

Sabine Maertens  
Dr. sc. hum.

## **NIAC-NTR - Eine neue Methode zur Analyse von neutranskribierter und steady-state mRNA**

Geboren am 18. Juni 1979 in Leverkusen  
Staatsexamen der Fachrichtung Pharmazie am 17. Februar 2004 an der Universität Bonn

Promotionsfach: DKFZ  
Doktorvater: Prof. Dr. med. H.-J. Gröne

Die Expression von Genen ist ein vielschichtiger Prozess, der sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene durch verschiedenste Mechanismen reguliert wird. Eine detaillierte Analyse der einzelnen Ebenen kann deshalb dem Verständnis der Vorgänge in Zellen, z.B. in gesundem und krankhaft verändertem Gewebe dienen. Die Unterteilung der Genexpression in neutranskribierte und steady-state RNA ist dementsprechend ein wichtiger Bestandteil einer solchen Analyse.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode etabliert, bei der neutranskribierte RNA (NT-RNA) mit 4-Thiouridin markiert und selektiv über eine auf Agarose basierende Quecksilbermatrix angereichert wird. Alle Zellen und Gewebe, deren Pyrimidinmetabolismus zumindest teilweise über den *Salvage-pathway* verläuft, sind der Markierung mit 4-Thiouridin zugänglich. Nach der erfolgreichen *in vitro* Etablierung der NIAC-NTR (*Non-Invasive Application and Capture of Newly Transcribed RNA*) genannten Technik, wurde die Methode auf eine *in vivo* Situation übertragen. In einem Modell für das ischämische akute Nierenversagen in der Maus wurde gezeigt, dass durch die Kombination der Genexpressionsdaten von NT-RNA und steady-state RNA zusätzliche Informationen gewonnen werden: Einige funktionelle Gruppen enthielten viele Gene, die nur durch die Analyse der NT-RNA als differentiell reguliert gefunden wurden. Bei der herkömmlichen Expressionsanalyse der steady-state RNA wäre die potentielle Bedeutung dieser funktionellen Gruppen zumindest zu dem untersuchten Zeitpunkt nicht erkannt worden. So wurde z.B. die differentielle Regulation des Proteasom-Komplexes, dessen Bedeutung bei der ischämischen Schädigungen von Organen auf Proteinebene bereits in der Literatur beschrieben wurde, nur über die Analyse der NT-RNA gefunden. Des Weiteren wurde deutlich, dass mit der neuen Methode unterschieden werden kann, ob mRNAs vorwiegend transkriptionell oder über eine Veränderung der Stabilität reguliert werden. Die qRT-PCR Daten aus den Actinomycin D Experimenten beweisen dies eindrücklich. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Markierung mit 4-Thiouridin nicht zytotoxisch ist, und dass alle mRNAs unabhängig von ihrer Länge erfasst werden.

Die NIAC-NTR Methode ist ein völlig neuer Ansatz, der der nukleären run-on Technik, mit der transkriptionelle Vorgänge bisher hauptsächlich untersucht wurden, deutlich überlegen ist. Der größte Vorteil liegt in der nicht invasiven Natur der NIAC-NTR Technik, die eine

Ausdehnung der Analyse auf *in vivo* Fragestellungen gestattet. Zudem ermöglicht die Kompatibilität mit modernen fluoreszenzbasierten Hochdurchsatztechniken die Untersuchung der Genexpressionsprofile von Geweben oder ganzen Organen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Herz, Leber, Lunge, Milz, Niere und Gehirn (mit Einschränkungen) viele wichtige Organe der Analyse mit der NIAC-NTR Technik prinzipiell zugänglich sind. Die Organe, die für Pyrimidin die *de-novo* Synthese bevorzugen, könnten mit Thioorotsäure markiert werden. Darüber hinaus könnte die Generierung transgener Tiere, deren NT-RNA mit Thiouracil markiert wird, voraussichtlich die Analyse aller Gewebe, unabhängig von ihrem bevorzugten Pyrimidinmetabolismus, ermöglichen.