

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie  
der Technischen Universität München,  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. M. Molls)

**Vergleich strahleninduzierter Änderungen in L929-Zellen  
auf Protein- und Genexpressionsebene**

Susanne Ulrike Götz

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Molls
2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 11.04.2005 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.10.2005  
angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 STAND DES WISSENS</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Translation</b>	<b>3</b>
2.1.1 Initiation	3
2.1.2 Elongation	5
2.1.3 Termination	6
2.1.4 Regulation der Translation	7
<b>2.2 RTQ-PCR – Verfahren</b>	<b>8</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Reagenzien und ihre Bezugsquellen</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Geräte und Labormaterialien</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Verwendete Puffer</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Ausgangsmaterial/-methoden</b>	<b>13</b>
<b>3.5 cDNA-Synthese</b>	<b>14</b>
3.5.1 Synthese	14
3.5.2 Kontrolle der cDNA-Synthese und Erstellen der Verdünnungsreihe	16
<b>3.6 Primer-Sonden-Design (PSD)</b>	<b>18</b>

---

<b>3.7</b>	<b>Kontrolle des PSD</b>	<b>20</b>
3.7.1	Schmelzkurve des Amplikons	20
3.7.2	Größe des Amplikons	21
3.7.3	Amplifikationsnachweis des PSD	22
<b>3.8</b>	<b>Quantitative Bestimmung der zu untersuchenden Gene</b>	<b>22</b>
<b>3.9</b>	<b>Auswertung</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Primer Sonden Design</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Kontrolle des PSD</b>	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung der Genexpression am Beispiel des Gens Psmd14</b>	<b>33</b>
4.3.1	cDNA-Synthese	33
4.3.2	Verdünnungsreihe	33
4.3.3	Genexpression von Psmd14	35
<b>4.4</b>	<b>Vergleich der Proteinmenge und der korrespondierenden Genexpression</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Primer-Sonden-Design</b>	<b>41</b>
<b>5.2</b>	<b>Proteinquantifizierung über 2D Elektrophorese</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>Charakteristika der untersuchten Proteine</b>	<b>42</b>
<b>5.4</b>	<b>Vergleich Proteine-Genexpression</b>	<b>46</b>
5.4.1	Posttranskriptionelle Modifikationen der mRNA	46
5.4.2	Regulation der Translation	47
5.4.3	Proteindegradation	48
5.4.4	Strahlenspezifische Effekte	49
5.4.5	Modifikation der Untersuchungsmethode	49
<b>5.5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>50</b>

---

<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>54</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>63</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>64</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

2D	zweidimensional
A	Adenin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BP	Bindeprotein
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
cDNA	copy DNA
C <sub>T</sub>	Zyklusnummer
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dest.	destillata
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEF	eukaryoter Elongationsfaktor
eIF	eukaryoter Initiationsfaktor
ER	endoplasmatisches Retikulum
eRF	eukaryoter Release Faktor
fg	Femtogramm
F-Primer	Vorwärtsprimer (forward primer)
γ-Strahlen	Gammastrahlen
G	Guanin
GCN2	general control nonderepressible 2
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanin nucleotide exchange factor

---

GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HRI	heme regulated inhibitor
IEF	isoelektrische Fokussierung
KCl	Kaliumchlorid
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kV	Kilovolt
mA	Milliampere
MEM	minimal essential medium
MET	Methionin
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
NTC	No Template Control
OD	Optical Density
PCR	Polymerase-chain-reaction
pg	Pikogramm
PKR	RNA-abhängige Proteinkinase
PSD	Primer-Sonden-Design
RNA	Ribonucleinsäure
R-Primer	Rückwärts-Primer (reverse primer)
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Real-Time-PCR
RTQ-PCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde(n)
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur

tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt

Symbole:

#	Anzahl
---	--------

## 1 Einleitung

Die Geschichte der Strahlentherapie beginnt mit der Entdeckung sogenannter „X-Strahlen“ durch Wilhelm Konrad Röntgen im Jahr 1895. Sehr schnell nach der Entdeckung der „neuen Art von Strahlen“ wurde ihr therapeutisches Potential erkannt und zunächst zur Behandlung gutartiger Erkrankungen der Haut eingesetzt (Gademann 1996, S. 6).

Neben einer Besserung der behandelten Krankheiten zeigten sich aber auch Veränderungen des umgebenden gesunden Gewebes. So wurden im März 1896 bereits lokale Nebenwirkungen wie umschriebener Haarausfall und Dermatitis bekannt. In besonders erheblichem Umfang konnte man die Schädlichkeit von Strahlen unter anderem an den Opfern des Atombombenabwurfs von Hiroshima beobachten.

Ein Anliegen in der radiobiologischen Forschung ist es biologische Parameter zu eruieren, die eine frühe Detektion von strahleninduzierten Zellschäden und eine Abschätzung der individuellen Strahlenempfindlichkeit erlauben. Damit wäre es möglich die Therapie zu optimieren, potentielle Schäden gering zu halten und das Ausmaß der Schädigung nach einem Strahlenunfall abschätzen zu können.

Bis vor wenigen Jahren glaubte man, dass Strahlen in der Zelle ausschließlich die DNA schädigen. In den letzten Jahren jedoch hat sich abgezeichnet, dass Strahlen mit einer Zelle auf viele verschiedene Arten interagieren können (Bodis 1998, S. 6). So können ionisierende Strahlen in einer Zelle die verschiedensten Kompartimente schädigen. Der Schaden wird in der Zelle erkannt und führt zu einem Proliferationsstopp. Je nach Art und Ausmaß der Schädigung können die Schäden repariert und die Zelle in ihrem früheren Funktionszustand wiederhergestellt werden oder es kommt zum Zelltod.

Es konnte gezeigt werden, dass die Art des Zelltodes, wie Mikronukleusbildung, Apoptose oder Bildung abnormaler Zellen (z.B. nekrotische Zellen) – unabhängig von der verwendeten Zellart - mit dem strahleninduzierten Zellschaden korrelieren (Abend 2000, S. 249). Morphologische Veränderungen, die mit dem Zelluntergang einhergehen, können jedoch erst sehr spät beobachtet werden und daher nicht als Frühindikatoren eines Strahlenschadens herangezogen werden. Die Verfügbarkeit eines Markers, der die Schädigung frühzeitig und einfach nachweisbar aufzeigt, wäre deshalb für die Beurteilung von Strahlenunfällen von besonderer Bedeutung.



Es gibt Hinweise darauf, dass nicht nur die Apoptose, sondern auch andere Arten des Zelltodes, wie Mikronukleusbildung und auch Nekrose einen von der Zelle aktiv kontrollierten Prozess von Zellzerstörung darstellen. Daher liegt der Schluss nahe, dass sich diese Prozesse auf Ebene der Genexpression abbilden. Als besonders geeignetes Material zur Untersuchung verschiedener Arten des Zelltodes hat sich die Mäusezelllinie (Fibroblasten) L929 herausgestellt. Durch Gabe spezifischer Agenzien kann an ihnen der Zelltod entweder in Richtung Apoptose oder in Richtung Mikronukleusbildung induziert und auf Genexpressions- bzw. Proteinebene untersucht werden.

So konnten in einem dieser Arbeit vorausgehenden Versuch an L929-Zellen Proteine bestimmt werden, die nach Bestrahlung verändert waren. Ihre Menge wurde mittels 2D Elektrophorese und Massenspektrometrie erfasst (Szkanderova 2003, S. 17)

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Veränderungen der Proteinmenge mit Veränderungen in der Expression bestimmter Gene nach Bestrahlung zu vergleichen.

Die Gene der im vorangehenden Versuch detektierten Proteine werden in dieser Arbeit quantitativ mittels „Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction“ (RTQ-PCR) untersucht. Dabei interessiert insbesondere die Frage, ob sich die Veränderung der Proteinmenge ebenso auf mRNA-Ebene widerspiegelt und diese somit potentielle Indikatoren für einen Zellschaden darstellen.

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Translation

**Translation** ist die Übersetzung der durch die Transkription in die mRNA umgeschriebenen genetischen Information der DNA in die Aminosäuresequenz der Proteine (Pschyrembel, 1994, S. 1556).

Dieser Vorgang lässt sich in 3 Phasen unterteilen:

#### 1. Initiation

In dieser Phase wird aus den Untereinheiten ein funktionelles Ribosom zusammengesetzt, das den Initiationskomplex bildet.

#### 2. Elongation

Hierbei erfolgt ausgehend vom Initiationskomplex die Verlängerung der Peptidkette.

#### 3. Termination

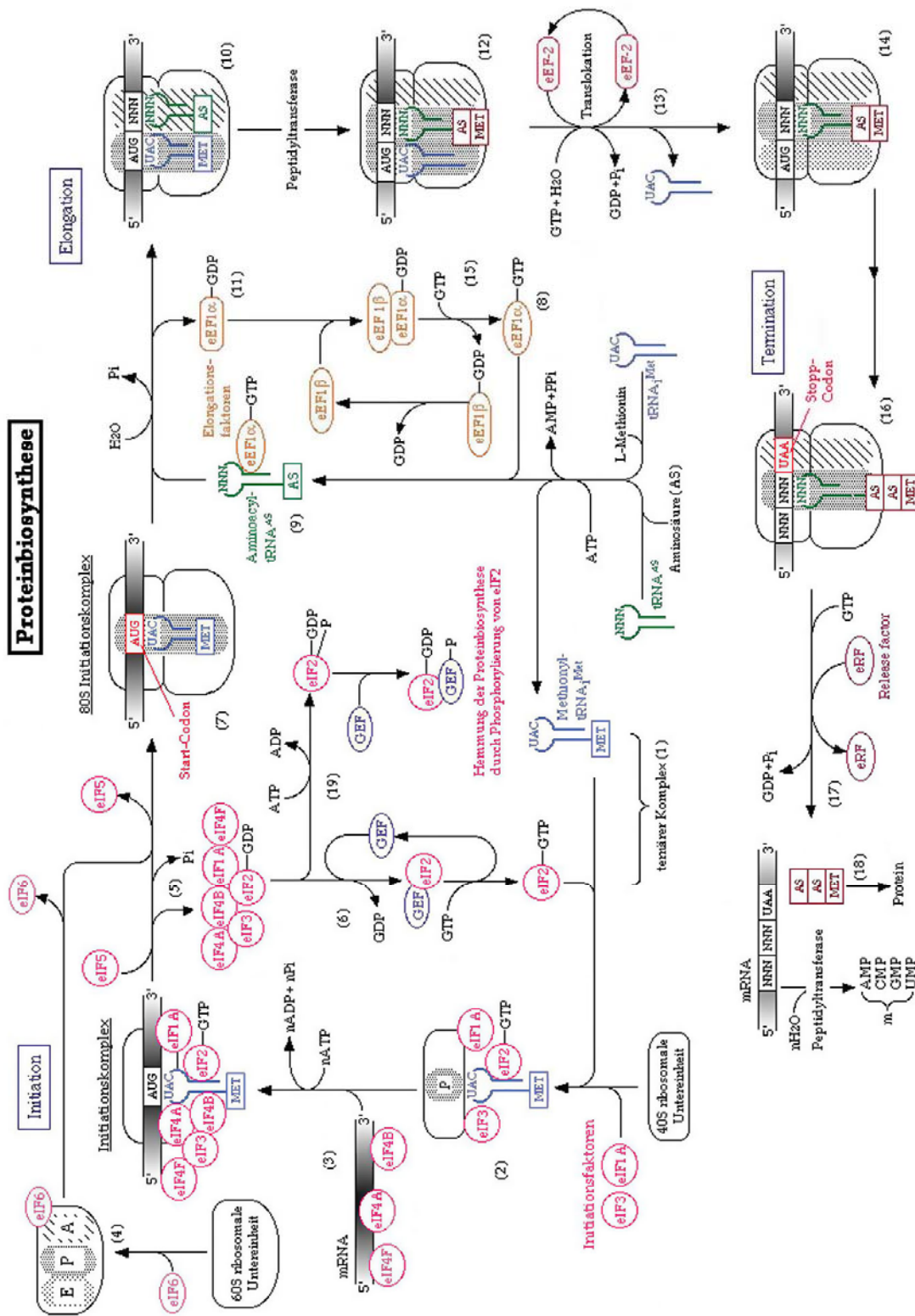
Freisetzung der Peptidkette aus dem Ribosom und Zerfall des Ribosoms in seine Untereinheiten.

Die im Folgenden beschriebene Darstellung der Translationsvorgänge beruht auf dem in „Molekularbiologie der Gene“ von Benjamin Lewin (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998, S. 125-228) und in „Molekulare Genetik“ von Rolf Knippers (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001, 8. neu bearbeitete Auflage, S. 421-440) veröffentlichten derzeitigen Wissen zu diesem Thema.

#### 2.1.1 Initiation

In dieser Phase entsteht aus den ribosomalen Untereinheiten, der mRNA, der Starter-Aminoacyl-tRNA und einer Reihe Initiationsfaktoren der Initiationskomplex, der den Ausgangspunkt der Proteinbiosynthese darstellt (Pestova 2001, S. 7029).

Zunächst bindet die Starter-Aminoacyl-tRNA an den eukaryoten Initiationsfaktor 2 (eIF-2), einem G-Protein. Durch die Bindung von GTP an eIF2 entsteht zusammen mit der Amino-



**Abbildung 1:** Darstellung der einzelnen Schritte der Proteinbiosynthese nach KEGG 1998. Die Translation lässt sich in drei Phasen unterteilen: Zunächst wird während der *Initiation* der Initiationskomplex (7) gebildet. In der *Elongationsphase* (10 - 14) wird ausgehend davon die Peptidkette verlängert bis ein Stopp-Codon (16) erreicht und die Peptidkette freigesetzt (18) wird (*Termination*).

acyl-tRNA (mit Methionin beladen) ein stabiler „ternärer Komplex“ (Sonenberg und Dever 2003, S. 57) (Abb. 1 (1)), der mit der P-Bindungsstelle der freien 40S Untereinheit assoziiert (Abb. 1 (2)). An diese sind die Initiationsfaktoren 1A und 3 gebunden, die eine vorzeitige Anlagerung der 60S Untereinheit verhindern. Dieser Komplex lagert sich im Folgenden an den Kappenbindungskomplex (eIF4F) am 5'-Ende der RNA an, der aus drei weiteren Initiationsfaktoren besteht: dem Kappen-Bindeprotein eIF4E, einem Koordinationsprotein eIF4G und einer RNA-Helikase eIF4A, die Sekundärstrukturen der RNA unter Spaltung von ATP auflöst. eIF4A bindet auch unabhängig von eIF4F an die RNA. Seine Aktivität wird durch eIF4B gefördert. (Abb. 1 (3))

Nun tastet die kleine Untereinheit mit Hilfe von eIF2 die RNA ab, bis sie das Startcodon AUG gefunden hat. eIF4A und eIF4B entwinden dabei auftretende Sekundärstrukturen. Nachdem die Starter-tRNA mit ihrem Anticodon an das AUG-Codon auf der mRNA gebunden hat, lagert sich die (große) 60S-Untereinheit des Ribosoms an (Abb. 1 (4)). Dabei kommt es unter Beteiligung von eIF-5, einer GTPase, zur Spaltung von GTP zu GDP und damit zur Abdissoziation von eIF2 und eIF3. Das an die 60S-Untereinheit gebundene Protein eIF6, das ähnlich eIF3 eine vorzeitige Anlagerung der Untereinheiten verhindert, dissoziiert wie auch die übrigen Initiationsfaktoren bei Bildung der 80S-Untereinheit ab. (Abb. 1 (5))

Der für das Auffinden des Initiations-Codons verantwortliche Faktor eIF-2 wird nach seiner Abspaltung mit Hilfe von GEF (guanin nucleotide exchange factor = eIF-2B) wieder mit GTP beladen. Damit steht er einem neuen Initiationszyklus zur Verfügung. (Abb. 1 (6))

Dieser Schritt bestimmt in der Regel die Geschwindigkeit, mit der eine RNA translatiert wird.

### 2.1.2 Elongation

Ausgangspunkt der Elongation ist ein intaktes Ribosom, das an der Peptidyl-Stelle (P) eine Starter-tRNA gebunden hat (Abb. 1 (7)). Im folgenden wird nun eine weitere Aminoacyl-tRNA mit komplementärem Codon an die freie Aminoacylstelle (A) des Ribosoms gebunden. Für diesen Schritt wird zunächst ein Komplex aus dem eukaryoten Elongationsfaktor  $1\alpha$  (eEF- $1\alpha$ ) und GTP benötigt (Abb. 1 (8)). Durch dessen Bindung mit Aminoacyl-tRNA entsteht, ähnlich zur Initiation ein ternärer Komplex (Abb. 1 (9)). Dieser assoziiert an die freie Aminoacylstelle des Ribosoms (Abb. 1 (10)). Die Codon-Anticodon-Erkennung führt zur GTP-Spaltung und Freisetzung des eEF- $1\alpha$ -GDP-Komplexes (Abb. 1 (11)). Diese Freiset-

zung des Komplexes ist Voraussetzung für die Peptidbindung zwischen der Aminosäure an der Peptidylbindungsstelle und der Aminosäure an der Aminoacyl-Stelle.

Im nächsten Schritt muss zwischen den an die tRNA gebundenen Aminosäuren eine Peptidbindung geknüpft werden. Dabei greift die freie Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA die Esterbindung zwischen Starter-Aminoacyl-tRNA und der Aminosäure (Methionin) an. Dieser Schritt wird durch die Peptidyltransferase, einem Enzym der 60S-Untereinheit, katalysiert. Das so gebildete Peptid ist nun an die t-RNA der Aminoacylstelle gebunden und die tRNA an der Peptidylstelle frei (Abb. 1 (12)).

Zur Vollendung des Elongationsschrittes muss zuletzt die Aminoacyl-Stelle für das nächste tRNA-Molekül freigemacht werden. Dieser Schritt wird auch als Translokation bezeichnet und ist, wie viele andere Schritte in der Proteinsynthese von einem weiteren G-Protein, nämlich dem eukaryoten Elongationsfaktor 2 (eEF-2) abhängig. Der eEF-2-GTP-Komplex bindet an das Ribosom, GTP wird hydrolysiert (Abb. 1 (13)) und es kommt zur Translokation (Abb. 1 (14)) des an die tRNA gebundenen Peptids an die Peptidylstelle des Ribosoms. Die freie tRNA der Peptidyl-Stelle wird in das Zytosol entlassen und auch der Elongationsfaktor 2 löst sich vom Ribosom.

Ähnlich eIF-2 ist auch der eukaryote Elongationsfaktor  $1\alpha$  (eEF- $1\alpha$ ) nur in Anwesenheit von GTP aktiv und wird wie der Initiationsfaktor nach jedem Reaktionszyklus durch Austausch des GDP gegen GTP reaktiviert (Abb. 1 (15)). Für diesen Schritt ist analog zu eIF-2B bei der Elongation eEF- $1\beta$  zuständig.

### 2.1.3 Termination

Die Schritte der Elongation werden solange wiederholt, bis eines (von drei) Stoppcodons (UAG, UAA, UGA) auf der Aminoacyl-Stelle des Ribosoms zu liegen kommt (Abb. 1 (16)). Hier kommt es unter Einwirkung des eukaryoten Release Faktors (eRF) (Abb. 1 (17)) zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese. Dieser bindet mit GTP an das Ribosom. Das führt dazu, dass die Peptidyltransferase die Peptidkette an der Peptidyl-Stelle auf Wasser überträgt und somit freigesetzt wird (Abb. 1 (18)). Die unbeladene tRNA auf der Peptidyl-Stelle wird unter Spaltung des an eRF gebundenen GTPs ebenfalls frei. Abschließend zerfällt das Ribosom in seine Untereinheiten und steht damit einem neuen Syntheseyklus zur Verfügung.

### 2.1.4 Regulation der Translation

Prinzipiell ist eine Regulation an jedem Schritt der Translation denkbar. So ist bekannt, dass die Effizienz der Translation unter anderem von der Sequenzumgebung des Start-Codons AUG abhängt. Kozak (1987, S. 8125) identifizierte folgende Konsensussequenz beim Vergleich zahlreicher mRNAs: CC<sup>A</sup><sub>G</sub>CCAUGG. Er zeigte, dass eine Abweichung der Nukleotide <sup>A</sup><sub>G</sub> bzw. G die Effizienz der Translation verringern. Sekundärschleifen in der Nähe des 5'-Endes beeinflussen die Translation in gleicher Weise.

Abgesehen von Alterationen im Bereich des Start-Codons wird die Translation auch auf Ebene der Translationsfaktoren reguliert. Besonders betroffen sind hierbei eIF4E und eIF2.

eIF4E bindet an das 5'-Ende der RNA und bildet zusammen mit eIF4A und eIF4G den Kappenkomplex eIF4F (siehe Abb. 1 (3)). Eine Phosphorylierung aktiviert ihn, eine Dephosphorylierung hemmt ihn. Diese Regulation spielt jedoch eine eher untergeordnete Rolle. Physiologisch bedeutender ist vermutlich (Knippers 2001, S. 436) die Regulation durch eIF4E-Bindeproteine (eIF4E-BP). Diese kleinen Proteine sind an eIF4E gebunden und blockieren die Translation durch Hemmung der Wechselwirkung von eIF4E mit eIF4G. Äußere Signale, wie Wachstumsfaktoren, Cytokine u.a. führen zu einer Übertragung von Phosphatgruppen auf 4E-BP. Dadurch wird eIF4E frei und steht zur Initiation der Translation zur Verfügung.

Der Initiationsfaktor 2 ist, wie bereits unter 2.1.1 erwähnt, für das Auffinden des Start-Codons verantwortlich. Phosphoryliertes eIF2 reagiert mit GEF. Dieser Faktor hält phosphoryliertes eIF2 in so stabiler Form gebunden, dass eine Aufnahme von GTP nicht möglich ist (Abb.1 (19)). Die Menge an GEF in der Zelle nimmt ab, eIF2-GDP kann nicht regeneriert werden und damit kommt es zu einem Stillstand der Proteinsynthese. Folgende Protein-Kinasen katalysieren eine Phosphorylierung von eIF2:

- HRI-Kinase (heme regulated inhibitor)

Dieses Protein unterdrückt bei Häm-Mangel die Translation der Globin-mRNA und kommt vor allem in erythroiden Zellen vor. Geringe Mengen in anderen Zellen haben vermutlich eine Funktion bei der Hemmung der Proteinsynthese im Zuge einer Hitze-Schock-Reaktion.

- RNA-abhängige Protein-Kinase (PKR)

Die Aktivierung dieser Kinase erfolgt durch Bindung an einen RNA-Doppelstrang, wie er in einigen Viren zu finden ist. Dies führt zu einer Autophosphorylierung und anschließenden Konformationsänderung des Enzyms. Eine Hemmung der Proteinsynthese über

Aktivierung von PKR kommt im Verlauf der Abwehr einer Zelle gegen Virusinfektionen zum Tragen. Dies führt einerseits zum Tod der infizierten Zelle, andererseits zur Eingrenzung des Infektionsherdes.

- Protein-Kinase GCN2 (general control nonderepressible)  
Ein Mangel an Aminosäuren löst die Aktivierung dieses Enzyms aus. Man nimmt an, dass sich unbeladene tRNAs an das Enzym lagern und damit die Protein-Kinase-Funktion aktivieren.

## 2.2 RTQ-PCR – Verfahren

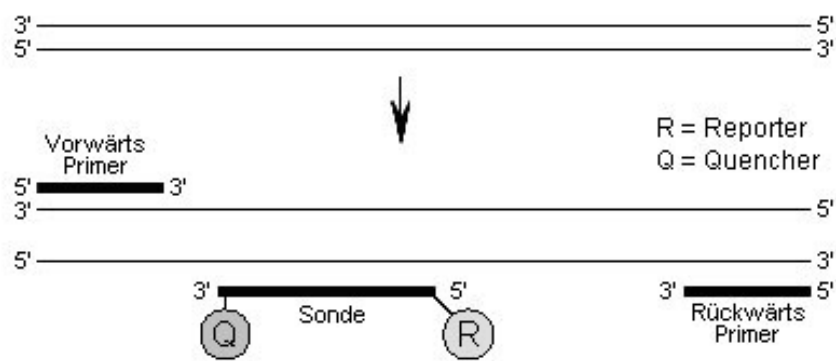
RTQ-PCR ist die Abkürzung für „Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction“. Mit diesem Verfahren lassen sich die Produkte der PCR, während diese abläuft, quantitativ bestimmen.

Während einer konventionellen PCR wird mit Hilfe einer DNA-abhängigen Polymerase und spezifischen Primern ein bestimmter DNA-Abschnitt amplifiziert. In einem Reaktionszyklus kommt es durch Änderungen der Temperatur zunächst zur Denaturierung der DNA und dann zu einer Anlagerung der Primer, die durch die Polymerase komplementär zur DNA verlängert werden. Durch Wiederholungen dieses Zyklus (meist  $n = 40$ ) ergibt sich im Idealfall eine  $2^n$ -fache Amplifikation des DNA-Moleküls.

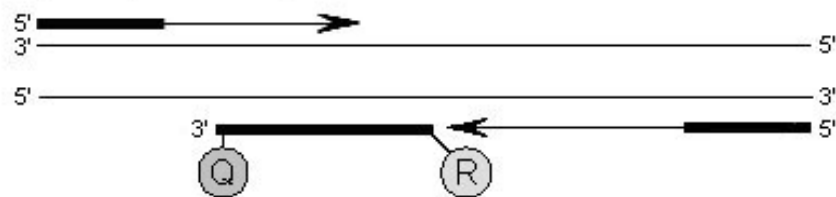
Handelt es sich beim Ausgangsmaterial um RNA, muss diese zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Grund dafür ist, dass die Polymerase DNA-abhängig ist. Die Umschreibung von Gesamt-RNA erfolgt in einer PCR-Reaktion mittels der reversen Transkriptase. Die dabei entstehende Menge cDNA entspricht idealerweise der ursprünglichen Menge an mRNA.

Soll eine Aussage darüber getroffen werden, wieviel Kopien an cDNA zu Beginn der Reaktion im Untersuchungsmaterial vorhanden war, ist zusätzlich eine Sonde und eine Verdünnungsreihe notwendig: Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff, auch „reporter“ genannt, verbunden. Das 3'-Ende der Sonde ist mit einem sogenannten „quencher“ versehen, der durch die Nähe zum „reporter“ dessen Fluoreszenz unterdrückt. Nach Denaturierung der cDNA bei 95°C können sich bei einer Temperatur von 60°C Primer und Sonde an die einzelsträngige cDNA anlagern und die Polymerase mit der Verlängerung des Strangs beginnen. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine chemisch modifizierte DNA Polymerase, die die Eigenschaften hat bei Raumtemperatur inaktiv zu sein. Dadurch können unerwünschte Amplifikationen (bei Raumtemperatur) vermieden werden. Durch eine vorher-

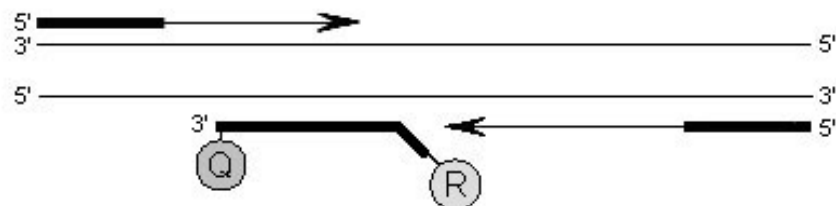
## Denaturierung und Anlagerung



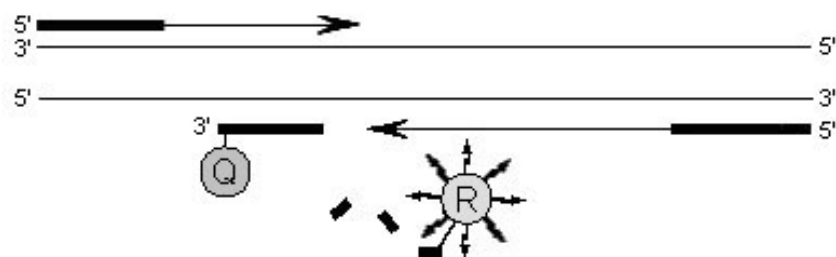
## Verlängerung des Stranges



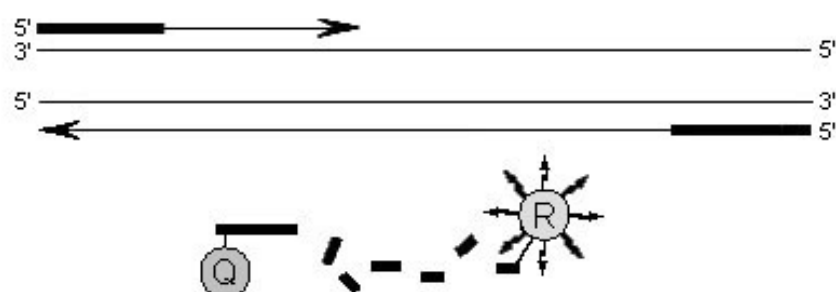
## Verlagerung der Sonde



## Abbau der Sonde



## vollständige Polymerisation



**Abbildung 2:** Darstellung der einzelnen Schritte der PCR-Reaktion: Nach Denaturierung des DNA-Doppelstranges kommt es zu einer Anlagerung der Primer und Sonde. Ausgehend von den Primern wird der Strang verlängert, der im Verlauf zu einer Verlagerung der Sonde führt. Schließlich wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut und der Strang fertiggestellt.



ige 10-minütige Erhitzung auf 95°C wird sie aktiviert. Mit ihrer Exonukleaseaktivität setzt sie, während der Elongation, den „reporter“ am 5'-Ende der Sonde frei, der dadurch vom „quencher“ entfernt wird (siehe Abbildung 1). Die Fluoreszenz des „reporters“ wird nicht mehr unterdrückt und kann durch eine geeignete Detektionseinheit gemessen werden.

Graphisch wird die Veränderung in der Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Dadurch erhält man einen Amplifikationsplot. Durch das Festlegen eines Schwellenwertes ergibt sich am Schnittpunkt der Kurve mit diesem ein  $C_T$ -Wert (=Zyklusnummer). Dieser kann mit dem  $C_T$ -Wert der Verdünnungsreihe verglichen und somit einem RNA-Äquivalent zugeordnet werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Reagenzien und ihre Bezugsquellen

- EDTA- $\text{Na}_2$ , Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Ethidiumbromid, Fa. Merck, Darmstadt, D
- KCl, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Ladepuffer BBXG (10x Lösung aus Bromphenolblau, Xylen, Cyanol FF, Glycerol), Fa. Q-BIOgene, Heidelberg, D
- Längenstandard von 50 Basenpaaren, „50 Base-Pair Ladder“, Fa. Amersham Biosciences, Piscataway, USA
- MEM Medium, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Pre-Developed TaqMan Assay Reagents Human 18S rRNA (20x), Fa. Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, D
- Primer und Sonden, Fa. Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, D
- QA-Agarose hoch-auflösend, Fa. Q-BIOgene, Heidelberg, D
- RNase free DNase Set, Fa. Qiagen, Hilden, D
- RNeasy Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden, D
- SYBR Green PCR Core Reagents, Fa. Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, D
- TAE-Puffer 50x (Tris Acetat EDTA Puffer: 2.0M Tris Acetat, 0.05M EDTA), Fa. Q-BIOgene, Heidelberg, D
- TaqMan Reverse Transcription Reagents, Fa. Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, D
- TaqMan Universal PCR Master Mix, Fa. Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, D
- TE 50x (500mM Tris, 50mM EDTA· $\text{Na}_2$ , pH 7,5 mit HCl), Fa. USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA
- Tris, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Tween 20, Fa. Serva, Heidelberg, D
- Wasser, RNase-frei, DEPC behandelt ultrapur 500 ml, Fa. USB Corporation Cleveland, Ohio USA

### 3.2 Geräte und Labormaterialien

- 0,5 ml Reaktionsgefäße „Thermo-Tube“, Fa. ABgene, Epsom, UK
- 1,5 ml Reaktionsgefäße „Safe-Lock“, Fa. Eppendorf, Hamburg, D
- 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße „Eppendorf-Biopur“, Fa. Eppendorf, Hamburg, D
- Filtertips 0,5 - 10  $\mu$ l, 5 - 100  $\mu$ l und 50 - 1000  $\mu$ l „Eppendorf“, Fa. Eppendorf, Hamburg, D
- Gelelektrophoresekammer „Hybaid Midi Gel System“, Fa. Hybaid, Heidelberg, D
- GeneAmp 5700 Sequence Detection System, Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- Land Camera MP-4, Polaroid Corporation, Cambridge, Massachusetts, USA
- Mikrotiterplatte „96-Well Optical Reaction Plate“ ABIPRISM, Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- „Optical Adhesive Covers“ ABIPRISM, Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- Pipetten „Eppendorf Research pro“ 0,5 - 10  $\mu$ l, 5 - 100  $\mu$ l und 50 - 1000  $\mu$ l, Fa. Eppendorf, Hamburg, D
- Polaroid-Film „Polapan“, Fa. Polaroid Ltd., Wheathampstead, Herfordshire, UK
- Reagenzglasschüttler, Typ Reax 2000, Fa. Heidolph, Schwabach, D
- Röntgenröhre, Fa. Seifert, Ahrensburg, D
- Rotilabo-Mini-Zentrifuge, Fa. Roth, Karlsruhe, D
- TemplateTamer™ PCR Workstation, Fa. Q-BIOgene, Heidelberg, D
- Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf, Köln, D
- UV-Transilluminator: 2011 Macrovue Transilluminator, Fa. LKB Produkter AB, Bromma, S
- Zentrifuge Rotanta/RP Typ 4300, Fa. Hettich, Tuttlingen, D

### 3.3 Verwendete Puffer

#### *Puffer für isoelektrische Fokussierung:*

- 9 M Harnstoff
- 4 % CHAPS
- 70 mM Dithiothreitol (DTT)
- 2 % Trägerampholyte pH 9 - 11

***Verdünnungspuffer:***

- 50 mM/l KCl
- 0,01 mM/l EDTA
- 10 mM/l Tris/HCl, pH 8,3
- 0,0003 % Tween 20 (w/v)

***Sonden-Puffer:***

- 1 mM/l Tris-HCl, pH 8,0
- 0,01 mM/l EDTA

***Lysepuffer:***

- 137 mM NaCl
- 10 % Glycerin
- 1 % n-Octylglucopyanosid
- 50 mM NaF
- 20 mM Tris pH 8
- Complete TMMini
- 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$

**3.4 Ausgangsmaterial/-methoden**

Als Ausgangsmaterial für alle Untersuchungen dienten Maus-Fibroblasten der Linie L929 der Fa. Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland. Es wurden insgesamt 3 Versuchsansätze mit MEM, das mit 20 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum ergänzt wurde, kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einer 5 %  $\text{CO}_2$  Atmosphäre. Der pH betrug 7,4.

24 Stunden nach dem Ansatz, in einer Phase, in der sich die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden sie bei Raumtemperatur mit Einzeldosen von 240 kV Röntgenstrahlen (Röntgenröhre: Isovolt 320/10) bestrahlt. Gefiltert wurde die Strahlung von 3 mm Beryllium. Die Dosisleistung betrug ungefähr 1 Gy/min bei einem Röhrenstrom von 13 mA. Die L929 Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt.

Zur Proteinisolation wurden die L929 Zellen in 500 µl Lysepuffer 20 min, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung lysiert. Die extrahierten Proteine wurden über Nacht in 20 % TCA in Aceton, versetzt mit 0,2 % DTT ausgefällt und dann in einem Puffer für isoelektrische Fokussierung (IEF) gelöst. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (5 min 15 000 x g, 4°C) und die Proteinkonzentration im IEF Puffer mit einem modifizierten BCA Assay bestimmt.

Zu den gleichen Zeitpunkten wurde aus Aliquots von  $13 \times 10^6$  Zellen die Gesamt-RNA gemäß den Anweisungen des Herstellers mit dem RNeasy Mini Kit isoliert. Jede Säule wurde mit  $7 \times 10^6$  Zellen beladen. Darin noch enthaltene DNA wurde mit Hilfe des „RNase free DNase Set“ gemäß Herstellerangaben verdaut und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Um Qualität und Reinheit der Gesamt-RNA zu überprüfen wurde sie spektralphotometrisch untersucht. Anhand der Absorption bei 260 und 280 nm konnte der Proteinanteil – als Anhaltspunkt für die Reinheit – und der RNA-Anteil (zur Quantifizierung) bestimmt werden ( $\text{OD } 260/280 > 1,8$ ). Gelelektrophoretisch wurde anhand der 28S und 18S rRNA-Banden die Integrität der RNA überprüft. ( $28\text{S}/18\text{S rRNA} \sim 2$ ). Zum Ausschluss einer DNA-Kontamination wurde eine PCR-Reaktion mit  $\beta$ -Aktin Primern durchgeführt.

Nur solche Gesamt-RNA, die diesen Kriterien entsprach, diente im folgenden als Ausgangsmaterial für die Experimente dieser Doktorarbeit.

### **3.5 cDNA-Synthese**

#### **3.5.1 Synthese**

Für den Nachweis der zu den Proteinen korrespondierenden Gene musste zu Beginn die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurden für den ersten Schritt der 2-Schritt RT-PCR-Reaktion zusätzlich zu der Gesamt-RNA als Template, die Reverse Transkriptase als Enzym, „randomisierte“ Hexamere (Oligonukleotide mit zufälliger Nukleotidsequenz) als Primer, ein dNTP-Mix als Bausteine, Magnesium und Puffer als Kofaktoren für die Synthese benötigt. Durch eine 10-minütige Inkubation bei  $25^\circ\text{C}$  im Thermocycler kam es zur Anlagerung der „randomisierten“ Hexamere an das Template. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf  $48^\circ\text{C}$  stellte ideale Arbeitsbedingungen für die reverse Transkriptase dar, die nun eine Verlängerung der Primer komplementär zum RNA-Strang bewirkte. Bausteine

für die Verlängerung waren die Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, die in gleicher Konzentration im dNTP-Mix enthalten waren. Abschließend wurde durch eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 95°C für 5 min die reverse Transkriptase wieder inaktiviert. Im einzelnen wurde für die Synthese folgendermaßen vorgegangen:

1. In einem ersten Schritt wurde die Gesamt-RNA, um später ein gut pipettierbares Volumen zu bekommen, verdünnt (10 µl Gesamt-RNA + 90 µl Aqua dest.). Anschließend berechnete man das Volumen jeder Probe, das 1 µg Gesamt-RNA enthielt, da in diesem Versuch die mRNA von 1 µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben werden sollte. Grundlage zu dieser Berechnung war die OD-Messung.
2. Im nächsten Schritt wurde die Chemie für den Ablauf der Reaktion vorbereitet. Hierzu wurden die folgenden Reagenzien, jedoch ohne Gesamt-RNA und RNase-freiem Wasser zusammenpipettiert:

Reagenz	Vol/1Rkt (µl)
10x TaqMan RT Puffer	10
25 mM Mg	22
dNTP Mix	20
random Hexamers	5
RNase Inhibitor	2
RTase	2,5
Gesamt-RNA	x
RNase-freies Wasser	38,5 - x
Gesamt-Volumen	100

**Tabelle 1:** Reagenzien, die zur Umsetzung von 1µg Gesamt-RNA in cDNA notwendig waren.

Hiervon wurden anschließend jeweils 61,5 µl pro Gefäß in die Mikrotiterplatte gegeben.

3. Zu der RT-Chemie pipettierte man schließlich das errechnete Volumen RNA, das 1 µg entsprach und füllte das entstandene Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl auf.
4. Nach kurzem (1 min) Zentrifugieren der Mikrotiterplatte bei 1400 U/min, um Blasenfreiheit zu erlangen, wurde diese in den Thermocycler gegeben und die Reaktion gemäß folgendem Protokoll gestartet:

Schritt	Inkubation	RTase-Rkt.	RT-Inaktivierung
Zeit	10 min	30 min	5 min
Temperatur	25°C	48°C	95°C

**Tabelle 2:** Protokoll für den Thermocycler zur Umsetzung von 1 µg Gesamt-RNA in cDNA.

- Nach Beendigung der Reaktion wurde das entstandene Produkt auf eine Konzentration von 1 ng/µl eingestellt und bei -20°C gelagert.

### 3.5.2 Kontrolle der cDNA-Synthese und Erstellen der Verdünnungsreihe

Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde der zweite Schritt der 2-Schritt RT-PCR-Reaktion zur Detektion von 18S rRNA mit Hilfe kommerziell erhältlicher Primer und Sonden durchgeführt.

Hierzu wurde aus folgenden Reagenzien ein Gesamtansatz hergestellt:

Reagenz	Initiale Konzentration	Endkonzentration	Volumen/ 1 Reaktion (µl)	3 Reaktionen (µl)
MasterMix	2x	1x	15	45
18SrRNA	20x	1x	1,5	4,5
Wasser			3,5	10,5
cDNA		10 ng/10 µl	10	30
Gesamtvol.			30	90

**Tabelle 3:** Reagenzien, die zur Kontrolle der cDNA-Synthese benötigt wurden. Pro Probe wurde ein Ansatz für 3 Reaktionen pipettiert. Prinzipiell wurde jeder Nachweis im Doppelansatz durchgeführt. Zur Verwendung des Dispensiermodus der elektronischen Pipetten war darüber hinaus ein zusätzlicher Reaktionsansatz als Pipettierüberschuss notwendig.

Da vorangegangene Experimente gezeigt hatten, dass es bei Verwendung von 10 ng cDNA pro Reaktionsansatz durch Signale in den ersten Zyklen zu Fehlern in der Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz für 18S rRNA gekommen war, wurde die cDNA um den Faktor 100 verdünnt: 990 µl Verdünnungspuffer + 10 µl cDNA (10 ng/10 µl). Die cDNA-Proben wurden hierfür bei 95°C für  $\geq 2$  min inkubiert, anschließend für ca. 30 sek. kräftig aufgeschüttelt und kurz anzentrifugiert. In gleicher Weise wurden die cDNA-Proben für den 18S rRNA-Nachweis in den folgenden Experimenten vorbereitet.

Nach diesem Schritt wurden jeweils 60 µl Gesamtansatz und 30 µl der verdünnten cDNA gemischt und hiervon abschließend jeweils 2x 30 µl auf die Mikrotiterplatte gegeben.

Um darzustellen, über welchen Bereich der 40 PCR-Zyklen eine Linearität zum erzeugten Amplikon besteht, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde die cDNA in einer Verdünnungsreihe jeweils um den Faktor 2 verdünnt. Die Konzentration der cDNA der Verdünnungsreihe betrug 0,5 ng, 0,0625 ng, 7,8125 pg, 0,9765 pg, 0,122 pg, 15,2 fg bzw. 1,9 fg pro 10 µl. An diesen Proben wurde wie oben beschrieben ein Nachweis der 18S rRNA durchgeführt, so dass ein linear-dynamischer Bereich von sechs logarithmischen Dekaden resultierte.

Zuletzt wurde zum Nachweis von Kontaminationen ein Doppelansatz aus Gesamtreaktionslösung und RNase-freiem Wasser (statt der cDNA) auf die Mikrotiterplatte gegeben. Diese Lösung diente als „No Template Control“ (NTC).

Nach Beschicken der Mikrotiterplatte wurde diese für ca. 1 min bei 1400 U/min zentrifugiert, um Blasen aus den Vertiefungen der Platte zu lösen. Abschließend wurde sie in den Thermocycler gegeben und das Protokoll gemäß Tabelle 1 gestartet.

Stufe	1	2	3	
Wiederholungen:	1	1	40	
	UNG Inkubation	Enzymaktivierung	Denaturierung	Anlagerung/ Verlängerung
Temperatur	50°C	95°C	95°C	60°C
Zeit (min)	2	10	1	1

**Tabelle 4:** Protokoll des Thermocyclers für die RTQ-PCR mit Darstellung der Temperatur, der Zeit, die diese Temperatur beibehalten wird und der Anzahl der Wiederholungen für die einzelnen Schritte.

In **Stufe 1** erfolgt für 2 min bei 50°C die Inkubation mit Aktivität der UNG AmpErase. Diese verhindert die Amplifikation verschleppter PCR-Produkte.

In **Stufe 2** wird durch Erhöhung der Temperatur auf 95°C für 10 min die AmpliTaq Gold Polymerase aktiviert.

**Stufe 3** beinhaltet 2 Temperaturschritte, die 40-mal wiederholt werden. Im ersten Schritt wird bei 95°C die cDNA für 1 min denaturiert. Im zweiten Schritt wird der Thermocycler für 1 min auf 60°C eingestellt. Dabei kommt es zur Anlagerung von Primern und Sonde und zur Verlängerung durch die Polymerase.

Das Ergebnis dieser PCR diente im Folgenden auch zur Normalisierung.



### 3.6 Primer-Sonden-Design (PSD)

Ausgehend von den bereits im Vorversuch definierten strahleninduzierten Proteinen wurde zum spezifischen Nachweis der die Proteine kodierenden Gene ein PSD durchgeführt.

Um für die zu untersuchenden Gene das passende Primer-Sonden-Paar zu finden, wurde zunächst auf der Internet-Seite von NCBI nach der Locus ID der Gene für die strahleninduzierten Proteine gemäß Tabelle 5 gesucht.

<b>Protein</b>	<b>Swiss-Code</b>	<b>Gen</b>	<b>Locus ID</b>
<b>14-3-3 protein zeta/delta</b>	P35215	<b>KCIP-1</b>	D17615.1
<b>2700049I22RIK protein</b>	Q9CQ99	<b>Rplp2</b>	AK012402.1
<b>2610008O03RIK protein</b>	Q9CV92	<b>OXCT</b>	AK009027.1
<b>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2</b>	P24547	<b>Impdh2</b>	M33934.1
<b>Vascular endothelial growth factor D</b>	P97946	<b>Figf</b>	X99572.1
<b>Initiation factor 5 A</b>	P10159	<b>EIF5A</b>	M23419.1
<b>Ras related protein RAB-1A</b>	P11476	<b>RAB1</b>	M28209.1
<b>Mitogen-activated protein kinase 9</b>	Q9WTU6	<b>MAPK9</b>	AF052469.1
<b>T-complex protein 1, epsilon subunit</b>	P80316	<b>CCT5</b>	Z31555.1
<b>Protein disulfide isomerase A6 precursor</b>	Q63081	<b>CaBP1</b>	X79328.1
<b>26 S Proteasome regulatory subunit S12</b>	P26516	<b>Psmc7</b>	M64641.1
<b>26 S Proteasome, non-ATPase subunit</b>	O35593	<b>Psmc14</b>	Y13071.1
<b>Pyruvate kinase, M2 isozyme</b>	P52480	<b>Pk3</b>	D38379.1

**Tabelle 5:** Auflistung strahleninduzierter Proteine und der entsprechenden Gene mit Locus ID

Anhand der sich hieraus ergebenden genomischen Sequenz wurden zwei aufeinander folgende Exone ausgewählt und mit der Primer Express 2.0 Software bearbeitet. Das so ermittelte Primer und Sonden-Design war „Intron-überspannend“, um Amplifikationen von genomischen Sequenzen zu vermeiden. Damit die RTQ-PCR spezifisch und quantitativ ablaufen konnte, mussten beim Design folgende Regeln beachtet werden:

- a) Die Größe des **Amplikons** sollte zwischen 50 und 150 bp liegen.
- b) Regeln für das **Sonden-Design**
- Der Anteil an Guanin (G) und Cytosin (C) sollte 30 - 80 % betragen.
  - Wiederholungen gleicher Sequenzen sollten vermieden werden. Dies galt im Besonderen für Guanin, bei dem Wiederholungen von mehr als 4 Gs umgangen werden sollten.
  - Gs durften nicht am 5'-Ende stehen.
  - Ausgewählt wurde die Sonde, die den höheren Anteil an Cs aufwies.
  - Die Schmelztemperatur  $T_m$  sollte 68 - 70°C betragen.
- c) Regeln für das **Primer-Design**
- Die Primer-Sequenz wurde nach der Sonden-Sequenz ausgewählt.
  - Die Primer sollten möglichst dicht an der Sonde liegen, jedoch keine Überschneidungen mit dieser aufweisen.
  - Der Anteil an G und C sollte zwischen 30 und 80 % liegen.
  - Wiederholungen gleicher Sequenzen sollten vermieden werden. Dies galt im Besonderen für Guanin, bei dem Wiederholungen von mehr als 4 Gs umgangen werden sollten.
  - Die Schmelztemperatur  $T_m$  sollte 58 – 60°C betragen.
  - Die 5 Nukleotide am 3'-Ende sollten nicht mehr als 2 G und/oder C aufweisen.

Abschließend wurde überprüft, ob eine der ausgewählten Primer- und Sonden-Sequenzen an anderen Stellen des Mäusegenoms – außer den interessierenden – Hybridisierungspartner aufwies.

Die kommerziell erhältlichen Primer wurden, um Verunreinigungen bei dem Öffnen und Verschließen zu vermeiden, in 6 - 8 Gefäße (ultrapur) aliquotiert. Die lyophilisierten Sonden wurden gemäß den Herstelleranweisungen in dem Sondenpuffer aufgelöst, auf 200 nM eingestellt und ebenfalls aliquotiert. Gelagert wurden diese Reagenzien bei -20°C.

### 3.7 Kontrolle des PSD

#### 3.7.1 Schmelzkurve des Amplikons

Das Amplikon, das sich aus dem PSD ergab, wies gemäß seiner Länge eine spezifische Schmelztemperatur ( $T_m$ ) auf. Zum Nachweis dieser wurde eine PCR mit dem fluoreszierenden Farbstoff SYBR-Green I durchgeführt. Dieser lagerte sich an der doppelsträngigen DNA an. Wurde bei der Erhöhung der Temperatur die spezifische Schmelztemperatur des Amplikons erreicht, denaturierte die DNA. Dadurch wurde der Farbstoff frei und es kam zu einem Abfall der Fluoreszenz. Dieser wurde von der Software graphisch als Peak dargestellt. Auf diese Art und Weise konnten auch andere Produkte (unerwünschte Amplikons) erkannt werden.

Bei diesem Versuch wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Zuerst wurde die SYBR-Green-Chemie aus folgenden Reagenzien, abgesehen von der cDNA und der AmpliTaqGold, zusammenpipettiert:

Reagenz	Init. Konz.	Endkonz.	Vol/1Rkt ( $\mu$ l)	3x Rkt ( $\mu$ l)
10x SYBR PCR Puffer	10x	1x	5	15
25 mM MgCl	20x	1x	6	18
dNTP	2,5-5 mM		4	12
Wasser			17,15	51,45
Vorwärts-Primer		300 nM	3,8	11,4
Rückwärts-Primer		300 nM	3,8	11,4
cDNA	10 ng/10 $\mu$ l		10	30
AmpliTaQGold	5U/ $\mu$ l		0,25	0,75
Gesamtvolumen			50	150

**Tabelle 6:** Reagenzien, die zur Ermittlung der Schmelztemperatur als Kontrolle des PSD-Designs benötigt wurden.

2. Danach wurde jedem Gefäß 0,75  $\mu$ l AmpliTaqGold zugegeben und sofort auf Eis gestellt.

3. Abschließend wurde dieser Mixtur die cDNA zugegeben.  
Für die „No-Template-Control“ wurde ein Reaktionsansatz mit den Primern zur Detektion der 18S rRNA, jedoch ohne Template pipettiert. Das Volumen wurde hierbei mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt.
4. Mit den Proben wurde, wie schon unter 3.5.1. und 3.5.2. beschrieben vorgegangen. D.h. es wurden jeweils 2x 50 µl des Reaktionsgemisches in die Mikrotiterplatte gegeben, diese dann bei 1400 U/min für ca. 1 min zentrifugiert und in den Thermocycler gegeben. Dabei wurde das Protokoll gemäß Tabelle 4 gestartet.  
Außerdem mussten die Voreinstellungen dahingehend geändert werden, dass nun 50 µl untersucht werden mussten und das „Dissociation Protocol“ für die Ermittlung der Schmelzkurve ausgeführt werden sollte.
5. Nach Ablauf der Reaktion wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgenommen und für weitere Untersuchungen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### 3.7.2 Größe des Amplikons

Ebenfalls charakteristisch für ein Amplikon, das im Rahmen einer PCR entsteht, ist neben dem Schmelzpunkt die Amplikonlänge. Diese lässt sich mit Hilfe einer Gelelektrophorese ermitteln. Zudem kann man neben dem spezifischen Amplikon auch unspezifische – nicht dem PSD entsprechende amplifizierte Regionen - darstellen, die sich im Gel als zusätzliche Banden darstellen würden.

Untersuchungsmaterial war das SYBR-Green markierte Amplikon. 27 µl hiervon wurden mit 3 µl des Ladepuffers BBXG versetzt, aufgeschüttelt und zentrifugiert. Zusätzlich wurden noch 2 µl des Längenstandards von 50 Basenpaaren, 25 µl TE-Puffer und 3µl Ladepuffer miteinander vermischt. Anhand dieses Gemisches konnte später die Länge des Amplikons bestimmt werden. Für das Gel wurden 3 g QA-Agarose High Resolution zu 100 ml TAE-Puffer (1x) gegeben. Diese Mischung kochte man mehrmals in der Mikrowelle auf, bis die Flüssigkeit klar war und keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Nachdem die so erhitzte Mixtur ca. 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 4 µl Ethidiumbromid dazugegeben, das Ganze leicht geschwenkt und, nachdem es nochmals kurz bei Raumtemperatur abgekühlt worden war, in die Gelkammer gegossen. Anschließend wurde die Gelkammer mit dem abgekühlten Gel mit ca. 800 ml TAE-Puffer (1x) aufgefüllt und die Slots mit dem Probenmaterial

bzw. dem Längenstandard beschickt. Abschließend wurde an das Gel eine Spannung von konstant 100 V für ca. 1,5 h angelegt.

Nach Ablauf der Zeit wurde das Gel unter einer UV-Lampe abgelichtet und das Photo eingescannt. Mit Hilfe dieses Datenfiles und der Sigma-Gel Software konnte anhand des Längenstandards die Länge des jeweiligen Amplikons errechnet werden.

### **3.7.3 Amplifikationsnachweis des PSD**

In einem weiteren Kontrollversuch wurde eine RTQ-PCR durchgeführt und nachgewiesen, ob eine Amplifikation stattfand. Hierzu wurde für jedes Primer-Sonden-Paar ein Gefäß (ultrapur) mit 45 µl MasterMix vorbereitet, in welches jeweils 300 nM Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer und 200 nM Sonde hineinpipettiert wurden. Abschließend wurden dieser Mixtur 30 µl cDNA zugegeben. Für die NTC wurden 4,5 µl 18S rRNA-Primern und Sonde und 40,5 µl RNase-freies Wasser, jedoch keine cDNA zu dem Reaktionsgemisch gegeben.

Nachdem die Mikrotiterplatte jeweils mit 2 x 30 µl beschickt und bei 1400 U/min für 1 min zentrifugiert worden war, wurde sie in den Thermocycler gegeben und das Protokoll gemäß Tabelle 4 gestartet.

## **3.8 Quantitative Bestimmung der zu untersuchenden Gene**

Für die quantitative Bestimmung der Gene wurde genauso vorgegangen, wie bei der Kontrolle des PSD (s. 3.7.3.), nur mit dem Unterschied, dass die zur Quantifizierung unerlässliche Verdünnungsreihe (Herstellung s. 3.5.2.) bei der Bestimmung jedes Gens mit untersucht wurde.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Herstellen der Taqman-Chemie: dazu wurden alle Reagenzien der nachfolgenden Tabelle in ein Gefäß pipettiert, 60 µl hiervon für jede zu untersuchende Probe in ein weiteres Gefäß dispensiert und abschließend 30 µl cDNA zugegeben. Für die NTC wurde statt der cDNA RNase-freies Wasser des gleichen Volumens zugegeben. Nachdem dieses Gemisch für ca. 20 sek. aufgeschüttelt und zentrifugiert worden war, wurden jeweils 2 x 30 µl in die Gefäße der Mikrotiterplatte gegeben.

Reagenz	Endkonz.	Vol/1 Rkt ( $\mu$ l)	Vol. für 3 Reakt. ( $\mu$ l)
Master Mix	1x	15	45
F-Primer	300 nM	2,3	6,9
R-Primer	300 nM	2,3	6,9
Probe	200 nM	1,2	3,6
cDNA	10 ng	10	<b>nicht hinzufügen!</b>
Wasser		0,2	0
<b>Gesamt inkl. cDNA</b>		<b>31</b>	<b>93</b>

**Tabelle 7:** Reagenzien, die zur quantitativen Untersuchung der Gene benötigt wurden.

- Als Standard für die Verdünnungsreihe diente der Nachweis von 18S rRNA. Hier wurde wie schon unter 3.6.2. beschrieben verfahren und jeweils 2 x 30  $\mu$ l in die Mikrotiterplatte pipettiert.
- Zuletzt wurde die Mikrotiterplatte wieder zentrifugiert, damit keine Luftblasen am Boden der Gefäße die Messung störten und das Protokoll gemäß Tabelle 4 gestartet.

### 3.9 Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Sigma Plot Software.

Betrachtet wurden die absoluten Ergebnisse der Messung, die sich aus der Verdünnungsreihe ergaben: die  $C_T$ -Werte der untersuchten Gene wurden mit den  $C_T$ -Werten der Verdünnungsreihe, denen jeweils eine bestimmte DNA-Menge zugeordnet werden konnte, verglichen. Daraus ergaben sich für diese ebenfalls absolute Werte.

Zur Bestimmung des Faktors der differentiellen Genexpression wurde zunächst gegen den 18S rRNA-Wert normalisiert: d.h. die Werte, die sich aus der 18S-Messung ergaben, wurden willkürlich auf 1 gesetzt. Daraus ergab sich ein Normalisierungsfaktor, der mit der DNA-Menge der Gene bei 0 und 6 Gy multipliziert wurde.

Anschließend wurden die daraus entstandenen Werte nach 0 und 6 Gy aufgeteilt und die Werte, die sich für 6 Gy ergaben, durch Quotientenbildung ins Verhältnis zu den Werten bei 0 Gy

gesetzt: Dadurch ergab sich dann die Abweichung der Genexpression bei Bestrahlung verglichen mit der Kontrolle angegeben in Vielfachen.

Dies wurde jeweils für alle 3 Versuche wiederholt, miteinander verrechnet und die Standardabweichung der einzelnen Werte mit Hilfe eines Balkens, ausgehend vom Mittelwert dieser Werte in der Graphik dargestellt.

Um nun eine Aussage darüber machen zu können, ob sich Proteinmenge und mRNA gleichsinnig unter Bestrahlung verhielten, wurde der Kurvenverlauf der Proteinmenge, die wie die mRNA gegen die Zeit aufgetragen worden war, mit dem Kurvenverlauf der mRNA verglichen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Primer Sonden Design

Zum spezifischen Nachweis der Gene musste für jedes Gen ein spezifisches Primer- und Sonden-Design entworfen werden. Bei der Suche nach Komplementärsequenzen wurden für **Pk3**, **Rplp2**, **RAB1**, **CCT5**, **Figf** und **Psm14** keine homologen Sequenzen erkannt. Die Lokalisation der Primer und Sonden ist in Tabelle 5 dargestellt. Bei der Entwicklung des Primer- und Sonden-Paares der übrigen sieben Gene ergab sich Folgendes:

Die Primer- und Sonden-Sequenzen von **KCIP-1** erkannten zwei homologe Sequenz (Ywhaz mit der Gensequenz D78647.1 (kodiert für Phospholipase A2) und XM\_147897.1). Bei den Kontrollen stellte sich heraus, dass dieses Design nicht funktionierte. Nach einem erfolglosen Versuch wurde an Exon 3 und 4 ein neues Paar entworfen, welches für die quantitative Messung herangezogen wurde und keine weiteren Homologien zu anderen Gensequenzen aufwies.

Das für **OXCT** (Chromosom 15) entworfene Primer-Sonden-Paar zeigte bei der Überprüfung Homologien mit einer Gensequenz auf Chromosom 4 (AB085609.1) Es zeigte sich, dass diese Sequenz für OXCT 2 (Scot, Scot-t1) kodierte und dass die mRNAs dieser beiden, abgesehen von Anfangs- und Endsequenz exakt übereinstimmten.

Die Primer- und Sonden-Sequenzen von Inosin-5'-Monophosphatdehydrogenase (**Impdh2** – Chromosom 9) ergaben eine fast vollständige Übereinstimmung mit der genomischen Sequenz dieses Enzyms auf Chromosom 8. Die genomischen Sequenzen unterschieden sich lediglich in einzelnen Nukleotiden. So stimmte auch ein Nukleotid im Bereich des Vorwärts-Primers nicht überein.

Die Primer- und Sonden-Sequenz von **EIF5A** konnte sowohl auf Chromosom 11 als auch auf Chromosom 19 identifiziert werden. Dem Design zugrunde lag die genomische Sequenz auf Chromosom 11.

Für die Sequenzen der Primer und Sonde von **MAPK9** (Chromosom 11) ergaben sich mehrere homologe Sequenzen (BC028341, AJ315339).

Für **CaBP1** mussten zwei Primer- und Sonden-Sequenzen entworfen werden. Die Kontrollen beider Designs mit SYBR-Green, Taqman und Gel fielen negativ aus.

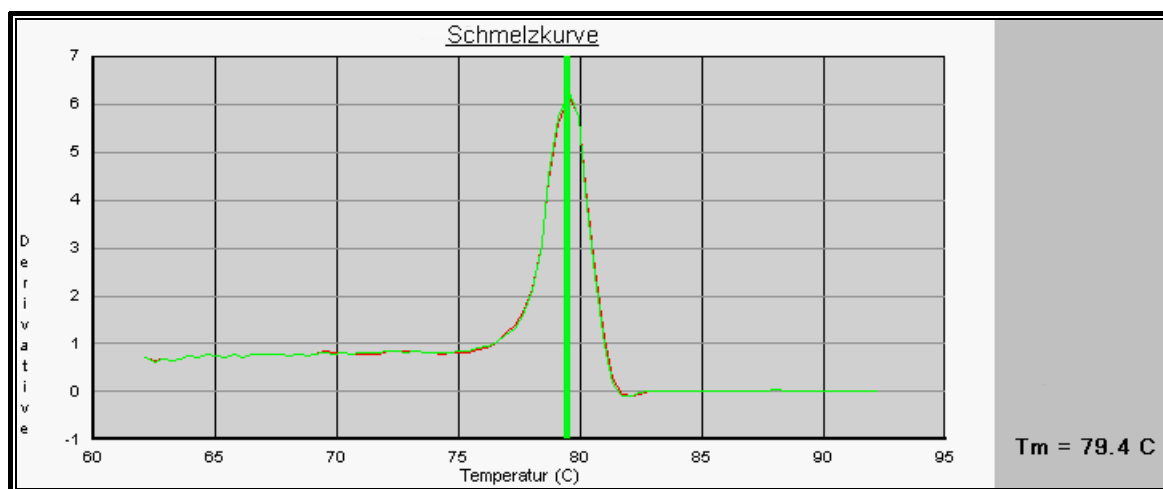


Für **Psm<sub>d</sub>7** musste, da das erste Design nicht funktionierte, ein zweiter Versuch unternommen werden. Anders als das erste Design, das durch Wiederholungen des gleichen Nukleotids in Vorwärts- (3x C und 3x A) und Rückwärts-Primer (3x T) und Sonde (4x A und 4x T) auffiel, konnten solche Wiederholungen in dem zweiten Design nicht beobachtet werden. Beide Designs zeigten in der Überprüfung keine weiteren Bindungspartner.

## 4.2 Kontrolle des PSD

Wie schon in Kapitel 3 beschrieben wurden alle Designs in gleicher Weise überprüft.

In dem **ersten** Versuch wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff SYBR-Green die Schmelztemperatur des in der PCR entstandenen Amplikons bestimmt. Erfahrungsgemäß ließ sich hier sagen: Lag der in diesem Experiment ermittelte Wert in einem Bereich von  $\pm 2^\circ\text{C}$ , verglichen mit der von der Primer Express Software ermittelten Schmelztemperatur, so galt dies als übereinstimmend.



**Abbildung 3:** Schmelzkurve von KCIP-1 nach dem zweiten Design, wobei der Schmelzpunkt – ermittelt durch den senkrechten Balken – bei  $79,4^\circ\text{C}$  lag.

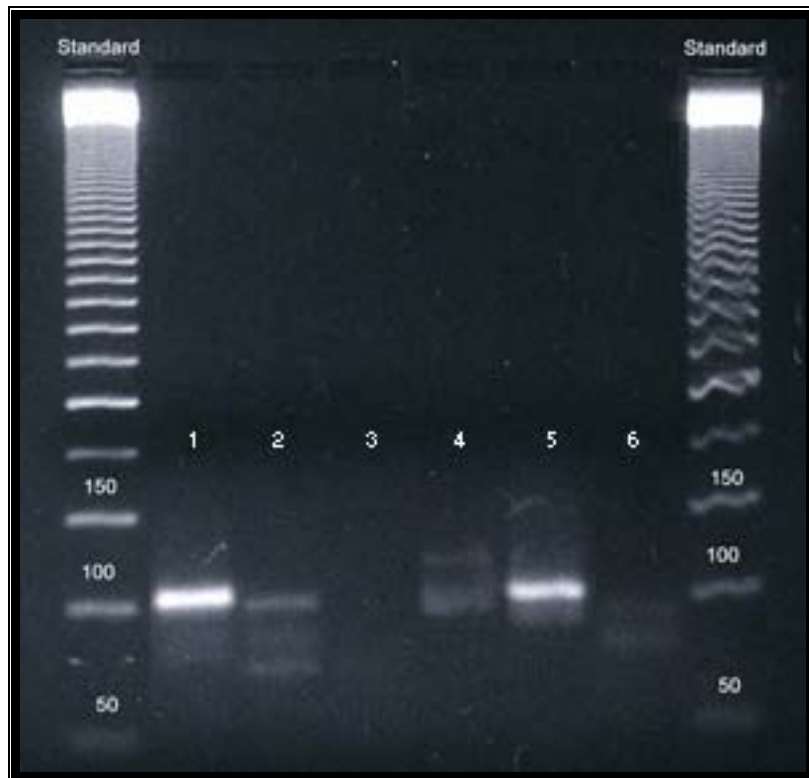
Anhand dieses Experimentes konnte auch gezeigt werden, dass eine Amplifikation ausgehend von den Primern stattgefunden hatte. Graphisch stellte sich das als Amplifikationsplot (AmpPlot) dar. Am Schnittpunkt dieser Kurve mit dem Schwellenwert ergab sich ein  $C_T$ -Wert (siehe dazu auch Abbildung 3). Die Ergebnisse des Experiments lassen sich der Tabelle 8 entnehmen:

Gene	AmpPlot C <sub>T</sub> SYBR-Green	T <sub>m</sub> (°C) SYBR-Green	T <sub>m</sub> (°C) Design
CaBP1	--	--	77
CCT5	21,2	82	82
EIF5A	21,8	80,5	80
Figf	27,5	80,5	79
Impdh2	22,6	78,4	78
KCIP-1	26	84,5	81
MAPK9	27,2	78,6	77
OXCT	21,6	80,5	79
Pk3_1	18,3	83,7	84
Pk3_2	19,1	83,7	84
Psm14	27,6	77,9	76
Psm7	31	81,8	81
RAB1	23,4	79,2	78
Rplp2	21,3	82,6	83

**Tabelle 8:** C<sub>T</sub>-Werte der 13 untersuchten Gene, die sich aus dem SYBR-Green-Experiment ergaben und Vergleich der hierbei ermittelten jeweiligen Schmelztemperaturen mit den aus dem Design erwarteten.

Während für CaBP1 keine Schmelztemperatur und kein Nachweis einer Amplifikation erbracht werden konnte, lag die Schmelztemperatur für KCIP-1 außerhalb der Referenz von  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Zur Bestimmung der Länge des Amplikons, wurde wie schon erwähnt, mit dem SYBR-Green-Produkt eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abbildung 4) durchgeführt. Mit der Sigma-Gel Software wurde die genaue Länge bestimmt und mit der sich aus dem Design ergebenden Länge verglichen. Lag der Wert bei  $\pm 10$  bp zu der gemäß PSD erwarteten Amplikonlänge, wurde von einer Übereinstimmung ausgegangen.



**Abbildung 4:** Darstellung der in einer Agarosegelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennten PCR-Produkte. Standard steht für den Längenstandard; 1 Rplp2, 2 OXCT, 3 CaBP1, 4 MAPK9, 5 RAB1, 6 Impdh2.

Für die zu untersuchenden Gene ergaben sich folgende Amplikonlängen:

Gene	Amplikon- Agarosegel (bp)	Amplikon- Design (bp)
CaBP1	--	113
CCT5	94	90
EIF5A	85	83
Figf	115/91	112
Impdh2	96/83	92
KCIP-1	> 300	82
MAPK9	126/102	119
OXCT	100	99
Pk3_1	97	95
Pk3_2	93	86
Psm14	100	97
Psm7	100 schwach	95
RAB1	110	103
Rplp2	106	103

**Tabelle 9:** Vergleich der im Agarosegel ermittelten Amplikonlängen der 13 Gene mit den sich aus dem Design ergebenden Längen.

Für Figf, Impdh2 und MAPK9 ließen sich in der Auswertung der Gelelektrophorese jeweils Doppelbanden erkennen (siehe Tabelle 9). Beim Vergleich der Längen dieser Banden mit den aus dem Design erwarteten Längen konnte beobachtet werden, dass jeweils eine Bande in dem erwarteten Bereich lag. Dies zeigte, dass anhand der verwendeten Primer und Sonden das gewünschte Produkt amplifiziert worden war und somit diese Sequenzen zur quantitativen Messung herangezogen werden konnten.

Im **dritten** und letzten Kontrollversuch wurde überprüft, ob neben den Primern auch die Sonde an der gewünschten Stelle band und eine Amplifikation durch die Taq-Polymerase stattgefunden hatte. Für die 13 Gene ergaben sich folgende Ergebnisse:

Gene	AmpPlot C <sub>T</sub> Taqman
CaBP1	--
CCT5	27,5
EIF5A	27,7
Figf	33,8
Impdh2	28,4
KCIP-1	--
MAPK9	33,5
OXCT	28,4
Pk3_1	25
Pk3_2	25,4
Psm14	32,4
Psm7	--
RAB1	30
Rplp2	30

**Tabelle 10:** C<sub>T</sub>-Werte der Amplifikationsplots der 13 untersuchten Gene

Die in Tabelle 10 dargestellten Daten zeigten, dass für CaBP1, KCIP-1 und Psm7 keine Amplifikation stattgefunden hatte. Betrachtete man nun noch die Ergebnisse aus den vorangegangenen SYBR-Green-Experimenten, so konnte für CaBP1 keine Schmelztemperatur ermittelt werden. Die Schmelztemperatur von KCIP-1 lag außerhalb des Toleranzbereichs von +/- 2 im Vergleich zu der aus dem PSD erwarteten. In der Gelelektrophorese konnte für die beiden genannten Gene Ähnliches beobachtet werden: Für CaBP1 konnte keine Bande ermittelt werden. Die Bande von KCIP-1 lag mit > 300 bp deutlich außerhalb des erwarteten Bereichs von 82 bp. Die elektrophoretische Auftrennung des SYBR-Green-Produkts von Psm7 erbrachte eine Bande im erwarteten Bereich, diese war jedoch sehr schwach. All diese Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, machten deutlich, dass die Designs der angeführten Gene wiederholt werden mussten.

Die übrigen Designs waren soweit gelungen und wurden für die quantitative Messung herangezogen.

Für CaBP1, KCIP-1 und Psmd7 wurden jeweils neue Designs entworfen und den schon beschriebenen Kontrollversuchen unterzogen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Gene	AmpPlot C <sub>T</sub> SYBR- Green	AmpPlot C <sub>T</sub> Taqman	T <sub>m</sub> (°C) SYBR- Green	T <sub>m</sub> (°C) Design	Amplikon (bp) Agarose- gel	Amplikon (bp) De- sign
CaBP1	21,1	--	84,1	79	44/254/372	103
KCIP-1	16,5	21,2	79,4	78	82/108	105
Psmd7	18,8	25,2	79,8	79	110/126	126

**Tabelle 11:** Zusammenstellung der Ergebnisse, die sich aus den Kontrollversuchen der PSDs der drei wiederholten Gene ergaben.

Die Ergebnisse der Kontrollversuche von KCIP-1 und Psmd7 ergaben Werte, die innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen lagen und wurden daher zur quantitativen Messung herangezogen.

Das Design von CaBP1 erbrachte auch im zweiten Versuch keine akzeptablen Ergebnisse. Daher wurden im folgenden die 12 Gene untersucht, deren Designs erfolgreich waren.

Die Sequenzen der Primer und Sonden der untersuchten Gene lassen sich der Tabelle 12 entnehmen:

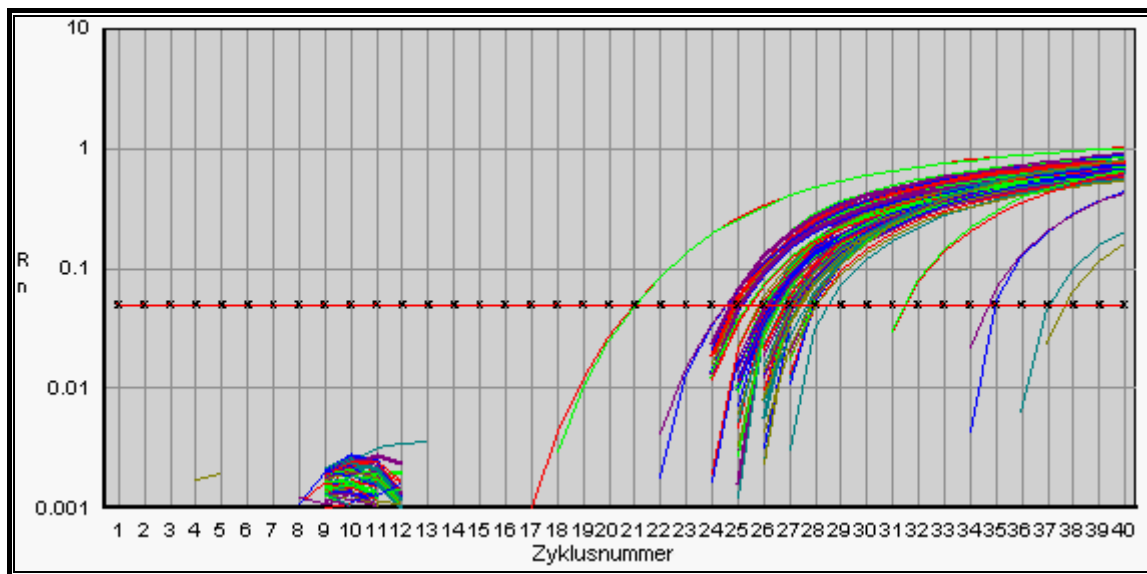
Gene	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer	Sonde
CCT5	Exon 1 GGCGCCCTTTCTCATTATC	Exon 2 CTTTGGCAGCCATGATGTGA	Exon 1 AGATCGCAAGTCCCCTCATGGG
	Exon 2 GCCATGTAAGATCGTCGAGATG	Exon 3 AAATGTCAATGCCAACCAGATG	Exon 2 CTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCC
Figf	Exon 1 AGATCGCAAGTCCCCTCATGGG	Exon 2 TTGCAGCAACTCCTCCAAACT	Exon 2 TTCTTTTGAGCGATCATCCCCTGTC
	Exon 4 GGTATTGGTTTCATCCACCACAA	Exon 5 TCAGTGATGAATCCCCTGTTTCGTA	Exon 4 CACTTTCCGAAC TTCATTGGCCTGGA
KCIP-1	Exon 3 CGCAACCAGAAAGCAAAGTCTT	Exon 4 ACTGGTCCACAATTCCTTTCTTG	Exon 3 CACCAGCAGCAACCTCGGGCA
	Exon 4 CATATGGAAGTGGACCATGAGAGA	Exon 5 ACTACAATGTTGCTAGGCTTCAAATC	Exon 4 CCTACCTTCTACCAGATGCTCTGTGGCA
OXCT	Exon 6 AAGCCATCACGGGAGATTTTG	Exon 7 TGGCAGATTGAAGTTTCTTGCA	Exon 6 CTGAAAATCACATTTGCCCTGCCCGGT
	Exon 1 TGAAGTACGCTCCGCTCTAGGT	Exon 2 GCAGTCCCCTGCTTCACTGTGT	Exon 1 CGCAGCAGGAACCGAAGTACGCC
Psm14	Exon 4 ATATCTCTTCCTTGGCCTTGCTAA	Exon 5 TCATCAACAATAATTCACCAAGCAT	Exon 5 CATAGGCACTCCAGCAGCACCATGTTT
	Exon 4 CCCCAAACTGCACAAGAATGA	Exon 5 ATGTAGGCTTCGGTGGGAAGT	Exon 5 ATTGGTCATTATCGACCGTGAAGCCAAAGG
RAB1	Exon 2 AAGTTACTTCTGATTGGCGATTCTG	Exon 3 CCACACCAATTGTGCTGATGTA	Exon 2 TTGGAAAAGTCCCTGCCCTTCTCCTTAGGTTG
	Exon 4 GCACCTGCTGCTGTTCTG	Exon 5 CAAACAAGCCAAAATCCCATGT	Exon 5 CTCCTCGGACTCCTCCTTCTCTCATCTTTCT

Tabelle 12: Sequenzen der Primer und Sonden und deren Exonlokalisationen

### 4.3 Bestimmung der Genexpression am Beispiel des Gens Psmid14

#### 4.3.1 cDNA-Synthese

Zunächst wurde wie schon in Kapitel 3 beschrieben die aus der Gesamt-RNA synthetisierte cDNA überprüft. Dazu wurde die cDNA mit 18S rRNA-Primern versetzt und eine PCR durchgeführt. Das Ergebnis der Messung wurde folgendermaßen graphisch aufgetragen:



**Abbildung 5:** 18S-Amplifikationsplots der Sonden und Amplifikationsplots der Verdünnungsreihe

Es konnte für jede Probe ein Amplifikationsplot nachgewiesen werden. Somit war die Synthese der cDNA gelungen.

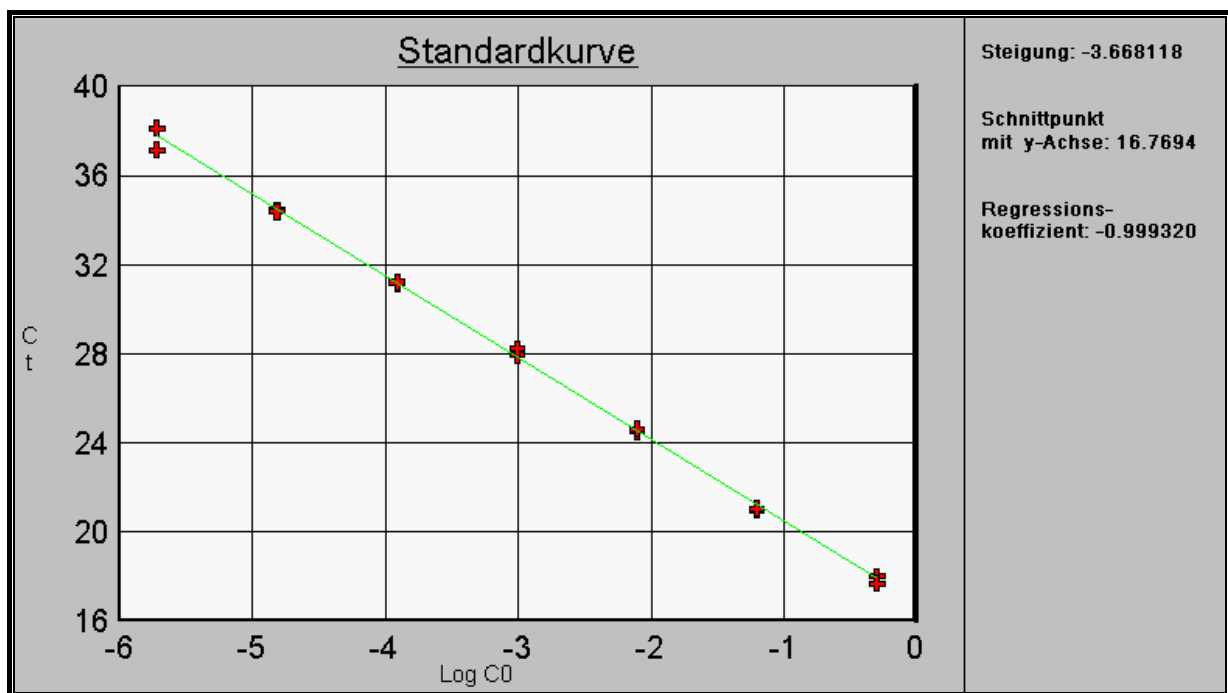
#### 4.3.2 Verdünnungsreihe

Wie schon unter 3.6.2. beschrieben, wurde zur Quantifizierung eine Verdünnungsreihe hergestellt. An dieser Verdünnungsreihe wurde, nachdem sie ebenfalls mit 18S rRNA-Primern versetzt worden war eine PCR durchgeführt. Die dabei gemessenen  $C_T$ -Werte (y-Achse) wurden gegen die entsprechende Menge cDNA (x-Achse) aufgetragen (Abbildung 6). Durch diese Punkte wurde eine Regressionsgerade gelegt. Idealerweise sollte deren Steigung 3,3 betragen. Dies würde bedeuten, dass bei einer Amplifikation von Proben, die um den Faktor 10 ver-



dünnt wurden, idealerweise 3,3  $C_T$ -Werte zwischen den Amplifikationsplots der einzelnen Verdünnungsschritte liegen. Bei den im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuchen lag dieser Wert meist im Bereich von 3,6. Als Maß für die Genauigkeit der experimentellen Daten, ist auch der Regressionskoeffizient von Bedeutung. Entsprechen die gemessenen Werten denen, die man aus der Regressionsgeraden erwartet, so nimmt der Regressionskoeffizient den Wert 1 an.

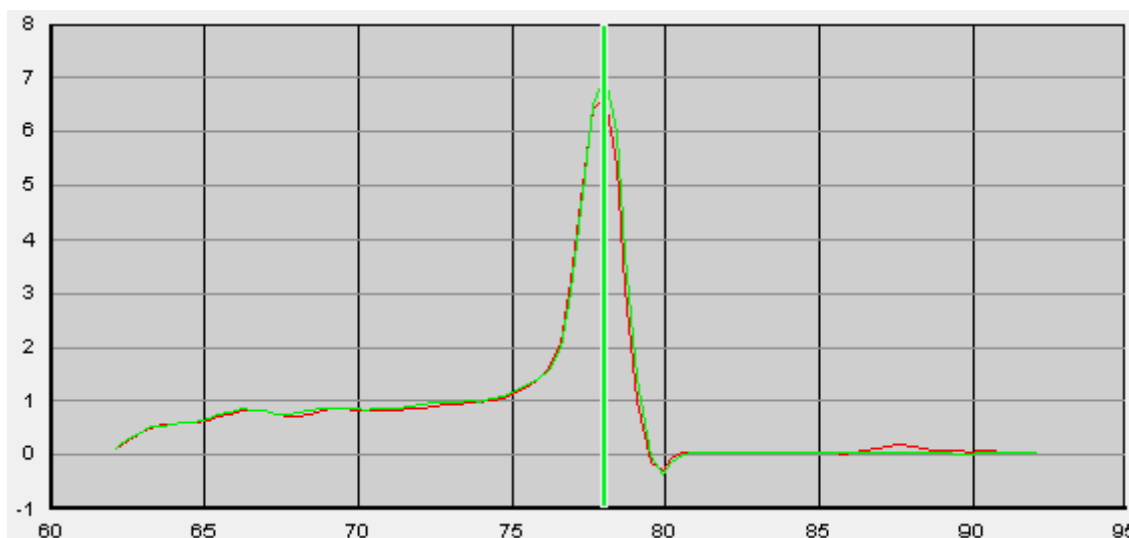
Der Regressionskoeffizient lag bei den meisten Messungen um 0,998 oder 0,999 (Abbildung 6). Die gemessenen Daten wurden somit von der Standardkurve sehr genau wiedergegeben.



**Abbildung 6:** Auftragung der  $C_T$ -Werte der Amplifikationsplots der Verdünnungsreihe gegen die cDNA-Menge (logarithmische Beschriftung). Die durch die Punkte gelegte Regressionsgerade stellt die Standardkurve dar. Diese wird durch ihre Steigung (idealerweise 3,3) und ihren Regressionskoeffizienten (idealerweise 1) beschrieben.

### 4.3.3 Genexpression von Psmid14

Um das entwickelte PSD für Psmid14 zu überprüfen, wurde mittels des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR-Green die Schmelztemperatur des Amplikons untersucht. Dabei kam es zu einer Amplifikation, die einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigte, wie die Amplifikationsplots in Abbildung 5. Der  $C_T$ -Wert lag bei 27,6 (Threshold bei 0,05). In der Dissoziationskurve lag die Schmelztemperatur bei 77,9°C (dem Design entsprechend waren es 76°C).

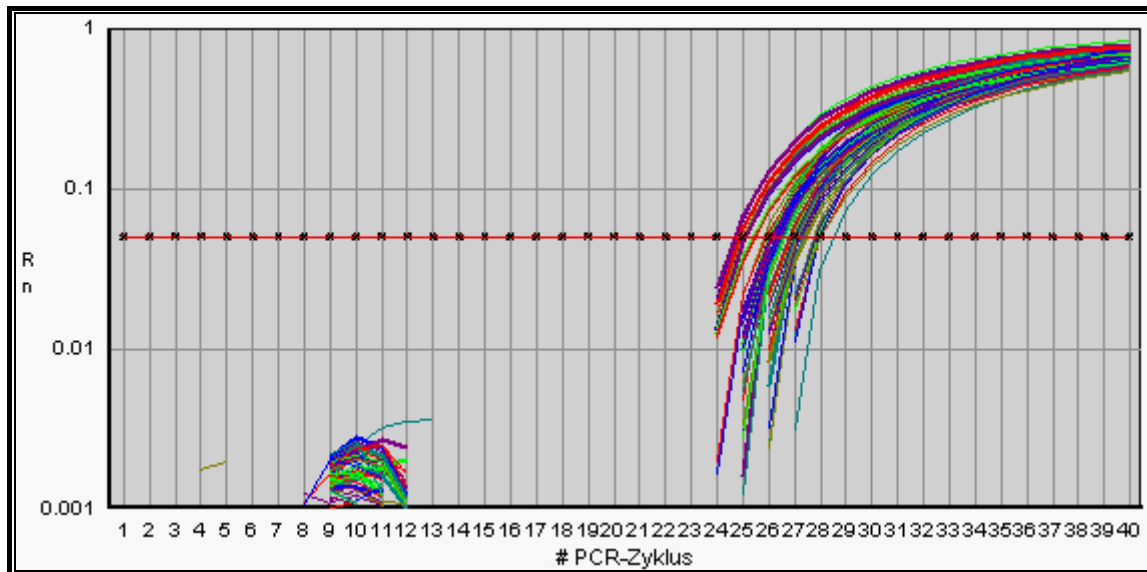


**Abbildung 7:** Dissoziationskurve von Psmid14 mit Schmelztemperatur von 77,9°C.

Mit dem SYBR-Green-markierten Amplikon wurde zur Bestimmung dessen Größe eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es zeigte sich eine Bande bei 100 bp (laut Design sollte es 97 bp umfassen). Somit lag die Länge des Amplikons im erwarteten Bereich.

Im Amplifikationsnachweis konnte gezeigt werden, dass Primer und Sonde binden und dass eine Amplifikation stattgefunden hatte. Der  $C_T$ -Wert lag bei 32,4.

Nachdem sich in den 3 Kontrollversuchen gezeigt hatte, dass das PSD funktioniert, wurde mit diesem die quantitative Messung des Gens an den 36 Proben (3 Versuche à 6 Kontrollen und 6 bestrahlte Proben) in Doppelansätzen durchgeführt. Das Ergebnis dieser RTQ-PCR ist graphisch in Abbildung 7 zu sehen:



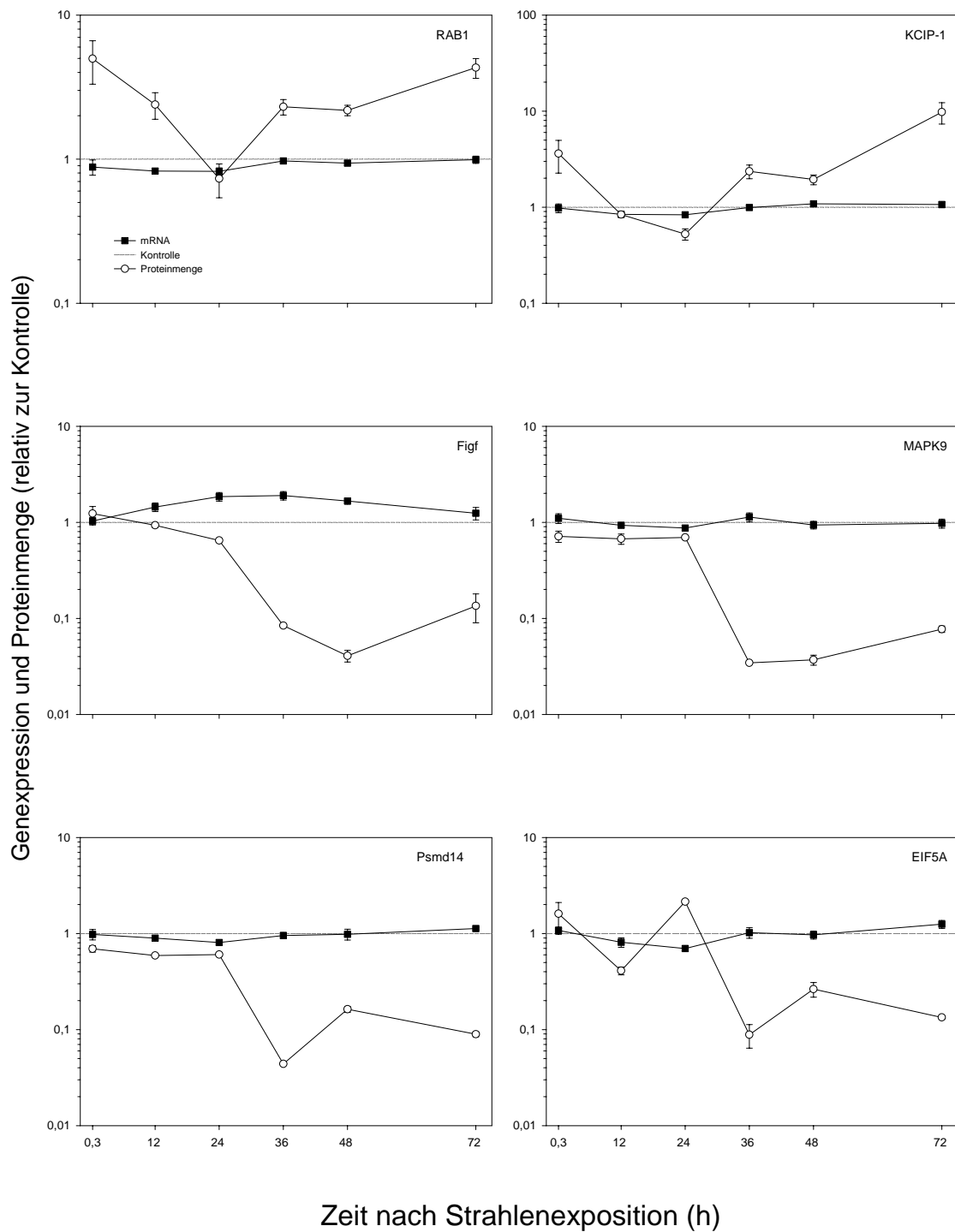
**Abbildung 8:** Amplifikationsplots der quantitativen Messung von Psmid14.

Zur Quantifizierung war bei jeder Messung die Standardreihe notwendig (siehe Abbildung 6). Den  $C_T$ -Werten dieser Messung konnten – wie schon unter 3.9. erwähnt – eine entsprechende Menge an cDNA zugeordnet werden. Diese Daten, als Vielfaches des korrespondierenden Kontrollwertes ausgedrückt, wurden graphisch aufgetragen und entsprachen somit der differentiellen Genexpression. Das Ergebnis wird in dem nachfolgenden Kapitel besprochen.

#### **4.4 Vergleich der Proteinmenge und der korrespondierenden Genexpression**

Betrachtete man vergleichend Proteinmenge und Genexpression konnte anhand der Graphiken der Abbildung 9-1 und Abbildung 9-2 das Folgende festgestellt werden:

Charakteristisch am Verhalten des Proteins **RAB1** (Abbildung 9-1) nach Bestrahlung war, dass die nach 20 min gemessene Proteinmenge dem 5-fachen der Kontrolle entsprach, diese nach 24 h Kontrollniveau erreicht hatte und bis zur letzten Messung bei 72 h ein ähnliches Niveau, wie zu Beginn – nämlich das 4,3-fache - erreicht hatte. Die Genexpression wies über den betrachteten Zeitraum eine maximale Erniedrigung um 25 % (24 h nach Bestrahlung) auf. Das Verhalten des **KCIP-1**-Proteins (Abbildung 9-1) zeigte ähnliche Charakteristika wie RAB1. So fiel die Proteinmenge ausgehend vom 3,6-fachen der Kontrollmenge bei 20 min bis auf die Hälfte der Kontrollmenge bei 24 h ab. Von diesem Wert bis zur letzten Messung bei 72 h stieg sie bis auf den 9,7-fachen Wert der Kontrolle an. Die Betrachtung des Verhaltens der Genexpression unter Bestrahlung zeigte leichte Schwankungen um die Kontrolle, deren



**Abbildung 9-1:** Graphische Darstellung der Menge an Protein bzw. mRNA, aufgetragen gegen die Zeit nach Strahlenexposition. Die Werte sind als Vielfache der Kontrolle (dargestellt als horizontale Linie) angegeben.

maximale Veränderung mit einer Verminderung von 20 % bei 12 h beobachtet werden konnte.

Abweichend von den zwei bisher besprochenen Proteinen waren die anderen zehn Proteine herunterreguliert:

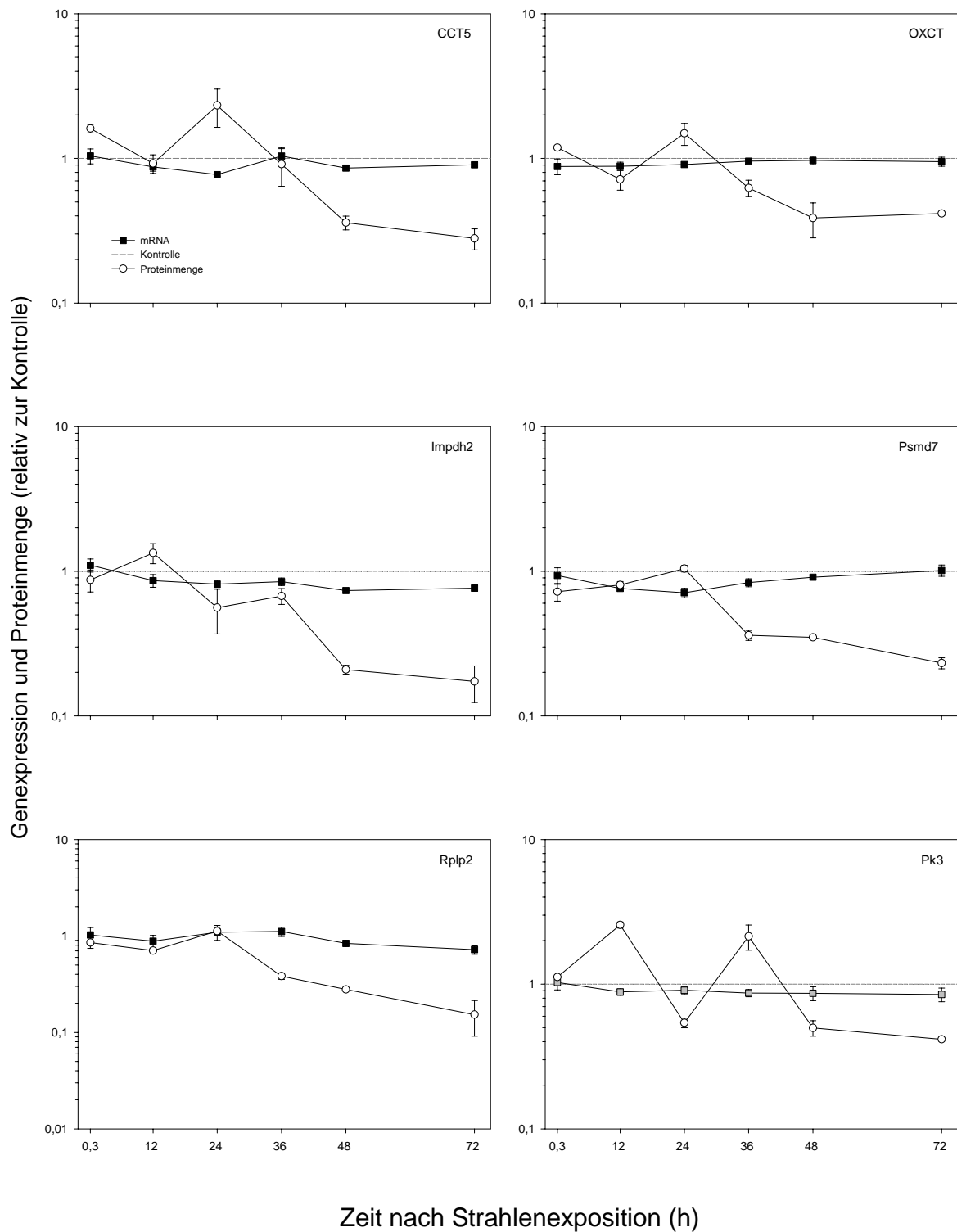
Bei **Figf** (Abbildung 9-1) kam es nach 24 h zu einem starken Abfall der Menge vom 0,7-fachen auf das 0,08-fache der Kontrollmenge (entspricht dem Faktor 12,5), der sich bis auf das 0,04-fache (Faktor 25) der Kontrolle nach 48 h fortsetzte. Abschließend kam es zu einem leichten Anstieg der Menge auf das 0,1-fache. Bei Betrachtung der Genexpression zeigte sich eine maximale Zunahme um den Faktor 1,9 bei 36 h, die bei 72 h wieder auf den Faktor 1,2 abgesunken war.

Für **MAPK9** (Abbildung 9-1) konnte man bis 24 h nach Bestrahlung eine konstante Menge an Proteinen nachweisen, die dem 0,7-fachen der Kontrollmenge entsprach. Nach 24 h kam es zu einem starken Abfall der Menge um 95 % auf das 0,03-fache der Kontrolle. Bis zum Ende der Messung stieg sie wieder leicht an. Die Genexpression von MAPK9 schwankte in einem Bereich von +/- 10 % um die Kontrolle.

Ähnlich wie MAPK9 verhielt sich auch die Menge von **Psmid14** (Abbildung 9-1). Ausgehend von dem 0,7-fachen der Kontrollmenge bei 20 min blieb diese Menge die folgenden 24 h konstant. Anschließend kam es auch hier zu einer starken Verringerung der Menge um 93 %, die sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraums einer Menge, die dem 0,09-fachen entsprach, annäherte. Die Genexpression von Psmid14 erreichte bei 24 h mit 81 % der Kontrollmenge ihren niedrigsten Wert. Bei 48 h konnten 10 % mehr wie in der Kontrolle nachgewiesen werden.

Die Proteinmenge von **EIF5A** (Abbildung 9-1) wies im Beobachtungszeitraum starke Schwankungen auf. So war die Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle wechselweise vermehrt bzw. vermindert. Die größte Menge ließ sich 24 h nach Bestrahlung mit dem 2,2-fachen Wert der Kontrolle und die kleinste Menge nach 36 h, mit dem 0,09-fachen der Kontrolle nachweisen. Nach 72 h war die Proteinmenge um den Faktor 7,5 vermindert. Die Menge an mRNA schwankte um die Kontrolle, wobei bei 24 h die maximale Verminderung um den Faktor 1,4 und bei 72 h die maximale Vermehrung um den Faktor 1,3 beobachtet werden konnte.

Die Proteinmenge von **CCT5** (Abbildung 9-2) wies ähnlich EIF5A starke gegensinnige Veränderungen auf. Nach 24 h war mit dem 2,3-fachen Wert der Kontrollmenge die Höchstmenge erreicht. Von diesem Zeitpunkt nahm die Proteinmenge bis zu 72 h nach Bestrahlung um



**Abbildung 9-2:** Graphische Darstellung der Menge an Protein bzw. mRNA, aufgetragen gegen die Zeit nach Strahlenexposition. Die Werte sind als Vielfache der Kontrolle (dargestellt als horizontale Linie) angegeben.

den Faktor 3 ab. Die Genexpression von CCT5 variierte um den Kontrollbereich. Bei 24 h konnte der maximale Abfall um 20 % beobachtet werden.

Das Protein von **OXCT** (Abbildung 9-2) wies vergleichbare Veränderungen wie CCT5 und EIF5A auf. So war auch hier nach Schwankungen während der ersten 24 h ein starker Abfall um den Faktor 2,5 zu sehen. Bei der Genexpression war bei 20 min die größte Abweichung von der Kontrolle mit einem Abfall um 10 % zu erkennen.

Die Proteinmenge von **Impdh2** (Abbildung 9-2) verringerte sich im Verlauf über die 72 h nach der Bestrahlung um den Faktor 5 verglichen mit der Kontrolle. Dabei nahm die Menge ausgehend vom 1,3-fachen der Kontrolle nach 12 h stetig ab. Die Menge an mRNA nahm über den gesamten Beobachtungszeitraum um den Faktor 1,4 (72 h) ab.

Nach einer leichten Zunahme der Proteinmenge von **Psmid7** (Abbildung 9-2) in den ersten 24 h auf Kontrollniveau, reduzierte sich diese in der Folgezeit um den Faktor 5. Die Genexpression lag, nach einer maximalen Verringerung um Faktor 1,4, nach 72 h im Bereich der Kontrolle.

Auch für **Rplp2** (Abbildung 9-2) zeigte sich ab 24 h nach Bestrahlung eine Reduktion der Proteinmenge um den Faktor 5. In den ersten 24 h ließen sich nur leichte Schwankungen der Menge im Bereich der Kontrolle erkennen. Die mRNA-Menge schwankte leicht um den Kontrollwert. Die größte Veränderung war bei 72 h zu sehen. Dort war sie um den Faktor 1,4 vermindert.

Das Verhalten der Proteinmenge von **Pk3** (Abbildung 9-2) zeigte insgesamt, wie Impdh2, CCT5 und EIF5A ein inhomogenes Bild. Man konnte Anstiege bei 12 h (Faktor 2,6) und 36 h (Faktor 2,1) beobachten und Abfälle bei 24, 48 und 72 h (jeweils Faktor 2). Die mRNA lag meist leicht unterhalb der Kontrolle. Bei 72 h war sie maximal um den Faktor 1,3 abgesunken.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass sich die Expression der untersuchten Gene in einem Rahmen änderte, die im Bereich von +/- 30 % lag. Gemäß den Angaben des Herstellers werden bei diesem Verfahren Änderungen, die in einem Bereich von +/- 42 % liegen als nicht signifikant gewertet. Somit galt, dass, abgesehen von Figf, keines der untersuchten Gene unter Bestrahlung bedeutsame Änderungen aufwies. Im Gegenzug dazu zeigten die strahleninduzierten Proteine Abweichungen ihrer Proteinmenge bis maximal Faktor 33.

## 5 Diskussion

### 5.1 Primer-Sonden-Design

Während des Primer-Sonden-Designs konnte mehrfach beobachtet werden, dass eines der zu untersuchenden Proteine auf 2 verschiedenen Chromosomen kodiert wurde. Dabei konnten in der Gensequenz meist nur geringe Abweichungen voneinander festgestellt werden. Auf die quantitative Messung der mRNA hatte dieses jedoch keinen Einfluss.

Daneben zeigte sich, dass die Suche nach der Locus ID zum Teil andere Gensequenzen erbrachte wie die Suche nach der entsprechenden Proteinbezeichnung. Ferner konnten speziell bei der Überprüfung des Designs von CaBP1 die Primer und Sonde nicht auf der ursprünglichen Sequenz lokalisiert werden. Bei manueller Überprüfung jedoch gelang die Zuordnung. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass die Verknüpfung der Datenbanken zum Teil fehlerhaft ist.

### 5.2 Proteinquantifizierung über 2D Elektrophorese

Um quantitative und qualitative Aussagen über die Proteinexpression treffen zu können, werden Proteine mit 2D Elektrophorese und Massenspektrometrie untersucht. Diese Untersuchungsmethoden werden allgemein unter dem Begriff „Proteomics“ subsummiert (Fields 2001, S. 1221).

Ein Nachteil der quantitativen Ermittlung von Proteinen über 2D Elektrophorese ist vor allem die begrenzte Auflösung der 2D Gele (Pradet-Balade 2001, S. 226). Die begrenzte Auflösung liegt zum einen darin begründet, dass zahlreich vorhandene Proteine, deren Spots auf dem Gel eine starke Intensität aufweisen, die schwachen Signale von Proteinen mit geringerem Vorkommen überdecken und diese somit nicht erkannt werden können (Futcher 1999, S. 7359).

Zum anderen können hydrophobe, sehr lange und sehr kurze Proteine mit 2D Elektrophorese nur schwer nachgewiesen werden (Hanash 2002, S. 69).



Eine weitere Fehlerquelle dieser Art der quantitativen Bestimmung ist in analytischen Faktoren zu suchen. Dazu gehören neben den einzelnen Schritten des Verfahrens, Temperatur, Zusammensetzung des Gels, Färbung, Entfärbung und schließlich Auswertung der Gele.

### 5.3 Charakteristika der untersuchten Proteine

Unter den 12 untersuchten Proteinen stechen **RAB1** und **KCIP-1** dadurch hervor, dass sie im Gegensatz zu den anderen Proteinen hochreguliert sind.

Bei **RAB 1** handelt es sich um eine GTPase, die zur Familie der Ras-Proteine gehört (Martinez 1998, S. 101). Es ist bekannt, dass die Rab-Proteine wichtige Regulatoren des Proteintransports in eukaryoten Zellen sind (Segev 2001, RE11). RAB1 ist in den Transport von Vesikeln aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi Apparat involviert (Moyer 2001, S. 268). Über eine besondere Rolle von RAB1 in bestrahlten Zellen ist nichts bekannt. Man weiß jedoch, dass einige Mitglieder der Ras-Familie mit einer verstärkten Strahlenresistenz vergesellschaftet sind und man hierbei eine verstärkte Expression dieser Proteine beobachten kann (Jones 2001, S. 326). Ähnlich dieser Darstellung zeigte RAB1 im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen über den Beobachtungszeitraum hinweg eine verstärkte Expression gegenüber der Kontrolle.

Das Gen **KCIP-1** kodiert für das Protein 14-3-3 zeta/delta. Die Proteine der 14-3-3-Familie sind dimere Phosphoserin-bindende Proteine, die an der durch Proteinkinase II und Proteinkinase C vermittelten Signaltransduktion teilnehmen. Eine primäre Funktion dieser Proteinklasse ist eine Hemmung der Apoptose (Xing 2000, S. 349). Das Protein 14-3-3 sigma dieser Familie zeigte nach Bestrahlung von kolorektalen Karzinomen mit  $\gamma$ -Strahlen und nach anderen DNA-schädigenden Stoffen eine deutliche Induktion (Hermeking 1997, S. 3). Ähnlich diesen Ergebnissen konnte für 14-3-3 zeta/delta eine Hochregulation als Zeichen einer verminderten Apoptose nachgewiesen werden.

Die im Folgenden dargestellten Proteine wiesen unter Bestrahlung eine Verringerung ihrer Menge auf:

Das zu **Figf** korrelierende Protein ist der „vascular endothelial growth factor D“ (VEGF D). Dieses Protein spielt in Angiogenese und Zellproliferation von Karzinomzellen eine wichtige Rolle. Anhand von VEGF D Expression in Ovarialkarzinomen (Yokoyama 2003, S.237), Mammakarzinomen (Nakamura 2003, S.716) und Magenkarzinomen (Ishikawa 2003, S. 21)

lassen sich Aussagen über die lymphatische Metastasierung und damit die Prognose treffen. Unter Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen kommt es, abhängig von Dosis und Dauer der Bestrahlung zu einer Induktion dieses Proteins (Gorski 1999, S. 3374; Park 2001, S. 3266). Die Induktion des „vascular endothelial growth factor“ und die durch ihn vermittelte Strahlenresistenz wird über den MAPK-Signaltransduktionsweg vermittelt (Mori 2000, S.157; Park 2001, S. 3266; Gupta 2002, S. 47). Im Gegensatz zu dem Vorgenannten war Figf nach Bestrahlung nach 48 h maximal um den Faktor 25 herunterreguliert.

Protein-mitogen-aktivierte Proteinkinase 9 (**MAPK9**, stress-aktivierte Proteinkinase JNK2, c-JUN N-terminale Kinase 2) spielt eine Schlüsselrolle im Signaltransduktionsweg, der durch zellulären Stress, inflammatorische Zytokine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoragonisten induziert wird. Zelluläre Stressoren wie UV- oder  $\gamma$ -Strahlen, osmotischer Stress, Hitzeschock oder Proteinsyntheseinhibitoren induzieren c-JUN NH<sub>2</sub>-terminale Kinase und p38 MAP Kinasen (Hagemann 2001, S. 863). Die Aktivierung dieser Kinasen wurde mit Apoptose (Takahashi 2002, S. 115), onkogenen Transformationen und entzündlichen Antworten in Verbindung gebracht (Hagemann 2001, S. 863). In dem hier durchgeführten Versuch zeigte MAPK9 eine deutlich verringerte Menge. Dieses Ergebnis kann auf eine Unterdrückung der Apoptose hinweisen.

Bei den Genen **Psmid14** und **Psmid7** handelt es sich zum einen um die nicht-ATPase-Untereinheit und zum anderen um eine regulatorische Untereinheit des 26S Proteasoms. Das 26S Proteasom ist für den Abbau geschädigter oder falsch gefalteter Proteine verantwortlich. Mit seiner proteolytischen Eigenschaft hat es in der Regulation zentraler Proteine eine bedeutende Rolle (Hartmann-Petersen 2003, S. 26). So ist das 26S Proteasom am Ablauf des Zellzyklus, der DNA Transkription, DNA Reparatur/Fehlreparatur, Angiogenese, Apoptose/Überleben, bei Wachstum, Entwicklung und Entzündung sowie an der Regulation von Faktoren von Signaltransduktionswegen, wie AP1 und NFkappaB (Pajonk 2001, S. 447) beteiligt. Eine Hemmung von NFkappaB induziert Apoptose. Durch eine Inhibition des Proteasoms oder eine Überexpression von IkappaBalpha kann NFkappaB gehemmt werden (Jeremias 1998, S. 4624). Man weiß auch, dass eine verminderte Aktivität von 26S Proteasom mit einer verstärkten Nukleotidexzisionsreparatur einhergeht (Lommel 2000, S. 4839). Dies kann bedeuten, dass eine Hemmung von 26S Proteasom die Reparatur von DNA-Schäden fördert. Für die hier durchgeführten Versuche zeigte es sich, wie auch bei Pajonk (2001, S. 203) dargestellt, dass es unter Bestrahlung zu einer Hemmung des Proteins kommt.

**EIF5A** (eukaryotic initiation factor 5A) gehört zu den Proteinen, die an der Proteinsynthese beteiligt sind. Unter Bestrahlung zeigt das Protein nach 24 h einen steilen Abfall. Bei Hitze-

stress-induziertem Zelltod ist der Verlust von EIF-5A mit einer verminderten Wachstumsrate und letztendlich mit einer verminderten Lebensfähigkeit der Zelle ohne chromosomale DNA Fragmentation assoziiert (Takeuchi 2002, S. 662). Die genaue Funktion von EIF5A ist bisher noch unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass EIF5A eine bedeutende Rolle bei der Expression von Proteinen, die für Apoptose von endothelialen Zellen und Zellproliferation notwendig sind, spielt (Lee 2002, S. 69).

Bei **CCT5** handelt es sich um die epsilon Untereinheit eines Chaperons, das Proteinfaltung im Zytoplasma von Eukaryonten vermittelt (Kubota 1999, S. 492), u.a. die von Aktin und Tubulin (Kubota 2002, S. 313). Nach einem Fas-induzierten Zelltod in Jurkat T-Lymphozyten ließ sich eine verminderte Menge an CCT5 im Zytoplasma und seine Translokation in den Kern feststellen (Gerner 2000, S.39018). Bei den hier durchgeführten Versuchen stellte sich für CCT5 ein Abfall der Proteinmenge, ausgehend von einer Hochregulation, nach 24 h dar.

Bei dem Protein **OXCT** handelt es sich um eine 3-Oxoacid CoA Transferase, die auch unter SCOT bekannt ist. OXCT ist ein mitochondriales Schlüsselenzym im Metabolismus von Ketonkörpern in verschiedenen Organen (Tanaka 2003, S. 52). Ein Mangel an OXCT führt zu episodischen Ketoazidosen (Fukao 2000, S. 144). Unter Bestrahlung ließ OXCT eine Verminderung seiner Proteinmenge erkennen.

Die Inosin 5'-monophosphatdehydrogenase (Impdh) ist ein geschwindigkeitslimitierendes Enzym der Synthese von GTP und dGTP (Gu 2003, S. 4958). Es gibt zwei Isoformen des Proteins: Impdh1, ubiquitär und in normalen Zellen zahlreich vorhanden, und **Impdh2**, das besonders in malignen Zellen vorhanden ist. Impdh spielt eine wichtige Rolle in der Expression von Genen wie p53, c-myc und Ki-ras (Jayaram 1999, S. 561). Eine Abnahme von intrazellulären Guanylaten durch Hemmung von Impdh ist ein Signal sowohl zur Hemmung der Proliferation als auch zur Hemmung der Apoptose. Die Aktivität von Impdh ist während der Tumorgenese ein Schlüsselenzym für die Progression (Yalowitz 2000, S. 2329). Impdh2 weist in den hier durchgeführten Versuchen nach Bestrahlung eine deutliche Herunterregulation auf.

**Rplp2** steht für „60S acidic ribosomal protein P2“ (alternativ: „ribosomal protein, large P2“). Es handelt sich dabei um ein ribosomales Protein, das über das Protein P0 an die ribosomale RNA bindet. Es wird mit der Bindung von Translationsfaktoren und der Stimulation von Faktor-abhängiger GTP-Hydrolyse in Zusammenhang gebracht. Die GTP-Hydrolyse induziert eine drastische konformationelle Änderung des Elongationsfaktors (Wahl 2002, S. 93). Unter Bestrahlung wies das Protein eine deutliche Herunterregulation auf.

Die Pyruvatkinase, M2 Isozym (**Pk3**) ist ein Enzym der Glykolyse. Je nachdem, ob das Enzym in dimerer oder tetramerer Form vorliegt, wird die Glucose entweder zu synthetischen Prozessen (dimer) oder zur glykolytischen Energiegewinnung (tetramer) herangezogen. In Tumorzellen überwiegt die dimere Form des Enzyms (Mazurek 2002, S. 23). Es ist bekannt, dass Bestrahlung zu einer Zunahme des glykolytischen Prozesses in Tumorzellen führt (Fujibayashi 1997, S. 729). Für die Pyruvatkinase M2 konnte hier nach Bestrahlung ein starker Wechsel zwischen Hoch- und Herunterregulation erkannt werden.

Zusammenfassend betrachtet zeichnen die strahleninduzierten Veränderungen der beobachteten Proteine ein Bild, das auf eine Hemmung der Apoptose hindeutet. Indiz dafür ist die deutliche Zunahme des Apoptoseinhibitors 14-3-3 zeta/delta und die Abnahme von MAPK9 und Impdh2. Diese Veränderungen decken sich mit der Beobachtung, dass es bei L929-Zellen nach Bestrahlung zu keiner Apoptose kommt (Abend 1995, S. 315).

Die Veränderungen der 26S Proteasom-Proteine deuten zum einen auf eine verminderten Proteinabbau und zum anderen auf eine verstärkte DNA-Reparatur hin.

Sowohl RAB1 als auch Figf haben Einfluss auf die Strahlenresistenz der Zelle. Bei Betrachtung ihrer Veränderungen sieht man zwei gegensinnige Effekte. RAB1 ist hochreguliert und deutet auf eine verstärkte Strahlenresistenz der L929-Zellen hin. Dies jedoch aufgrund der Annahme, dass RAB1 ähnlich manchen Mitgliedern der Ras-Familie Strahlenresistenz vermittelt. Figf ist entgegen der in der Literatur beschriebenen Veränderung unter Bestrahlung herunterreguliert (s.o.). Es ist jedoch auch beschrieben, dass eine Induktion des Proteins von der Dosis abhängig ist und im Falle dieser Untersuchung möglicherweise nicht ausreichend war, um eine Induktion zu bewirken. Außerdem ist bekannt, dass diese Induktion MAPK-abhängig ist. Die geringe Menge an Figf kann somit auch auf einer verminderten Aktivität des MAPK-Systems beruhen. Indiz hierfür ist das ebenfalls herunterregulierte Protein MAPK9.

Zeichen eines veränderten Zellstoffwechsels sind die strahleninduzierten Schwankungen von Pk3 und die Herunterregulation von OXCT, CCT5 und Rplp2.

## **5.4 Vergleich Proteine-Genexpression**

Wie bereits verschiedentlich dargestellt, kam es unter Bestrahlung zu einer deutlichen Veränderung der Proteinmenge. Eine ähnliche Veränderung auf mRNA-Ebene konnte jedoch nicht beobachtet werden. Ähnliche Abweichungen zwischen Protein- und mRNA-Menge wurden schon bei verschiedenen Autoren beschrieben: Anderson und Seilhamer beschrieben 1997 (S. 533) eine derartige Diskrepanz von Protein- und mRNA-Menge in der menschlichen Leber. Sie untersuchten dabei 19 Proteine mit ihren zugehörigen mRNAs. Futcher (1999, S. 7362) und Gygi (1998, S. 1723) bemerkten bei ihren Untersuchungen an Hefen ebenfalls, dass Protein- und mRNA-Level deutlich differierten. Auch Pradet-Balade (2001, S. 226) zeigte in ihrer Untersuchung, dass die Proteinmenge nicht mit der Menge an mRNA korrelierte. Bei der Untersuchung von humanen Brustkrebsproben stellte Fritz (2002, S. 635) ebenfalls eine erhöhte Menge fest, die auf mRNA-Ebene der Tumorzellen nicht beobachtet werden konnte.

Diese Beobachtungen widersprechen der bisherigen Annahme, dass die mRNA-Menge als verlässlicher Indikator für die korrespondierende Proteinmenge herangezogen werden kann. Dies steht im Einklang mit der Vermutung, dass der Schritt von der mRNA bis zum fertigen Proteinen weitaus komplexeren Regulationsmechanismus unterworfen ist. Ebenen auf denen Modulationen stattfinden können, sind:

1. Posttranskriptionelle Modifikationen der mRNA
2. Regulation der Translation
3. Proteindegradation

### **5.4.1 Posttranskriptionelle Modifikationen der mRNA**

Ein wichtiger Punkt in der Regulation der Translation von Proteinen ist die Lokalisation der Transkripte. Durch die Lokalisation ist es möglich, Proteine am Ort ihrer Bestimmung zu produzieren, die Produktion von Proteinen an einem Ort, an dem sie eine schädliche Wirkung entfalten könnten, zu vermeiden und eine strukturelle Basis für den Aufbau von bestimmten nicht-membran-gebundenen Organellen herzustellen.

Für die Lokalisation der mRNA wurden 4 Mechanismen beschrieben (Bashirullah 1998, S. 335). Am Beispiel der Drosophila wurde von Lipshitz und Smibert (2000, S. 476) gezeigt, dass eine Translation der Transkripte während ihres Transportes unterdrückt wird. Für diese Hemmung wurden Faktoren identifiziert, die an das Transkript gebunden sind. Werden diese Faktoren am Zielort gehemmt, kommt es zu einer Translation. Auf diese Art und Weise können die oben genannten Effekte erzielt werden.

Wichtig für den Export aus dem Kern, die Translation und die Stabilität der mRNA scheint der Poly(A)-Schwanz zu sein (Shatkin und Manley 2000, S. 838). Er befindet sich charakteristischerweise am 3'-Ende der mRNA. Im Zellkern wird er durch ein Poly(A)-Polymerase an das freie OH-Ende angehängt. Dieser Vorgang der Polyadenylierung muss aber nicht im Zellkern stattfinden. Er kann auch im Zytoplasma erfolgen. Man weiß, dass in der frühen embryonalen Entwicklung vieler Tiere und während der Reifung der Geschlechtszellen die Transkription weitgehend ausgeschaltet ist. Eine Verlängerung eines kurzen Poly(A)-Schwanzes schlafender zytoplasmatischer mRNAs stellt einen schnellen Schritt zu ihrer Stabilisierung und Aktivierung dar. Proteine können so ohne Transkription produziert werden (Richter 1999, S. 446). Dieser Mechanismus ist sehr nützlich, um in Zeiten von metabolischem Stress oder bei Beschädigung des Genoms die Transkription und die Prozessierung zu umgehen. Darüber hinaus läuft der Prozess der Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes schneller ab als die Transkription (Keller und Martin 2002, S. 468).

#### 5.4.2 Regulation der Translation

Eine Regulation der Translation (siehe Kap. 2) ist prinzipiell an jedem beteiligten Faktor denkbar. Am Besten untersucht ist bisher eine Regulation der Translation auf der Ebene der Initiation. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Initiationsfaktoren 2B und 4E:

Der eukaryote Initiationsfaktor 2B (eIF2B) ist neben vielen anderen Faktoren an der Initiation der Translation beteiligt. Durch eine vermehrte Phosphorylierung dieses Faktors kann es zu einer Inhibition der Proteinsynthese kommen (Vary 2002, E1032)

Der eukaryote Initiationsfaktor 4E (eIF4E) ist ein geschwindigkeits-limitierender Schritt in der Proteinsynthese (Schwarz 2002, S. 175). Er bindet an die Cap-Struktur des 5'-Endes der mRNA und erhöht die translationelle Effizienz, indem er die ribosomale Abtastung der mRNA erleichtert. Eine Phosphorylierung dieses Faktors ist bedeutend für normales Wachs-

tum und Entwicklung (Lachance 2002, S. 1656). Man weiß, dass eine chronische Überexpression von eIF4E zu einer Zelltransformation führt. Diese rührt von einer Hochregulation mit Wachstum assoziierter Proteine her (Schwarz 2002, S. 175).

Werden MCF7-Zellen Apoptose-induzierenden Stoffen ausgesetzt, kommt es unter Einbeziehung des Caspase-Mechanismus durch Modifikationen entsprechender Initiationsfaktoren zu einer schnellen Hemmung der Proteinsynthese (Jeffrey 2002, S. 2272).

### 5.4.3 Proteindegradation

Eine Veränderung der Proteinmenge kann, wie unter Kap. 5.4.2 beschrieben, auf der Ebene der Synthese geschehen oder auf einen verminderten bzw. verstärkten Abbau der Proteine zurückgeführt werden. Für den Abbau von Proteinen in der Zelle sind 3 Mechanismen bekannt:

1. Ubiquitin-Proteasom System
2. Endosom-Lysosom System
3. Calpain-Caspase System

Das Ubiquitin-Proteasom System scheint beim Abbau von kurzlebigen Proteinen eine zentrale Rolle zu spielen. Ein Protein, das abgebaut werden soll, muss, um von dem 26S Proteasom erkannt zu werden, mit einem Ubiquitinrest versehen sein. Nach Erkennung dieses Restes wird das Protein durch das 26S Proteasom proteolytisch gespalten.

Der Abbau im Endosom-Lysosom System kann über zwei Wege erfolgen. Zum einen kann das zytosolische Protein direkt, zum anderen nach einer Ubiquitinierung (v.a. Membranrezeptorproteine) in das Lysosom aufgenommen werden.

Die Proteindegradation über das Calpain-Caspase System ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Calpain ist eine Cystein-Protease. Einige Studien zeigen ihre Rolle bei Nekrose und Apoptose (Nakai 2001, S. 105).

#### 5.4.4 Strahlenspezifische Effekte

Die Diskrepanz zwischen der in der Regel unveränderten Genexpression und der korrespondierenden erhöhten bzw. erniedrigten Proteinmenge könnte auf einen strahlenspezifischen Effekt zurückzuführen sein: Für *E. coli* wurde nach Strahlenexposition (16.000 Rad) eine Degradation verschiedener RNA-Spezies gefunden. Dies wurde auf eine erhöhte RNase-Aktivität zurückgeführt, die in verschiedenen Organen nach Ganzkörperbestrahlung beobachtet wurde (Streffer 1969, S.54). So könnte nach 6 Gy Strahlenexposition in L929 die RNase-Aktivität erhöht worden sein. Dies führt zu einem Abbau möglicherweise hochregulierter RNA-Spezies, so dass mit Hilfe der RTQ-PCR schließlich RNA-Mengen im Kontrollniveau, aber keine Hochregulation gemessen wurde.

Als besonders strahlenempfindlich erwiesen sich zudem Proteine, die Sulfhydrylgruppen enthielten. Als möglicher Mechanismus wird eine Reaktion mit strahleninduzierten Radikalen diskutiert (Streffer 1969, S. 71). So wird beispielsweise für das Protein Ribonuclease eine strahleninduzierte Störung der nativen Proteinkonformation beschrieben. Diese geht mit einer gesteigerten Aggregation des Proteins einher, das durch Trypsin leichter abgebaut wird. Solche strahleninduzierten Abbauprozesse von Proteinen könnten die verminderten Proteinmengen, die nach 6 Gy Strahlenexposition in L929 gefunden wurden, erklären helfen.

Einschränkend für diese Interpretation muss berücksichtigt werden, dass sehr hohe Strahledosen und einfach Modellen (*E. coli*) zum Einfluss ionisierender Strahlen auf die RNA und Proteine untersucht wurden.

#### 5.4.5 Modifikation der Untersuchungsmethode

Wie oben bereits dargestellt (Kap. 5.4.), hat es sich gezeigt, dass Änderungen der mRNA-Menge keine eindeutigen Rückschlüsse auf die korrespondierende Proteinmenge und umgekehrt zulassen. Es ist bekannt, dass die Translation für jedes Gen spezifisch ist und zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzykluses differiert. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Betrachtung von mRNA, die tatsächlich translatiert wird, verlässlichere Rückschlüsse auf die korrespondierende Proteinmenge erlaubt. Bei Bestimmung der mRNA wird dies jedoch nicht berücksichtigt. Korrelat der tatsächlich translatierten mRNA ist die mit Ribosomen besetzte mRNA. Diese wird auch als Polysom bezeichnet. Eine Auftrennung von Ribosomen-



gebundener und freier mRNA kann mit einem Sucrose-Gradienten erreicht werden. Die Summe dieser einzelnen Fraktionen entspricht der Gesamt-mRNA (Pradet-Balade 2001, S. 1352). Pradet-Balade (2001, S. 228) hat gezeigt, dass bei Vergleich von Proteinmenge und Polysom-gebundener mRNA diese sehr stark miteinander korrelierten. Es konnte für 10 – 20 % der untersuchten Gene dargestellt werden, dass bei Betrachtung der Polysom-gebundenen mRNA Veränderungen auftraten, die man an der Gesamt-mRNA nicht erkennen konnte.

## 5.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erbrachten Veränderungen in der Proteinmenge, die zum einen eine unterdrückte Apoptose und zum anderen Modifikationen im Zellmetabolismus ausdrücken. Diese Veränderungen konnten jedoch auf Ebene der mRNA nicht beobachtet werden.

Da die Proteine aus der Translation der mRNA entstehen, könnte man annehmen, dass die Menge an Protein der Menge an mRNA entspricht. Da sich in den hier durchgeführten Untersuchungen jedoch Gegenteiliges gezeigt hat, stellt sich die Frage nach den Ursachen. Es konnten hierfür sowohl Faktoren auf Ebene der Synthese und des Abbaus der Proteine und RNA als auch Faktoren, die die Detektion von mRNA- bzw. Proteinmenge betreffen, eruiert werden.

Eine große Bedeutung kommt hier sicherlich der Beobachtung zu, dass die Menge an Proteinen besser mit der Menge an Polysom-gebundener mRNA korreliert als mit der Gesamt-mRNA. Es empfiehlt sich daher in Zukunft sicherlich Untersuchungen über Korrelation von mRNA- und Proteinmenge mit aufgetrennter mRNA durchzuführen.

Daneben spielt auch die fehlerhafte Lokalisation der mRNA eine große Rolle. Durch die fehlende Hemmung des Translationsinhibitors bleibt somit die Menge an mRNA konstant, die Menge an Protein nimmt jedoch ab bzw. bei korrekter Lokalisation, zu. Eine weitere Möglichkeit, die die beobachtete Diskrepanz auf mRNA-Niveau erklären würde, ist die Translation der mRNA aktiviert durch Verlängerung eines kurzen Poly(A)-Schwanzes. Diese Art der Proteinsynthese scheint vermehrt in Zeiten zellulären Stresses von Bedeutung zu sein und ebenfalls mit einer konstant bleibenden mRNA-Menge einherzugehen.

Auch Veränderungen auf Ebene der Translation können die beobachteten Alterationen bewirken. Über eine Hemmung der Schlüssel-Initiationsfaktoren 2B und 4E kann es bei gleichblei-

bender mRNA-Menge zu einer Abnahme der Proteinmenge kommen. In diesem Falle müssten jedoch alle Proteine betroffen sein. RAB1 und KCIP-1 weisen jedoch eine erhöhte Proteinmenge auf.

Ebenso kann eine Regulation der Proteinmenge über den Abbau der Proteine beeinflusst werden. Durch eine verstärkte Markierung der Proteine mit Ubiquitin kann dieser induziert werden. Um das hier beobachtete Bild zu bekommen, müsste auch diese Modifikation sehr selektiv sein.

Zuletzt kann es sich bei den beobachteten Veränderungen um strahlenspezifische Effekte handeln. Dabei tritt strahleninduziert eine erhöhte RNase-Aktivität auf. Möglicherweise hochregulierte RNA-Spezies können dadurch vermehrt abgebaut werden und damit das Bild scheinbar unveränderter RNA-Mengen nach Strahlenexposition erklären. Zum anderen kann es durch Bestrahlung zu Störungen in der Proteinkonfiguration kommen. Die dadurch verursachte Aggregation des Proteins führt zu einem leichteren Abbau des Proteins durch Trypsin. Dies stellt eine weitere mögliche Erklärung für erniedrigte Proteinmengen nach Bestrahlung dar.

## 6 Zusammenfassung

Ein bedeutendes Ziel in der radiobiologischen Forschung ist die Detektion biologischer „Marker“, die eine Schädigung von Zellen nach Bestrahlung möglichst früh aufzeigen. Anhand eines solchen Markers wäre es möglich, Strahlenschäden früh zu erkennen und in adäquater Weise zu behandeln bzw. die Therapie zu optimieren.

Die vorliegende Arbeit spiegelt das Ergebnis einer Untersuchungsreihe wider, die die Gene der durch Bestrahlung veränderten Proteine von L929-Zellen mit der RTQ-PCR untersucht. Die sich aus dieser quantitativen Messung der mRNA ergebende Menge wurde mit der in einer 2D Elektrophorese bestimmten Menge des entsprechenden Proteins verglichen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinmenge nach Bestrahlung z.T. bis um den Faktor 25 von der Kontrolle abwichen. Die Menge an mRNA wurde durch Bestrahlung jedoch nicht verändert. Ein Indikator für Strahlenschäden auf mRNA-Ebene ist daher bislang nicht auffindig zu machen.

Auffallend an den Ergebnissen dieser Untersuchung war die Divergenz zwischen mRNA- und Proteinmenge. Bisher hatte man angenommen, dass von der mRNA-Menge auf die entsprechende Proteinmenge geschlossen werden kann. Die Analyse dieser Ergebnisse erbrachte mögliche Ursachen für dieses Phänomen einerseits auf biologischer (Synthese und Abbau), andererseits auf methodischer Ebene.

Veränderungen auf biologischer Ebene sind in den einzelnen Schritten von der mRNA zum Protein zu suchen. So können zum einen posttranskriptionelle Modifikationen der mRNA, wie fehlerhafte Lokalisation der mRNA oder Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes zur Aktivierung der mRNA, zu einem veränderten Proteinniveau bei konstanter mRNA-Menge führen. Des Weiteren kann eine Inhibition bzw. Aktivierung bestimmter Translationsfaktoren ein ähnliches Ergebnis erbringen. Aber auch ein vermehrter Abbau von Proteinen durch Ubiquitierung könnte zu den hier beschriebenen Ergebnissen führen. Ebenfalls möglich sind strahlenspezifische Effekte, die einen vermehrten Abbau von RNA und/oder Proteinen bedingen könnten.

Auf analytischer Ebene gilt eine besondere Aufmerksamkeit der Beobachtung, dass Polyso-men-gebundene mRNA deutlich besser mit der Proteinmenge korreliert als die Messung einer nicht-aufgetrennten mRNA.

Da in dieser Arbeit die Untersuchungen an der nicht-aufgetrennten mRNA durchgeführt wurden, erscheint es sinnvoll, in zukünftigen Untersuchungen mit aufgetrennter Polysomen-gebundener mRNA zu arbeiten.

## 7 Literaturverzeichnis

**Abend, M., Rhein, A., Gilbertz, K.P., Blakely, W.F., van Beuningen, D.**

Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death

*Int J Radiat Biol* 67 (1995) 315-326

**Abend, M., Kehe, K., Kehe, K., van Beuningen, D.**

Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death can be improved by considering other modes of death

*Int J Radiat Biol* 76 (2000) 249-259

**Anderson, L., Seilhamer, J.**

A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver

*Electrophoresis* 18 (1997) 533-537

**Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., Lipshitz, H.D.**

RNA localization in development

*Annu Rev Biochem* 67 (1998) 335-394

**Bodis, S.**

Neues Wissen über die Strahlenwirkung: Krebszellprogrammfehler als mögliche Angriffspunkte der Strahlentherapie

*Bulletin der Krebsliga des Kantons Zürich* (1998)

**Fields, S.**

Proteomics in Genomeland

*Science* 291 (2001) 1221-1224

**Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M., Kaina, B.**

Rho GTPases in human breast tumours and mutation analyses and correlation with clinical parameters

*Br J Cancer* 87 (2002) 635-644

**Fujibayashi, Y., Waki, A., Sakahara, H., Konishi, J., Yonekura, Y., Ishii, Y., Yokoyama, A.**

Transient increase in glycolytic metabolism in cultured tumor cells immediately after exposure to ionizing radiation: from gene expression to deoxyglucose uptake

*Radiat Res* 147 (1997) 729-734

**Fukao, T., Mitchell, G.A., Song, X.Q., Nakamura, H., Kassovska-Bratinova, S., Orii, K.E., Wraith, J.E., Besley, G., Wanders, R.J., Niezen-Koning, K.E., Berry, G.T., Palmieri, M., Kondo, N.**

Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT): cloning of the human SCOT gene, tertiary structural modeling of the human SCOT monomer, and characterization of three pathogenic mutations

*Genomics* 68 (2000) 144-151

**Futcher, B., Latter, G.I., Monardo, P., McLaughlin, C.S., Garrels, J.I.**

A Sampling of the Yeast Proteome

*Mol Cell Biol* 19 (1999) 7357-7368

**Gademann, G.**

Strahlentherapie aktuell: Bewährtes und Neues

*Schriftenreihe des Tumorzentrums Magdeburg/Sachsen-Anhalt e.V.* (1996)

**Gerner, C., Frohwein, U., Gotzmann, J., Bayer, E., Gelbmann, D., Bursch, W., Schulte-Hermann, R.**

The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis

*J Biol Chem* 275 (2000) 39018-39026

**Gorski, D.H., Beckett, M.A., Jaskowiak, N.T., Calvin, D.P., Mauceri, H.J., Salloum, R.M., Seetharam, S., Koons, A., Hari, D.M., Kufe, D.W., Weichselbaum, R.R.**

Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation

*Cancer Res* 59 (1999) 3374-3378

**Gu, J.J., Gathy, K., Santiago, L., Chen, E., Huang, M., Graves, L.M., Mitchell, B.S.**

Induction of apoptosis in IL-3-dependent hematopoietic cell lines by guanine nucleotide depletion

*Blood* 101 (2003) 4958-4965

**Gupta, V.K., Jaskowiak, N.T., Beckett, M.A., Mauceri, H.J., Grunstein, J., Johnson, R.S., Calvin, D.A., Nodzenski, E., Pejovic, M., Kufe, D.W., Posner, M.C., Weichselbaum, R.R.**

Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance

*Cancer J* 8 (2002) 47-54

**Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R.**

Correlation between protein and mRNA abundance in yeast

*Mol Cell Biol* 19 (1999) 1720-1730

**Hagemann, C., Blank, J.L.**

The ups and downs of MEK kinase interactions

*Cell Signal* 13 (2001) 863-75

**Hanash, S.M., Bobek, M.P., Rickmann, D.S., Williams, T., Rouillard, J.M., Kuick, R., Puravs, E.**

Integrating cancer genomics and proteomics in the post-genome era

*Proteomics* 2 (2002) 69-75

**Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., Gordon, C.**

Transferring substrates to the 26S proteasome

*Trends Biochem Sci* 28 (2003) 26-31

**Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingham, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.**

14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression

*Mol Cell* 1 (1997) 3-11

**Ishikawa, M., Kitayama, J., Kazama, S., Nagawa, H.**

Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma

*Jpn J Clin Oncol* 33 (2003) 21-27

**Jayaram, H.N., Cooney, D.A., Grush, M.**

Consequences of IMP dehydrogenase inhibition, and its relationship to cancer and apoptosis

*Curr Med Chem* 6 (1999) 561-74

**Jeffrey, I.W., Bushell, M., Tilleray, V.J., Morley, S., Clemens, M.J.**

Inhibition of protein synthesis in apoptosis: differential requirements by the tumor necrosis factor alpha family and a DNA-damaging agent for caspases and the double-stranded RNA-dependent protein kinase

*Cancer Res* 62 (2002) 2272-2280

**Jeremias, I., Kupatt, C., Baumann, B., Herr, I., Wirth, T., Debatin, K.M.**

Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells

*Blood* 91 (1998) 4624-4631

**Jones, H.A., Hahn, S.N., Bernhard, E., Mckenna, W.G.**

Ras inhibitors and radiation therapy

*Semin Radiat Oncol* 11 (2001) 326-327

**Keller, W., Martin, G.**

Gene regulation: Reviving the message

*Nature* 419 (2002) 267-268

**Knippers, R.**

Messenger-RNA im Cytoplasma.

In: „Molekulare Genetik“, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001, 8. neu bearbeitete Auflage, 421-440



**Kozak, M.**

An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 messenger RNAs

*Nucleic Acids Res* 15 (1987) 8125-8148

**Kubota, H., Yokota, S., Yanagi, H., Yura, T.**

Structures and coregulated expression of the genes encoding mouse cytosolic chaperonin CCT subunits

*Eur J Biochem* 262 (1999) 492-500

**Kubota, H.**

Function and regulation of cytosolic molecular chaperone CCT

*Vitam Horm* 65 (2002) 313-331

**Lachance, P.E., Miron, M., Raught, B., Sonenberg, N. And Lasko, P.**

Phosphorylation of eukaryotic translation factor 4E is critical for growth

*Mol Cell Biol* 22 (2002) 1656-1663

**Lee, Y., Kim, H.K., Park, H.E., Park, M.H., Joe, Y.A.**

Effect of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on endothelial cell growth, differentiation and apoptosis

*Mol Cell Biochem* 237 (2002) 69-76

**Lewin, B.**

Vom Gen zum Protein

In: „Molekularbiologie der Gene“, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998, 125-228

**Lipshitz, H.D., Smibert, C.A.**

Mechanisms of RNA localization and translational regulation

*Curr Opin Genet Dev* 10 (2000) 476-488

**Lommel, L., Chen, L., Madura, K., Sweder, K.**

The 26S Proteasome negatively regulates the level of overall genomic nucleotide excision repair

*Nucleic Acids Res* 28 (2000) 4839-4845

**Martinez, O., Goud, B.**

Rab proteins

*Biochim Biophys Acta* 1404 (1998) 101-112

**Mazurek, S., Grimm, H., Boschek, C.B., Vaupel, P., Eigenbrodt, E.**

Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome

*Br J Nutr* 87 Suppl 1 (2002) 23-29

**Mori, K., Tani, M., Kamata, K., Kawamura, H., Urata, Y., Goto, S., Kuwano, M., Shibata, S., Kondo, T.**

Mitogen-activated protein kinase, ERK1/2, is essential for the induction of vascular endothelial growth factor by ionizing irradiation mediated by activator protein-1 in human glioblastoma cells

*Free Radic Res* 33 (2000) 157-66

**Moyer, B.D., Allan, B.B., Balch, W.E.**

Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering

*Traffic* 2 (2001) 268-27

**Nakai, K.**

Review: Prediction of in vivo fates of proteins in the era of genomics and Proteomics

*J Struct Biol* 134 (2001) 103-116

**Nakamura, Y., Yasuoka, H., Tsujimoto, M., Yang, Q., Imabun, S., Nakahara, M., Nakao, K., Nakamura, M., Mori, I., Kakudo, K.**

Prognostic significance of vascular endothelial growth factor in breast carcinoma with long-term follow-up

*Clin Cancer Res* 9 (2003) 716-721

**Pajonk, F., McBride, W.H.**

Ionizing radiation affects 26S proteasome function and associated molecular responses, even at low doses

*Radiother Oncol* 59 (2001) 203-212

**Pajonk, F., McBride, W.H.**

The proteasome in cancer biology and treatment

*J Radiat Res* 156 (2001) 447-459

**Park, J.S., Qiao, L., Su, Z.Z., Hinman, D., Willoughby, K., McKinstry, R., Yacoub, A., Duigou, G.J., Young, C.S., Grant, S., Hagan, M.P., Ellis, E., Fisher, P.B., Dent, P.**

Ionizing radiation modulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression through multiple mitogen activated protein kinase dependent pathways

*Oncogene* 20 (2001) 3266-3280

**Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I. Hellen, C.U.**

Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes

*Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 7029-7036

**Pradet-Balade, B., Boulme, F., Beug, H., Mullner, E.W., Garcia-Sanz, J.A.**

Translation control: bridging the gap between genomics and Proteomics

*Trends Biochem Sci* 26 (2001) 225-229

**Pradet-Balade, B., Boulme, F., Mullner, E.W., Garcia-Sanz, J.A.**

Reliability of mRNA profiling: verification for samples with different complexities

*Biotechniques* 30 (2001) 1352-1357

**Pschyrembel**

Medizinisches Wörterbuch

Nikol Verlagsgesellschaft mbH, Hamburg, 1994, 257. Auflage, 1556

**Richter, J.D.**

Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond

*Microbiol Mol Biol Rev* 63 (1999) 446-456

**Schwarz, K.W., Murray, M.T., Sylora, R. Sohn, R.L., Dulchavsky, S.A.**

Augmentation of wound healing with translation factor eIF4E mRNA

*J Surg Res* 103 (2002) 175-182

**Segev, N.**

Ypt/rab GTPases: regulators of protein trafficking

*Sci STKE* (2001) RE11

**Shatkin, A.J., Manley, J.L.**

The ends of the affair: capping and polyadenylation

*Nat Struct Biol* 7 (2000) 838-842

**Sonenberg, N., Dever, T.E.**

Eukaryotic translation initiation factors and regulators

*Curr Opin Struct Biol* 13 (2003) 56-63

**Streffer, C.**

Strahlen-Biochemie

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1969, Reihe Heidelberger Taschenbücher

**Szkanderova, S., Hernychova, L., Kasakova, I., Vavrova, J., Stulik, J., Abend, M., van****Beuningen, D.**

Proteomic analysis of radiation-induced alterations in L929 cells

*Folia Biol (Praha)* 49 (2003) 15-25

**Takahashi, K., Inamani, O., Hayashi, M., Kuwabara, M.**

Protein synthesis-dependent apoptic signaling pathway in X-irradiated MOLT-4 human leukaemia cell line

*Int J Radiat Biol* 78 (2002) 115-24

**Takeuchi, K., Nakamura, K., Fujimoto, M., Kaino, S., Kondoh, S., Okita, K.**

Heat stress-induced loss of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) in a human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2, analysed by two-dimensional gel electrophoresis

*Electrophoresis* 23 (2002) 662-669

**Tanaka, H., Iguchi, N., Miyagawa, Y., Koga, M., Kohroki, J., Nishimune, Y.**

Differential expression of succinyl CoA transferase (SCOT) genes in somatic and germline cells of the mouse testis

*Int J Androl* 26 (2003) 52-56

**Vary, T.C., Deiter, G., Kimball, S.R.**

Phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF2epsilon in skeletal muscle during sepsis

*Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 (2002) E1032-1039

**Wahl, M.C., Moller, W.**

Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins

*Curr Protein Pept Sci* 3 (2002) 93-106

**Xing, H., Zhang, S., Weinheimer, C., Kovacs, A., Muslin, A.J.**

14-3-3 protein block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades

*EMBO J* 19 (2000) 349-358

**Yalowitz, J.A., Jayaram, H.N.**

Molecular targets of guanine nucleotides in differentiation, proliferation and apoptosis

*Anticancer Res* 20 (2000) 2329-2338

**Yokoyama, Y., Charnock-Jones, D.S., Licence, D., Yanaihara, A., Hastings, J.M., Holland, C.M., Emoto, M., Umemoto, M., Sakamoto, T., Sato, S., Mizunuma, H., Smith, S.K.**

Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma

*Br J Cancer* 88 (2003) 237-244

## Danksagung

Am Ende dieser Arbeit angelangt, möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die sie ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

So möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Molls für die Übernahme dieser Doktorarbeit und die Erstellung des Gutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. D. van Beuningen danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut sowie die großzügige Bereitstellung der benötigten Materialien.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. M. Abend für die freundliche Überlassung des Themas, die ausgezeichnete und kompetente Betreuung, seine stets freundliche, offene und gesprächsbereite Haltung und die immerwährende Unterstützung in allen Aspekten der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. M. Port, der mir besonders während der Laborarbeit ruhig und gelassen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau I. Nuyken danke ich ganz herzlich für die fachkundige und engagierte Einweisung im Labor und die vielen anregenden und gewinnbringenden Diskussionen. Darüber hinaus gilt mein Dank Frau M. Katipoglu für die herzliche Zusammenarbeit.

Bei allen nicht namentlich erwähnten Institutsmitgliedern bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme.

Meinen Eltern, Johanna und Bruno Götz danke ich von Herzen dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich dabei immer so liebevoll unterstützt haben. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Brüdern Christian, Manuel und Felix Götz, die mir sowohl in technischer als auch menschlicher Hinsicht stets eine große Hilfe waren, bedanken.

Aus tiefstem Herzen danke ich meiner lieben Freundin Frau Dr. rer. pol. Heidi Winkler für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die zahlreichen Anregungen und besonders für ihren unermüdliche Unterstützung, den grenzenlosen Zuspruch und ihre unendliche Geduld. Ebenso danke ich Herrn Andreas Schlicker für seine konstruktiven Verbesserungsvorschläge und seine liebevolle Unterstützung.

Allen Freunden und Mitbewohnern des Willi-Graf-Wohnheims ein herzliches „Dankeschön“ für die guten Gespräche und immer wieder schönen und einzigartigen Ablenkungen.

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

---

Name: Götz  
Vorname: Susanne Ulrike  
Geburtsdatum: 27. Dezember 1977  
Geburtsort: Kaufbeuren  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulische Ausbildung**

---

1984 – 1988 **Grundschule** Buchloe  
1988 – 1997 **Mariengymnasium** Kaufbeuren  
06/97 **Abitur**

### **Studium**

---

05/98 – 04/00 Studium der Medizin an der LMU München  
03/00 **Ärztliche Vorprüfung**  
05/00 – 11/04 Studium der Medizin an der TU München  
03/01 **1. Staatsexamen**  
09/03 **2. Staatsexamen**  
11/04 **3. Staatsexamen**

### **Praktika**

---

08/97 – 10/97 Krankenpflegepraktikum, Krankenhaus St. Josef, Buchloe  
(Innere Medizin)  
09/99 Krankenpflegepraktikum, Kreiskrankenhaus Landsberg/Lech  
(Innere Medizin)

**Famulaturen**

---

08/00	<b>Chirurgie</b> , Klinikum Kaufbeuren-Ostallgäu
07/01 - 08/01	<b>Innere Medizin</b> , Städtischen Krankenhaus Schwabmünchen
02/02 - 03/02	<b>Pädiatrie</b> , Praxis Dr. Baumann & Schall, Bad Wörishofen
02/03 – 03/03	<b>Anästhesiologie</b> , Krankenhaus St. Josef, Buchloe

**Praktisches Jahr**

---

10/03 – 02/04	<b>Innere Medizin</b> Klinikum Rechts der Isar, München
02/04 – 05/04	<b>Chirurgie</b> Klinikum St. Elisabeth, Straubing
06/04 – 09/04	<b>Gynäkologie und Geburtshilfe</b> Kantonsspital Uri, Altdorf (Schweiz)

**Sonstiges**

---

01/01 – 12/03	Tätigkeit als <b>studentische Hilfskraft</b> im Institut für Röntgendiagnostik am Klinikum Rechts der Isar, München
---------------	--

**Assistenzzeit**

---

Seit 06/05	Assistenzärztin Gynäkologie/Geburtshilfe im Spitalzentrum Oberwallis, Standort Visp, Schweiz
------------	---