

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen (Department)
Abteilung Innere Medizin V, Sportmedizin
(Schwerpunkte: Leistungsmedizin, spezielle Prävention, spezielle
Rehabilitation)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Nieß

**Differentielle Regulation und subzelluläre Lokalisation
verschiedener Transkripte der Serum- und Glukokortikoid
induzierten Kinase 1 *in vivo* und *in vitro***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Tabea Bianca Hochstetter
aus
Mühlacker

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nieß

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

meinem Vater

1 EINLEITUNG.....	4
1.1 Der Körper unter Stress - Anpassungsreaktionen auf physische Belastungen.....	4
1.1.1 Anpassungen an akute körperliche Belastung.....	4
1.1.2 Körperliche Belastung als Stressfaktor für das Immunsystem	6
1.1.3 Hypoxie als belastender Umweltfaktor.....	8
1.2 Anpassungsreaktionen auf molekularer Ebene	10
1.2.1 klassische Transaktivierung	10
1.2.2 Bedeutung schneller molekularer Veränderungen auf Belastung und physikalische Reize	13
1.2.3 Transkriptionsunabhängige Mechanismen	14
1.3 SGK1 als mögliches Schlüsselgen für die Sofortvermittlung von Anpassungsreaktionen	17
1.3.1 SGK1 als <i>Immediate Early Gene</i> (IEG)	17
1.3.2 SGK1 vermittelte Effekte und ihre Bedeutung bei Belastung	19
1.4 Arbeitshypothese	22
2 MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1 Bioinformatische Methoden	23
2.1.1 <i>GeneOntology</i> Suchanfragen.....	23
2.1.2 Multiple Sequenzabgleiche und <i>in silico</i> Expressionsanalysen mittels <i>GenomeBrowser</i> ...	24
2.2 Patientengut und Versuchssettings.....	26
2.2.1 <i>in vitro</i> -Versuche	26
2.2.2 <i>in vivo</i> -Versuche.....	27
2.3 Aufarbeitung der Blutproben	28
2.3.1 Lymphozytenisolation, PBMC-Gewinnung.....	28
2.3.2 Isolation zellulärer RNA.....	29
2.3.3 Aufbereitung der RNA	29
2.3.4 Gewinnung von cDNA unter Verwendung reverser Transkriptase und 3'RACE.....	30
2.4 PCR	32
2.4.1 Grundlagen.....	32
2.4.2 Quantitative <i>Real-Time-RT-PCR</i>	32
2.4.3 Primerauswahl und Bestimmung der PCR-Effizienz.....	33
2.4.4 PCR-Setting und Schmelzkurvenanalyse	36

2.5	statistische Auswertung	38
2.5.1	<i>Real-Time</i> RT-PCR	38
2.6	Gelelektrophorese.....	39
3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	in silico-Analysen	40
3.1.1	<i>GeneOntology</i> -Analyse	40
3.1.2	Analyse der 3'-UTR des humanen SGK1-Gens	41
3.1.3	3'-UTR – hohe Konservierung zwischen unterschiedlichen Spezies und den verschiedenen IEGs	43
3.1.4	SGK-Pseudogene auf Chromosom 1 und 5	45
3.1.5	SGK1-mRNA Variantenreichtum.....	49
3.2	in vitro-Untersuchungen.....	52
3.2.1	Expression der Pseudogene	52
3.2.2	Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben.....	53
3.2.3	Stimulation von Myotuben mit Kobaltchlorid (CoCl ₂)	56
3.2.4	PBMC-Stimulation mit Lipopolysacchariden	60
3.2.5	PBMC-Stimulation mit Noradrenalin	62
3.3	in vivo-Untersuchungen	67
3.3.1	Halbmarathon – erschöpfende Ausdauerbelastung.....	67
3.3.2	kurzfristige, normobare Hypoxieexposition unter Placebo- bzw. Antioxidatengabe	68
3.4	subzelluläre Lokalisation der SGK1-Primer	69
4	DISKUSSION.....	71
4.1	Möglichkeit alternativer SGK1-mRNA-Enden (in silico-Untersuchungen)	71
4.2	Nachweis alternativer SGK1-mRNA-Varianten, Verhalten unter den unterschiedlichen Stressstimuli	73
4.2.1	Differenzierung	73
4.2.2	Entzündung	74
4.2.3	Hypoxie	75
4.2.4	NA-Stimulation	77
4.2.5	Ausdauerbelastung	77

4.3	SGK1-lv – Funktion / Bedeutung?.....	78
4.4	5´-Bereich / Promotorregion.....	80
4.5	subzelluläre Lokalisation & inverted repeats.....	84
5	ZUSAMMENFASSUNG	87
6	LITERATURVERZEICHNIS	89
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	98

1 Einleitung

1.1 Der Körper unter Stress - Anpassungsreaktionen auf physische Belastungen

Täglich ist unser Körper Situationen ausgesetzt, die den Organismus angreifen und ihm potentiellen Schaden zufügen können. Solche Stress auslösenden Faktoren können von außen auf den Körper wirken und als exogene, umweltbedingte Stressoren fungieren oder aber auch vom Körper selbst produziert werden und somit als endogene Stressfaktoren in Erscheinung treten. Die Auswirkungen der Stressstimuli auf die einzelne Zelle können dabei sehr unterschiedlich ausfallen und von der Hypertrophie eines Zellverbandes über DNA-Mutationen bis hin zum programmierten Zelltod der einzelnen Zelle reichen. Um potentielle Gefahren erkennen und adäquat darauf reagieren zu können, bedarf es daher eines zuverlässigen und schnell funktionierenden intrazellulären Netzwerkes, welches proliferativen, adaptiven sowie das Überleben der einzelnen Zellen sichernde Reaktionen einleitet. Gleichzeitig muss es allerdings auch fähig sein, Zellen die zu stark geschädigt sind, zum Wohl des Gesamtorganismus zu eliminieren und den Weg zum Zelltod zu bereiten (Leong et al. 2003).

1.1.1 Anpassungen an akute körperliche Belastung

Sport als körperliche Betätigung zur Steigerung des physischen und psychischen Wohlbefindens hat in unserem Leben einen wichtigen und stetig steigenden Stellenwert eingenommen. Während des Trainings wird unser Organismus ständig der Herausforderung gestellt, sich präzise und schnell an die wechselnden Anforderungen der Belastung anzupassen, sein inneres Gleichgewicht zu behalten und als Adaptationsmechanismus die gewünschte physische Fitness zu entwickeln (Mastorakos & Pavlatou 2005). Anpassungen an körperliches Training zeigen sich auf kardiopulmonaler, metabolischer und hormoneller Ebene. Als eine der ersten Reaktionen an die Belastungssituation kommt es zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit einem schnellen Anstieg der Stresshormone. Neben den Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin, wird auch Cortisol vermehrt produziert und in den Körperkreislauf ausgeschüttet (Mastorakos & Pavlatou 2005),(Duntas 2005). Stimuliert durch den Anstieg der Katecholamine reagiert das Herz-

Kreislaufsystem mit einer gesteigerten Herzfrequenz, Erhöhung des kardialen Schlagvolumens, dem Anstieg des arteriellen Blutdrucks und einer deutlichen Zunahme der Gewebe- und insbesondere auch der Muskeldurchblutung (De Feo et al. 2003). Abhängig von der Leistungsintensität werden die respiratorischen Parameter Atemminutenvolumen und Sauerstoffaufnahme gesteigert. Insgesamt kommt es zu einer Steigerung des Energieumsatzes proportional zur abgegebenen Leistung. Glukose- und Glykogenumsatz steigen an und die Insulinsensitivität der Zellen nimmt zu (Sakamoto & Goodyear 2002).

Während sportlicher Betätigung findet man eine erhöhte Konzentration an zirkulierendem, sowie an intrazellulärem Laktat (De Feo, Di Loreto, Lucidi, Murdolo, Parlanti, De Cicco, Piccioni, & Santeusanio 2003). Connett et al. (Connett, Gayeski, & Honig 1984) haben in einer Studie gezeigt, dass Laktat nicht nur im O₂-defiziten Muskel, sondern auch im vollständig oxygenierten Muskel als Antwort auf Belastung ansteigen kann. Da unter Trainingsbedingungen neben den Muskeln auch andere Laktat produzierende Gewebe gefunden werden konnten (De Feo, Di Loreto, Lucidi, Murdolo, Parlanti, De Cicco, Piccioni, & Santeusanio 2003), liegt die Vermutung nahe, dass Laktat nicht nur als Marker für exzessive anaerobe Glykolyse durch limitierte Sauerstoffversorgung angesehen werden kann, sondern es vielmehr direkt (durch Oxygenierung) und indirekt (durch Eingang in die Glukoneogenese) als eine weitere Energiereserve für den Muskel dienen kann (Brooks 1998).

Während Krafttraining ein Ansteigen des anabolen Hormons Testosteron erzeugt (Kraemer & Ratamess 2005), findet sich bei Ausdauertraining ein signifikanter Abfall des Hormons (Maimoun et al. 2003) und kann sogar in einen hypogonadalen Zustand des Athleten führen. Andere anabole Hormone, wie die große Familie der Wachstumshormone, inklusive der IGFs (*insulin-like growth factors*), zeigen dagegen bei beiden Sportarten einen deutlichen Anstieg (Kraemer & Ratamess 2005), (Godfrey, Madgwick, & Whyte 2003).

Luger und Mitarbeiter zeigten, dass Sport intensitätsabhängig zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) führt (Luger et al. 1988). Direkt nach einer Ausdauerbelastung konnten sie erhöhte Kalium- (K⁺) und Aldosteronkonzentrationen, sowie eine erhöhte Renin-Aktivität im Plasma messen. Bei schwerer körperlicher Arbeit kommt es durch Depolarisation der Muskelzellen und durch Aktivierung von K⁺-Kanälen bei der Repolarisation zu zellulären K⁺-Verlusten. Sind große Muskelmassen am Geschehen beteiligt, kann sich eine

bedrohliche Hyperkaliämie mit der Gefahr schwerer Herzrhythmusstörungen bilden. Durch vermehrtes Schwitzen verliert der Körper neben Wasser weitere Elektrolyte, wie zum Beispiel Natrium (Na^+). Aldosteron stimuliert in den Tubuluszellen der Niere durch Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase die Rückresorption von Na^+ aus dem Primärharn und fördert die K^+ -Aufnahme in die Zelle. Neben der renalen Funktion kann Aldosteron durch negative Stimulation von Na^+ -Kanälen in Dickdarm und den Schweißdrüsenausführungsgängen zur Regulation des Kochsalzhaushaltes und somit einem Natriumverlust entgegenwirken (aus Thieme: Physiologie des Menschen, 28.Aufl., 2000).

1.1.2 Körperliche Belastung als Stressfaktor für das Immunsystem

Schon während kurzer Trainingseinheiten kann man einen Anstieg peripherer mononukleärer Zellen (PBMCS: Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen) im Blut nachweisen (Connolly et al. 2004). Dabei kommt es bis zum Ende einer Belastungsphase intensitätsabhängig zu einer Lymphozytose (Pedersen & Hoffman-Goetz 2000), sowie einer Neutrophilie (Kratz et al. 2006). In der Erholungsphase normalisieren sich die Werte der Lymphozyten wieder und fallen sogar unter die Ausgangswerte ab, dagegen findet sich bei den Neutrophilen zu Beginn der Erholungsphase ein weiteres Ansteigen (Pedersen & Hoffman-Goetz 2000). In dieser Phase bildet sich das so genannte „offene Fenster“ mit einer veränderten Immunlage. Viren und Bakterien können sich vermehrt ansiedeln und somit eine mögliche Erklärung für die Beobachtung einer erhöhten Infektanfälligkeit (insbesondere der oberen Atemwege) nach wiederholtem, intensivem Training bieten (Pedersen & Toft 2000).

Im arbeitenden Muskel konnten während Belastung erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffradikale (*reactive oxygen / nitric species*, ROS / RNS) festgestellt werden (Niess et al. 1999), (Alessio et al. 2000). ROS verfügen über ein sehr reaktionsfreudiges freies Elektron, das in DNA, Protein und Lipiden zu erheblichen Schäden führen kann. Typischerweise führt man die erhöhten ROS-Werte auf einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch zurück, allerdings sollten alternative Mechanismen, wie der *respiratory burst* der Neutrophilen oder die Autooxidation der Katecholamine ebenfalls mit in Betracht gezogen werden (Ramel, Wagner, & Elmadfa 2004). Untersuchungen zeigten, dass auch neutrophile Granulozyten das Potential haben, ROS zu produzieren (Alessio, Hagerman,

Fulkerson, Ambrose, Rice, & Wiley 2000), so dass ihr vermehrtes Auftreten während körperlicher Belastung wahrscheinlich ebenfalls zu den trainingsbedingten Muskelschädigungen beiträgt (Konig et al. 2001), (Powers & Lennon 1999). Diese machen sich klinisch durch eine herabgesetzte physische Leistungsfähigkeit mit Muskelermüdung und einem Zustand des Übertrainings bemerkbar (Nielsen, Hagberg, & Lyberg 2004).

Um sich vor oxidativem Stress zu schützen, stehen dem Körper zwei ineinander greifende Mechanismen zur Verfügung: der erste wird von den endogen produzierten enzymatischen Antioxidanzien dargestellt, der zweite durch exogen zugeführte nicht-enzymatische Antioxidantien. Unter den endogen produzierten Antioxidanzien findet man neben anderen die Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase, Katalase oder die Thioredoxin-Reduktase. Zu den exogenen, nicht-enzymatischen Antioxidanzien zählt man Vitamine und Provitamine (u.a. Vitamine C und E, β -Karotin), Polyphenolen und Flavonoiden. Mehrere Studien (Niess et al. 2004), (Davison & Gleeson 2006), (Konig, Wagner, Elmadfa, & Berg 2001) zeigten allerdings, dass diätetisch zugefügte Antioxidanzien keinen zusätzlichen Schutz vor oxidativem Stress während körperlicher Belastung bieten konnten. Witt et al. konnten bei Probanden mit Vitamin C-Mangel zwar nachweisen, dass es zu einer verringerten Trainingsleistung kommt, sie konnten allerdings keinen positiven Effekt einer Vitamin-C-Substitution auf die Trainingsleistung finden (Witt et al. 1992). Dagegen wurde festgestellt, dass regelmäßiges Training zu einer Erschöpfung der ROS-produzierenden Mechanismen in Leukozyten führt (Niess, Dickhuth, Northoff, & Fehrenbach 1999), (Nielsen, Hagberg, & Lyberg 2004), was in einem Zustand geringeren oxidativen Stresses resultiert. Bedenkt man die Rolle der ROS bezüglich ihrer antimikrobiellen Wirkung, findet sich neben dem „offenen Fenster“ in der Immunabwehr ein weiterer Faktor für die erhöhte Infektanfälligkeit hoch trainierter und dadurch ROS-ärmer Athleten unmittelbar nach erschöpfender Belastung (Nielsen, Hagberg, & Lyberg 2004).

Neben dem Ansteigen der PBMCs stellten Connolly und Mitarbeiter durch Microarray-Untersuchungen fest, dass schon relativ kurze Trainingseinheiten, zu einer veränderten Expression mehrerer hundert Genen in den PBMCs führen (Connolly, Caiozzo, Zaldivar, Nemet, Larson, Hung, Heck, Hatfield, & Cooper 2004). Sofort nach einer erschöpfenden sportlichen Belastung zeigte sich ein Überwiegen der proinflammatorischen Antwort mit Ausbildung eines aspetischen

Entzündungszustandes. Dieser normalisiert sich in der Erholungsphase allerdings rasch durch eine antiinflammatorische Antwort oder fällt sogar unter das Ausgangsniveau ab, so dass es nicht zu entzündungstypischen Erscheinungen wie Leukozytenaggregation, Vasodilatation oder Beeinträchtigung von Organfunktionen kommt. Die Ergebnisse von Connolly et al. decken sich mit anderen Studien, in denen gezeigt wurde, dass ein muskulärer Schaden als Antwort auf starke körperliche Belastung zu einer lokalen Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 (Interleukin-6, auch CSF = *colony stimulation factor*) führt (Pedersen & Toft 2000) und eine systemische Gegenregulation mit gesteigerter Produktion antiinflammatorischer Zytokine nach sich zieht. Durch Stimulation mit Katecholaminen zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der systemischen IL-6-Konzentration (DeRijk et al. 1994), (Papanicolaou et al. 1996). Weiter werden die proinflammatorischen IL-1 und TNF α (*tumor necrosis factor α*) vermehrt exprimiert. In einer Arbeit von 2000 fassen Pedersen et al. (Pedersen & Toft 2000) die durch Sport induzierten starken antiinflammatorischen Reaktionen zusammen: Nach Beendigung der Belastung kommt es zu einem verzögerten Ansteigen der löslichen TNF α -Rezeptoren 1 und 2 (sTNF α 1/2), dem Monozyten chemotaktischen Protein-1 (MIP-1) und dem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra). IL-6 selbst wirkt dieser Entzündungsreaktion entgegen, indem es die Produktion von Glukokortikoiden über eine Erhöhung des ACTH stimuliert (Mastorakos & Pavlatou 2005).

1.1.3 Hypoxie als belastender Umweltfaktor

Nicht nur körperliche Belastung kann zu Anpassungsvorgängen im Bereich des Herz-Kreislaufsystems, der metabolischen und hormonellen Regulation sowie der Genexpression führen, es finden sich auch exogene Stressstimuli, wie zum Beispiel Hypoxie, unter deren Einfluss es zu weitreichenden Adaptationen kommen kann. Hypoxische Umweltzustände finden sich während Aufenthalt in großen Höhen, bei körperlicher Belastung, aber auch bei Krankheitszuständen, wie Tumorerkrankungen und kardialer oder zerebraler Ischämie, welche zu einer zellulären Hypoxie führen kann.

Durch das Versagen energie- (ATP-) abhängiger Ionenkanäle kommt es während Hypoxie zu einem unmittelbaren Verlust der Membranintegrität mit Änderungen der intrazellulären Ca²⁺/Na⁺-Homöostase und den zellulären Enzymmechanismen (Leach & Treacher 1998). Diese Änderungen können den Zelltod mit sich führen. Zur

Sicherung der Energiegewinnung stellt die Zelle unter Hypoxie auf die anaerobe Glykolyse mit Anhäufung von Laktat um. Ist es der Zelle allerdings nicht mehr möglich sich zu adaptieren, folgt der Zelltod. Bei einem durch ATP-Mangel verursachten nekrotischen Zelltod kommt es zu einer gesteigerten Membrandurchlässigkeit, dem Anschwellen der Zelle und einer Aufhebung sämtlicher Zellkompartimente. Es kommt zur Membranruptur, die Zelle platzt und schüttet ihren gesamten Inhalt in die unmittelbare Umgebung aus, wodurch eine entzündlich-toxische Umgebung entsteht, in der die umliegenden Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden.

Hypoxie kann aber auch den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten, was in einer Arbeit von Carmeliet et al. durch Induktion von HIF1 α (*hypoxia inducible factor 1*, Untereinheit α) nachgewiesen werden konnte. HIF1 α stimuliert dabei die Proteine p53, p21 oder Bcl-2 durch welche es zur Einleitung der Apoptose kommt (Carmeliet et al. 1998). Die Toleranz einzelner Gewebe gegenüber Hypoxie ist sehr unterschiedlich, so können Haare und Nägel mehrere Tage überleben, der Skelettmuskel toleriert immerhin noch bis zu 1,5 Stunden, das Gehirn dagegen zeigt schon nach weniger als 3 Minuten hypoxische Zellschädigungen (Leach & Treacher 1998).

In vielen Untersuchungen, die unter Hypoxie stattfanden, konnte gezeigt werden, dass es als respiratorische Anpassung zu einer milden Hyperventilation mit erniedrigtem CO₂-Partialdruck (pCO₂) kommt, woraus sich eine respiratorische Alkalose entwickelt. Untersuchungen mit an Höhe angepassten Einheimischen aus den Anden zeigten, dass es bei chronischer Höhenexposition zur Stimulation des sympathischen Nervensystems kommt, was in der Folge zu erhöhten Plasmakonzentrationen von Noradrenalin, Dopamin und DHPG (Dihydroxyphenylglycerol) führt (Gamboa et al. 2006). Pedersen et al. konnten zeigen, dass eine akute Hypoxieexposition die gleichen Effekte auf die zirkulierende Lymphozyten- und Neutrophilenzahl hat, wie eine akute körperliche Belastungssituation (Pedersen & Steensberg 2002). So kommt es ebenfalls während der Belastung zu einem stetigen Ansteigen von Lymphozyten und Neutrophilen, wobei es allerdings in der Regenerationsphase zu einem schnelleren Abfall der Lymphozyten kommt. Sie fanden weiter, dass die Kombination von Training und hypoxischen Bedingungen diese Effekte verstärkt. Es ist bekannt, dass es ähnlich der körperlichen Belastung auch unter Hypoxie zur Entstehung von ROS / RNS kommt. Pialoux et al. konnten in

ihrer Arbeit (Pialoux et al. 2006) zeigen, dass es während so genannter „*live low – train high*“-Trainingskonzepten zu einem kumulativen Effekt des oxidativen Stress auf die Zellen kommt, in dessen Folge die antioxidativen Kapazitäten von Athleten drastisch geschwächt sind. Vij und Mitarbeiter (Vij, Dutta, & Satija 2005) zeigen dagegen, dass es unter chronischer Höhenexposition (> 13 Monate) zu einer Anpassung an den oxidativen Stress durch Erhöhung der antioxidativen Abwehrmechanismen kommt. Sie fanden Erhöhungen im totalen antioxidativen Status (TAS) des Plasmas, der Glutathionreduktase, des Plasma-Bilirubin oder auch der Harnsäure. In Endothelzellen führt chronische Hypoxieexposition durch Aktivierung von HIF1 zu einer gesteigerten Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie dem PDGF (*platelet derived growth factor*) oder dem VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Michiels, Arnould, & Remacle 2000), welche die Entstehung von ROS / RNS induzieren können (Turpaev 2002).

Da oxidativer Stress eine große Rolle in der Pathophysiologie der Maladaptation an Höhe spielt (Vij, Dutta, & Satija 2005), liegt es nahe, in der Stärkung antioxidativer Mechanismen einen Weg zu vermuten, der die Akklimatisation an Höhe erleichtern und das Auftreten der akuten Bergkrankheit (*acute mountain sickness*; AMS) vermindern kann. Tatsächlich konnten Bailey et al. einen positiven Effekt einer oralen Antioxidanzengabe 3 Wochen vor einem Höhengaufstieg auf das Auftreten von AMS finden (Bailey & Davies 2001). Eine Reihe anderer Studien stellte dagegen fest, dass sich weder Marker für oxidativen Stress noch Entzündungsmarker durch Antioxidanzengabe während Höhengaufenthalt verbessern ließen, insbesondere nicht in Kombination mit Sport (Subudhi et al. 2004), (Hagobian et al. 2006).

1.2 Anpassungsreaktionen auf molekularer Ebene

1.2.1 klassische Transaktivierung

Unter Transaktivierung versteht man eine Signaltransduktion, die zur Steigerung der Genexpression führt. Schon während sehr kurzer Belastungsphasen kommt es im Körper zur Stimulierung der Transkriptionsrate einer Reihe von Genen, welche die Anpassungsvorgänge an die physischen Reize einleiten sollen.

Ein Aktionspotential an der Plasmamembran einer Muskelzelle löst die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und den Einstrom extrazellulären Ca^{2+} aus, so dass es zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol kommt. Ca^{2+} bindet

an das Ca^{2+} -Bindungsprotein Calmodulin und aktiviert die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK) (Koulmann & Bigard 2006). Expression und Aktivität der CaMK werden ebenfalls durch Training reguliert. CaMK steuert dann direkt durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. durch *myocyte enhancing factor* (MEF)) die Genexpression. Weitere Ca^{2+} -getriggerte Regelprozesse laufen über die Phosphatase Calcineurin oder die Proteinkinase C (PKC) ab (Koulmann & Bigard 2006). Dabei phosphoryliert Calcineurin den im Zytosol befindlichen Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), dieser stimuliert, nachdem er in den Zellkern gewandert ist, die Aktivität einer Reihe von Genen zur Expression von langsamen Typ I-Faser Proteinen (Koulmann & Bigard 2006) und trägt somit zur Modifikation der Fasertypisierung bei (McCullagh et al. 2004). Änderungen in der Expression von Stoffwechsellenzymen laufen nicht über eine NFAT-abhängige Genexpression, jedoch über eine durch Calcineurin stimulierte Expression des Transkriptionsfaktors PGC-1 (*peroxysome proliferator-activated-receptor co-activator*), der selbst wiederum als Co-Faktor für weitere Transkriptionsfaktoren dient. Dazu gehört z.B. NRF (*nuclear respiratory factor*), welcher zum einen die Expression nuklear kodierender Stoffwechsellenzyme erhöht, zum anderen aber auch über die Stimulation des mTFA (mitochondrialen Transkriptionsfaktor A) die Expression von Genen des mitochondrialen Genoms führt und somit die Kapazität des aeroben Stoffwechsels zu steigern vermag. PGC-1 trägt zudem auch zur Erhöhung von mRNA der langsamen MHC-Isoformen (*myosin heavy chain*) bei (Mortensen et al. 2006). Nicht nur durch Calcineurin wird die PGC-1-Expression gesteigert, auch Stoffwechselmetabolite wie das Spaltprodukt des ATP (Adenosintriphosphat) das AMP (Adenosinmonophosphat) können über die AMP-abhängige Kinase (AMPK) diesen Effekt erzielen. Die AMPK wird durch die Abnahme von Energiesubstraten (Glukose, Glykogen) oder durch einen AMP-Anstieg infolge Muskelarbeit, Hypoxie, Leptin u.a. geregelt.

Zustände mit einem erniedrigten pO_2 im Gewebe, herbeigeführt durch hypoxische Umweltzustände, bei Anämie, während kindlicher Entwicklungsphasen oder O_2 -Mangel in Zusammenhang mit körperlicher Belastung, führen zu einer gesteigerten Expression des Hypoxie-induzierten Faktor 1 (HIF 1) (Wenger & Gassmann 1997), (Appenzeller et al. 2006). HIF1 ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, der sich aus den beiden Untereinheiten α und β zusammensetzt. HIF 1α verfügt in seinem C-terminalen Ende über eine Sauerstoff-abhängige Degradierungsdomäne (O-DDD =

oxygen dependent degradation domain), die in Anwesenheit von O₂ hydroxyliert wird, dann mit dem von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein einen Komplex bildet, in dieser Form von der E3 Ubiquitin-Ligase ubiquitiniert und anschließend sofort proteosomal abgebaut wird (Jelkmann 2003), (Fukuda et al. 2002). Fehlt nun Sauerstoff als inhibierender Faktor, kommt es zu einer Erhöhung der HIF1 α -Konzentration und zur Anlagerung an die dafür spezifischen DNA-Stellen (*hypoxia response element*; HRE) eines Genabschnittes. HREs konnten auf einer Reihe verschiedener Gene identifiziert werden. Zu den bekanntesten zählt dabei der für Erythropoietin kodierende Genabschnitt (EPO) (Wenger & Gassmann 1997), (Jelkmann 2003). EPO stellt als essentieller Wachstumsfaktor der erythropoietischen Progenitorzellen im Knochenmark einen wichtigen Regulator der Erythropoese dar. Seine Stimulation führt zum Anstieg des Hämatokrit und damit zu einer erhöhten O₂-Transportkapazität des Blutes (Jelkmann 2003). Ebenfalls werden der VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder die Gene für die Glucosetransporter 1 und 3 (GLUT1 und 3) vermehrt durch Stimulation von HIF1 α exprimiert (Jelkmann 2003). VEGF erhöht dabei, als starker Induktor der Angiogenese, die Dichte der Blutkapillaren (Wenger & Gassmann 1997) und trägt zur verbesserten Sauerstoffversorgung im Gewebe bei (Tagarakis et al. 2000). GLUT1 und 3 zeigen eine hohe Affinität zu Glucose, kommen auf fast allen Zellen vor und sorgen für eine kontinuierliche Glucose-Aufnahme in die Zelle, wodurch eine Verbesserung der Energiebereitstellung erzielt werden kann.

Auch mechanische Signale, wie sie nicht nur bei sportlicher Betätigung zuhauf vorkommen, beeinflussen die Genexpression in Muskeln und vielen anderen Geweben wie Fibroblasten, Osteoblasten oder Knorpel (Goldspink 2005). Wie bereits zu Anfang der klassischen Transaktivierung beschrieben, gibt es eine Ca²⁺-induzierte Signalkaskade, welche die Ausprägung des Fasertypus regelt. Der Ca²⁺-Einstrom in die Zelle kann allerdings auch durch dehnungssensitive Ionenkanäle aktiviert werden (Zou et al. 2002). Muskelkontraktionen lösen weiterhin direkt die Transkription des IGF-Gens aus. Dabei wird zuerst die IGF-I Splice-Variante MGF (*mechano growth factor*; auch: IGF-IEc) gebildet, mit ca. einem Tag Verzögerung folgen dann die Isoformen des IGF-I, IGF-IEa und IGF-IEb (Goldspink 2005). Diese Wachstumshormone aktivieren ihrerseits wiederum die Ca²⁺-induzierte Signalkaskade, induzieren aber auch eine Kaskade von Phosphorylierungsprozessen, die über Kinasen wie IRS (*insulin response substrate*), PI3K (Phosphatidylinositol 3-

Kinase), Akt (= Proteinkinase B) oder mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ablaufen (Tidball 2005).

Schon innerhalb der ersten Stunde nach einer sportlichen Belastung, werden durch mechanische Faktoren auch die Transkriptionsfaktoren c-jun und c-fos aktiviert, die den MAP-Kinase Weg eingeleiten (= MAPK; *mitogen activated protein kinase*) und dessen Äste zur Steigerung der Genexpression und Translation von Muskelwachstumsgenen (hauptsächlich Typ I) führen (Tidball 2005), (Fluck & Hoppeler 2003).

1.2.2 Bedeutung schneller molekularer Veränderungen auf Belastung und physikalische Reize

Man sieht bei den bereits beschriebenen Mechanismen, dass sich viele Anpassungsvorgänge auf molekularer Ebene innerhalb kürzester Zeit nach körperlichem Training abspielen. Um die Wichtigkeit einer schnellen molekularer Adaptation für den Phänotyp hervorzuheben, sei auf eine Arbeit von Hambrecht et al. verwiesen (Hambrecht et al. 2004). In der 2003 publizierte Arbeit wurde ein 12-monatiges Trainingsprogramm (täglich 20min Ausdauerbelastung auf dem Fahrradergometer bei 70% der maximalen Herzfrequenz, kombiniert mit einem einmal pro Woche für 60min stattfindenden Gruppentraining) gegen ein konventionelles Vorgehen mit PTCA (perkutane transluminale Koronarangioplastie) bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) verglichen. Trotz ähnlicher Verbesserung bei der Myokardperfusion beider Studienarmen, konnte nur in der Trainingsgruppe eine niedrigere Rate an kardialen Ereignissen (*event-free survival* 88% vs. 72%), eine verbesserte maximale O₂-Aufnahmekapazität (VO_{2max}: + 16%) zusammen mit einer reduzierten Rehospitalisierungs- und erhöhten Revaskularisierungsrate gefunden werden. 2004 wurde eine Arbeit veröffentlicht, welche zeigte, dass auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (*chronic heart failure*, CHF) durch Trainingseinheiten im Bereich von 50 – 70% VO_{2max} das relative Mortalitätsrisiko um 35% gesenkt werden kann (Hambrecht 2004). Schon dieses kurze und lediglich moderat intensive Training verbesserte bei diesen Patienten die epithelialen Funktionen, reduzierte die Progression koronarer Läsionen sowie das Thromboserisiko und führte zu einer verbesserten Rekapillarisation des Myokards (Hambrecht 2004).

Bei Typ II-Diabetikern führten kurze aerobe Trainingseinheiten zu einer verminderten Gefäßsteifheit mit verbesserter Pufferkapazität arterieller Gefäße und zu einer Verbesserung der peripheren Insulinresistenz (Yokoyama et al. 2004).

Der Vergleich eines Trainingsprogrammes von 4 x 10min strammem Gehen täglich mit einer einzelnen Einheit von 40min pro Tag, zeigte bei hypertensiven Patienten die gleichen positiven Effekte in der Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks (Elley, Bagrie, & Arroll 2006).

In Schwimmversuchen mit Ratten konnten Matsakas et al. zeigen, dass es schon nach kurzen Belastungen zu einer verminderten Expression der Myostatin-mRNA kam, das als negativer Regulator des Muskelwachstums bekannt ist (Matsakas et al. 2005).

Querschnittsgelähmte Patienten leiden unter Muskelatrophie, was zu einer Reihe gesundheitlicher Probleme, wie kardiovaskulären Ereignissen oder Osteoporose beitragen kann. Bickel und Mitarbeiter zeigten eine im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erniedrigte Gesamt-mRNA-Konzentration im Muskelgewebe vor Trainingsbeginn (Bickel et al. 2003). Durch kurze Intervalle eines EMS- (Elektromyostimulations-) Widerstandstrainings konnte gezeigt werden, dass auch bei querschnittsgelähmten Patienten die mRNA-Konzentrationen stiegen und sich sogar an die Werte der gesunden Kontrollgruppe angleichen. Es konnte somit durch Versagen des primären molekularen Adaptationsmechanismus die Ursache für die nicht stattfindende Normalisierung der Muskelmasse durch EMS gefunden werden.

Schon alleine diese kleine Auswahl an Studienergebnissen zeigt, dass auch kurze Trainingseinheiten einen Effekt auf die molekularen Geschehnisse im Körper haben, und die daraus resultierenden metabolischen und hormonellen Antworten positive Auswirkungen auf den Gesundheitszustand von gesunden, sowie auch von kranken Menschen haben können.

1.2.3 Transkriptionsunabhängige Mechanismen

Bei der Beschreibung der klassischen Transaktivierung wurde deutlich, dass es eine Vielzahl exogener sowie endogener Faktoren gibt, die über unterschiedlichste Mechanismen wie Phosphorylierung (Bsp. Wachstumshormone), Hydroxylierung (Bsp. HIF1 α), Änderungen der Ionenkonzentration (Bsp.: Ca²⁺ durch Aktionspotentiale oder Dehnungsrezeptoren), u.v.m. eine Änderung der Genexpression einleiten und damit das Vorkommen bestimmter mRNA beeinflussen

können. Es können allerdings auch Mechanismen beschrieben werden, die unabhängig von der Transkription zu einem veränderten Auftreten von mRNA führen können.

Das unterschiedliche Auftreten von mRNA-Varianten wird über posttranskriptionelle Modifikationen geregelt. Die eigentliche Transkription wird mit Hilfe einer Endonuklease beendet, welche 5'-AATAAA-3'-Sequenzen (oder ähnliche Sequenzen wie zum Beispiel 5'-ATAA-3', 5'-AATAA-3', 5'-AATAAAA-3',...) auf dem gegenüberliegenden, kodierenden DNA-Strang erkennt. Am 5'-Ende der heteronukleären RNA (hnRNA oder pre-mRNA) entsteht durch Anheften eines N⁷-methylierten GTP das 5'-Cap (= Capping). Eine Polymerase fügt durch Polyadenylierung einen aus bis zu 200 Basen langen AMP-Rest (Adenosin-5'-Monophosphat) an das 3'-Ende an, den so genannten Poly-A-Schwanz. Polyadenylierungssignale können unterschiedliche Stärken aufweisen, so dass je nach Zustand der Zelle ein solches Signal erkannt oder übersprungen werden kann und somit zu unterschiedlich langen mRNA-Varianten am 3'-Ende führt. Man bezeichnet diesen Vorgang als „differentielle Polyadenylierung“.

Weitere Schritte in der Prozessierung der mRNA finden durch das Splicing statt. Während des Splice-Vorgangs werden in den sogenannten Splicisomen Introns aus der hnRNA herausgeschnitten. Durch „alternatives Splicen“ können je nach Umgebungsbedingungen unterschiedliche Introns oder Exons aus der RNA geschnitten werden und somit zu unterschiedlichen Varianten eines Genabschnittes führen.

Betrachtet man all diese Möglichkeiten, stellt man fest, dass die Zelle alleine über die Herstellung unterschiedlichster mRNAs eines einzelnen Genabschnitts zu einer sehr großen Proteinviefalt gelangen kann, und damit befähigt ist, auf unterschiedlichste Situationen adäquat zu reagieren.

In einer Arbeit von Simon et al. (Simon et al. 2004) konnte gezeigt werden, dass Lichteinfall in muriner Retina zu einem gesteigerten Vorkommen einer nahe der 3'-UTR (*3'-untranslated region*) um 293 Basenpaare (bp) längeren EGR1-Variante (EGR1-lv; *early growth response gene – long variant*) führt (Kodierungen der EGR1-Varianten in der Gendatenbank GenBank: EGR1-sv: AK_040925 und EGR1-lv: NM_007913). In diesem sehr hoch konservierten erweiterten Genabschnitt konnte ein Polyadenylierungselement gefunden werden, welches auf NMDA-Rezeptor- (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor) Aktivität reagiert. Sie konnten zeigen, dass das

Auftreten der längeren mRNA-Variante des EGR1 nicht nur durch den exogenen Stimulus Licht, sondern auch über eine Glutamat-Stimulation und den Weg der posttranskriptionellen Polyadenylierung reguliert werden kann.

Ähnliche Verhältnisse finden sich bei HIF1. Gothie et al. fanden unterschiedliche Splice-Varianten des HIF1 mit fakultativem Vorhandensein eines zusätzlichen TAG-Basentriplets zwischen Exon 1 und 2, oder einem fehlenden 127bp langen Abschnitts, dem Exon 14 entsprechend (Gothie et al. 2000). Eine Hypoxie-unabhängig exprimierte mRNA-Variante der HIF1-Untereinheit α konnte in einer Arbeit von Lukashev et al. (Lukashev et al. 2001) gezeigt werden. In T-Zellen, die mit Antigen-Rezeptoren *in vitro* stimuliert wurden, sowie in T-Lymphozyten während Zytokin induzierter Entzündungsreaktionen *in vivo*, konnte die Akkumulation einer am 5'-Ende (N-terminal) um 12 Aminosäuren kürzeren HIF1 α -mRNA-Variante (I.1 HIF1 α) gefunden werden, wogegen es nicht zu einer Änderung bei der längeren I.2 HIF1 α -Isoform kam. Dies legt die Vermutung nahe, dass unterschiedliche Splice-Varianten als Antwort auf bestimmte Reize zu unterschiedlichen physiologischen Adaptationsmechanismen führen. Diese Hypothese bekräftigen auch Chun et al. (Chun et al. 2002). Sie fanden eine um die Exons 11 und 12 verkürzte HIF1 α -Variante. Die fehlenden Exons resultierten in einem *frameshift*, wodurch dem translatierten Protein Teile der Sauerstoff-abhängigen Degradierungsdomäne (ODDD), die beiden Transaktivierungsdomänen (TADs) und das nukleäre Lokalisierungssignal (NLS) fehlten. Diesem Fehlen entsprechend, konnten sie keine vermehrte Expression dieser Variante während Hypoxie finden, sondern stellten vielmehr eine durch kompetitive Hemmung der HIF1 α -Normvariante erzeugte, verminderte Expression der mRNA von Hypoxie-induzierten Genen fest. Diese Ergebnisse zeigen also recht eindrücklich, wie „alternatives Splicing“ ein- und derselben mRNA zu komplett gegensätzlichen physiologischen Reaktionen führen kann.

In einer 2005 veröffentlichten Arbeit von Prasanth (Prasanth et al. 2005) wurde eine weitere, bisher noch nicht beschriebene Möglichkeit des alternativen Splicens und in deren Folge der Genregulation vorgestellt: In der 3'-UTR der mCAT2 mRNA (*mouse cationic amino acid transporter 2*) fanden sie eine ca. 100bp lange Gensequenz, welche im weiteren Verlauf weitere dreimal als komplementäre Wiederholungen (*inverted repeats*) vom SINE-Typ (*short interfering nuclear elements*) in Erscheinung tritt (s. Abb. 1). Es konnte gezeigt werden, dass sich in diesem Abschnitt ein

gestielter Loop ausbildet, der auf Stimulation von einer noch nicht näher charakterisierten Endonuklease im Bereich der SINEs trunktiert wird. Die genaue Schnittstelle sowie auch das Enzym, konnten allerdings noch nicht identifiziert werden. Prasanth et al. zeigten allerdings, dass auf einen Stressreiz hin, die in den *paraspeckles* des Zellkerns gespeicherte, längere Variante der mCAT2, die mCAT2-lv, trunktiert ins Zytosol freigegeben und auf diese Weise der Translation zugänglich gemacht wurde. Hier wurde zum ersten Mal ein Weg beschrieben, der von der Speicherung einer mRNA mit hoher Halbwertszeit (HWZ) über die Trunkierung eines distalen Teils selbiger auf einen exogenen Reiz hin zur Freilassung einer mRNA-sv (*short variant*) ins Zytosol und damit zur Translation führt.

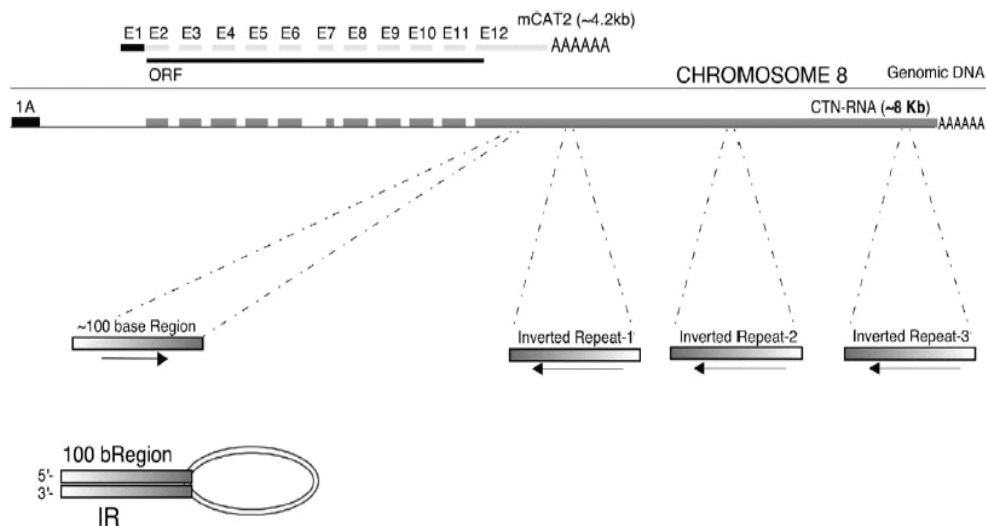


Abb. 1: Darstellung der inverted repeats der mCAT2-3'-UTR, welche komplementär zu einem weiter in Richtung 5'-Ende liegenden 100bp-langen Abschnitt des Gens sind und durch Anlagerung an diese Sequenz eine Schleife ausbilden können. (Skizze nach Prasanth et al., 2005)

1.3 SGK1 als mögliches Schlüsselgen für die Sofortvermittlung von Anpassungsreaktionen

1.3.1 SGK1 als Immediate Early Gene (IEG)

Gene, die nach Stimulation einer Zelle innerhalb kürzester Zeit exprimiert werden, bezeichnet man als *immediate early genes* (IEGs). Viele dieser IEGs sind Transkriptionsfaktoren oder andere DNA-bindende Proteine. Bekannte IEGs sind zum Beispiel die als erste in diesem Rahmen entdeckten und am besten untersuchten c-fos, c-myc oder c-jun. Da IEGs hauptverantwortlich das weitere

Geschehen in der Zelle bestimmen, werden sie auch als „Tor zur genomischen Antwort“ bezeichnet. Unter den IEGs finden sich Regulatoren des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, sie sind aber auch bei Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt.

Die Serum- und Glukokortikoid-induzierte Proteinkinase 1 (SGK1) wird als ein solches IEG beschrieben. Das auf Chromosom 6q23 liegende Gen kodiert für ein 50 kDa Protein, welches zur „AGC“-Familie der Serin-/Threonin-Proteinkinasen gehört. Außer den Proteinkinasen A, G und C gehören, neben anderen, auch die Proteinkinase B (Akt/PKB) oder die p70^{S6K}/p85^{S6K}-Kinasen der Ratte dieser Familie an. Sie alle zeigen eine hohe Homologie in ihrer katalytischen Domäne (45 – 55%), und eine starke phylogenetische Konservierung, was als indirekter Hinweis auf die physiologische Bedeutung dieses Abschnittes verstanden werden kann.

Die Kinasen dieser Familie sind an der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse, wie Metabolismus, Proliferation, Differenzierung und beim Überleben der Zelle, dem *cell survival* beteiligt (Webster, Goya, & Firestone 1993),(Leong, Maiyar, Kim, O'Keeffe, & Firestone 2003).

Die SGK1 zeichnet sich dadurch aus, dass ihr Vorhandensein und ihre Funktion als Antwort auf unterschiedlichste Reize auf drei verschiedenen zellulären Ebenen reguliert werden. Auf der ersten Ebene findet sich eine Stimulus- und Zelltyp-abhängige Transkriptionskontrolle der SGK1 (Firestone, Giampaolo, & O'Keeffe 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation durch osmotischen Stress, Hitzeschock, UV-Bestrahlung oder oxidativen Schock zu einer gesteigerten Proteinexpression führten (Leong, Maiyar, Kim, O'Keeffe, & Firestone 2003). Beachtenswert ist dabei, dass eine stimulusabhängige Regulation auf Transkriptionsebene eine Ausnahme unter den Proteinkinasen darstellt. Die Mehrheit der Proteinkinasen wird vor allem durch posttranslationale Modifikation (Phosphorylierung / Dephosphorylierung) auf enzymatischer Ebene reguliert. Auch dies stellt bei der SGK1 eine weitere Regulationsebene dar: PDK1 (*phosphoinositid dependent kinase 1*) phosphoryliert und aktiviert die SGK1 an Threonin 256 (*activation loop*) und Serin 422 (C-terminale Domäne) (Park et al. 1999). PDK1 selbst wird wiederum über den Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3-K) abhängigen Weg aktiviert. Die PI3-K ist dafür bekannt, Zellüberlebensmechanismen als Antwort auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Stresstimuli zu aktivieren (Leong, Maiyar, Kim, O'Keeffe, & Firestone 2003), (Ye 2005). So führt eine Stimulation von Zellen mit

Serum, Insulin, IGF-1 (Park, Leong, Buse, Maiyar, Firestone, & Hemmings 1999) und anderen Wachstumsfaktoren oder auch das Aussetzen der Zellen auf bestimmte Stresssituation (z.B. osmotischer Schock (Pearce 2001) oder oxidativer Stress (Kobayashi & Cohen 1999)) über den PDK1/PI3K-abhängigen Weg zu einer Steigerung der Enzymaktivität der SGK1.

Auf der dritten Ebene wird die Funktion der SGK1 stimulationsabhängig subzellulär geregelt (Firestone, Giampaolo, & O'Keeffe 2003). Tumorzellen welche mit Serum stimuliert wurden zeigten über Interaktion mit Importin-alpha eine nukleäre Lokalisation der SGK1 (Maiyar, Leong, & Firestone 2003), wohingegen sich nach Applikation von Glukokortikoiden die SGK1 ausschließlich im Zytosol finden ließ (Buse et al. 1999). Laserzytometrie-Untersuchungen konnten zeigen, dass die nukleäre Lokalisation der SGK1 mit einer Progression in die S-Phase des Zellzyklus zusammen fiel, dagegen die Glukokortikoid-stimulierten Zellen, in denen die SGK1 im Zytoplasma zurückgehalten wurde, einen antiproliferativen Zustand mit unterdrücktem Wachstum und verminderter DNA-Synthese zeigten (Buse, Tran, Luther, Phu, Aponte, & Firestone 1999).

Mit der SGK1 lässt sich somit eine Schlüsselkomponente der intrazellulären Kommunikation finden, in welcher die Signaltransduktion von Zelloberflächenrezeptoren, nukleäre Rezeptoren und Wege der zellulären Stressantwort zusammenlaufen und welche viele zellulären Prozesse, inklusive Zellproliferation, Osmoregulation, *cell survival* und Apoptose kontrolliert (Leong, Maiyar, Kim, O'Keeffe, & Firestone 2003), (Firestone, Giampaolo, & O'Keeffe 2003).

1.3.2 SGK1 vermittelte Effekte und ihre Bedeutung bei Belastung

Traditionell wurde die SGK1 als ein Protein zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase beschrieben, welches u.a. durch hyperosmolaren Stress und Zellvolumenänderungen vermehrt exprimiert wird (Leong, Maiyar, Kim, O'Keeffe, & Firestone 2003). In einem Review von 2003 fassen Lang et al. (Lang et al. 2003) die diversen Auswirkungen erhöhter SGK1-Konzentrationen auf zelluläre Ionenkanäle zusammen. Als einer der am besten untersuchten Kanäle gilt dabei der epitheliale Natriumkanal (ENaC). Aldosteron, ein Mineralokortikoid, das durch ACTH, aber v.a. auch bei Hypovolämie, Hyponatriämie oder Hyperkaliämie durch das aktivierte RAAS gebildet wird, stimuliert die Expression der SGK1-mRNA (Kellner et al. 2003). Die durch PDK1 aktivierte SGK1 assoziiert mit der Ubiquitinligase Nedd-2 sowie mit

ENaC (Pearce 2003), führt zur Phosphorylierung und Degradierung von Nedd-2 und resultiert in einer erhöhten Aktivität des ENaC mit Einstrom von Na^+ in die Zelle (Pearce 2003). Bei gleichzeitiger Expression des Na^+/H^+ -Austauscher-Regulationsfaktor NHERF2, vermag sie den ebenfalls luminal gelegenen K^+ -Kanal ROMK1 (*renal outer medullary K^+ channel*) zu vermehrter K^+ -Sekretion zu stimulieren (Lang, Henke, Embark, Waldegger, Palmada, Bohmer, & Vallon 2003). Da sie auch Einflüsse auf die Regulation der basolateral liegenden Na^+/K^+ -ATPase hat (Zecevic et al. 2004), kommt der SGK1 insgesamt betrachtet eine wichtige Rolle für den transzellulären Ionenstrom zu. Vallon und Mitarbeiter (Vallon et al. 2005) postulieren dabei, dass SGK1 unter einer normalen NaCl- und K^+ -Diät nicht absolut notwendig für den Erhalt einer kompensierten renalen NaCl-/ K^+ -Homöostase ist, allerdings dann als Regulator wichtig wird, wenn es darum geht, eine adäquate Adaptation an eine verminderte NaCl-Zufuhr, sowie an eine vermehrte K^+ -Aufnahme zu erlangen (Stockand 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass es zu einer Zunahme des K^+ -Stroms bei gleichzeitiger Expression von SGK1 und dem durch langsame Depolarisation aktivierten K^+ -Kanal KCNE1/KCNQ1 in *Xenopus* Oozyten kommt (Embark et al. 2003). Neben diesen Prozessen stimuliert SGK1 weiter den CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*). Da man außerdem die SGK1 bei entzündlichen Lungenkrankheiten deutlich erhöht exprimiert gefunden hat (Waerntges et al. 2002), liegt die Vermutung nahe, dass sie zur Stimulation der Cl^- -Sekretion und/oder Reabsorption in den Bronchien beiträgt (Lang, Henke, Embark, Waldegger, Palmada, Bohmer, & Vallon 2003).

Neben dem Beitrag der SGK1 zur Aufrechterhaltung einer NaCl- und K^+ - Homöostase, konnte eine Reihe exogener Stimuli gefunden werden, auf dessen Exposition hin der Körper mit einer erhöhten Expression der SGK1 reagiert. Unter diesen Stimuli fanden sich Umweltreize wie Hitze, UV-Strahlung und oxidativer Stress (Firestone, Giampaolo, & O'Keeffe 2003), (Schoenebeck et al. 2005), (You et al. 2004). Diese Faktoren führten über einen p38/MAPK- (Mitogen aktivierte Proteinkinase) abhängigen Weg zu einer gesteigerten Expressionsrate der SGK1. Die aktivierte SGK1 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor FKHRL1 (*forkhead transcription factor*, FOXO3a) und führt dadurch zur Translokation des FKHRL1 ins Zytoplasma, wodurch dieser in seiner Transkriptionsaktivität gehemmt wird. FKHRL1 transkribiert Gene, welche die Apoptose einleiten, wie z.B. den Fas Liganden (Brunet et al. 1999). Der SGK1 kommt durch dessen Hemmung eine antiapoptotische, also

das *cell survival* unterstützende Funktion zu.

In einer Arbeit von You et al. konnte gezeigt werden, dass genotoxischer Schaden eine vermehrte SGK1-Expression zur Folge hat (You, Jang, You, Okada, Liepa, Wakeham, Zaugg, & Mak 2004). DNA-Schäden durch UV-Bestrahlung führten hierbei über einen p53-abhängigen Weg zur Phosphorylierung und Inaktivierung von ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), was eine Induktion der SGK1 zur Folge hatte. Anschließende Phosphorylierung des FKHRL1 resultierte auch hier wiederum in der Hemmung der Apoptose. Antiapoptotische Eigenschaften der SGK1 wurden auch von der Arbeitsgruppe um Zhang belegt, die herausfanden, dass SGK1 in Brusttumorzellen auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren durch Aktivierung des IKK-NF- κ B-Wegs als ein Onkogen wirkt (Zhang et al. 2005). Der nukleäre Transkriptionsfaktor κ B (NF- κ B) wurde vorher als Inhibitor der Apoptose in Tumor- und anderen Zellen gefunden (Qiao et al. 2006). Assoziation und Phosphorylierung der SGK1 mit IKK β (IkB Kinase β) führte zur Degradierung des IKK β -Komplexes und Translokation von p65. Daraus resultierte die Lösung von NF- κ B aus dem Komplex und erhöhte dessen Bindungsaktivität an DNA (Zhang, Cui, Cheng, & Du 2005).

1.4 Arbeitshypothese

Die zahlreichen Untersuchungen zu IEGs und Transkriptionsfaktoren konnten zeigen, dass sie eine zentrale Bedeutung in schnell zu erfolgenden Anpassungsvorgängen haben. Für die zwei IEGs, EGR1 und HIF1 α , wurden in mehreren Arbeiten bereits Mechanismen beschrieben, wie sie auf posttranskriptioneller Ebene über die Expression verschiedener mRNA-Varianten eine Anpassung auf unterschiedliche Reize zeigen. Die SGK1 wird nicht nur als ein solches IEG beschrieben, sondern es fanden sich durch *in silico* Untersuchungen der Gensequenz auch strukturelle Ähnlichkeiten zu den beiden oben genannten IEGs. Weiter zeigte sich für die SGK1 neben ihrer klassischen Funktionsbeschreibung zur Aufrechterhaltung einer NaCl- und K⁺-Homöostase, in zahlreichen neueren Untersuchungen eine Beeinflussbarkeit ihrer Expression auf unterschiedlichste endo- sowie exogene Reize, welche in einem das Überleben der Zelle sichernden, antiapoptotischen Zustand resultierten.

Mit dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob es in Analogie zu EGR1 und HIF1 α ebenfalls zu einer differenziellen Regulation potentieller SGK1-mRNA-Varianten unter unterschiedlichen Belastungsbedingungen, wie körperliche Anstrengung oder Hypoxieexposition kommt und ob sich dabei eine Bedeutung für den Organismus herauskristallisieren lässt. Bei den Untersuchungen haben wir uns, wiederum in Analogie zur Arbeit von Simon und Kollegen, schwerpunktmäßig mit dem Bereich der 3'-UTR beschäftigt für den bei IEGs eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Splice-Varianten bekannt ist (Simon et al. 2004). Dies erklärt sich aus der Annahme, dass die IEGs als Vermittler einer Sofortreaktion schnell auf die unterschiedlichsten Reize reagieren müssen, um der Zelle eine Anpassung an die veränderten Bedingungen zu ermöglichen und daher über die strukturellen Voraussetzungen verfügen. So finden sich in den 3'-UTRs gehäuft phylogenetisch hoch konservierte, charakteristische Strukturelemente, die sogenannten *expressed sequence tags* (ESTs; z.B. Polyadenylierungs-Hexanukleotide oder zytoplasmatische Polyadenylierungselemente), welche Hinweise auf mögliche Transkriptionsstopps bieten und somit durch Generierung unterschiedlicher mRNAs ein differenzielles Agieren der Zelle auf Schlüsselreize ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Bioinformatische Methoden

2.1.1 GeneOntology Suchanfragen

Unter Ontologien versteht man formal definierte Systeme von Begriffen und/oder Konzepten und deren Relationen. *GeneOntology* (GO) stellt eine kontrollierte und hierarchisch gegliederte internetbasierte Datenbank zur Beschreibung von Genprodukten (Proteine und RNA), deren zelluläre Lokalisation, molekularer Funktion und den von ihnen involvierten biologischen Prozessen dar. Somit wird es unter Verwendung eines standartisierten biologischen Vokabulars, unabhängig von der Spezies oder der verwendeten Datenbank möglich, schnell und übersichtlich Informationen über ein bestimmtes Gen bzw. einen bestimmten Terminus zu erlangen. Zusammenhänge werden in GO über DAGs (= *directed acyclic graphs*, s. Abb. 8 als Beispiel für eine SGK1-Anfrage) visualisiert. Zusammenhänge zwischen den einzelnen Graphikboxen werden entweder mit „*is_a*“ oder mit „*part_of*“ geknüpft. „*is_a*“ stellt eine einfache Beziehung zwischen Klasse und Subklasse her, „A *is_a* B“ bedeutet dabei, dass A eine Subklasse von B ist. Beispiel: „nukleäre Chromosomen *is_a* Chromosomen“. Dagegen handelt es sich bei „*part_of*“ um eine komplexere Beziehung, „C *part_of* D“ bedeutet, dass wenn immer C vorhanden ist, ist es immer ein Teil von D, allerdings muss C nicht immer vorhanden sein. Beispiel: „Nukleus *part_of* Zelle“.

GeneOntology Anfragen wurden somit verwendet, um in einem ersten Arbeitsschritt zu prüfen, in wie weit die mit bestimmten Genexpressionen assoziierten Prozesse im Einklang mit den Erwartungen unserer Arbeitshypothese stehen.

Zur Beurteilung der Qualität der Angaben werden bei GO verschiedene Evidence-Grade angegeben, dabei wird zwischen den im Folgenden beschriebenen Codes unterschieden. In Tabelle 1 sind sie hierarchisch nach ihrer Aussagekraft gegliedert dargestellt (Einteilung nach Pubmed).

Tab.1: Darstellung der hierarchisch gegliederten Evidence-Grade, welche in der Auswertung der GO-Anfragen verwendet werden (Einteilung nach Pubmed).

<p>TAS = <i>Traceable Author Statement</i> (zurückverfolgbare Erklärung eines Autors)</p> <p>IDA = <i>Inferred from Direct Assay</i> (Folgerung aus einem wissenschaftlichen Bericht)</p>
<p>IPI = <i>Inferred from Physical Interaction</i> (Folgerung über physikalische Interaktionen)</p>
<p>ISS = <i>Inferred from Sequence or structural Similarity</i> Folgerung über Basensequenz oder strukturelle Gleichartigkeit</p> <p>IEP = <i>Inferred from Expression Pattern</i> (Folgerung über Expressionsmuster)</p>
<p>NAS = <i>Non-Traceable Author Statement</i> (nicht zurückverfolgbare Erklärung eines Autors)</p>
<p>IEA = <i>Inferred from Electronic Annotation</i> (Folgerung über elektronische Benotung)</p> <p>NR = <i>Not Recorded</i> nicht schriftlich belegt</p>

2.1.2 Multiple Sequenzabgleiche und *in silico* Expressionsanalysen mittels *GenomeBrowser*

In der komparativen Genomik werden multiple Sequenzabgleiche vorallem mit dem Ziel durchgeführt, phylogenetisch hochkonservierte Sequenzabschnitte zu finden und zu charakterisieren. Ein wichtiger Gesichtspunkt ist hierbei, dass konservierte Sequenzen häufig auf einen wichtigen funktionellen Aspekt hinweisen, der im Rahmen der Evolution erhalten blieb.

In dieser Arbeit wurden zwei Arten von multiplen Sequenzabgleichen durchgeführt. Zum einen wurden klassische *alignments* kürzerer Sequenzabschnitte von wenigen 100bp durchgeführt, um die phylogentische Konservierung auf Einzelbasenniveau zu bestimmen und um einzelne konservierte Funktionselemente wie zum Beispiel das Polyadenylierungssignal HEX auf Konservierung zu untersuchen. Diese Abgleiche wurden mit dem Program *GeneDoc* vorgenommen (Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. 1997 *GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation*, EMBNEW.NEWS 4:14). Zum anderen wurden im Sinne eines

orientierenden Screenings, alle mRNA-Varianten und *expressed sequence tags* (ESTs), die sich innerhalb eines ausgewählten Genlokus befinden gegeneinander verglichen. Ein solcher Vergleich ermöglicht einen ersten Überblick über die Vielzahl möglicher Varianten an proteincodierenden oder auch nicht-proteinkodierenden mRNAs und ihre jeweiligen Sequenzunterschiede, die aus einem Genlokus durch alternatives Splicing entstehen. Über das alternative Splicing hinaus kann hierdurch auch die Existenz möglicher weiterer sense oder antisense mRNA-Varianten, resultierend aus der Nutzung alternativer Promotoren, eruiert werden.

Für solche Abgleiche wurde der UCSC *GenomeBrowser* verwendet (<http://genome.ucsc.edu>), der es ermöglicht, ausgehend von einem eingegebenen Zielbereich innerhalb des Genoms oder einer eingegebenen Zielsequenz, Sequenzanalysen durchzuführen (Kent et al. 2002). Dem *GenomeBrowser* liegt dabei eine umfangreiche Datenbank, welche nicht ausschließlich humane Gensequenzen und Genomdaten, sondern auch solche weiterer 19 Spezies umfasst, zugrunde (Karolchik et al. 2003).

Gezielte Sequenzabgleiche wurden innerhalb des Browsers mittels *BLAT* vorgenommen (Kent 2002). Dabei können der jeweiligen Zielsequenz nicht nur die in Datenbanken abgelegten mRNA-Sequenzen und ESTs einer Species zugeordnet werden, sondern auch die homologen ESTs und mRNAs von bis zu 17 anderen Species. Durch einen solchen Abgleich erhärtet sich die Aussagekraft der Analyse über exprimierte Bereiche innerhalb des Genoms. Zur verfeinerten Sequenzanalyse verfügt der *GenomeBrowser* über integrierte Zugriffsmöglichkeiten auf Expressionsdatenbanken, die mittels einer Vielzahl bioinformatischer Verfahren zur funktionell orientierten Expressionsanalytik untersucht werden können und auch integrierte *share ware*-Programme zur funktionell orientierten Sequenzanalytik enthalten.

Genutzt wurden im Rahmen dieser Arbeit Verfahren zur Detektion von bei Vertebraten promotortypischen CpG-Inseln (Gardiner-Garden & Frommer 1987), zur Detektion von micro-RNA Bindungsstellen (Lewis, Burge, & Bartel 2005), zur Untersuchung von *repeating elements* (Jurka 2000) und zur Detektion von Eigenkomplementaritäten von Sequenzen innerhalb eines Genlokus, sowie des Gesamtgenoms (Kent et al. 2003), (Schwartz et al. 2003). Um zu untersuchen, ob bestimmte Bereiche außerhalb der Referenz-RNA-Sequenz eines Gens exprimiert sein könnten, wurden Daten des *Affymetrix Transcriptome Project Phase 2* berücksichtigt (Cheng et al. 2005).

2.2 Patientengut und Versuchssettings

2.2.1 *in vitro*-Versuche

2.2.1.1 Myotubenzellkultur

Die freundliche Bereitstellung ausdifferenzierter Myotuben und ihrer Vorläufer sowie mit Kobaltchlorid (CoCl) stimulierter Myotuben durch Fr. Dr. Cora Weigert, Tübingen, gab uns die Möglichkeit, unsere Analysen auf menschliche Muskelzellen auszuweiten.

Für diese Versuche wurden, nach vorheriger Aufklärung und Zustimmung der Probanden sowie der Ethikkommission, Satellitenzellen aus dem lateralen Anteil des Musculus quadriceps femoris durch perkutane Feinnadelbiopsie entnommen. Alle Probanden waren körperlich gesund, normalgewichtig und europäischer Abstammung.

Verwendete Zellkulturmedien und Ergänzungslösungen für den Differenzierungsversuch stammen allesamt von der Firma Invitrogen. Eine 1:1-Lösung, bestehend aus α -Minimum Eagles Medium und Ham's F-12, wurde mit 20% fetalem Rinderserum, 1% Haushuhn-Embryoextrakt und 0,2% Antibiotika- / Antimykotika-Gemisch angereichert. In diese Lösung wurden Satellitenzellen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro 60cm^3 zugegeben. Nach 4 Tagen wurden die Zellen in ein α -Minimum Eagles Medium mit 5,5mM Glucose, 2% fetalem Rinderserum und 0,2% Antibiotika/Antimykotika-Gemisch gegeben. Eine zusätzliche Stimulation erfolgte am 5. Tag durch Zugabe von 30mM Glucose.

2.2.1.2 THP-1-Zellversuche

Um die zelluläre Lokalisation von mRNA untersuchen zu können, wurde aus THP-1-Zellen (frühes Entwicklungsstadium myelomonozytärer Differenzierung) zytoplasmatische und nukleäre RNA isoliert.

Dabei wurden 2×10^7 Zellen angezchtet, abtrypsinisiert und abzentrifugiert. Das erhaltene Material wurde in 0,2ml RLN-Puffer resuspendiert (RLN-Puffer: 50mM Trispuffer pH 8,0, 140mM NaCl, 1,5mM MgCl, 0,5% (v/v) Triton x-100 + 200U/ml RNAse Inhibitor). Nach Zentrifugation dieses Gemisches bei 5500rpm (= 1000g) und 4°C für 3min erhielt man im Überstand die zytoplasmatische RNA 1. Für die zytoplasmatische RNA 2, wurde das Pellet erneut in 0,1ml RLN-Puffer + 20 μ l RLN-

Detergenz (= 3,3% (wt/v) NA-Deoxycholat + 6,6% (v/v) Tween 40) gelöst, 5min auf Eis stehen gelassen und danach zentrifugiert (3min, 5500rpm, 4°C). Dieses neu gewonnene Pellet wurde ein weiteres mal mit RLN-Puffer gewaschen, so dass dann die nukleäre RNA gewonnen wurde.

Die jeweils erhaltenen Extraktionen für die zytoplasmatische RNA 1 und 2, sowie für die nukleäre RNA wurden jeweils mit 1ml TriFast™ versetzt und dann weiter nach dem Protokoll des Herstellers „peqGOLD“ bearbeitet.

2.2.2 *in vivo*-Versuche

2.2.2.1 erschöpfende Ausdauerbelastung – Halbmarathon

Nach Aufklärung über eventuelle Risiken einer Blutentnahme, wurde im Rahmen eines Halbmarathonwettkampfes sieben ausdauertrainierten und wettkapferfahrenen Probanden jeweils 10min vor und unmittelbar nach Beendigung ihres Laufes 10ml venöses Vollblut entnommen. Dieses wurde umgehend der Lymphozytenisolation zugeführt (weiter s. Punkt 2.3.1).

2.2.2.2 Doppelblinde, placebokontrollierte, kurzfristige normobare Hypoxieexposition unter Antioxidatengabe

Hierbei wurde auf Proben zurückgegriffen, die im Rahmen einer früheren Arbeit von Nieß und Kollegen in der Abteilung für Sportmedizin der Universität Tübingen entstand (Niess et al. 2004). Im Folgenden ist kurz die Vorgehensweise bei diesem Versuch dargelegt.

Sechs männliche, nicht rauchende Probanden mit einem Durchschnittsalter von 26,2 Jahren (+/- 4,1 Jahre), die weder Medikamente, Nahrungsergänzungstoffe noch Vitamine zu sich nahmen und bei welchen keine internistischen Erkrankungen (kardial, respiratorisch, hämatologisch oder renal) bekannt waren, wurden in die Studie aufgenommen.

Die Studie gliederte sich in zwei Versuchstage, welche jeweils für 4 Stunden in der Hypoxiekammer unter einem normobaren hypoxischen Versuchszustand mit einer Sauerstoffkonzentration in der Maskenluft von 12,5% stattfanden, was einer Höhe von ungefähr 4100m üNN entspricht. Die Versuchstage wurden in 6-wöchigem Abstand durchgeführt. Nach Aufklärung über die möglichen Nebenwirkungen und

Risiken der Einnahme unten genannter Medikamente wurde in Vorbereitung auf den Aufenthalt in der Hypoxiekammer den Probanden zuerst all-rac- α -Tocopherol (α -Toc, 1 Kapsel mit 400mg; Woelm Pharma, Bad Honneff) 3 Wochen vor Versuch bzw. α -Liponsäure (α -LA, 1 Kapsel mit 600mg; ASTA Medica, Frankfurt) 2 Wochen vor Versuch einmal täglich verordnet. Dies geschah in doppelter Verblindung gegen ein entsprechendes Placebopräparat. Die Probanden wurden über die Risiken einer Blutentnahme aufgeklärt und an den Versuchstagen zu fünf definierten Zeitpunkten jeweils 10ml venöses Vollblut abgenommen. Die Zeitpunkte lagen zu Beginn (0h), nach 2h in der Kammer (2h), zum Ende des Versuchs (4h), 1 Stunde nach Versuchsende (5h) und 3 Stunden nach Versuchsende (8h).

2.3 Aufarbeitung der Blutproben

2.3.1 Lymphozytenisolation, PBMC-Gewinnung

Mit Hilfe von Lymphoflot (Biotest AG, Dreieich) wurden nach Entnahme des Blutes bei der Halbmarathonbelastung die PBMCs (periphere mononukleäre Blutzellen) gewonnen. Zuerst wurden je 20ml Blut mit 20ml PBS- (Phosphat-gepufferte Salzlösung) Puffer versetzt. 20ml des Gemischs wurden in ein Cup gegeben, welches zuvor mit 20ml Lymphoflot gefüllt wurde. Da die einzelnen Blutzellen eine unterschiedliche Dichte haben, können sie durch Zentrifugation in der Lymphoflotverdünnung entlang ihres Dichtegradienten aufgetrennt werden. Lymphozyten, Monozyten sowie Thrombozyten haben eine niedrigere Dichte und lagern sich oberhalb der Lymphoflotschicht ab. Erythrozyten und Granulozyten sammeln sich dagegen aufgrund ihrer höheren Dichte unterhalb der Schicht an. Die Zentrifugation erfolgte bei 2100rpm für 20 Minuten. Die obere Schicht mit Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten wurde abpipettiert und mit 50ml PBS-Puffer verdünnt. 300 μ l dieser Verdünnung wurden verwendet, um mit Hilfe des Zellzählers Cell-Dyn (Abbott, Ludwigshafen) den Zellgehalt zu messen. Die restlichen 49,7ml wurden einer erneuten Zentrifugation unterzogen (10min bei 1200rpm), nach welcher sich nun ein Pellet mit den Zellen absetzte. Dieses wurde, je nach Zellgehalt, so in PBS-Puffer gelöst, dass eine Zellkonzentration von 10⁷ Zellen/ml erreicht wurde. 1ml des Gemischs wurde erneut in 9ml PBS-Puffer gelöst, bei 1200rpm für 10min zentrifugiert und wiederum der Überstand abpipettiert. Im letzten Arbeitsschritt wurden dann noch 600 μ l RLT-Puffer dazugegeben.

2.3.2 Isolation zellulärer RNA

Die Isolierung der zellulären RNA nahmen wir unter Verwendung des PAXgene™ Blood RNA Kit (PreAnalytiX, Qiagen GmbH, Hilden) vor. Zu Beginn wurden die Proben für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend für 10min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dem übrig gebliebenen Pellet wurden 5ml RNase-freies Wasser zugegeben. Nach Vortexen (REAXtop, Heidolph), erneuter Zentrifugation bei 4000g (= 5000rpm) für 10min und Verwerfen des Überstandes, wurde das Pellet mit 360µl Pufferlösung BR1 gemischt. Anschließend wurden der Probe 300µl Pufferlösung BR2 und 40µl Proteinase K zugegeben und diese bei 55°C für 10min inkubiert. Nach einer weiteren 3-minütigen Zentrifugation verwarfen wir die untere Phase und fügten dem Überstand 350µl Ethanol zu. 700µl der Probe wurden dann auf der PAXgene-Säule für 1min bei 8000g zentrifugiert. Nach Entfernen des Durchflusses konnte weiteres Probenmaterial auf der Säule zentrifugiert werden. Im nächsten Schritt wurden der Probe 700µl Pufferlösung BR3 zugefügt, zentrifugiert (1min, 8000g) und nach Austauschen des Cups das Vorgehen mit 500µl Pufferlösung BR4 wiederholt. Noch einmal wurden 500µl BR4 zugegeben, wobei dieses Mal für 3min bei 8000g zentrifugiert wurde. Erneute Wiederholung des letzten Schrittes. Nach 5-minütiger Inkubation bei 65°C wurde die Probe sofort auf Eis gelagert. (Dieses Vorgehen richtet sich nach den Angaben des Herstellers)

2.3.3 Aufbereitung der RNA

2.3.3.1 DNase-Verdau

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Vorgaben des RNeasy Midi-Kits (Qiagen GmbH, Hilden). Diese wurde anschließend in 88µl RNase-freies Wasser aufgenommen. Den Proben wurde je 2µl DNase I (RNase-Free DNase-Set, Qiagen GmbH, Hilden) und 10µl 10-fach DNase-Puffer (1M Natriumacetat, 50mM MgSO₄, pH5) zugegeben. Während der Inkubation bei 25°C für 1 Stunde fand der enzymatische DNA-Verdau statt. Um anschließend die DNase wieder zu inaktivieren, wurden die Proben bei 65°C für 10min auf dem Hitzeblock (Digital Dry Block Heater; PMC) inkubiert.

2.3.3.2 RNA-Aufreinigung

In weiteren Reinigungsschritten sollten anschließend die restlichen Verunreinigungen aus den Proben entfernt werden. Unter Zugabe von je 400µl Phenol/Chloroform (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000rpm (EBA 12R, Hettich) bildeten sich in den Proben zwei Phasen, von denen die untere verworfen wurde, welche die gelösten Stoffe enthielt. Zentrifugation und Verwerfen der unteren Schicht wiederholten sich nach Zugabe von 400µl Chloroform/Isoamylalkohol (Sigma-Aldrich GmbH, München). Eine Inkubation der Proben mit 10µl Natriumacetat (Merck, Darmstadt) und 250µl 100% Ethanol (Merck, Darmstadt) für 30min bei -70°C, führte zur Ausfällung der RNA. Durch anschließende Zentrifugation der Probe für 15min bei 14 000rpm und 4°C setzte sich die RNA am Boden der Cups ab. Der Ethanol wurde dekantiert und die Zentrifugation (15min, 12 000rpm, 4°C) unter Zugabe von 300µl 70% Ethanol als Waschschrift zweimal wiederholt. Das so entstandene RNA-haltige Pellet wurde luftgetrocknet und in 20µl 10mM Tris-Puffer (pH 8) gelöst.

2.3.3.3 Konzentrations- & Reinheitsbestimmung der RNA

Um die gewonnen RNA-Proben auf die einheitliche Konzentration von 50ng/µl einstellen zu können und den Grad der RNA-Reinheit bestimmen zu können, wurden sie mit Hilfe eines Photometers (Utrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) vermessen. Dazu wurden 4µl RNA in 66µl Tris-Puffer (pH 8) gelöst und nach vorheriger Eichung des Gerätes in den Strahlengang gestellt. Bei Bedarf wurden die Proben mit Reinstwasser (Ampuwa[®], Fresenius Kabi, Bad Homburg) an die vorgegebene Konzentration angeglichen.

2.3.4 Gewinnung von cDNA unter Verwendung reverser Transkriptase und 3'RACE

Um später die Proben mit Hilfe der PCR messen zu können, musste die aufgereinigte RNA nun noch in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Es wurde ein Reagenzansatz bestehend aus 5µl Probe (250ng RNA) und 1µl 100mM Random Hexamer (PreQlab, Erlangen) und 1µl dNTPs (1mM) (Gemisch, das zu gleichen Teilen aus dATP, dTTP, dCTP und dGTP besteht) (Roche, Mannheim) angefertigt und bei 70°C für 10min inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Probe auf

4°C abgekühlt und dem Ansatz 13µl RT-Reagenz zupipettiert. Dieses Reagenz setzte sich aus 2µl RT-Puffer (10mM Tris-Puffer, 5mM MgCl₂, pH 8,3), 1µl Reverse Transkriptase (50U) (M-MLV RT, Promega, Mannheim), 0,5µl RNase-Inhibitor (50U), und 9,5µl Reinstwasser (Ampuwa[®], Fresenius Kabi, Bad Homburg) zusammen. Die Probe wurde weiter für 50min bei 37°C inkubiert, anschließend bei 90°C für 5min erhitzt, wieder auf 4°C abgekühlt (30sec) und erneut für 5min auf 90°C erhitzt (s. Abb. 2). Als Negativkontrolle und zur Detektion eventueller genomischer Verunreinigungen der RNA-Proben, stellten wir bei jedem Umschrieb sogenannte no-RT-Kontrollproben (no-RT-control) her. Dabei wurde ebenfalls der RNA-Ansatz verwendet, jedoch wurde im RT-Reagenzgemisch das Reverse Transkriptase-Enzym durch Wasser ersetzt. Somit soll erreicht werden, dass die vorhandene RNA nicht in cDNA umgeschrieben werden kann. Sollte diese Probe später während der PCR doch positiv werden, kann von einer Verunreinigung mit genomischer DNA ausgegangen werden.

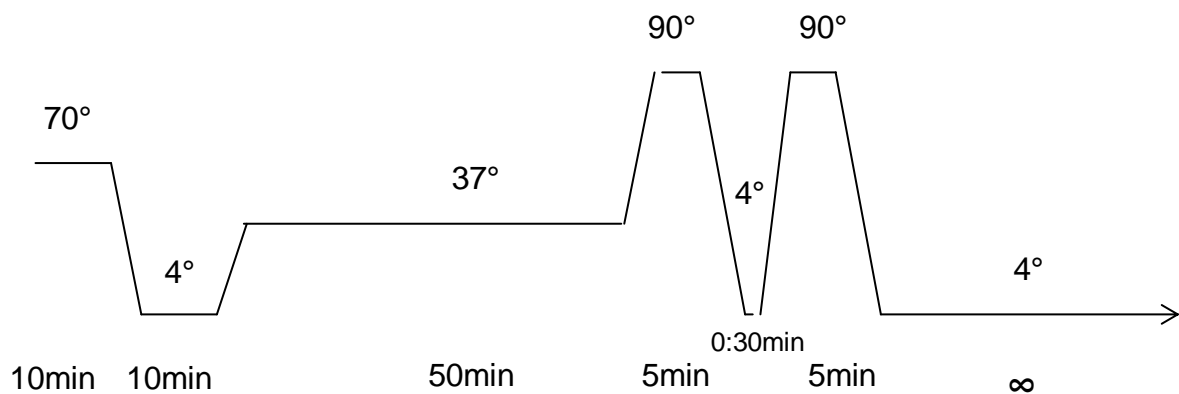


Abb. 2: Temperatursetting Reverse Transkription (Zeitangaben in Minuten; Temperatur in Grad Celsius)

2.4 PCR

2.4.1 Grundlagen

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) leitete nach ihrer Bekanntmachung 1987 eine Revolution in den Arbeitstechniken der Biologie und deren angrenzenden Fachgebieten ein. Mit ihrer Hilfe wurde es möglich, kleinste Mengen genetischen Materials *in vitro*, also ohne einen vorherigen Transfer der DNA in lebende Zellen vornehmen zu müssen, zu amplifizieren. Für die Durchführung der PCR benötigt man Informationen über die Sequenzen der Regionen, welche die gesuchte Stelle flankieren. Die zu diesen Sequenzen komplementäre Oligonukleotide werden synthetisch hergestellt und als Primer für die PCR benutzt. Als erster Schritt wird die zu untersuchende dsDNA (Doppelstrang-DNA) erhitzt und denaturiert, die Stränge trennen sich voneinander und dienen als Vorlage (*template*) für die DNA-Polymerase. Als nächstes können sich die im Überschuß zugegebenen Primer bei gemäßigter Temperatur an die Einzelstränge anlagern (*annealing*). Sie sind Ausgangspunkt für die Taq DNA-Polymerase, welche die neuen komplementären Stränge synthetisiert. Die Polymerase wird von dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen, um zu verhindern, dass nach jedem Denaturierungsschritt erneut Polymerase zur Aufrechterhaltung der Strangverlängerung zugegeben werden muss. Am Ende eines Zyklus wurde ein einzeln vorhandener DNA-Strang verdoppelt. Wiederholt man dieses Verfahren mehrere Zyklen, so erhält man nach jedem weiteren erfolgreich abgeschlossenen Zyklus theoretisch eine Verdoppelung der vorhandenen DNA. Bei einer Anzahl von n Zyklen, beläuft sich die Anzahl der Kopien auf 2^{n-1} .

2.4.2 Quantitative *Real-Time-RT-PCR*

Bei unseren Versuchen benutzten wir das Verfahren der Echtzeit-RT-PCR (*real-time reverse transcription – polymerase chain reaction*), durch die es uns möglich war, eine DNA-Probe zu amplifizieren und gleichzeitig im selben Reaktionsgefäß den quantitativen Nachweis der entsandenen Produkte durchführen zu können. Dafür gaben wir dem Reaktionsansatz den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (Molecular Probes, Eugene, USA) zu, der durch Interkallation mit der DNA zur Markierung von DNA-Produkten geeignet ist. Um den Fluoreszenzdetektor zu eichen und eine

einheitliche Basisfluoreszenz zu erlangen, setzten wir dem Gemisch außerdem noch den Fluoreszenzfarbstoff FITC (10nM, Molecular Probes, Eugene, USA) bei.

2.4.3 Primerauswahl und Bestimmung der PCR-Effizienz

Für den Start einer PCR benötigt man, wie bereits oben erwähnt, die sogenannten Primer. Die synthetisch hergestellten Basensequenzen sind jeweils antiparallel und komplementär zu dem zu untersuchenden Ausgangs-mRNA-Strang. Optimale Primer haben dabei eine Länge von 20 – 24bp und einen GC-Gehalt von 45 – 63%, um eine spezifische Anlagerung der Primer an die cDNA und eine optimale Annealingtemperatur von 62 – 63°C zu erreichen. Desweiteren strebten wir an, Produkte mit einer Länge von 60 – 140bp zu erhalten.

Für die Untersuchungen zur SGK1 wurden folgende in Tab. 2 angegebene Primer verwendet. Sie wurden mit Hilfe der Programme *Primer 3* (Rozen und Skaletsky, 2000) und *Primer Premier 5* (Premier, Biosoft International) ausgewählt. Um die Spezifität der jeweiligen Primerpaare im zu untersuchenden Genabschnitt zu prüfen, bedienten wir uns der Datenbank *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi). Alle hier verwendeten Primer wurden bei der Firma MWG Biotech, Ebersberg hergestellt. Ihre Lage innerhalb der Gensequenz ist in Abb. 3 dargestellt.

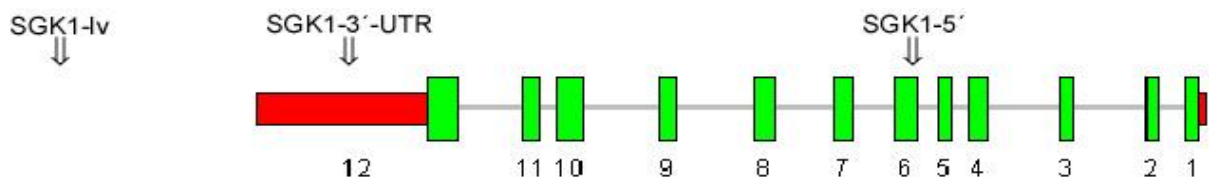


Abb. 3: Schematische Darstellung des SGK1-Genabschnittes und der Lage der in dieser Arbeit verwendeten Primer. Grüne Kästchen stellen die Exons dar (durchnummeriert), rote Kästchen stehen für die 3'- bzw. 5'-UTR. Der SGK1-lv-Primer liegt außerhalb der Referenzsequenz im Bereich des bioinformatisch gefundenen alternativen 3'-Endes (s. 3.1.5.)

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer, deren Sequenzen und Basenlänge.

Primer	Sense	Antisense	Länge
SGK-3'UTR	5'-TGT ATA AAG AAC GTC TGT ACA TTG GG-3'	5'-GTT GTG TGA TGG GAT GAG GGA-3'	143bp
SGK-5'	5'-GAG CGG AAT GTT CTG TTG AAG A-3'	5'-GAG AAG TGA AGG CCC ACC AG-3'	59bp
SGK_hs5	5'-CAG TTG TCA GCC AGA ACT GTT T-3'	5'-ACA ACA CAT ATA ATT ACC AGG AAT GC-3'	110bp
SGK_hs1	5'-GGG CAT TAT TTA TGT GTA TAT GGC-3'	5'-TGT GTG ATG GTA GGA CAG AAG GAC-3'	191bp
SGK lv	5'-CCA GAA TTG AAA GGT GCC AGA-3'	5'-CCC TTG TTC ACT GCC TGT CAC-3'	487bp
GAPDH	5'- TCA ACA GCG ACA CCC ACT CC -3'	5'- TGA GGT CCA CCA CCC TGT TG -3'	126bp

Weiter bedarf es eines sogenannten Housekeeping-Gens, mit welchem später die Expressionswerte der PCR-Produkte in Relation zu einem definierten Ausgangswert betrachten werden können und welches zudem als interne Kontrolle für den korrekten Ablauf der PCR dient. Dadurch wird es möglich, verschiedene Amplikons und unterschiedliche PCR-Läufe miteinander zu vergleichen. Als Housekeeping-Gen diente uns ein Primerpaar, welches einen Genabschnitt der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert. In Vorversuchen zeigte sich die GAPDH im Vergleich mit ribosomaler 18s RNA mit zuverlässig stabilen Expressionswerten, so dass wir sie als Housekeeping-Gen einsetzen konnten (s. Abb. 4: CT-Werte in Lymphozyten und PBMCs) (Simon, Schott, Williams, & Schaeffel 2004). Weiter setzten wir das Gen 7sk als ein solches Housekeeping-Gen ein. Die 7sk-mRNA verweilt im Zellkern und wird nicht im Zytoplasma in Protein umgeschrieben, weshalb wir dieses Gen als Housekeeping Gen für unsere Kern-Zytoplasma-Versuche verwendet haben.

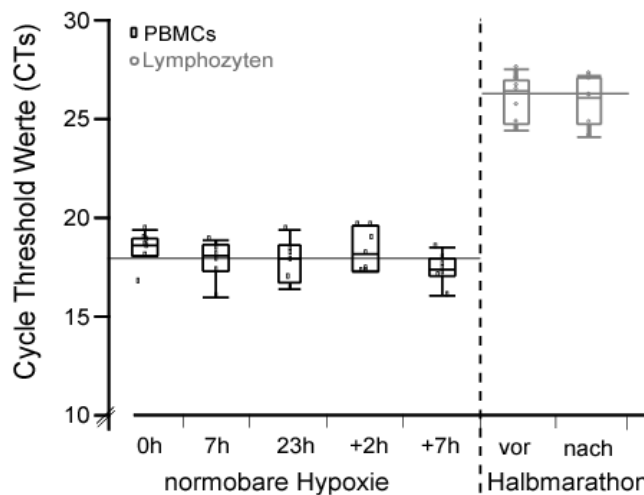


Abb. 4: Expressionswerte des Housekeeping-Gens GAPDH. Es zeigt sich eine hohe Konstanz der CT-Werte sowohl unter Hypoxie in PBMCs als auch unter Ausdauerbelastung in Lymphozyten. Festzustellen ist dabei, die höheren CT-Werte beim Halbmarathon in Lymphozyten.

Um die PCR-Ergebniss später statistisch auswerten zu können, mussten wir vor Beginn der eigentlichen Messungen, die Effizienzen (E) der jeweils verwendeten Primer bestimmen. Dazu erstellten wir 6-stufige exponentielle Verdünnungsreihen, anhand derer Standardkurven berechnet werden konnten. Durch Veränderungen in der *Annealing*-Temperatur oder der Dauer der Polymeraseaktivierung während der PCR, wurde versucht eine möglichst optimale Effizienz der Primer zu erreichen. Dabei orientierten wir uns daran, so nahe an wie möglich an die theoretisch beste Effizienz von 2,0 (entspricht einer Verdoppelung des DNA-Template) zu kommen, was aber in der Praxis quasi nie zu erreichen ist. Mit Hilfe des Programms REST[®] (R.Rasmussen 2001), (Pfaffl, Horgan, & Dempfle 2002) konnte aus den CT-Werten (*cycle threshold values*) der Verdünnungsstufen die Effizienz der Primer errechnet werden. CT-Werte geben die Anzahl der Zyklen wider, die man benötigt, um in einer Messung eine Fluoreszenz über einen vorher bestimmten Wert (*threshold*) zu bekommen. In einem Schaubild wurden diese CT-Werte der einzelnen Gene gegen den Logarithmus der jeweiligen cDNA-Konzentration aufgetragen, wodurch sich für jedes Primerpaar eine Gerade mit einer Steigung f ergab. Damit konnte die Effizienz der Primer mit der in Abb. 5 dargestellten Formel berechnet werden. Tabelle 3 stellt die damit berechneten Effizienzen in einer Übersicht dar.

$$E = 10^{1/f}$$

Abb. 5: Formel zur Berechnung der Primereffizienzen.

Tab. 3: Übersicht über die Effizienzen der hier verwendeten Primerpaare.

Primer	Effizienz
GAPDH (Housekeeping)	1,98
7sk (Housekeeping)	1,93
SGK-lv	2
SGK-3'-UTR	1,97
SGK-5'	1,96
SGK_hs5	über 5 Log ₁₀ -Stufen nicht bestimmbar
SGK_hs1	über 5 Log ₁₀ -Stufen nicht bestimmbar

2.4.4 PCR-Setting und Schmelzkurvenanalyse

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Versuchsreihen verwendeten wir einen PCR-Ansatz von insgesamt 15µl, der sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte: 7,5µl QuantiTech™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) inklusive 0,015µl (10nM) FITC (Molecular Probes, Eugene, USA), je 1,25µl Sense- bzw. Antisenseprimer in einer Endkonzentration von 0,3µM sowie 5µl der zu untersuchenden cDNA-Probe im Verhältnis Kit : Primer : cDNA = 3 : 1 : 2. Wir pipettierten jeweils 3 Wells des selben Proben-Ansatzes auf eine 96 Well Platte (Thermo Fast 96®, Semi-Skirted, natural, Cat# AB-0900, ABgene, Epsome, U.K.), um Abweichung in der PCR durch Mittelung der CT-Werte umgehen zu können. Vor dem Lauf wurde die Platte mit dem Combi Thermo-Sealer (Model-No. 0384/240, ABgene, Epsom, U.K.) und unter Verwendung der Clear Seal-Folie (Clear Seal Strong, Cat# AB-0685 ABgene, Epsom, U.K.) luftdicht verschlossen. Wir verwendeten das PCR-Gerät iCycler von der Firma Biorad (Hercules, CA, USA).

Unter Berücksichtigung der zuvor durchgeführten Versuche zur Primereffizienz, wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet: Vor die eigentliche PCR, die sich aus 40 Zyklen von einem 15-sekündigen 95°-Schritt, einer *Annealing*-Temperatur von 60°C (15sec) und der Fluoreszenzmessung bei 72°C (10sec) zusammensetzte, stellten wir zur Aktivierung der Polymerase eine „Pre-PCR“ mit einem auf 4min verlängerten 95°C-Schritt, und wiederholten diese bei gleicher *Annealing*- & Fluoreszenzmessungstemperatur wie die folgende PCR 4-mal (s. Abb. 6).

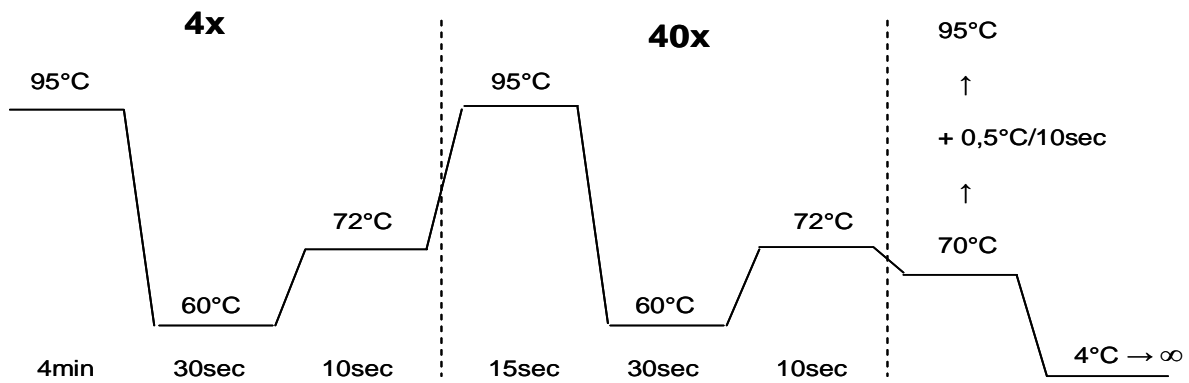


Abb. 6: Temperatursetzung der PCR mit angeschlossener Schmelzkurvenmessung (rechte Spalte). Die linke Spalte zeigt die von uns verwendete erweiterte Aktivierungsphase des Polymeraseenzym.

Zur Identifikation des PCR-Produkts und zum Ausschluss von Verunreinigungen eventuell unspezifisch amplifizierter Produkte, wurde der PCR noch eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen. Dabei bedient man sich der Tatsache, dass abhängig vom jeweiligen GC-Gehalt jeder DNA-Doppelstrang einen spezifischen Schmelzpunkt besitzt, an welchem definitionsgemäß 50% der Doppelstränge aufgetrennt sind. Ausgehend von 70°C wurde in schrittweiser Erhöhung von 0,5°C (für je 10sec) bis zu einer Temperatur von 95°C die Fluoreszenz gemessen und in einem Diagramm zur Darstellung gebracht (s. Abb. 7).

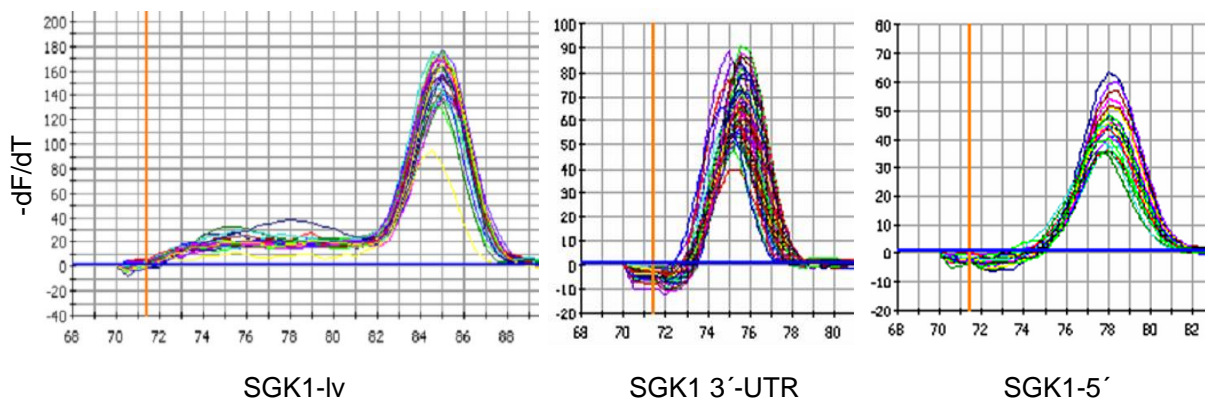


Abb. 7: Schmelzkurven der SGK1-Primer IV, 3'-UTR und 5'. Auf der x-Achse ist die Temperatur in Grad Celsius angegeben, bei welcher sich die jeweiligen Primer charakteristischerweise auftrennen: IV: 85°C, 3'-UTR: 75,5°C, 5': 78°C.

2.5 statistische Auswertung

2.5.1 Real-Time RT-PCR

Die Auswertung der PCR-Läufe geschah unter Verwendung der Software JMP IN 5.1 (SAS Institute Inc., NC, USA). Stark unterschiedliche CT-Werte innerhalb eines von der selben Probe angesetzten Triplets wurden anhand ihrer Schmelz- und Amplifikationskurven untersucht und die negativ auffälligen Proben von der Statistik ausgeschlossen. Am Ende fanden die gemittelten CT-Werte der PCR-Amplifikationen Eingang in die statistische Auswertung.

Der CT-Wert gibt die Anzahl der Zyklen während einer PCR an, nach welchen die Fluoreszenzintensität des Amplifikationsproduktes einen zuvor festgelegten Schwellenwert (*Threshold*) überschreitet. Wir wählten für unsere Untersuchungen eine Threshold-Position von 25, was ungefähr 10% der mittleren maximalen Fluoreszenz entsprach. Mit Hilfe des CT-Wertes kann man die *mean normalized expression* (MNE) berechnen, welche das PCR-Ergebnis des untersuchten Amplifikons in Relation zum Housekeeping-Gen GAPDH ausdrückt (Simon 2003). Die Berechnung dieses Wertes erfolgte anhand folgender Formel:

$$MNE = \frac{E_{reference}^{CT_{reference,mean}}}{E_{target}^{CT_{target,mean}}}$$

Anschließend logarithmierten wir die MNE-Werte, da nach Durchführung eines Shapiro-Wilk-W-Testes festgestellt wurde, dass diese Werte in den Behandlungsgruppen einer Nicht-Normalverteilung entsprachen. Eine Box-Cox-Transformation zeigte, dass die Logarithmierung der Daten (Log-Normalisierung) am geeignetsten war, die Normalverteilung in den Gruppen zu erreichen.

Um die Ergebnisse auf signifikante Einflüsse zu untersuchen, wurden oneway-ANOVA-Analyse (*analysis of variance*: Varianzanalyse bezüglich eines einzelnen Merkmals) durchgeführt. In den Schaubildern sind wir teilweise wieder auf eine nicht-logarithmierte Darstellung der Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle zurückgegangen, um eine übersichtlichere Darstellungsform zu erhalten.

Bezüglich der Zellkulturexperimente wurden die Konfidenzintervalle auf Basis technischer Replikate für die *Real-Time-PCR* angegeben.

Zur Analyse von Einflüssen mehrerer Variablen wie zum Beispiel bei der kurzfristigen Hypoxie die Antioxidantien- bzw. Placebogabe und Hyp- bzw. Normoxie auf die jeweilige Zielvariable einer Genexpression, führten wir mittels logistischer Regression in einer Multivariaten-Analyse das *Standard Least Squares Fitting* durch. Jump 5.1 berechnet in diesen Fällen die entsprechend adjustierten Varianzen und Signifikanzen.

Gepaarte Vergleiche bei Verlaufsanalysen zu denselben Probanden wurden dadurch ermöglicht, dass jeweils der Faktor „Proband“ als Einflussvariable in das Modell mit einbezogen wurde.

2.6 Gelelektrophorese

Um eine zusätzliche Identifikation und Längenbestimmung der PCR-Produkte durchführen zu können, verwendeten wir die Methode der Gelelektrophorese. Wir benutzten eine 1,5%ige Agarose-Laufmatrize, die hergestellt wurde indem 1,5g Agarosepulver in 100ml 1xTAE-Puffer durch Erhitzen gelöst wurden. Damit die PCR-Produkte später mittels UV-Lampe dargestellt werden konnten, versetzten wir die Agarose-Lösung vor dem Gießen in die Laufform zusätzlich noch mit 5µl Ethidiumbromid, das mit der DNA interkaliert und uns somit als Marker diente. Sobald die Lösung genügend abgekühlt war, wurde sie in die Laufform gegossen und mit Kammerplatzhaltern versehen. Nach 45-minütiger Aushärtung des Gels konnte es in die Laufkammern gegeben und mit 1x TAE-Puffer bedeckt werden. Anschließend konnte das Gel mit den PCR-Produkten befüllt werden. Dazu mischten wir 15µl PCR-Produkt mit 3µl 6x Ladepuffer und pipettierten je 15µl dieses Gemisches in die zuvor angefertigten Taschen der Gelmatrize. Damit wir bei der Auswertung die Laufbanden einer bestimmten Größe zuordnen konnten, ließen wir Basenpaarleitern einer vorgegebenen Länge (123bp, 250bp oder 1kb) in den Gelen mitlaufen. Nach einer Laufzeit von 1 – 1,5h bei 89mV konnten die Laufbanden mit Hilfe des Programmes QuantityOne unter der UV-Lampe detektiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 *in silico*-Analysen

3.1.1 GeneOntology-Analyse

GeneOntology-Analysen für die SGK1 erbrachten als Ergebnisse mit hohem Evidenzgrad deren Beteiligung an den Prozessen Proteinphosphorylierung, Stressantwort und Na⁺-Transport, sowie den molekularen Funktionen Proteinbindung und die Serin- / Threoninkinase-Aktivität. Mit deutlich geringerem Evidenzgrad finden sich weitere Beteiligungen bei der Apoptose, der ATP-Bindung, Transferase-Aktivität und die subzelluläre Lokalisation der SGK1 in Nukleus, Zytoplasma und endoplasmatischen Retikulum (in der Tabelle kursiv markiert).

Tab. 4: GO-Anfragen-Ergebnisse zu SGK1_human. IPI = Interferred from physical interaction, TAS = traceable author statement (zurückverfolgbare Erklärung eines Authors), IEA = interferred by electronic annotation (Folgerung über elektronische Benotung). IntAct = proteomic database, ProtInc = Proteome Incorporated.

	Annotations	GO-ID	Evidence / Source
Molecular function	protein binding	GO:0005515	IPI:IntAct
Molecular function	protein serine/threonine kinase activity	GO:0004674	TAS:ProtInc
<i>Molecular function</i>	<i>ATP-binding</i>	<i>GO:0005524</i>	<i>IEA</i>
<i>Molecular function</i>	<i>kinase activity</i>	<i>GO:0016301</i>	<i>IEA</i>
<i>Molecular function</i>	<i>transferase activity</i>	<i>GO:0016740</i>	<i>IEA</i>
Biological process	protein amino acid phosphorylation	GO:0006468	TAS:ProtInc
Biological process	response to stress	GO:0006950	TAS:ProtInc
Biological process	sodium ion transport	GO:0006814	TAS:ProtInc
<i>Biological process</i>	<i>Apoptosis</i>	<i>GO:0006915</i>	<i>IEA</i>
<i>Component</i>	<i>Nucleus</i>	<i>GO:0005634</i>	<i>IEA</i>
<i>Component</i>	<i>Cytoplasm</i>	<i>GO:0005737</i>	<i>IEA</i>
<i>Component</i>	<i>Endoplasmic reticulum</i>	<i>GO:0005783</i>	<i>IEA</i>

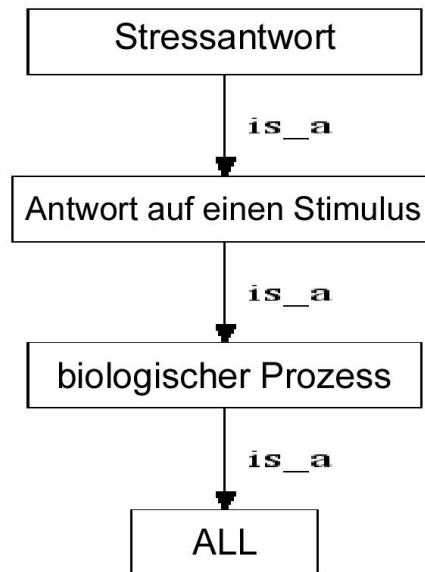


Abb. 8: Beispiel der graphischen Darstellung für die Suchanfrage „Stressantwort“ (stress response) in GeneOntology für SGK1 mittels eines DAG (directed acyclic graph).

3.1.2 Analyse der 3'-UTR des humanen SGK1-Gens

Bioinformatisch gestützte Untersuchungen der nicht transponierten Region des 3'-Endes, der *3'-untranslated region* (3'-UTR) des SGK1-Gens, zeigen charakteristische Strukturelemente innerhalb dieser 1017 Basenpaar (bp) langen Sequenzabfolge, die so genannten *expressed sequence tags* (ESTs). Es finden sich AU-reiche Abschnitte, welche sich durch leicht zu lösende Basenpaarungen auszeichnen und somit einen instabilen Bereich innerhalb der Sequenz darstellen. Daneben finden sich zytoplasmatische Polyadenylierungselemente (CPEs), die sich, an das Bindungsprotein CPEB (CPE-Bindungsprotein) angelagert, mit dem CPSF-Komplex verbinden und in dieser Form mit dem Polyadenylierungs-Hexanukleotid (HEX, 5'-AATAAA-3') interagieren können. Eine solche Interaktion führt zur Polyadenylierung der mRNA. Wie bereits unter 1.2.3. (transkriptionsunabhängige Mechanismen) dargestellt, bricht die Endonuklease die Transkription an 5'-AATAAA-3'-Sequenzen ab. Somit geben solche Regionen, in welchen die beschriebenen EST-Elemente gehäuft vorkommen, Hinweise auf mögliche Transkriptionsstopps wider. Die folgende Darstellung gibt einen Überblick über die in der 3'-UTR vorhandenen ESTs (Abb. 9).

Unter Zuhilfenahme des UCSC-Browsers untersuchten wir die SGK1-Sequenz auf strukturelle Auffälligkeiten in ihrer 3'-UTR sowie ihrer 5'- bzw. Promotorregion. Dabei fiel auch hier auf, dass es neben dem bekannten 3'-UTR-Ende und der dort

liegenden Polyadenylierungsstelle (Abb. 10: *reported Poly(A) Sites, grün*), noch mindestens 3 weitere potentielle Polyadenylierungsstellen in dieser Region gibt (Abb. 10: *predicted Poly(A) Sites, violett*). Diese Befunde machen das Auftreten alternativer Enden innerhalb dieser Sequenz wahrscheinlich.

Am 5'-Ende finden sich CpG-Islands (Abb. 10: grün), die typischerweise in Bereichen des Transkriptionsstarts zu finden sind. Abbildung 10 zeigt neben dem starken, direkt in der Promotorregion liegenden CpG-Insel, eine zweite schwächere, da kürzere CpG-Insel weiter upstream (hellgrün dargestellt). Promotorregionen sind hier mit Hilfe des *FirstEF* dargestellt, dabei wird diese Region mitsamt dem ersten Exon aufgezeigt. Auch an der zweiten CpG-Insel findet man Angaben unter *FirstEF*, so dass auch hier die Vermutung nahe liegt, dass es sich um eine alternative Promotorregion für die SGK1 handeln kann.

ACCCTGTTAG	GGCTTGGTTT	TAAAGGATTT	TATGTGTGTT	TCCGAATGTT	134533049
TTAGTTAGCC	TTTTGGTGGG	GCCGCCAGCT	GACAGGACAT	CTTACAAGAG	134532999
AATTTGCACA	TCTCTGGAAG	CTTAGCAATC	TTATTGCACA	CTGTTTCGCTG	134532949
GAAGCTTTTT	GAAGAGCACA	TTCTCCTCAG	TGAGCTCATG	AGGTTTTTCAT	134532899
TTTTATTCTT	CCTTCCAACG	TGGTGCTATC	TCTGAAACGA	GCGTTAGAGT	134532849
GCCGCCTTAG	ACGGAGGCAG	GAGTTTCGTT	AGAAAGCGGA	CGCTGTTCTA	134532799
AAAAAGGTCT	CCTGCAGATC	TGTCTGGGCT	GTGATGACGA	ATATTATGAA	134532749
ATGTGCCTTT	TCTGAAGAGA	TTGTGTTAGC	TCCAAAGCTT	TTCCTATCGC	134532699
AGTGTTCAG	TTCTTTATTT	TCCCTTGTTG	ATATGCTGTG	TGAACCGTCG	134532649
TGTGAGTGTG	GTATGCCTGA	TCACAGATGG	ATTTTGTTAT	AAGCATCAAT	134532599
GTGACACTTG	CAGGACACTA	CAACGTGGGA	CATTGTTTGT	TTCTTCCATA	134532549
TTTGGAAGAT	AAATTTATGT	GTAGACTTTT	TTGTAAGATA	CGGTTAATAA	134532499
CTAAAATTTA	TTGAAATGGT	CTTGCAATGA	CTCGTATTCA	GATGCCTAAA	134532449
GAAAGCATTG	CTGCTACAAA	TATTTCTATT	TTTAGAAAGG	GTTTTTATGG	134532399
ACCAATGCCC	CAGTTGTCAG	TCAGAGCCGT	TGGTGTGTTT	CATGTTTAA	134532349
AATGTCACCT	GTAATAATGGG	CATTATTTAT	GTTTTTTTTT	TTGCATTCCT	134532299
GATAATTGTA	TGTATTGTAT	AAAGAACGTC	TGTACATTGG	GTTATAACAC	134532249
TAGTATATTT	AAACTTACAG	GCTTATTTGT	AATGTAAACC	ACCATTTTAA	134532199
TGTACTGTAA	TTAAACATGGT	TATAATACGT	ACAATCCTTC	CCTCATCCCA	134532149
TCACACAACH	TTTTTTTGT	GTGATAAACT	GATTTTGTTT	TGCAATAAAA	134532099
CCTTGAAAAA	TATTTAC				134532049

Abb. 9: Genomische Sequenz der 3'-UTR des SGK1-Gens mit Darstellung der ESTs. (blau: AU-reiche Elemente, grün: CPE, rot: HEX-Elemente)

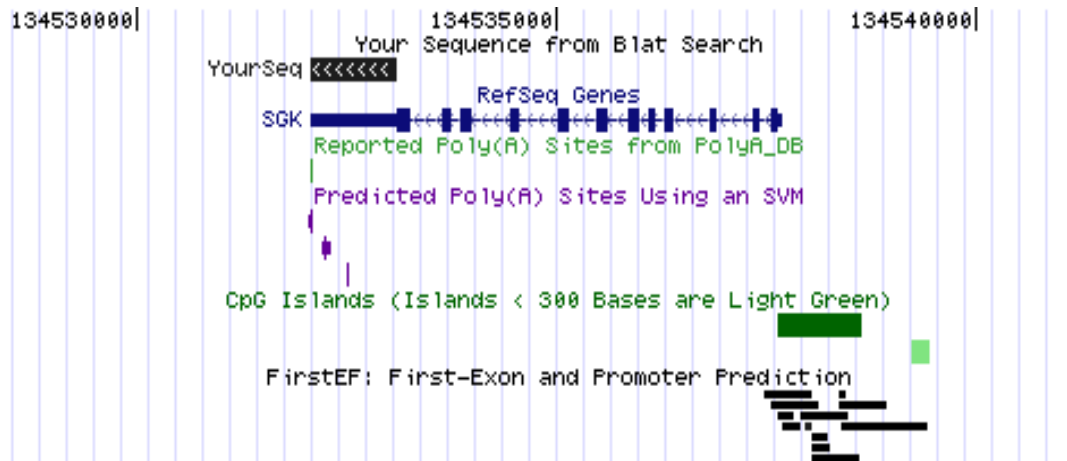


Abb. 10: UCSC-Browser (March 2006) BLAT-Search Ergebnis: Unter „YourSeq“ ist die 3'-UTR (1017bp) der SGK1-mRNA dargestellt. Darunter zur Orientierung die komplette SGK1-Referenzsequenz (3196bp). Auf der Abbildung sieht man die bekannten (reported Poly(A)-Sites: Daten aus der PolyA-Datenbank, hellgrün), sowie die durch Sequenzanalyse wahrscheinlichen (predicted Poly(A)-Sites, die durch ein „support vector machine“ (SVM) Verfahren bestimmt werden, violett) Polyadenylierungsstellen (Cheng et al. 2006). Weiter sind am 5'-Ende CpG-Islands (grün) und die Promotorregion samt dem ersten Exon abgebildet (FirstEF).

3.1.3 3'-UTR – hohe Konservierung zwischen unterschiedlichen Spezies und den verschiedenen IEGs

Es zeigte sich weiter, dass eine hohe phylogenetische Konservierung des gesamten distalen 3'-UTR-Bereichs im Vergleich zu verschiedensten anderen Spezies besteht. Abbildung 11 gibt anhand eines Vergleichs zwischen Mensch, Maus, Ratte und Huhn ein Beispiel darüber ab. Es fanden sich AU-reiche Regionen (blau), zytoplasmatische Polyadenylierungselemente (CPEs, grün), sowie weiter downstream am 3'-Ende liegende Polyadenylierungs-Hexanukleotid (HEX: AATAAA; rot) in den jeweils korrespondierenden Gensequenzen. Solch eine starke Konservierung zwischen den einzelnen Spezies gibt einen starken Hinweis darauf, dass dieser Bereich, obwohl er nicht in das eigentliche Transkript übergeht, eine wichtige, evolutionär übergreifende Rolle zur Regulierung dieses Genabschnittes spielen kann.

Auch im Vergleich unterschiedlicher *immediate early genes* (IEGs) findet man in ähnlicher Anordnung auftretende ESTs. In den folgenden Abbildungen werden die IEGs p27 und EGR1 dargestellt. Dabei ist von beiden bereits bekannt, dass sie über eine differentiell regulierte RNA verfügen. Die Abbildungen 12.a und 12.b veranschaulichen, wie auch hier eine hohe Konservierung der gesamten distalen 3'-

UTR, sowie eine Übereinstimmung der Lage der ESTs bei den humanen Formen von p27 und EGR1 im Vergleich zum Vorkommen bei Maus und Ratte vorhanden ist. Aus diesen Gemeinsamkeiten lässt sich erneut die Wichtigkeit dieser Steuerungselemente auf evolutionärer Ebene ablesen und bekräftigt unsere Vermutung, dass es auch bei der SGK1, eine differentielle Regulierung auf mRNA-Ebene geben könnte.

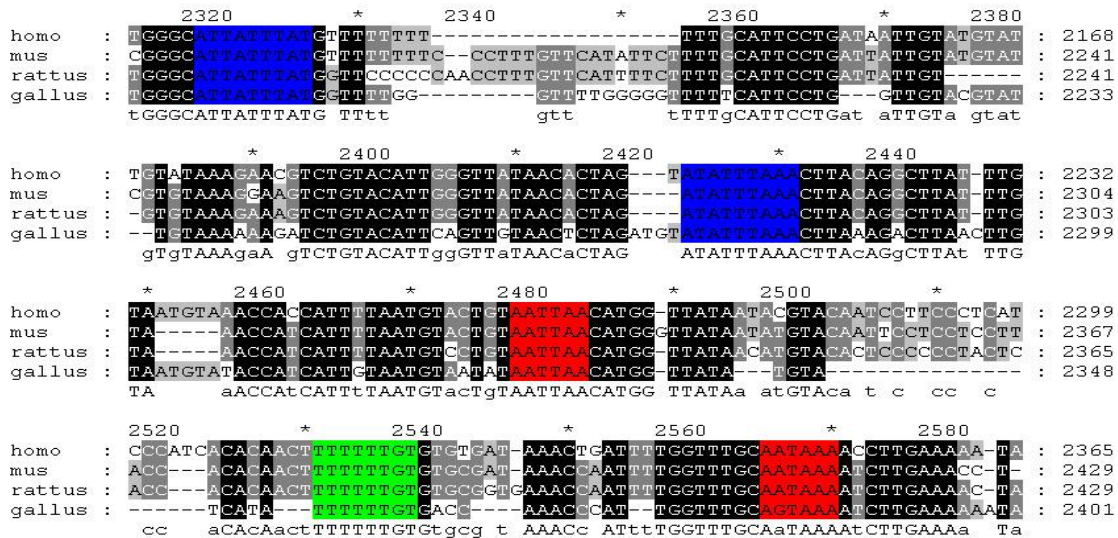


Abb. 11: Darstellung des distalen 3'-UTR der SGK1 des Menschen im Vergleich zu den entsprechenden Genabschnitten bei der Maus, der Ratte und beim Hähnchen. AU-reiche Elemente sind blau, die CPEs grün und die HEX rot gekennzeichnet.

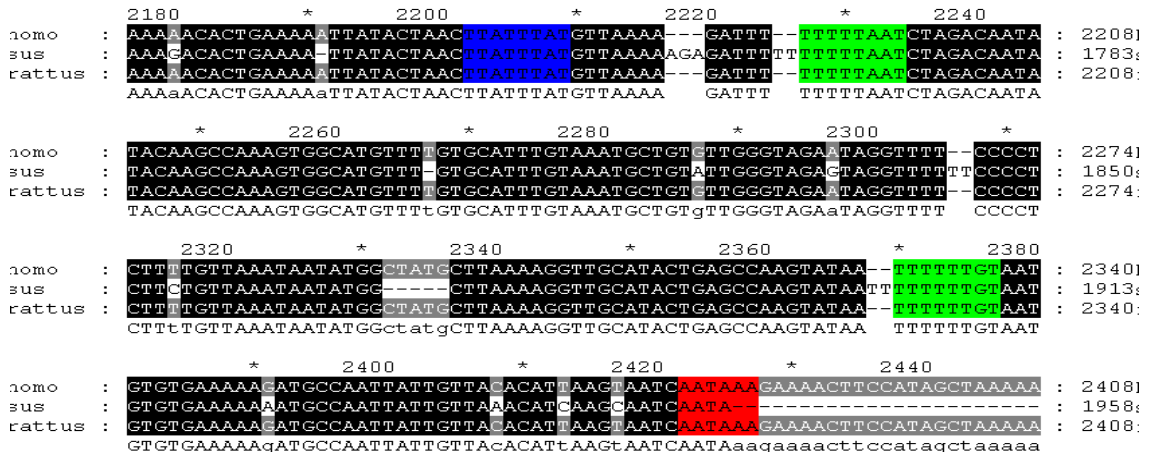


Abb. 12.a: phylogenetische Konservierung des distalen 3'-UTR von p27 im Vergleich zur Maus und Ratte. Dunkelgraue Abschnitte stimmen in allen Spezies überein, mind. 2 Übereinstimmungen zeigen die hellgrau markierten Bereiche.

```

human : CTATTTTTT TAACTGAAATG AACTTAAAT AATATAH ---TCAGGAGTTGGAATGCTGTACTTA : 62
mouse : CTATTTTTCT AAACIGAAATG AACTTAAAT CATCPAH ---TCAGGAGTTGGACGCTGTACTTA : 63
chicken : CTATTTTTTGT TAA CA AAAATG AACTTAAAT AATATAHATAT TCAGGAGTTGGAATGCTGTACTTA : 65
catfish : CTATTTTTTGTAACTGAAA TGTACAT ---ATCTA ---TCAGGAGTTGGAATGCTGTACTTA : 55
      CTATTTTT T tAaCtgAAAaTGTAAAtttata AT TAt tCAGGAGTTGGAaTgtTGTaGTTA

*          *          *          *
human : CCTACTGAGTAGGC---GCGCATTTTTTGTATGTTATGA-ACATGCAGTTCATTATTTTGTGGTTCAT : 126
mouse : CCTACTGAGTAGGC---TCAGTTTTTGTATGTTATGA-ACATGCAGTTCATTATTTTGTGGTTCAT : 127
chicken : CCTACTGAGTAGGC---ACCAATTTTTGTATGTTATGA-ACATGCAGTTCATTATTTTGTGATTTAT : 129
catfish : CCTACTGAGTAGGCATGCGATTTTTTTGTATGTTATTTTACATGCAGTCCAT-ATTTTGTGTTAT : 121
      CCTACTGAGTAGGC Gc TTTTTGTATGTTATga ACATGcagTtCATtATTTtGTggTt t T

*          *          *          *
human : TTTACTTTGTACTTGTGTTTCTTAAACAAA-CTCAC TGTTTT--GCCTTATAAACACATTGAATCC : 190
mouse : TTTACTTTGTACTTGTGTTTCTTAAACAAA-CTAAC TGTTTT--GCCTTATAAACACATTGAATCC : 192
chicken : TTTACTTTGTACTTGTGTTTCTTAAATGAAATGAC TGTTTT--RVCTTATAAACACATTGAATNCN : 194
catfish : TTTACTTTGTACTTGTGTTTCTTAAACAAA-CTCAC TGTTTTATGCCTTATAAACACATTGAATCC : 186
      TTTACTTTGTAT TTGTGTTtG TtAaa aAa gtgAc TGTTT ggCCTT TAAACACATTGAATgCg

*          *          *          *
human : CTTTATTCGCCATGGGATATGTGTTGT-----ATAACCTTCAGAAAA--ATTAAACCAAAAATAAA : 249
mouse : CTTTATTCGCCATGGGATATGTGTTGT-----GTAACTTCAGAAAA--ATTAAACCAAAAATAAA : 252
chicken : CTTTATTCGCCAATGGGATATTTGTTGTACCA-ATACCTTCAGAAAAATGTATAAAACCAAAAATAAA : 261
catfish : CTTTATTCGCCAATGGGATATTTGATGTACAAGATATCCTTCCTAAAACAG-ATAAA GAATATATATA : 253
      CTTta TGCC ATGGGATAT TGtGT atAtcCTTC AAAa AttAAaA aaAaTaaA

```

Abb. 12.b: phylogenetische Konservierung des distalen 3'-UTR von *EGR1* im Vergleich zu Maus, Hähnchen und Katzenwels. Dunkelgraue Abschnitte stimmen in allen Spezies überein, mind. 2 Übereinstimmungen zeigen die hellgrau markierten Bereiche.

3.1.4 SGK-Pseudogene auf Chromosom 1 und 5

Während dieser ersten Analysen der 3'-UTR fanden wir die untersuchte Region jedoch nicht nur auf Chromosom 6 (Referenzen), sondern auch als retrotransponierte Sequenzen auf den Chromosomen 1 und 5 (s. Abb. 13.a). Dabei erstrecken sich die übereinstimmenden Sequenzabfolgen auf dem langen Arm des Chromosom 5 über 630bp (Position: chr5: 71271882-71272511), auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 dabei lediglich über 472bp (Position: chr1: 94128365-94128837). Auf Chromosom 5 liegt diese Sequenzabfolge in einem nicht transponierten Areal, außerhalb eines bestimmten Genlokus, dargestellt in Abb. 13.b. Der Abschnitt auf Chromosom 1 liegt dagegen innerhalb der GCLM-Referenzsequenz im letzten Intron zwischen Exon 6 und 7. Bei der γ -Glutamylcystein-Synthetase (Syn.: Glutamat-Cystein Ligase, GCLM) handelt es sich um ein limitierendes Enzym der Gluthation-Synthese. Ein Fehlen dieser Synthetase wurde in einigen Formen der hämolytischen Anämie gefunden (s. Abb. 13.c)

Untersucht man diese Sequenzen auf ihre ESTs, zeigen sich auch in den retrotransponierten Abschnitten AU-reiche Abschnitte und HEX-Elemente. Jedoch findet sich lediglich in der Referenzsequenz auf Chromosom 6 ein CPE. Abb. 14 zeigt diesen Sachverhalt im Überblick. Da wir in einer Reihe verschiedenster Zelllinien und Gewebe eine Expression der Pseudogene finden konnten, achteten wir

bei unseren weiteren Untersuchungen darauf, einen für das jeweilige Chromosom spezifischen Primer zu verwenden.

Chromosom 6:

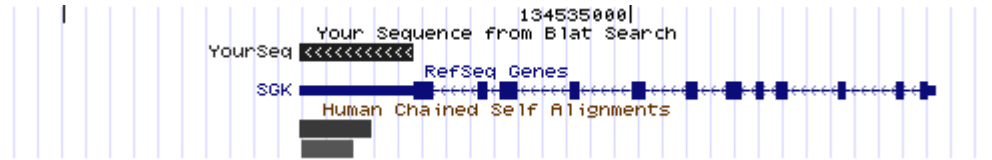


Abb. 13.a: UCSC-Browser (March 2006) BLAT-Search Ergebnis: „YourSeq“ stellt die Sequenz der 3'-UTR (1017bp) dar. Darunter ist die bekannte Referenzsequenz auf Chromosom 6 der SGK1 abgebildet. In den letzten beiden Zeilen sieht man die retrotransponierten Sequenzen der 3'-UTR auf Chromosom 5 bzw. Chromosom 1 (graue Kästchen). Farbgefüllte Kästchen stellen Exons dar, die Pfeile auf den Linien zeigen die Ablese-Richtung des Genabschnitts an.

Chromosom 5:

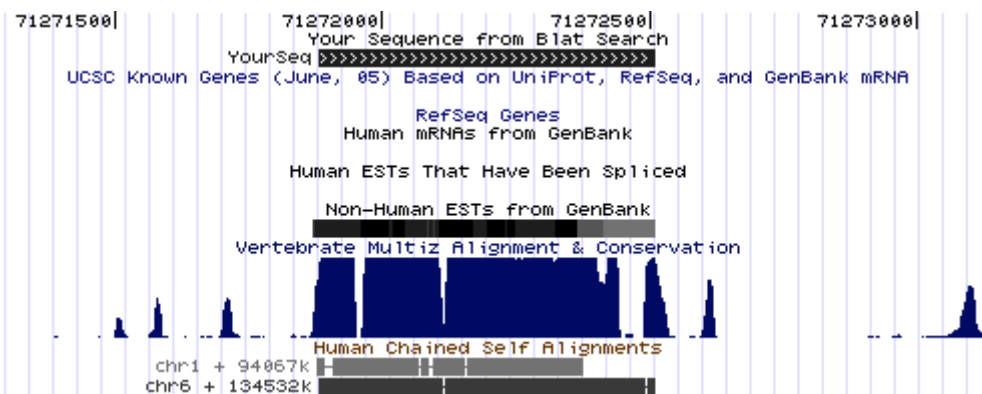


Abb. 13.b: UCSC-Browser (May 2004) BLAT-Search-Ergebnis: Unter „YourSeq“ ist der Abschnitt der retrotransponierten Sequenz auf Chromosom 5 dargestellt (630bp). In den darunter liegenden Zeilen sieht man, dass sich dieser Abschnitt nicht zu einem humanen Referenzgen zuordnen lässt (keine Ergebnisse für: „RefSeq Genes“, „human mRNAs from GenBank“). Auch finden sich in dieser Datenbank keine Einträge zu eventuell vorhandenen humanen EST-Splice-Varianten („human ESTs that have been spliced“). Darunter liegen die nicht-humanen ESTs-Splice-Varianten, unter denen sich korrespondierende Abschnitte in unterschiedlichsten Geweben und Entwicklungszuständen finden lassen – wiederum jedoch außerhalb definierter Genabschnitte. Weiter sind die auffällig hohe Konservierung dieses Abschnittes innerhalb der Wirbeltiere („conservation“), sowie der retrotransponierte Abschnitt auf Chromosom 1 und die korrespondierende Sequenz auf Chromosom 6 dargestellt. Pfeile auf den Linien zeigen die Ablese-Richtung des Genabschnitts an.

Chromosom 1:

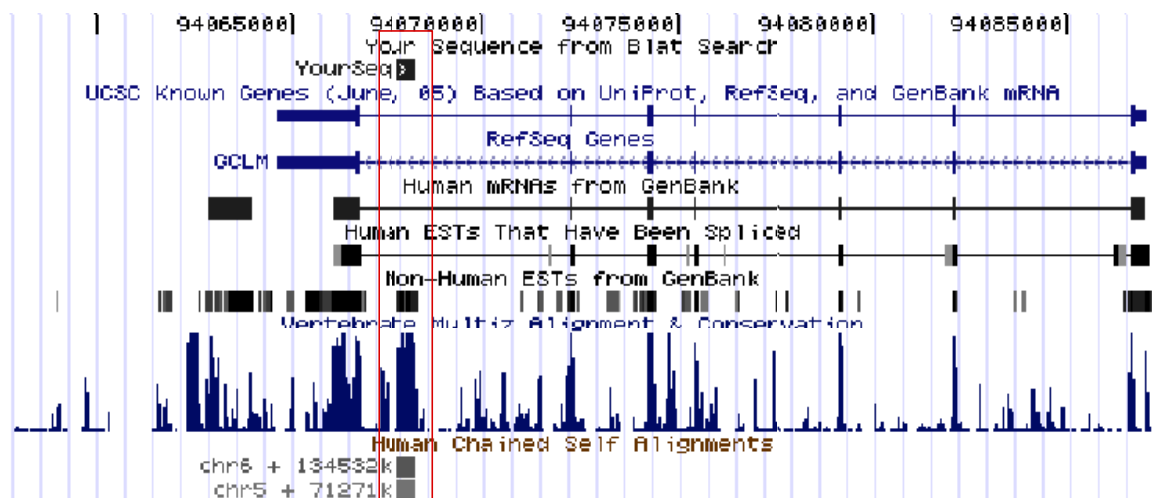


Abb. 12.c: UCSC-Browser (May 2004) BLAT-Search-Ergebnis: „YourSeq“ zeigt die retrotransponierte Sequenz auf Chromosom 1 (472bp). Man erkennt, dass dieser Abschnitt innerhalb des letzten Introns zwischen Exon 6 und 7 der GCLM-Gensequenz zu liegen kommt (GCLM = γ -Glutamylcystein Synthetase, Syn.: Glutamat-Cystein Ligase). In diesem Bereich finden sich keine humanen mRNAs oder gesplicte ESTs, jedoch wiederum eine Reihe nicht-humaner gesplicter ESTs („non-human ESTs from GenBank“). Darunter dargestellt ist die hohe Konservierung zwischen den Spezies („Conservation“) und die korrespondierenden Abschnitte auf Chromosom 6, sowie Chromosom 1 am unteren Bildrand. Farbgefüllte Kästchen stellen Exons dar, die Pfeile auf den Linien zeigen die Ableserichtung des Genabschnitts an.

```

      *           20           *           40           *           60
Chr. 6 : CTTTTCCTATCGCAG--TGTTTCAGTTCCTTATTTTCCCTTGTGGATATGCTGTGTGAAGCCGTCCGTTGTG : 67
Ps_Chr.5 : CTTTTCCTATCGCAGATTGTTTCAGTTCCTTATTTTCCCTTGTGGATATGCTGTGTAAAGGCTCATTATG : 69
Ps_Chr.1 : ----- : -
      cttttcctatgcgag tgtttcagttccttatttt ccttgtggatagctgtgt aac gtc t tg

      *           80           *           100          *           120          *           1
Chr. 6 : AGTGTGGTATGCTTGATCACAGATGGATTTTGTATAAGCATCAATGTGACACTTGCAGGACACTACAA : 136
Ps_Chr.5 : AGTGTGGTATGCTTGATCACAGATGGATTTTGTATAAGCATCAAGTGACTCTTAAGGACACTACAA : 138
Ps_Chr.1 : ----- : -
      agtgtggatgct tga cacagatggatTTTgttataagcatcaa gtgac ctt caggacactacaa

      40           *           160          *           180          *           200
Chr. 6 : CGTGGGACATTGTTTGTTCCTTCCATATTTGGAAGATAAAATTTATGTGTAGAC---TTTTTTGTAAGAT : 202
Ps_Chr.5 : CGTGGGAC---TTTGTTCCTTCCATATTTGGAAGATAAAATTTATGTGTAGAC---TTTTTTGTAAGAT : 200
Ps_Chr.1 : -----GTTTGTTCCTTCCATATTTGG-AGATAAAATTTATGTGTAGACTTTTTTTTGTAAAGAC : 57
      cgtgggac gTTTGTTCCTTCCATATTTGGAAGATAAAATTTATGTGTAGAC tTTTTTGTAAAGAT

      *           220          *           240          *           260          *
Chr. 6 : ACGGTTAATAACTAAAATTTATTGAAATGGTCTTCCAATGACTC--GTATTCAGATGCTTAAAGAAAGC : 269
Ps_Chr.5 : ACGGTTAATAACTAAAATTTATTGAAATGGTCTTCCAATGACTT--GTATTCAGATGCTTAAAGAAAGC : 267
Ps_Chr.1 : ATAGTTGATAAATGAAAATTTATTGAAATGGTCTTCCAATGACTTAAAGATTCAGATGCTTAAAGAAAGC : 126
      AcgGTTaATAActAAAATTTATTgAAATGGTCTTgCAATGActt GTATTCAGaTGCTTAAAGAAAGC

      280          *           300          *           320          *           340
Chr. 6 : ATTGCTGCTACAAATATTTCTATTTTGTAGAAAGGTTTTTATGGACCAATGCCCC-AGTGTCACTCAG : 337
Ps_Chr.5 : ATTGCTGCTACAACTATTTCTATTTTGTAGAAAGGTTTTTATGGACCAATGCCCC-AGTGTCACTCAG : 335
Ps_Chr.1 : ATTGCTGCTACAAATATTTCTATTTTGTAGAAAGGTTTTTATGGATCAATGCCCCAAGTGTCACTCAG : 193
      ATTGCTGCTACAAATATTTCTATTTTGTAGAAAGGTTTTTATGGACCAATGCCCC AGTGTCACTCAG

      *           360          *           380          *           400          *
Chr. 6 : AGCCCTTGTGTGTTTTCATTGTTTAAAATGTCACCTGTAAAATGGGCATTATTTAAGT---TTTT---TT : 400
Ps_Chr.5 : AACTCTTTTGTG-TTTCATTGTTTAAAATGTCACCTGTAAAATGGGCATTATTTAAGT---TTTTCTTTT : 400
Ps_Chr.1 : AGCCATTGTGTGTTTTCATT-TTTAAAATGTCACCTGTAAAATGGGCATTATTTAAGTGTATTAAGGCTT : 260
      AgCcgTTgTG TtTTCATTgTTTAAAATGTCACCTGTAAAATGGGCATTATTTATGT Ttt TT

      420          *           440          *           460          *           480
Chr. 6 : TTTTTGCATTCCTGATAAATTGTATGTATTTATATAAAGAACGTCCTGTACATTGGCTTATAACACTAGT : 468
Ps_Chr.5 : TTTTTGCATTCCTGATAAATTGTATGTATTTATATAAAGAAATCTGTACATTGACTTATAACACTAGT : 468
Ps_Chr.1 : TTTTTGCATTCCTGATAA---ATGTATTTATATAAAG---TCGTACATTGCTAATAACACTAGT : 321
      TTTTTGCATTCCTGATAAAtt tATGTatTTgTATAAAGaa TCTgTACATTGggTtATAACACTAGTA

      *           500          *           520          *           540          *
Chr. 6 : TATTTAACTTACAGGCTTATTTGTAAATGTAACCACCATTTTAAATGTACTGTAATTAACATGGTTATA : 537
Ps_Chr.5 : TATTTAACTTACAGGCTTATTTGTAAATGTAACCACCATTTTAAATGTACTGTAATTAACATGGTTATA : 537
Ps_Chr.1 : TATTTAACTTACAGACTTATTTGTAAATGTAACCACCATTTTAAATGTACTGTAATTAATATGGTTATA : 390
      TATTTAACTTACAGgCTTATTTGTAAAtGtAAACCACCATTTTAAATGTACTGTAATTAACATGGTTATA

      560          *           580          *           600          *           620
Chr. 6 : ATACGTACAA--TCCTTCCCTCATCCCATCACACAACTTTTTTTGTGTGTGATAAACTGATTTTGGTTT : 604
Ps_Chr.5 : ATATGTACTA--TCCTTCCCTCCTCCCATCCACAACCTTTGTTGTGTGTGATAAAATCAATTTTGGTTT : 604
Ps_Chr.1 : ATATATATATAGTCCCTTCCCTCCCATCCACAACCTTTTGTGTGTGTGATAAAACCCGTTTTTGGTTT : 459
      ATAtgTAcAA TCCTTccTCCcCCATCaCAACCTTTtGtGTGTGTAATAAAaccgATTTtGGTTT

      *           640
Chr. 6 : GCAATAAACCTTGAAAAATATTTAC : 630
Ps_Chr.5 : GCAATAAACCTTGAAAAATATTTAC : 630
Ps_Chr.1 : GAAAATATTT----- : 469
      GcAAtaAaaccttgaaaa tatttac

```

Abb. 14: Sequenzvergleich der 3'-UTR der SGK1-Referenz-RNA auf Chromosom 6 mit den Sequenzen auf den Chromosomen 1 (NT_032977.7; Hs1_33153:48175164-48175632) und 5 (NT_006713.14; Hs5_6870:21830484-21831113). Schwarz ausgefüllte Kästchen zeigen dabei eine genaue Übereinstimmung aller Sequenzen, die hellgrauen zeigen diese in mind. 2 Genabschnitten (blau: AU-reiche Elemente, grün: CPE, rot: HEX-Elemente).

3.1.5 SGK1-mRNA Variantenreichtum

Bei weiteren *in silico*-Analysen der SGK1 mit Hilfe der *GenBank*-Datenbank fanden wir eine enorm große Menge bereits beschriebener, unterschiedlich langer mRNA-Splicevarianten dieser Gensequenz.

Eine sehr große Anzahl dieser Varianten befindet sich in unterschiedlichen Längen innerhalb der 3'-UTR. Viele Arbeitsgruppen haben sich also schon mit dem 3'-Ende der SGK1 auseinandergesetzt und bestätigt, dass es innerhalb der 3'-UTR verschiedene Stellen des Transkriptionsstopps gibt. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den von uns angestellten Strukturanalysen und dem Auffinden alternativer Polyadenylierungsstellen innerhalb der 3'-UTR (s. auch unter 3.1.2). Die große Anzahl dieser Varianten wurde nicht in der unten folgenden Darstellung (Abb. 15) jedoch nicht berücksichtigt.

Am 5'-terminalen Ende beobachtet man gehäuft das Auftreten zweier, unterschiedlich langer Splice-Varianten. In Abb. 15 werden diese blau umrandet im rechten Bildteil dargestellt. Sie zeichnen sich mit einer Ausnahme dadurch aus, dass sie ungeachtet dessen, wo sie vor dem 5'-Ende angefangen haben, alle das erste Exon der Referenzsequenz aussparen und dann regulär mit dem Exon2 als ihrem ebenfalls zweiten Exon fortfahren. Der Abstand zwischen der kürzeren 5'-Variante zum Anfang der SGK1-Sequenz beträgt dabei 850bp [SGK1(-850)], bei der längeren beträgt der Abstand 2981bp [SGK1(-2981)]. Die Abbildung zeigt, dass diese beiden Varianten nicht nur in humanem Gewebe, sondern auch in einer großen Anzahl anderer verglichener Spezies zu finden sind, darunter befinden sich Maus, Ratte, Rind, Schaf und Affe. Die Bezeichnungen der genauen, hier verwendeten Sequenzen sind in Tab. 5 abgebildet, wobei auch diese nur eine Auswahl der gefundenen Möglichkeiten repräsentieren.

Eine der langen Variante fällt dabei, wie oben bereits erwähnt, besonders hervor: Sie beginnt 2981bp upstream der eigentlichen Promotorregion [SGK(+1)], spart sämtliche Exons der Referenzsequenz aus, folgt mit Exon 10 als ihrem zweiten Exon wieder der Referenzsequenz und endet regulär in der 3'-UTR, womit sie einen Bereich von insgesamt 7663bp umspannt.

Durch unterschiedliche Tests des *GenomeBrowsers* stellen sich die oben beschriebenen Bereiche der kürzeren und längeren Variante im 5'-UTR-Bereich als äußerst interessant heraus. Unter *ExonWalk Alt-Splicing Transcript* werden Isoformen der Ausgangssequenz, inklusive alternativer Transkripte dargestellt, wobei

nur solche abgebildet werden, die durch das Erfüllen bestimmter Kriterien vermuten lassen, tatsächlich eine biologische Funktion zu erfüllen und nicht nur das Ergebnis technischen bzw. biologischen Rauschens zu sein. Die Kriterien, die diese Funktion zu erfassen versuchen sind: a.) das Vorhandensein der Isoform in einer cDNA-Datenbanken mindestens eines Organismus, b.) 3 verschiedene cDNA-Datenbanken-Einträge, die die Theorie unterstützen und c.) sich das Exon als kodierendes Exon im Sinne des *Exoniphy* auszeichnen. *Exoniphy* stellt evolutionär konservierte, proteinkodierende Exons dar, dessen Berechnungen auf dem phylo-HMM = *phylogenetic hidden Markov model* beruhen. Dieses gibt gleichzeitig die Exonstruktur einer RNA und die dazu gehörige Evolution an. In unserem Fall sind beide der oben beschriebenen Stellen unter den alternativen Splicingstellen des *ExonWalks* dargestellt. Daneben findet sich für die kürzere Variante auch noch ein Eintrag in der *Exoniphy*-Datenbank. Einen weiteren Hinweis für einen möglichen Transkriptionsstart gibt für die kurze Variante auch noch das unter 3.1.2. bereits beschriebene Auftreten einer schwachen CpG-Insel und dem positiven Eintrag unter *FirstEF*, was auf eine Promotorregion mitsamt erstem Exon hinweist. Somit kann die Vermutung aufgestellt werden, dass es sich bei diesen beiden Bereichen, insbesondere der kürzeren Variante, nicht nur um alternative Formen der SGK1-mRNA handelt, sondern dass sie tatsächlich auch eine funktionelle Bedeutung haben.

Im Bereich des 3'-Endes findet sich unter den ungespliced ESTs eine sehr kurze, 503bp lange Variante, die erst 1869bp weiter downstream des regulären 3'-UTR-Endes beginnt. Ein alternatives 3'-Ende findet sich auch unter den nicht-humanen Splice-Varianten. Dabei erstreckt sich beim Affen (*Macaca* EB520570) eine sehr lange Variante, beginnend im kurzen oben beschriebenen alternativen 5'-Anfang [SGK1(-850)] über 6116bp bis in ein alternatives 3'-Ende. Ein alternatives 3'-Ende zeigt sich auch beim Rind (*Bos* BM483747). Diese Variante liegt jedoch lediglich mit 210bp in eben diesem umschriebenen Bereich (in Abb. 15 durch eine rote Ellipse kenntlich gemacht). Auffällig ist, dass man auch diese alternativen 3'- bzw. 5'-Formen als hoch konservierte Bereiche im Vergleich mit 17 unterschiedlichen Spezies findet. Dieser Sachverhalt ist in der Abbildung in der untersten Zeile dargestellt. In einem Test auf sich wiederholende Sequenzen, fielen SINE-Repeats (*short interfering nuclear elements*) auf, die sich unmittelbar an den 3'-UTR-Bereich der SGK1 anschließen. Sie sind auf der Abbildung durch einen grünen Kasten kenntlich gemacht.

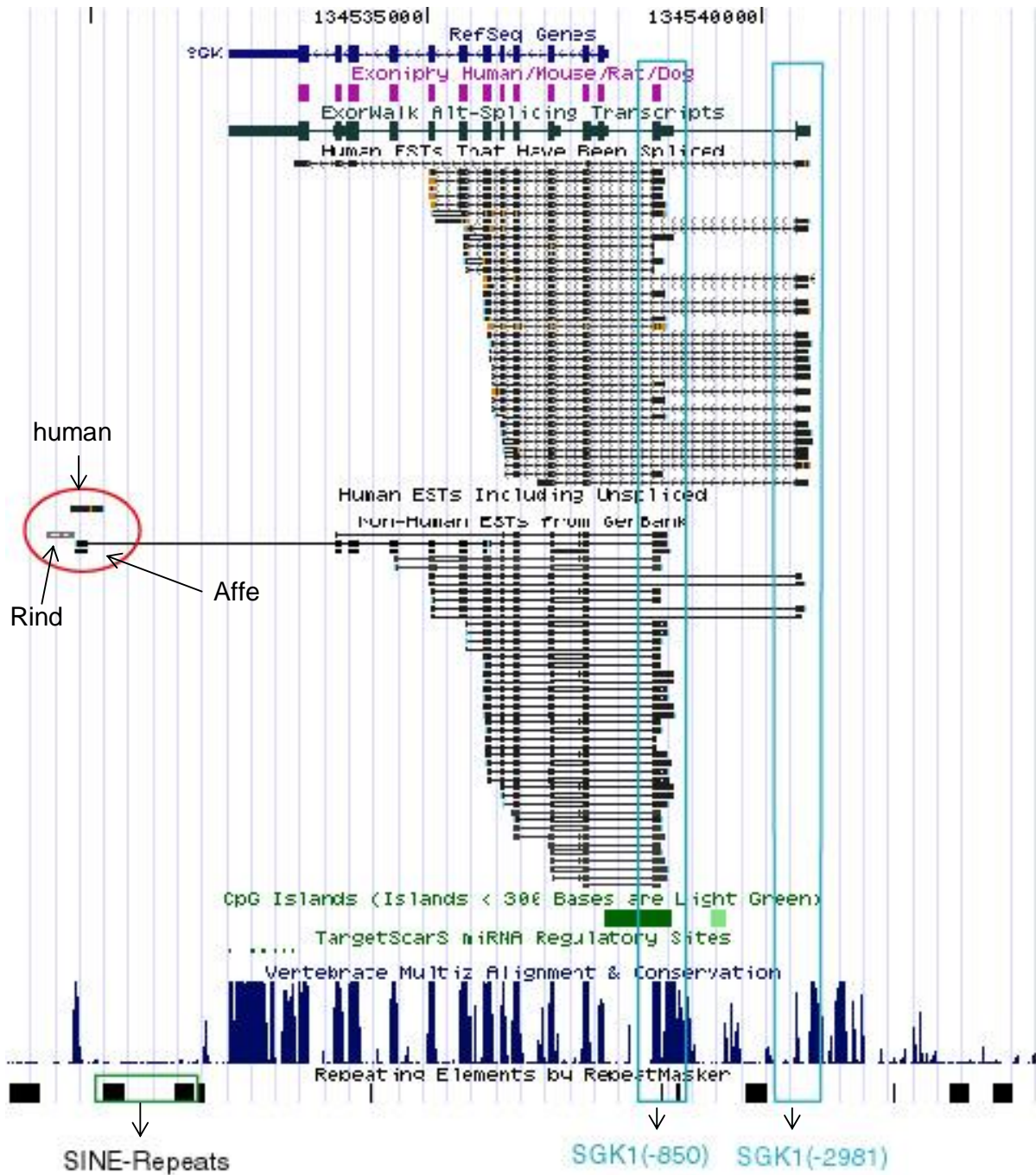


Abb. 15: USCS-Browser (May 2004): Die oberste Zeile zeigt die SGK1-mRNA. Darunter sind eine Auswahl humaner ESTs im Vergleich zu einer Auswahl nicht-humaner ESTs abgebildet. Im 5'-Bereich fallen die beiden gehäuften Splice-Varianten SGK1(-850) und SGK1(-2981) auf (hellblau gekennzeichnet), sowie am 3'-Ende je eine lange Variante beim Menschen, Macaca-Affe und dem Rind (jeweils rot umrandet). Zur Orientierung sieht man im unteren Bildanteil zusätzlich die phylogenetische Konservierung zwischen 17 unterschiedlichen Spezies. „Exoniphy“ beschreibt evolutionär konservierte, Protein-kodierende Exons (Berechnungen beruhen auf phylo-HMM = phylogenetic hidden Markov Modell, das gleichzeitig die Exonstruktur und dessen Evolution angibt; violett). Darunter werden unter „ExonWalk Alt-Splicing Transcripts“ Isoformen, inklusiver alternativer Transkripte dargestellt. In der untersten Zeile sind kurz nach der 3'-UTR der Referenzsequenz beginnende, grün umrandete, repeating elements vom Sine-Typ dargestellt.

Tab.5 : Für Abb. 15 verwendete humane und nicht-humane EST-Sequenzen.

	human	nicht-human
langes 3'-UTR	BI063089	Bos BM483747 Macaca EB520570
SGK1(-850)	BQ925372 BQ936977 CF272410 BQ934765 BU541905 BI551358 AU122750 DA883617 DA881272 BG715428 DA884954 AU136391 BQ937193 BM049073 DA648504 AU137632 BU536594 BP312228	Mus AI876950 Mus AU080100 Mus CF725074 Mus BQ714990 Mus AI527833 Mus BB611614 Mus CK624167 Mus CK626189 Mus AA451285 Mus BY289681 Mus BY289681 Mus BY108609 Mus BY108609 Mus BY319889 Mus BY792091 Mus BY336182 Bos DV927112 Bos DV819531 Rattus DN933009 Rattus DN932087 Rattus DV216545 Sus AU296359 Ovis DY483264
SGK1(-2981)	BP383035 CF593884 BP382846 CB999967 BP382962 BP223332 BP383057 BP295433 CD639005 DA948654 DB004543 DA130512 DA979401 BP223640 DB116423 DA141886 DA567971 DA309338 DA427842 DA550504 DA985990 BP382814, DA959d942	Bos DT821484 Bos DT808273 Bos CN793702 Bos CK831901 Macaca CO582245

3.2 *in vitro*-Untersuchungen

3.2.1 Expression der Pseudogene

Um den Einfluss der retrotransponierten Sequenzen der SGK1 der Chromosome 1 und 5 einschätzen zu können, haben wir Untersuchungen zu deren Expression in den von uns verwendeten Proben angestellt und anschließend mit dem Auftreten der Referenz-mRNA-Expression verglichen.

Das theoretisch gefundene Pseudogen auf Chromosom 1 wird in den von uns verwendeten Proben nur so schwach exprimiert, dass es uns nicht gelungen ist, einen eindeutigen Nachweis für dessen Auftreten zu messen.

Eine ähnliche Situation stellte sich bei den Messungen des Pseudogens auf Chromosom 5 dar. Wiederum konnten wir nur eine sehr schwache Expression

messen, die allerdings höher und stabiler als die des Chromosom 1 ist.

Abb. 16 zeigt die Expressionswerte der Chromosom 5-Variante im Vergleich zur regulären SGK1-3'-UTR in unterschiedlichsten Zellen (Leukozyten, PBMCs, Astrozyten- & Gliomzelllinien). Durchschnittliche CT-Werte der 3'-UTR liegen bei 26 Zyklen, die des Pseudogens (SGK1_hs5) bei 33 Zyklen. Somit findet sich für SGK1_hs5 eine 2^7 -fach schwächere Expression im Vergleich zur 3'-UTR.

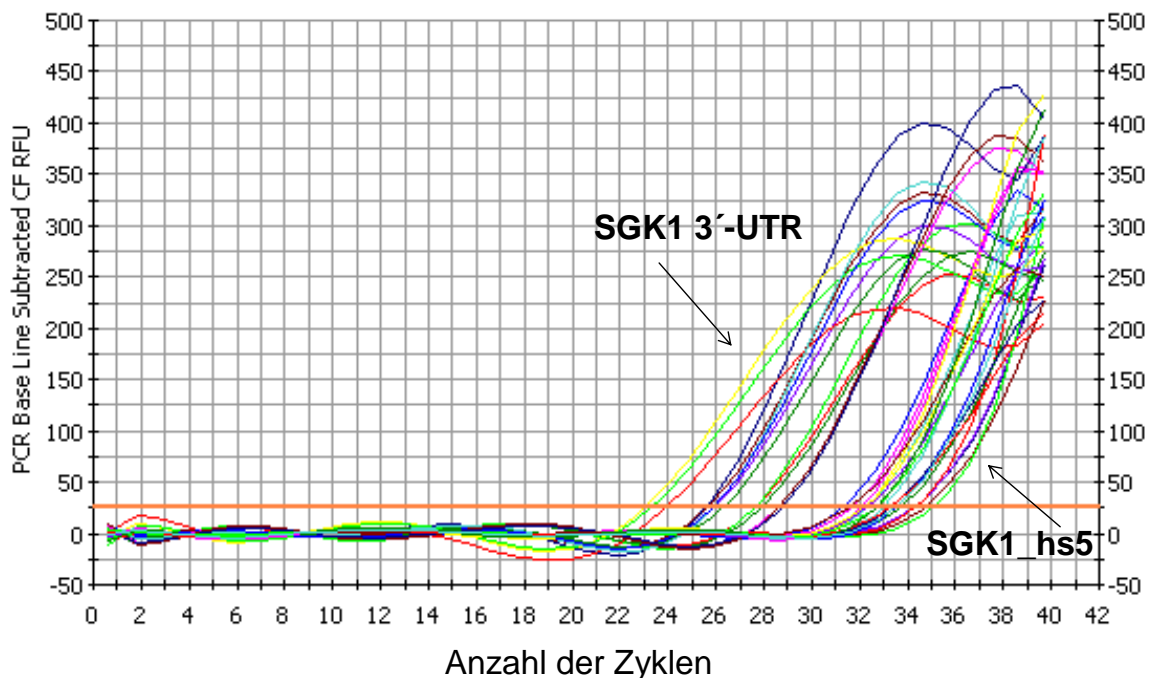


Abb. 16: Real-Time RT-PCR-Ergebnis der Primer SGK1 3'-UTR gegen SGK1_hs5. Die vorderen Graphen stellen die Expression der SGK1 3'-UTR dar, dahinter sieht man die 2^7 -fach schwächer exprimierten Werte des SGK1_hs5-Primers.

3.2.2 Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben

In zu Differenzierung stimulierten Myoblasten konnten wir ein unterschiedliches Expressionsverhalten der SGK1-Varianten finden. Zur Auswertung der Daten setzten wir die gemessenen Werte mit dem Ausgangswert (0h) in Relation und haben die relativen Differenzen der Expressionswerte im unten folgenden Schaubild dargestellt. Während der 6-tägigen Differenzierung zeigte der in der 3'-UTR liegende Primer eine sehr stabile, dem Housekeeping-Gen GAPDH ähnliche Expression. Die SGK1-lv zeigte erst ganz zum Ende des Versuchs, nach 144h, eine im Vergleich zum Ausgangswert 0,25-fach niedrigere Expression [99%-CI(0h): 0,48 – 1,53; 99%-CI (144h): 0,12 – 0,38]. Ein Maximum ließ sich für diesen Primer nach 4Tagen finden. In

Relation zum Ausgangswert war dieser Anstieg allerdings nicht signifikant [99%-CI(0h): 0,48 – 1,53; 99%-CI(96h): 0,90 – 2,88]. Die kürzere, in Exon 6 gelegene 5'-Variante der SGK1 zeigte im Verlauf der Differenzierung ein kontinuierliches Ansteigen mit einem maximal um 2,77-fach signifikant erhöhten Wert nach 96h [99%-CI(0h): 0,80 – 1,19; 99%-CI(96h): 2,23 – 3,31]. Ähnlich wie bei der SGK1-lv findet sich auch hier ein signifikanter Abfall im Verlauf der nächsten 48h (= 144h-Wert) [99%-CI(96h): 2,23 – 3,31; 99%-CI(144h): 0,94 – 1,39], dieser zeigt sich jedoch im Vergleich zum Ausgangswert als nicht signifikant [99%-CI(0h): 0,80 – 1,19; 99%-CI(144h): 0,94 – 1,39].

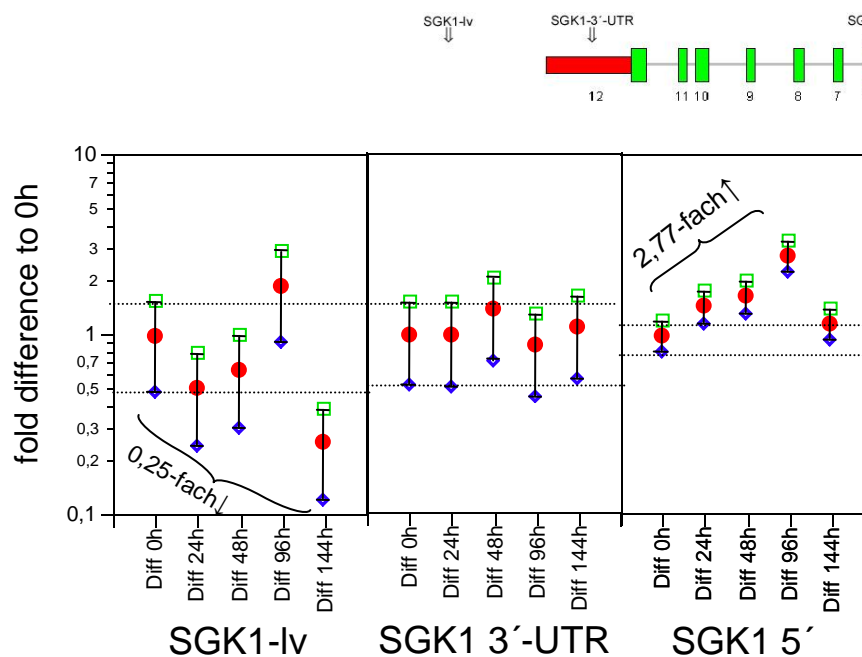


Abb. 17.a zeigt die logarithmisierte Expression der verschiedenen SGK1-Primer im Vergleich zu den jeweiligen 0h-Werten („fold differences“) und deren 99%-Konfidenzintervalle (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR (upper 99%-CI: grün, lower 99%-CI: blau) zu Beginn (0h) und im Verlauf der Differenzierung (24h, 48h, 96h und nach 144h); Dargestellt werden SGK1-lv, SGK1 3'-UTR und SGK1 5'. Lediglich bei der SGK1 5' zeigt sich ein signifikantes Ansteigen im Verlauf der Differenzierung, welches allerdings zum Ende des Versuchs hin wieder auf ein dem Kontrollwert ähnlichen Niveau abfällt. Für die SGK1-lv findet sich zum Ende der Differenzierung nach 6 Tagen ein signifikanter Abfall.

Als Positivkontrolle für ein bekanntermaßen differenziell reguliertes Gen, stellten wir unsere Ergebnisse der SGK1 denen des EGR1 gegenüber. Dabei fanden wir die EGR1-sv lediglich nach 144h um den Faktor 0,43 signifikant erniedrigt exprimiert [99%-CI(0h): 0,64 – 1,36; 99%-CI(144h): 0,27 – 0,59]. Bei der EGR1-lv dagegen zeigte sich bereits nach 24-stündiger Differenzierung ein signifikantes

Expressionsmaximum mit 2,9-fach erhöhter Expression [99%-CI(0h): 0,77 – 1,23; 99%-CI(24h): 2,24 – 3,59]. Im Laufe des Versuchs kam es dabei allerdings zu einem stetigen Abfall der Expression, so dass nach 144h ebenfalls wieder ein signifikant erniedrigter Wert resultierte [99%-CI(0h): 0,77 – 1,23; 99%-CI(144h): 0,28 – 0,44; Faktor 0,36].

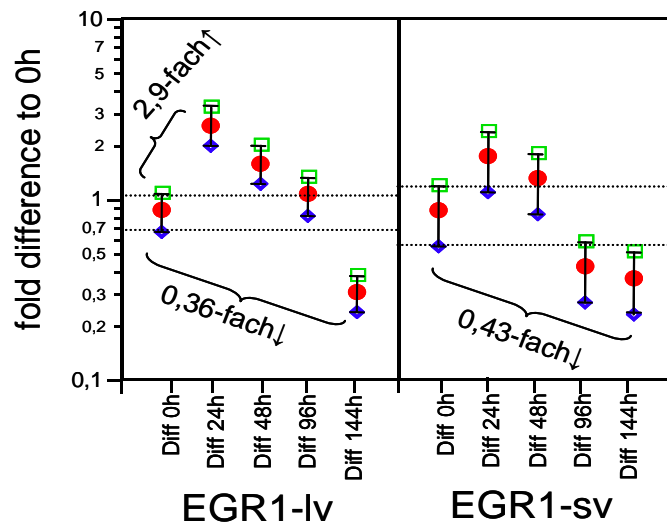


Abb. 17.b: zum Vergleich eine Positivkontrolle mit EGR1 und seinen beiden Varianten Iv und sv. EGR1-iv zeigt nach einem signifikanten Expressionsmaximum zum Zeitpunkt 24h Differenzierung am Ende des Versuchs eine signifikant erniedrigte Expression. Diese signifikant erniedrigte Expression zum Differenzierungsende hin findet sich auch für die EGR1-sv. Dargestellt wird der logarithmisierte x-fache Expressionsunterschied im Vergleich zum Ausgangswert und die dazugehörigen 99%-Konfidenzintervalle (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR (upper 99%-CI: grün, lower 99%-CI: blau).

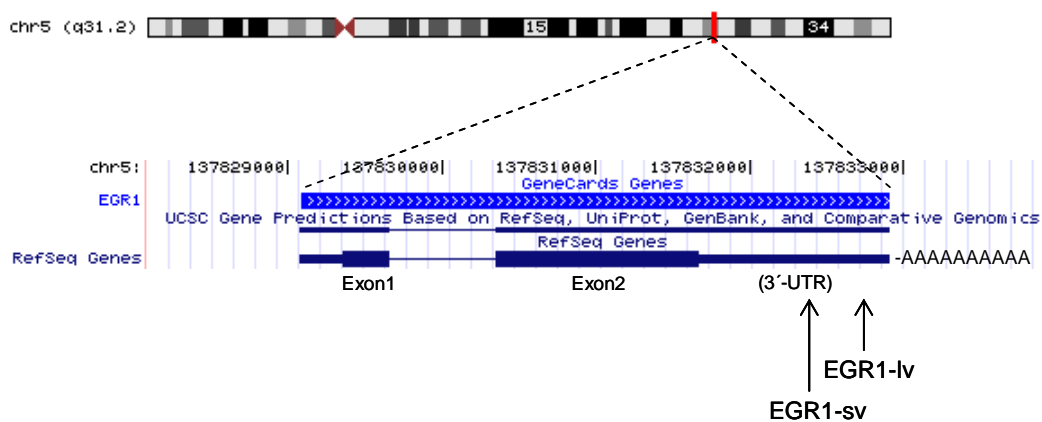


Abb. 18: Darstellung der Lage der EGR1-Primer sv und Iv innerhalb der genomischen Sequenz in der 3-UTR. EGR-sv = EGR1-5', EGR-iv = EGR1-3' (BLAT Search Genome, Mar. 2006)

3.2.3 Stimulation von Myotuben mit Kobaltchlorid (CoCl₂)

Unter Stimulation von Myotuben mit Kobaltchlorid (CoCl₂) induzierten wir einen hypoxischen Zustand. Zur graphischen Darstellung wurden die Expressionswerte wieder in Relation zum 0h-Ausgangswert gesetzt.

Im Schaubild kann man deutlich die sehr ähnlichen Expressionsverläufe der drei SGK1-Varianten während der Stimulation erkennen. Insgesamt gleichen sich insbesondere die Verläufe der lv- und 3'-UTR-Variante. Bei allen drei Varianten lässt sich schon innerhalb der ersten 30 Minuten ein Ansteigen der Expressionsraten verzeichnen. Die SGK1-lv zeigt dabei innerhalb dieser Zeit ein nicht signifikantes Ansteigen [99%-CI(0h): 0,48 – 1,52; 99%-CI(30min): 1,3 – 4,13]. Nach 20h Stimulation findet sich bei ihr allerdings eine signifikante um 0,30-fach niedrigere Expression im Vergleich zum Ausgangswert ohne Stimulation [99%-CI(0h): 0,48 – 1,52; 99%-CI(20h): 0,14 – 0,46]. Die SGK1 3'-UTR zeigte nach 30min ein signifikantes Expressionsmaximum [99%-CI(0h): 0,52 – 1,48; 99%-CI(30min): 4,72 – 13,56]. Im weiteren Verlauf der Hypoxiestimulation kam es dabei zu einem erneuten Abfallen des Wertes, welcher sich allerdings im Verhältnis zum Ausgangswert als nicht signifikant darstellte [99%-CI(0h): 0,52 – 1,48; 99%-CI(20h): 0,18 – 0,53]. Das Expressionsmuster der 5'-Variante stellte sich im Vergleich zu den beiden zuvor besprochenen Varianten als leicht unterschiedlich dar. Auch sie zeigte nach 30min bereits einen 3,7-fach erhöhten signifikanten Wert [99%-CI(0h): 0,81 – 1,19; 99%-CI(30min): 3,01 – 4,47], das Maximum zeigte sich allerdings erst nach weiteren 30min Stimulation [99%-CI(60min): 5,43 – 8,04] in einem im Vergleich zum Ausgangswert um 6,7-fach erhöhten Wert. Auch bei ihr fand sich bis zum Ende des Versuchs ein signifikantes Abfallen der Expression auf einen 0,37-fach erniedrigten Wert [99%-CI(0h): 0,81 – 1,19; 99%-CI(20h): 0,30 – 0,44].

Wieder haben wir die SGK1-Werte mit denen der differenziell regulierten Positivkontrolle EGR1 verglichen (s. Abb. 19.b). Diese beiden Varianten fallen durch einen insgesamt sehr ähnlichen Expressionsverlauf auf. Bereits nach 30-minütiger Stimulation zeigte sich bei der EGR1-lv ein um das 16-fache gesteigerter, sowie bei der EGR1-sv ein sogar um den Faktor 26 gesteigerter, deutlich signifikanter Anstieg der Expressionsrate ([EGR1-lv: 99%-CI(0h): 0,77 – 1,23; 99%-CI(30min): 12,35 – 19,82], [EGR1-sv: 99%-CI(0h): 0,64 – 1,36; 99%-CI(30min): 16,54 – 35,35]). Beide Varianten zeigen zum Messzeitpunkt 180min einen signifikanten Expressionsabfall auf das Ausgangsniveau ([EGR1-lv: 99%-CI(60min): 14,16 – 22,72; 99%-CI(180min):

1,45 – 2,33], [EGR1-sv: 99%-CI(60min): 7,12 – 15, 22; 99%-CI(180min): 0,96 – 2,05]). EGR1 zeigt sich in diesem Zellkulturversuch also nicht als differenziell reguliert.

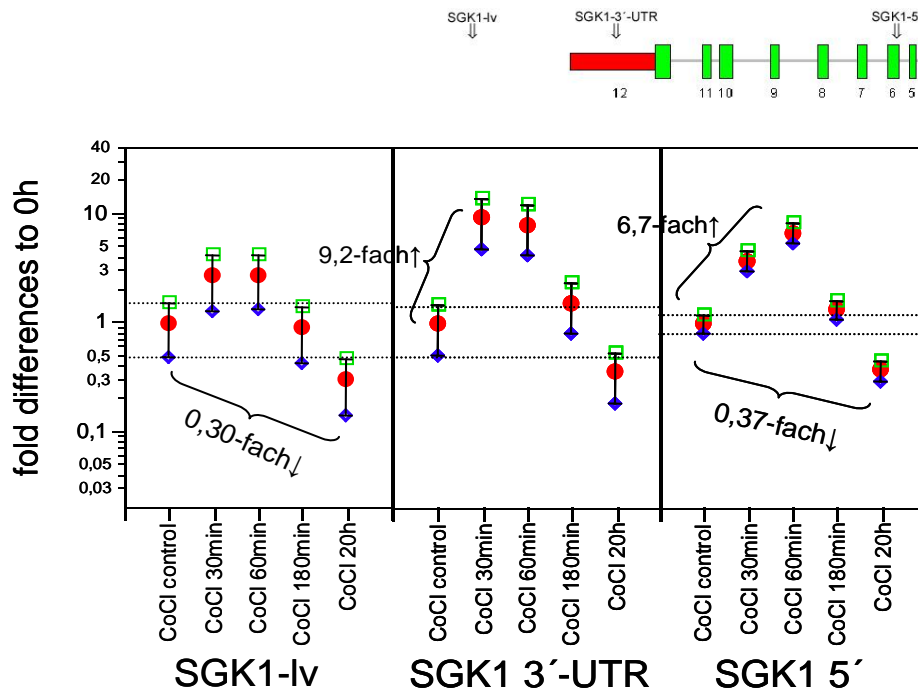


Abb. 19.a: logarithmisierte Darstellung der Expression der verschiedenen SGK1-Primer im Vergleich zu den jeweiligen 0h-Werten („fold differences“, x-fache Expression, rot) und deren 99%-Konfidenzintervalle (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR (upper 99%-CI: grün, lower 99%-CI: blau) zu Beginn (control) und im Verlauf der Stimulierung mit Kobalddichlorid (CoCl₂) nach 30min, 60min, 180min und 20h; SGK1-lv, SGK1 3'-UTR und SGK1 5'. Kurz nach Stimulationsbeginn kommt es zu einem Ansteigen aller SGK1-Varianten, wobei sich bei der SGK1-5' im Vergleich zu den 3'-UTR- & lv-Varianten erst 30 Minuten später, zum Zeitpunkt 60min, ein Expressionsmaximum zeigt. Jeweils zu Ende der Stimulation zeigt sich ein signifikanter Abfall der Werte; bei den Varianten lv und 5' fällt dieser signifikant erniedrigt zum Ausgangswert aus,

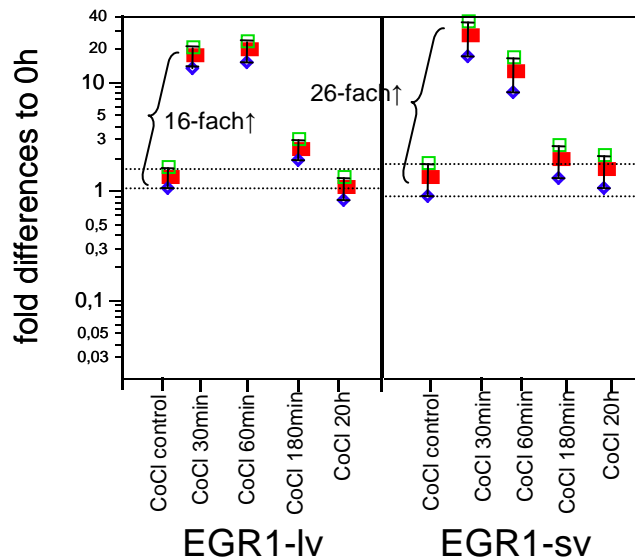


Abb. 19.b: Hypoxieexposition in Zellkultur bei den bekanntermaßen differenziell regulierten EGR1 Varianten lv und sv. Dargestellt sind die logarithmisierten Expressionsunterschiede der Primer im Vergleich zu den jeweiligen 0h-Werten („fold differences“, x-fache Expression, rot) und deren 99%-Konfidenzintervalle (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR (upper 99%-CI: grün, lower 99%-CI: blau) zu Beginn (control) und im Verlauf der Stimulierung mit Kobaltdchlorid (CoCl₂) nach 30min, 60min, 180min und 20h. Bei beiden Varianten zeigte sich einem immediate early gene entsprechend, bereits nach 30-minütiger Stimulation einen klaren signifikanten Expressionsanstieg mit nachfolgendem Abfallen auf das Ausgangsniveau,

Der Hypoxie induzierte Faktor1 α ist das Paradebeispiel eines durch Hypoxie beeinflussbaren Proteins, so dass uns dies hier als eine weitere Positivkontrolle diene. Auch hier konnten schon verschiedene Längenvarianten nachgewiesen werden, so dass sich durch diesen Versuch eine differenziell geregelte Expression darstellen ließ. Die dafür verwendeten Primer des Hif1 α -Komplexes lagen an den Positionen 2618 \rightarrow 2675 für Hif1 α , und +1946 \rightarrow +2045 für Hif1 α -lv. Hif1 α -lv steigt 60min nach CoCl₂-Behandlung signifikant an, erreicht bei 180min seinen Höhepunkt (3,0-fach gegenüber dem Ausgangswert (99%-CI(180min): 2,27 – 3,65; p < 0.001) und ist bei 20h immer noch signifikant gegenüber dem 0min Kontrollwert [99%-CI(0h): 0,76 – 1,23; 99%-CI(20h): 1,47 – 2,36]. Die konventionelle Hif1 α mRNA-Varianten reagiert dagegen zuerst nicht signifikant. 20h nach Kobaltchloridbehandlung fällt sie dann aber signifikant gegenüber dem 0min Kontrollwert um den Faktor 0,18 ab [99%-CI(0h): 0,75 – 1,24; 99%-CI(20h): 0,14 – 0,23 , p < 0,0001].

Mit diesen beiden Varianten des Hif1 α konnten wir durch eine Hypoxieinduktion mittels Kobaltchlorid also tatsächlich eine differenzielle Regulation zeigen: die längere der beiden Varianten zeigt tendenziell eher ein Ansteigen der Expressionswerte, während sich die Referenz-mRNA durch ein Absinken der Expression charakterisiert.

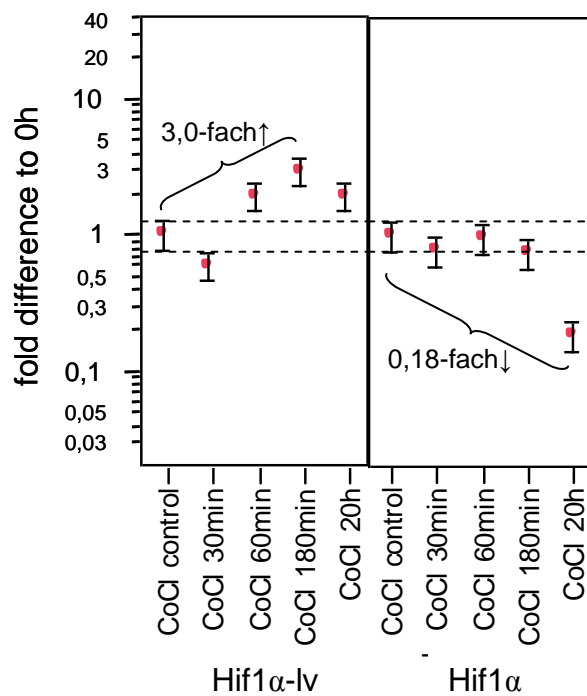


Abb. 19.c: In diesem Schaubild sind als weitere Positivkontrolle die Expressionswerte des Hypoxie-induzierten Faktors 1 α (Hif1 α) im Verhältnis zum Kontrollwert ohne Kobaltchlorid-Stimulation dargestellt (rote Punkte) und dient uns als Paradebeispiel eines unter Hypoxie differenziell regulierten Gens. Weiter sind die 99%-Konfidenzintervalle (upper- / lower-CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR abgebildet.

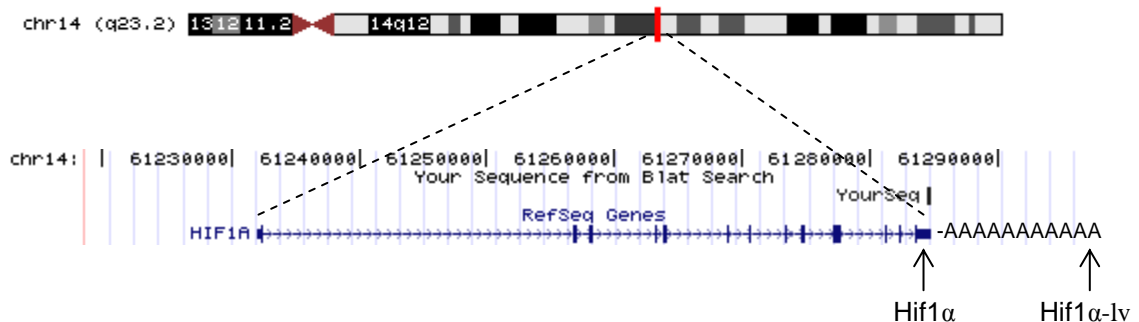


Abb. 19.d: Darstellung der hier verwendeten Hif1 α -Primer innerhalb des Genoms.

3.2.4 PBMC-Stimulation mit Lipopolysacchariden

In einem weiteren *in vitro*-Versuch wurden Monozyten (PBMCs) durch Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS), einem proinflammatorischen B-Zell-Mitogen, stimuliert. Gemessen wurde jeweils nach 1h bzw. nach 3h Stimulation.

Betrachtet man die Stimulation mit LPS, so fällt schon nach 1h Stimulation in allen drei gemessenen Primerkombinationen der SGK1 ein signifikanter Anstieg im Vergleich zum Kontrollwert ohne Stimulation auf. Dabei zeigt die SGK1-lv in Relation zum Kontrollwert mit einer um 5,07-fach erhöhten Expression die stärkste Expressionszunahme [99%-CI(1h control): 0,72 – 1,28; 99%-CI(1h LPS): 3,67 – 6,47]. Die Expression der beiden anderen Primer stieg lediglich 3,96-fach für SGK1 3'-UTR [99%-CI(1h control): 0,75 – 1,25; 99%-CI(1h LPS): 2,98 – 4,94] bzw. 2,77-fach für SGK1-5' [99%-CI(1h control): 0,85 – 1,15; 99%-CI(1h LPS): 2,35 – 3,2].

Interessante, differenziell regulierte Verhältnisse zeigen sich unter länger dauernder LPS-Stimulation nach 3h. Zeigt sich bei der SGK1 3'-UTR eine nahezu konstante Expression im Vergleich zum 3h-Kontrollwert [99%-CI(3h control): 0,75 – 1,25; 99%-CI(3h LPS): 0,87 – 1,44], finden sich bei den lv- und 5'-Varianten gegensätzliche Reaktionsweisen. In Analogie zum Verhalten nach 1h-Stimulation findet man bei der SGK1-5' ebenfalls einen signifikant erhöhten Expressionswert [99%-CI(3h control): 0,85 – 1,15; 99%-CI(3h LPS): 1,29 – 1,77], der allerdings lediglich um den Faktor 1,5 erhöht ist. Die SGK-lv reagiert dagegen mit einem signifikanten Abfall der Expressionswerte nach 3-stündiger Stimulation um den Faktor 0,48 [99%-CI(3h control): 0,72 – 1,28; 99%-CI(3h LPS): 0,35 – 0,62].

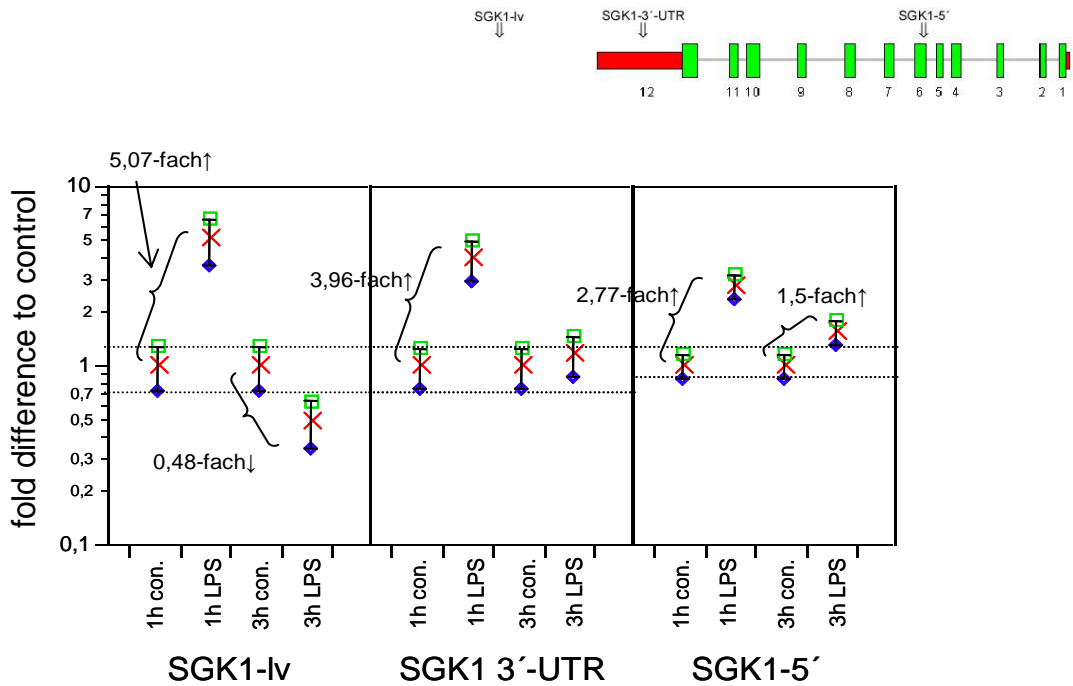


Abb. 20.a: Dargestellt sind die logarithmisierten Expressionsunterschiede (x-fache Expression, rot) während der Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharide) in Relation zu den jeweiligen nicht-stimulierten Kontrollwerten nach 1h bzw. 3h Stimulation. Schaubilder zeigen die Messwerte für SGK1-iv, SGK1 3'-UTR und SGK1-5' und geben die 99%-Konfidenzintervalle (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR an (grün: upper 99%-CI, blau: lower 99%-CI).

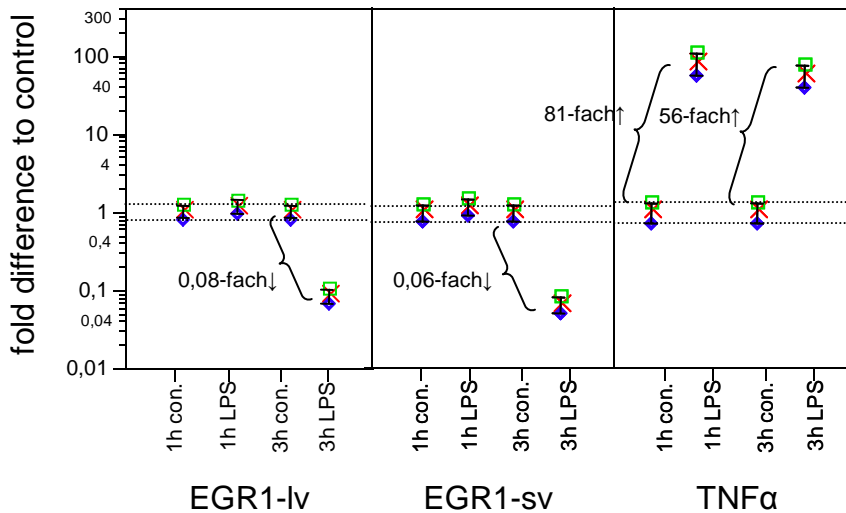


Abb. 20.b: Logarithmisierte Expressionsunterschiede (x-fache Expression, rot) während der Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharide) in Relation zu den jeweiligen nicht-stimulierten Kontrollwerten nach 1h bzw. 3h Stimulation von EGR1 als bekanntlich differenziell reguliertes Protein und des TNFα als belegtes Effektorgen der LPS-Stimulation zur Positivkontrolle. EGR1 zeigt nach 1h in beiden Varianten keine Antwort, nach 3-stündiger Exposition jedoch ein signifikantes Abfallen der Expression. TNFα dagegen zeigt zu beiden Messzeitpunkten eine signifikant gesteigerte Expression. Weiter sind die 99%-Konfidenzintervalle (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR angegeben (grün: upper 99%-CI, blau: lower 99%-CI).

Um Vergleiche zu bereits gut untersuchten Genen herstellen zu können, untersuchten wir das Verhalten unter LPS-Stimulation auch an EGR1 und an TNF α . EGR1 diente wieder als bekanntermaßen differenziell reguliertes Gen, zeigte jedoch wie schon unter der Hypoxiebelastung auch in diesem Versuch wiederum bei beiden Varianten ein gleiches Expressionsmuster. Nach 1-stündiger Stimulation konnten wir noch keinerlei Effekt aufzeigen [EGR1-lv: 99%-CI(1h-control): 0,81 – 1,19; 99%-CI(1h-LPS): 0,93 – 1,36], [EGR1-sv: 99%-CI(1h-control): 0,77 – 1,22; 99%-CI(1h-LPS): 0,91 – 1,43], allerdings fanden wir nach 3h Entzündungsstimulation bei beiden Varianten ein signifikantes Abfallen der Expressionswerte [EGR1-lv: 99%-CI(3h-control): 0,81 – 1,19; 99%-CI(3h-LPS): 0,07 – 0,10], [EGR-sv: 99%-CI(3h-control): 0,78 – 1,22; 99%-CI(3h-LPS): 0,05 – 0,07].

Der Tumor Nekrosefaktor α (TNF α) dagegen zeigte, wie zu erwarten, eine prompte Reaktion auf dem Entzündungsstimulus. Bereits nach 1 Stunde stiegen die Expressionswerte um den Faktor 81 im Vergleich zum Kontrollwert an [99%-CI(1h-control): 0,7 – 1,3; 99%-CI(1h-LPS): 56,71 – 105,58]. Es zeigte sich hierbei im Verlauf der weiteren Stimulation jedoch keine weitere Steigerung der Expressionsraten. Nach 3-stündiger Stimulation resultierten die Werte auf einem weiterhin hohen, im Vergleich zur Kontrolle 56-fach erhöht, jedoch leicht abgefallenen Wert [99%-CI(3h-control): 0,7 – 1,3; 99%-CI(3h-LPS): 39,45 – 73,44] (s. Abb. 20.b).

3.2.5 PBMC-Stimulation mit Noradrenalin

In einem zweiten Versuchsarm erfolgte eine Stimulation der PBMCs mit Noradrenalin und Adrenalin (NA), welche die physiologischen Stresshormone repräsentieren. Um deren Einfluss auf α - und β -Rezeptoren zu überprüfen, haben wir einen Teil der NA-stimulierten Proben mit jeweils spezifischen Rezeptorblocker versehen: Phentolamin + Noradrenalin (Phen. + NA) zur α -Blockade bzw. Propranolol + Noradrenalin (Prop. + NA) um die β -Rezeptoren zu blockieren. Wieder wurden die Proben nach 1h bzw. nach 3h gemessen.

Als Reaktion auf einen Stressreiz, konnte durch Stimulation der PBMCs mit Noradrenalin / Adrenalin, bereits nach 1 Stunde bei allen drei Varianten der SGK1 eine signifikante Abnahme der Expression gefunden werden. Für SGK1-lv fanden wir eine 0,55-fach niedrigere Expression im Vergleich zum 1h-Kontrollwert [99%-CI(1h control): 0,72 – 1,28; 99%-CI(1h NA): 0,40 – 0,70]. Die SGK1 3'-UTR-Variante zeigte

sich um den Faktor 0,59 vermindert [99%-CI(1h control): 0,75 – 1,25; 99%-CI(1h NA): 0,44 – 0,74] und SGK1-5´ mit dem deutlichsten signifikanten Abfall um den Faktor 0,64 [99%-CI(1h control): 0,85 – 1,15; 99%-CI(1h NA): 0,54 – 0,74].

Blockiert man innerhalb der ersten Stunde die α -Rezeptoren mittels Phentolamin unter gleichzeitiger Stimulation mit NA, so zeigt sich bei allen Varianten eine kaum veränderte Expression im Vergleich zur Kontrollmessung ohne Stimulation.

Unter einer β -Blockade mittels Propanolol konnten wir dagegen bei allen Varianten eine verminderte Expressionsrate verzeichnen. Dieser Abfall in der Expression zeigte sich allerdings lediglich bei der SGK1-5´ als signifikant und um den Faktor 0,67 vermindert [99%-CI(1h control): 0,85 – 1,15; 99%-CI(1h Prop. + NA): 0,57 – 0,77] (vgl. Tab. 6.a).

Tab. 6.a: x-fache Expressionsänderung zur 1h-Kontrolle unter NA-Stimulation alleine, bzw. in Kombination mit dem α -Blocker Phentolamin oder dem β -Blocker Propanolol. Weiter sind die 99%-Konfidenzintervalle (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR des 1h-Ausgangswertes und die dazugehörigen CI's unter 1-stündiger Stimulation in den beiden rechts gelegenen Spalten angegeben. Die zu den jeweiligen Kontrollintervallen signifikant veränderten Messwerte sind Fett hervorgehoben.

	<u>Primer</u>	<u>x-fache</u> <u>Expression zur</u> <u>1h-Kontrolle</u>	<u>99%-</u> <u>Konfidenzintervall</u> <u>der 1h-Kontrolle</u>	<u>99%-</u> <u>Konfidenzintervall</u>
NA	SGK1-lv	0,55	0,72 – 1,28	0,40 – 0,70
	SGK1 3´-UTR	0,59	0,75 – 1,25	0,44 – 0,74
	SGK1-5´	0,64	0,85 – 1,15	0,54 – 0,74
+ Phen.	SGK1-lv	1,13	0,72 – 1,28	0,82 – 1,44
	SGK1 3´-UTR	0,8	0,75 – 1,25	0,6 – 1,0
	SGK1-5´	0,97	0,85 – 1,15	0,82 – 1,12
+ Prop.	SGK1-lv	0,72	0,72 – 1,28	0,52 – 0,91
	SGK1 3´-UTR	0,66	0,75 – 1,25	0,5 – 0,83
	SGK1-5´	0,67	0,85 – 1,15	0,57 – 0,77

Nach 3-stündiger Stimulation mit NA zeigte sich der bereits nach 1h zu beobachtende Trend des Expressionsabfalls noch sehr viel deutlicher ausgeprägt, so dass nach 3h für alle Varianten ein deutlich signifikant erniedrigender Einfluss des Noradrenalins auf die SGK1-Varianten finden ließ.

Die beiden 3'-gelegenen Varianten, SGK1-lv und SGK1 3'-UTR, welche nach 1h lediglich schwach signifikant erniedrigt waren, zeigte sich jetzt einen sogar die 5'-Variante übertreffenden Abfall. SGK1-lv [99%-CI(3h control): 0,72 – 1,28; 99%-CI(3h NA): 0,20 – 0,36], SGK1 3'-UTR [99%-CI(3h control): 0,75 – 1,25; 99%-CI(3h NA): 0,16 – 0,27], SGK1-5' [99%-CI(3h control): 0,85 – 1,15; 99%-CI(3h NA): 0,39 – 0,54]. In den Untersuchungen zum Verhalten der SGK1-Varianten nach Blockade der α - bzw. β -Rezeptoren, zeigte sich auch nach 3-stündiger Stimulation wiederum ein deutlich stärkerer Einfluss des β -Blocker auf die Expression. Unter Behandlung mit dem α -Blocker Phentolamin fiel die Expression der SGK1-lv um den Faktor 0,43 ab [99%-CI(3h control): 0,72 – 1,28; 99%-CI(3h NA + Phen.): 0,31 – 0,54], die des 5'-Primers dagegen um den Faktor 0,51 [99%-CI(3h control): 0,85 – 1,15; 99%-CI(3h NA + Phen.): 0,43 – 0,58]. Die Blockade der β -Rezeptoren mittels Propranolol drosselte die Expression der SGK1-Primer stärker, so dass es hier bei allen Varianten zu einem signifikanten Expressionsabfall kam: SGK1-lv wurde um den Faktor 0,22 vermindert [99%-CI(3h control): 0,72 – 1,28; 99%-CI(3h NA + Prop.): 0,16 – 0,28], die SGK1 3'-UTR um das 0,32-fache [99%-CI(3h control): 0,75 – 1,25; 99%-CI(3h NA + Prop.): 0,24 – 0,4] und die SGK1-5'-Expression sank um das 0,44-fache [99%-CI(3h control): 0,85 – 1,15; 99%-CI(3h NA + Prop.): 0,37 – 0,51] (vgl. Tab. 6.b).

Tab. 6.b: x-fache Expressionsänderung zur 3h-Kontrolle unter NA-Stimulation alleine, bzw. in Kombination mit dem α -Blocker Phentolamin oder dem β -Blocker Propranolol. Weiter sind die 99%-Konfidenzintervalle (CI) auf Basis technischer Replikate für die real-time PCR des 3h-Ausgangswertes und die dazugehörigen CI's unter 3-stündiger Stimulation in den rechts gelegenen Spalten angegeben. Die zu den jeweiligen Kontrollintervallen signifikant veränderten Messwerte sind Fett hervorgehoben.

	<u>Primer</u>	<u>x-fache</u> <u>Expression zur</u> <u>3h-Kontrolle</u>	<u>99%-</u> <u>Konfidenzintervall</u> <u>der 3h-Kontrolle</u>	<u>99%-</u> <u>Konfidenzintervall</u>
<u>NA</u>	SGK1-iv	0,28	0,72 – 1,28	0,20 – 0,36
	SGK1 3'-UTR	0,22	0,75 – 1,25	0,16 – 0,27
	SGK1-5'	0,47	0,85 – 1,15	0,39 – 0,54
<u>+ Phen.</u>	SGK1-iv	0,43	0,72 – 1,28	0,31 – 0,54
	SGK1 3'-UTR	0,7	0,75 – 1,25	0,52 – 0,87
	SGK1-5'	0,51	0,85 – 1,15	0,43 – 0,58
<u>+ Prop.</u>	SGK1-iv	0,22	0,72 – 1,28	0,16 – 0,28
	SGK1 3'-UTR	0,32	0,75 – 1,25	0,24 – 0,4
	SGK1-5'	0,44	0,85 – 1,15	0,37 – 0,51

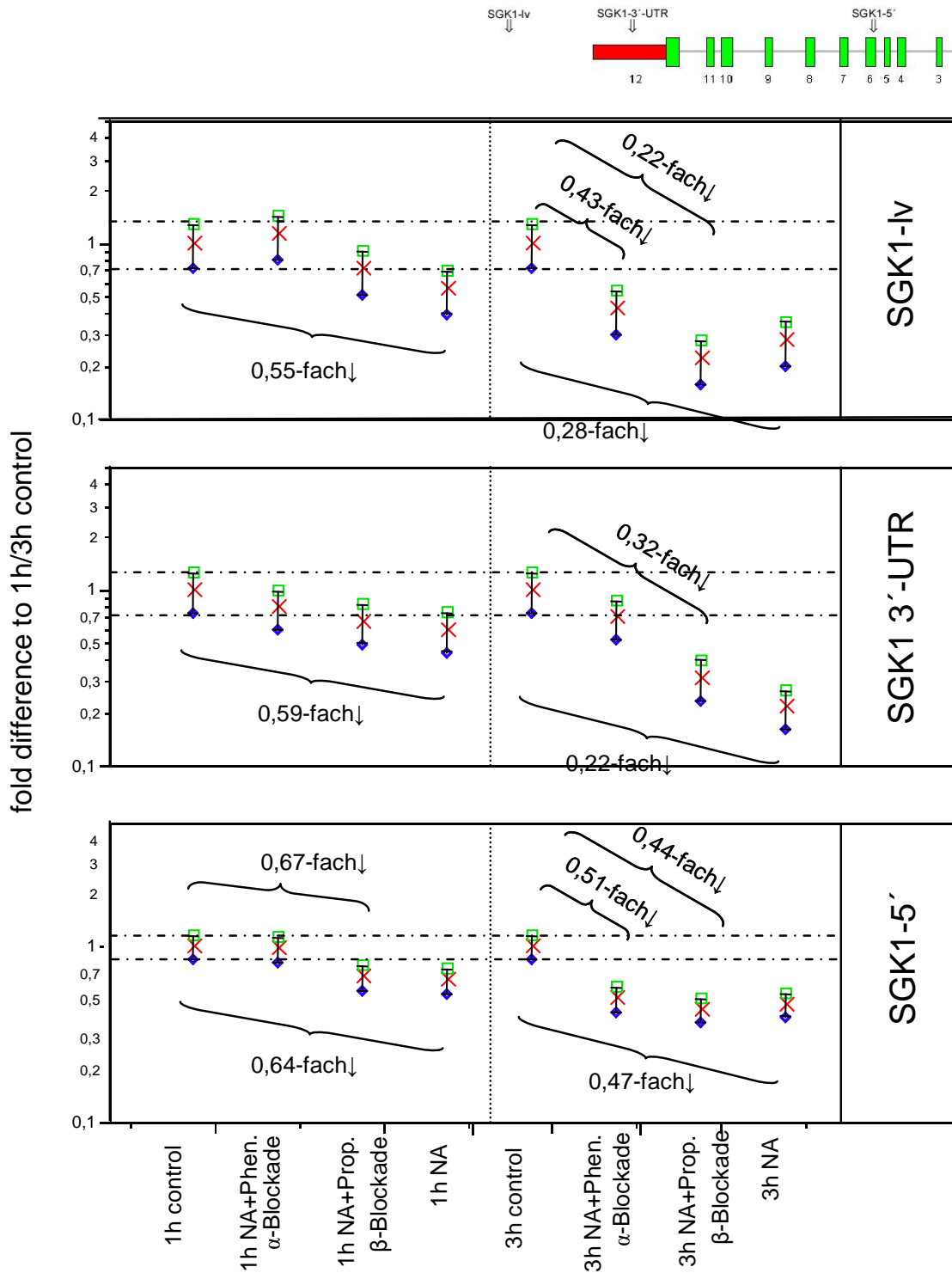


Abb. 21: logarithmisierte Darstellung der x-fachen Expression (rot) und deren 99%-Konfidenzintervalle (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR in Relation zu den 1h- bzw. 3h-Kontrollwerten während Stimulation mit Noradrenalin / Adrenalin alleine und in Kombination mit einem α - (Phentolamin) bzw. β -Blocker (Propranolol) (upper 99%-CI: grün, lower 99%-CI: blau).

3.3 *in vivo*-Untersuchungen

Da sich in den durchgeführten *in vitro*-Versuchen keine differenzielle Regulierung der beiden 3'-gelegenen Varianten der SGK1 finden ließ, beschränkten wir uns in den nun folgenden *in vivo*-Untersuchungen lediglich auf die Darstellung der Ergebnisse für die SGK1 3'-UTR und SGK1-5'.

3.3.1 Halbmarathon – erschöpfende Ausdauerbelastung

Im Rahmen des jährlichen Tübinger „Nikolauslaufes“ untersuchten wir das Expressionsverhalten der SGK1 in isolierten Lymphozyten vor und unmittelbar nach der Beendigung des Halbmarathons. Insgesamt konnten hier allerdings keine signifikanten Veränderungen der Zustände „vor“ bzw. „nach“ dem Lauf innerhalb der beiden untersuchten Varianten festgestellt werden (SGK1-3'-UTR: $p = 0,8075$; SGK1-5': $p = 0,5267$).

Auch das im Vergleich dargestellte *immediate early gen* EGR1 (Lokalisation: Chr. 5q23-31) zeigte unter diesen Ausdauerbelastungsbedingungen keine signifikanten Veränderungen (EGR1-3' $p = 0,5894$; EGR1-5' $p = 0,1107$), und ebenfalls eine stärkere Expression der am 3'-Ende gelegenen Variante.

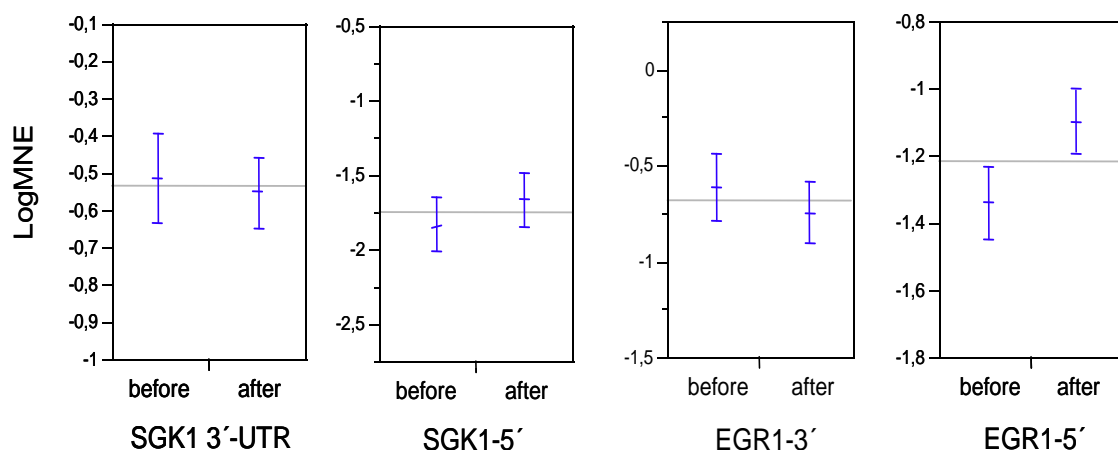


Abb. 22: Expression der SGK1 3'- bzw. 5'-Varianten vor und nach Beendigung des Halbmarathons. X-Achsen zeigen die Messzeitpunkte vor (before) bzw. nach (after) dem Lauf, die y-Achsen die LogMNE-Werte mitsamt dem Standardfehler des Mittelwertes (mean error). Im Vergleich dazu sind die beiden Varianten des IEG EGR1 dargestellt, wobei sich für keinen der vier Primer eine signifikante Expressionsänderung zeigen lässt.

3.3.2 kurzfristige, normobare Hypoxieexposition unter Placebo- bzw. Antioxidantiengabe

Im Rahmen dieses Versuchs untersuchten wir die Expression der SGK1 in PBMCs. Dabei galt es, die Ergebnisse unter Berücksichtigung der verschiedenen Variablen und deren Zusammenspiel zu analysieren. Die hier zu berücksichtigenden Faktoren betrafen zum einen die Antioxidanzien- bzw. Placebogabe, die Reihenfolge derer Applikation und die unterschiedlichen Messzeitpunkte.

Für die SGK1 3'-UTR konnten wir keine Abhängigkeit von einer Antioxidanzien- bzw. Placebogabe feststellen ($p = 0,7890$). Dahingegen zeigte sich bei der SGK1-5' eine signifikant erhöhte Expression unter Antioxidanziengabe ($p = 0,0117$).

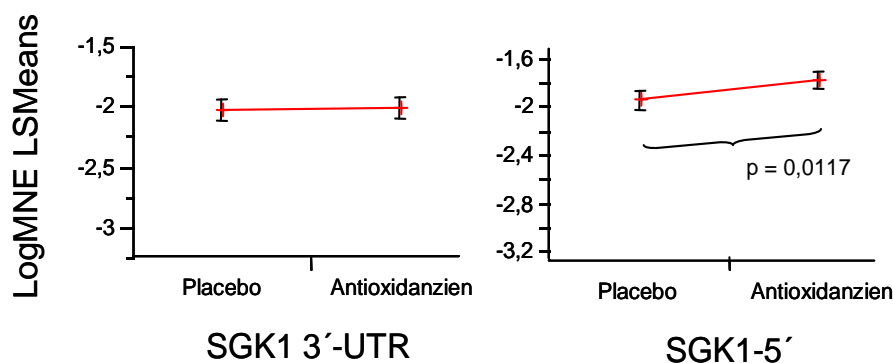


Abb. 23: Auswirkungen des Behandlungsschemas (Placebo bzw. Verum) auf die Expression der beiden SGK1-Primer. SGK1-5' zeigt unter Antioxidanziengabe eine im Vergleich zur Placebogabe signifikant stärkere Expression ($p = 0,0117$). LogMNE LSMMeans: LS Means der logarithmierten Mittleren Normalisierten Expressionswerte.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Behandlungsmethode auf die einzelnen Messzeitpunkte zeigten sich weder für die SGK1 3'-UTR ($p = 0,8663$), noch für die 5'-Variante ($p = 0,9769$) zu irgendeinem Zeitpunkt signifikante Expressionsunterschiede. Tabelle 8 zeigt die gefundenen Ergebnisse noch einmal auf die einzelnen Messzeitpunkte aufgeschlüsselt.

Tab. 8: p -values der SGK1-Primer 3'-UTR und 5' im Vergleich zwischen den einzelnen Messzeitpunkte und der Behandlung mit Antioxidanzien (xh/1) oder Placebo (xh/0), wobei keine signifikanten Veränderungen zu verzeichnen waren.

	0h/1 – 0h/0	2h/1 – 2h/0	4h/1 – 4h/0	5h/1 – 5h/0	8h/1 – 8h/0
SGK1 3'-UTR	0,3013	0,9722	0,8808	0,9046	0,6559
SGK1-5'	0,0912	0,1747	0,3573	0,3174	0,3851

3.4 subzelluläre Lokalisation der SGK1-Primer

Um die subzelluläre Lokalisation unserer SGK1-Primer zu untersuchen, verwendeten wir THP-1 Zellen und stellten uns zuerst Vertreter typischer subzellulärer Lokalisationen dar. Hierzu diente uns zum einen das Housekeeping-Gen GAPDH als Repräsentant für eine typisch zytoplasmatische, und zum anderen die 7sk als typischer Vertreter einer nukleären Lokalisation.

Für die GAPDH zeigte sich im Zytoplasma eine zwar nahezu unveränderte Expression im Vergleich zu dem Ausgangswert „total“ [95%-CI(total): 0,85 – 1,15; 95%-CI(cytoplas.): 0,89 – 1,2], jedoch fanden wir bei den Werten zur nukleären Lokalisation ein um den Faktor 0,44 signifikant vermindertes Expressionsmuster [95%-CI(total): 0,85 – 1,15, 95%-CI(ncl2): 0,37 – 0,51].

Die 7sk zeigte dagegen in der Lokalisationsdiagnostik einen deutlichen Anstieg der Expression im Zellkern [95%-CI(total): 0,93 – 1,07; 95%-CI(ncl2): 1,83 – 2,08; 1,95-fach \uparrow]. Auch bei der 7sk erwiesen sich die zytoplasmatischen Werte als sehr stabil exprimiert und zeigten dann sogar eine gerade eben signifikante Expressionsabnahme um den Faktor 0,79 in der zweiten zytoplasmatischen Aufreinigung [95%-CI(total): 0,93 – 1,07; 95%-CI(cytoplas.2): 0,74 – 0,85].

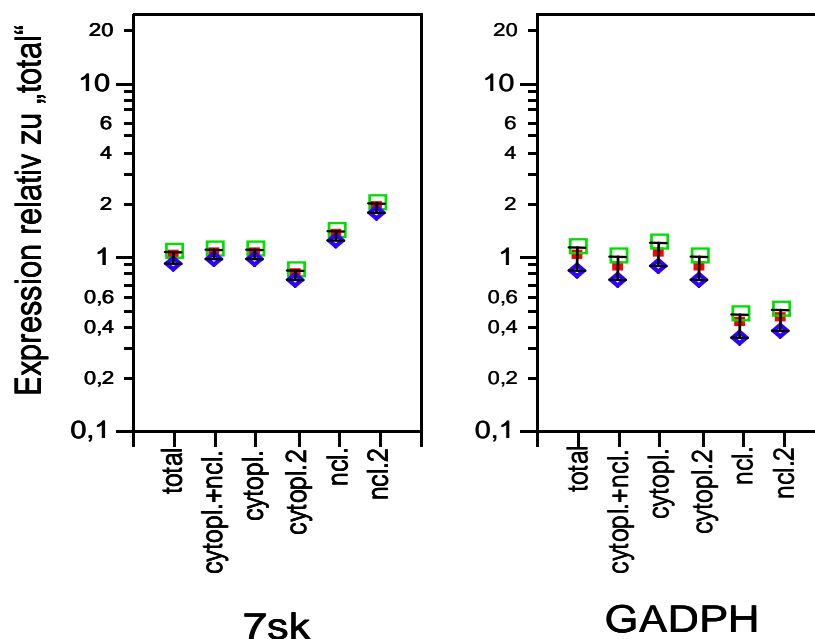


Abb. 24: Darstellung der 7sk und GAPDH als Vertreter typischer subzellulärer Lokalisationstypen mit ihren MNE-Werten (mean normalized expression, rot) und den dazugehörigen 95%-Konfidenzintervallen (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR relativ zum Ausgangswert „total“ (upper 95%-CI: grün, lower 95%-CI: blau). 7sk findet sich v.a. nukleär, die GAPDH v.a. im Zytoplasma.

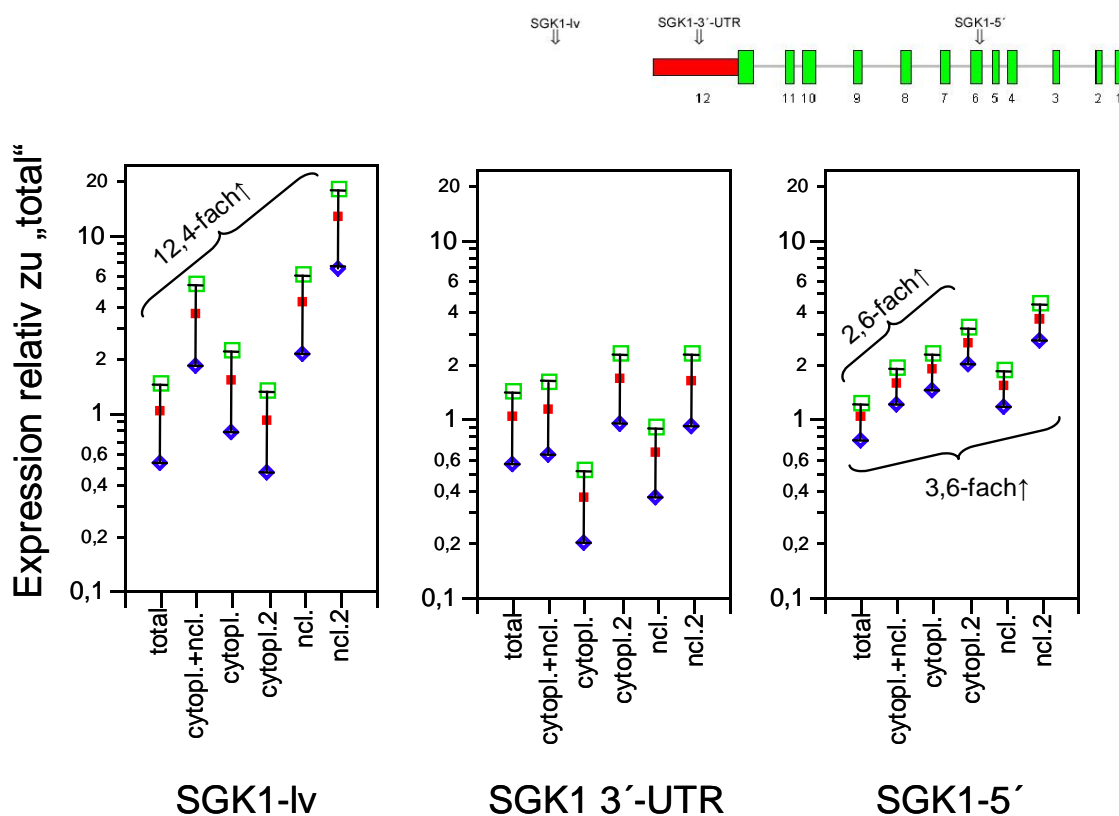


Abb. 25: Abgebildet sind die Expressionen unserer SGK1 Primer lv, 3'-UTR und 5' in den unterschiedlichen zellulären Ebenen als logarithmierte MNE-Werte (mean normalized expression, rot) zusammen mit deren zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen (upper 95%-CI: grün, lower 95%-CI: blau) (CI) auf Basis technischer Replikate für die Real-Time PCR.

Analysiert man nun die bekannten SGK1-Primer, so zeigen sich deutliche Unterschiede in deren subzellulären Lokalisation. Die lange Variante SGK1-lv zeigt im Zytoplasma eine lediglich um den Faktor 1,52 stärkere, jedoch nicht signifikante, Expression als zum Vergleichswert „total“ [95%-CI(total): 0,52 – 1,48; 95%-CI(cytopl.): 0,8 – 2,24]. Dagegen findet sich für sie im Zellkern ein 12,4-fach erhöhtes, signifikantes Vorkommen [95%-CI(total): 0,52 – 1,48; 95%-CI(ncl2): 6,51 – 18,3]. Bei der 3'-UTR ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der subzellulären Lokalisation ausmachen [95%-CI(total): 0,57 – 1,43; 95%-CI(cytoplas.): 0,36 – 0,91; 95%-CI(ncl): 0,92 – 2,29]. Die 5'-Varinante zeigte dagegen in beiden Kompartimenten eine relativ erhöhte Expressionsrate. Im Zytoplasma fand sich eine um den Faktor 2,6 signifikant erhöhte Expression im Vergleich zum Ausgangswert [95%-CI(total): 0,77 – 1,23; 95%-CI(cytoplas2): 2,02 – 3,22]. Die Expression im Zellkern zeigte sich mit um das 3,6-fache gesteigert noch deutlich stärker erhöht [95%-CI(total): 0,77 – 1,23; 95%-CI(ncl2): 2,77 – 4,42].

4 Diskussion

4.1 Möglichkeit alternativer SGK1-mRNA-Enden (in silico-Untersuchungen)

Bioinformatisch gestützte Strukturanalysen gaben uns Hinweise darauf, dass die bekannte SGK1-mRNA Referenzsequenz möglicherweise über alternative 3'- sowie 5'-Enden verfügt. Wir fanden eine auffallend hohe Konservierung der humanen 3'-UTR zu korrespondierenden Abschnitten anderer Spezies, was eine evolutionär und funktionell wichtige Aufgabe dieses Bereiches vermuten lässt. Erwartungsgemäß weisen vor allem proteinkodierende Sequenzabschnitte eine besonders hohe phylogenetische Konservierung auf. Häufig finden sich aber auch in den nicht kodierenden Abschnitten von mRNAs, den 5'- und 3'-*untranslated regions* (UTRs) hochkonservierte Bereiche. Diese können zum Beispiel eine Bedeutung für den Transport, oder auch die Stabilität einer mRNA besitzen und dementsprechend funktionell wichtig sein, obgleich sie nicht direkt für ein Protein kodieren. Für das *immediate early* Gen (IEG) EGR1 (*early growth response factor*) wurde beispielsweise zunächst die hohe phylogenetische Konservierung der am weitesten 3' gelegenen Abschnitte der 3'-UTR berichtet (Long & Salbaum 1998), bevor anschließend ein funktioneller Bezug dieses Sequenzabschnittes aufgezeigt werden konnte (Simon, Schott, Williams, & Schaeffel 2004). Untersuchungen des EGR1 in muriner Retina zeigen, dass eine in der 3'-UTR um 293bp längere Variante (EGR1-lv) durch den posttranskriptionellen Mechanismus der Polyadenylierung reguliert wird. Die Kontrolle der kürzeren EGR1-sv dagegen wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene stattfindet (Simon, Schott, Williams, & Schaeffel 2004). Studien unserer Arbeitsgruppe zu EGR1 in humanen Zellen unter Ausdauerbelastung und Hypoxieexposition zeigten, dass sich die EGR1-lv-Expression praktisch nicht verändert. Dagegen zeigte sich bei der EGR1-sv durchaus eine deutliche differenzielle Regulation durch Hypoxie und Ausdauerbelastung *in vivo*. Ebenso ließ sich während der placebokontrollierten Hypoxieexposition unter Antioxidanzengabe ein Expressionsunterschied für EGR1-sv feststellen. Dabei blieb die EGR1-sv-Expression während des eigentlichen Hypoxieaufenthaltes unter Antioxidantienbehandlung unverändert, in der Placebogruppe hingegen stieg diese an. Demnach scheint sich hier also tatsächlich ein protektiver Effekt einer Antioxidanzengabe auf

EGR1 abzuzeichnen (Dissertation Annette Blösch, 2006).

Analysen der in der 3'-UTR der SGK1 vorhandenen ESTs (*expressed sequence tags*) ließen auf alternative Polyadenylierungsstellen innerhalb dieses Bereichs schließen (s. Abb. 15). Unter Zuhilfenahme des *GenomeBrowsers* fanden wir eine auffällige Varianten knapp 2000bp weiter downstream des 3'-UTR-Bereichs. Sie zeigte sich bei den Analysen der ungespligten humanen, sowie der nicht-humanen ESTs. Beim Menschen fanden Dias et al. 2001 das lediglich 503bp umspannende EST BI063089 in Brusttumorzellen. Ein ebenfalls sehr kurzes Element von 201bp wurde beim Rind entdeckt (BM483747; Smith et al. 2002). Dagegen fand man beim Affen eine sehr lange Variante, welche sich, beginnend an einem alternativen 5'-Start [SGK1(-850)] über 6116bp durch die gesamte Gensequenz in ein alternatives 3'-Ende erstreckt (EB520570; Wallace et al. 2006).

Im Bereich der 3'-UTR fanden wir als weitere Auffälligkeit einen Bereich von *inverted repeats*, einem Bereich der aus zu 81% komplementären Basenpaaren besteht und eine Region markiert, in der sich potenziell eine Loop-Struktur ausbilden kann.

Auch der 5'-Bereich zeigte strukturelle Besonderheiten. So fanden sich dort auffallend häufig zwei alternative Transkriptionsstart-Bereiche, deren Charakteristika genauer unter Abschnitt 4.4 besprochen werden.

Weitere strukturelle Analysen enthüllten zwei retrotransponierte Sequenzen der SGK1 auf den Chromosomen 1 und 5, die sich jedoch in den Versuchsreihen als etwa um den Faktor 2^7 geringer exprimiert zeigten, so dass es uns über 5 $_{10}$ Log-Stufen nicht gelungen ist, Standardkurven zu erstellen und wir damit eine Verunreinigung unserer Ergebnisse als unerheblich betrachten konnten.

In Analogie zu den strukturellen Ähnlichkeiten und der hohen phylogenetischen Konservierung der SGK1 zu anderen IEGs, wie dem EGR1 oder Hif1 α (s. Abb. 11, 12.a und 12.b), für welche eine differentielle Regulation und funktionelle Bedeutung der verschiedenen Varianten bereits beschrieben wurde (s. (Simon, Schott, Williams, & Schaeffel 2004) für EGR1 bzw. (Lauzier et al. 2007) (Page et al. 2002) für Hif1 α), stellte sich uns die Frage, ob sich ein solches Verhalten nicht auch bei der SGK1 finden lässt. Für unsere Untersuchungen verwendeten wir drei verschiedene SGK1-Primer, SGK1-5' platzierten wir im Exon 6 der Referenzsequenz, SGK1 3'-UTR kam in der 3'-UTR zum Liegen und den SGK1-lv-Primer legten wir weit downstream der 3'-UTR in die Region der *in silico* gefundenen alternativen ESTs bzw. den *inverted repeat* Sequenzen.

4.2 Nachweis alternativer SGK1-mRNA-Varianten, Verhalten unter den unterschiedlichen Stressstimuli

Die in dieser Arbeit besprochenen experimentellen Untersuchungen zielten darauf ab, am 3'-Ende alternative SGK1-mRNAs zu finden. Durch eine Reihe von *in vitro*-Versuchen konnten wir die Existenz zweier unterschiedlich langer SGK1-mRNA-Varianten am 3'-Ende der SGK1 in verschiedenen Geweben wie Muskel, PBMCs und Monozyten nachweisen. Ihre Expression erfolgte in Reaktion auf Reize wie Differenzierung, Stimulation mit Kobalddchlorid, LPS oder Noradrenalin. Versuche aus *in vivo* gewonnenen Proben unter Ausdauerbelastung und Hypoxieexposition unter Antioxidazientgabe sollten die Bedeutung der verschiedenen Varianten im menschlichen Organismus unter definierten Bedingungen zu Tage bringen.

4.2.1 Differenzierung

Schon 1999 fanden Zetser et al. die p38/MAPK-Aktivität (Myogen aktivierte Proteinkinase) in frühen Entwicklungsstadien während der Muskeldifferenzierung aktiviert und zeigten, dass eine spezifische Blockade der p38/MAPK durch den Inhibitor SB203580 zu einem Sistieren der Myoblastendifferenzierung führte (Zetser, Gredinger, & Bengal 1999). In unseren Versuchsreihen zur Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben zeigte sich für die SGK1-Variante SGK1-5' gegen Ende der Differenzierung ein signifikant erhöhter Wert (96h: 2,8-fach \uparrow). Dieses Ergebnis scheint in Einklang mit dem eben erwähnten und der schon unter 1.3.2. beschriebenen Beobachtung zu stehen, dass eine Aktivierung der p38/MAPK mit einer gesteigerten Expressionsrate der SGK1 einhergeht (Leong, Maiyar, Kim, O'Keeffe, & Firestone 2003).

Dagegen zeigten sich die 3'-UTR als äußerst stabil exprimiert gegenüber dem Differenzierungsstimulus und zeigte kaum Expressionsänderungen im Verlauf des Versuchs und für die SGK1-lv konnten wir am Ende des Versuchs ein zur SGK1-5' gegenläufiger, um das 0,25-fache signifikant erniedrigter Wert (s. Abb. 17.a).

So konnte sich für dieses *in vitro*-Experiment tatsächlich eine differenzielle Regulierung der SGK1 zeigen lassen. Die 5'-Variante, dessen Primer im Exon 6 des Referenzgens zum Liegen kommen, reagierte wie man es nach theoretischen Vorüberlegungen erwarten konnte durch Aktivierung der p38/MAPK mit einem Ansteigen der Expression. Zhang et al. hatten zuvor beschrieben, dass die SGK1 in

Brusttumorzellen durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu einer Aktivierung des IKK-NF- κ B-Weges führte und somit antiapoptotische, das Überleben der Zelle sichernde Eigenschaften aufwies (Zhang, Cui, Cheng, & Du 2005).

Die interessante Entdeckung folgte in diesem Versuch allerdings mit dem Expressionsabfall der SGK1 3'-UTR. Welche Bedeutung oder Funktion diese gegensätzlich exprimierte Variante haben könnte, wird weiter unten unter Abschnitt 4.3 ausführlich diskutiert. Im Vergleich mit EGR1 konnten wir feststellen, dass es auch hier – allerdings in beiden Varianten – unter dem Differenzierungsstimulus zum Abfallen der Expressionswerte kommt (s. Abb. 17.b).

4.2.2 Entzündung

Ein starker Entzündungsstimulus für Monozyten stellt das bakterielle Endotoxin (Lipopolysaccharid = LPS) dar, welches aus der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien gewonnen wird. Als Antwort auf eine LPS-Stimulation produzieren Monozyten eine große Anzahl proinflammatorischer Zytokine, wie den Tumornekrose-Faktor α (TNF α), und die Interleukine 1 und 6 (IL-1, IL-6), aber auch das IL-10, welches antiinflammatorische Eigenschaften aufweist (de Waal et al. 1991). Die Entzündungsantwort wird durch die Aufnahme der LPS über CD14 und anschließender Aktivierung des *toll-like receptor 4* (TLR4), mit Induktion der angeborenen Immunantwort ausgelöst (Dunzendorfer et al. 2004). In verschiedenen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass die LPS-Stimulation zur Aktivierung einer Reihe intrazellulärer Signalwege führt. Davon betroffen ist der IKK/NF- κ B-Signalweg (Krappmann et al. 2004), sowie die MAPK-Familie mit dem p38 (Reimann et al. 1994), (Zhu et al. 2000), ERK1 und ERK2 (*extracellular-signal-regulated kinase-1 und -2*; (Liu et al. 1994)), sowie JNK (*c-Jun N-terminal kinase*, (Hambleton et al. 1996)). Dies stellen alle Signalwege dar, welche bekanntermaßen auch mit einer Aktivierung der SGK1 in Verbindung gebracht werden können.

Unter dem Einfluß des Entzündungsstimulus zeigte sich in unseren Versuchen zu den SGK1 3'-Varianten bei allen drei getesteten Primern in PBMCs eine schnelle, innerhalb der ersten Stunde festzustellende, signifikante Expressionszunahme (SGK1-5': 2,77-fach, SGK1 3'-UTR: 3,96-fach, SGK1-lv: 5,07-fach). Weitere Messungen zu einem späteren Stimulationszeitpunkt (Messzeitpunkt 3h) zeigten ähnliche Verhältnisse, wie schon unter den Differenzierungsbedingungen beobachtet: während die 3'-UTR keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle

zeigte, fand sich für die SGK1-5´ eine um das 1,5-fach erhöhte Expression, die SGK1-lv zeigte dagegen eine gegenläufige, um den Faktor 0,48 erniedrigte Expression (s. Abb. 20.a).

Das Ansteigen der SGK1-5´ nach 3-stündiger Entzündungsstimulation lässt sich, wie schon unter den Differenzierungsbedingungen gut mit den oben genannten Effekten auf die intrazellulären Signalwege durch LPS-Stimulation und den unter 1.3.2 beschriebenen antiapoptotischen Eigenschaften der SGK1 erklären (Zhang, Cui, Cheng, & Du 2005), (You, Jang, You, Okada, Liepa, Wakeham, Zaugg, & Mak 2004), (Brunet et al. 2001), (Brunet, Bonni, Zigmund, Lin, Juo, Hu, Anderson, Arden, Blenis, & Greenberg 1999). Interessanterweise zeigte sich auch in diesem Experiment, dass die gegenläufige SGK1-lv dem Expressionsmuster des differenziell regulierten EGR1 gleicht und mit einem Abfallen reagiert. Dagegen konnten wir als quasi Positivkontrolle für TNF α eine eindeutige Expressionszunahme unter LPS-Stimulation feststellen (s. Abb. 20.b).

4.2.3 Hypoxie

Eindeutige, stichhaltige Angaben zum Verhalten der SGK1 unter hypoxischen Zuständen fehlen bislang in der Literatur. Allerdings lässt sich auch hier wieder eine Verbindung über die p38/MAPK herstellen. In einer aktuellen Arbeit der Arbeitsgruppe um Lu et al. wurde gezeigt, dass in CoCl₂-stimulierten Prostatatumorzellen ROS (*reactive oxygen species*) induziert werden und sich die Zellen somit in einem Zustand des oxidativen Stress befinden. Sie wiesen eine erhöhte Aktivität der p38/MAPK und der Proteinkinase C nach und postulierten, dass die Aktivierung der Proteinkinasen zu einer Erhöhung der Zelladhäsion führt, was in einem erhöhten Malignitätspotenzial resultierte (Lu et al. 2007). Ein Zusammenhang zwischen der SGK1 mit malignen Tumoren wurde schon zuvor über die Beeinflussung des *cell survival*s durch die SGK1 hergestellt. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Shanmugam et al. zeigte eine Androgen-abhängige Expression der SGK1: Durch Bindung von Androgenen an den Androgenrezeptor (AR) in der Promotorregion, fanden sie eine Aktivierung des SGK1-Promotors mit nachfolgend gesteigerter Genexpression. Sie zeigten weiter, dass die SGK1 die Möglichkeit besitzt, Zellen vor der Apoptose durch *small-interfering RNA* (siRNA) zu retten und weiter zu einer Beschleunigung der AR-Transaktivierung auch in Abwesenheit von Androgenen führt. So konnten sie die wichtige Rolle der SGK1 im AR-abhängigen *cell survival* und der

Genexpression verdeutlichen (Shanmugam et al. 2007).

In unserem Zellkulturversuch mit CoCl_2 -stimulierten Myotuben zeigte sich ein deutliches Ansprechen der SGK1 auf diesen Hypoxiestimulus. Insbesondere die SGK1-5' fiel durch einen schnellen, signifikant erhöhten Anstieg nach bereits 30-minütiger Exposition auf (3,7-fach gesteigert). Auf den Höhepunkt nach einstündiger CoCl_2 -Stimulation folgte ein kontinuierliches Abfallen der Expressionswerte im weiteren Verlauf und endete auf einem signifikant um den Faktor 0,4 erniedrigten Niveau nach 20h Versuchsdauer. Interessanterweise zeigte sich hier im Gegensatz zur Differenzierung keine differenzielle Regulation der SGK1-Varianten. Die 3'-UTR sowie die SGK1-lv ähnelten in ihrem Expressionsverlauf stark der SGK1-5' (s. Abb. 19.a). Allerdings zeigten sich insbesondere für die SGK1-lv sehr viel schwächer ausgeprägte Expressionsunterschiede innerhalb der Versuchsreihe.

In *in vivo*-Untersuchungen zur Reaktion der SGK1 unter Hypoxie führten wir unter Placebo-kontrollierter Antioxidanzengabe durch, um einen möglichen protektiven Effekt der Antioxidanzien untersuchen zu können. Hierbei zeigte sich lediglich für die 5'-Variante ein schwach signifikanter Einfluss auf die Genexpression ($p = 0,0117$, Abb. 23). In der Einleitung wurde bereits angesprochen, dass es in der Vergangenheit eine Reihe von Studien gab, die keinen positiven Effekt einer Antioxidanzengabe auf den oxidativen Stress einer Zellen nachweisen konnten (Niess, 2004, (Davison & Gleeson 2006)). Die hier gefundenen Ergebnisse lassen ebenfalls lediglich eine sehr schwache Beeinflussbarkeit auf Hypoxie nachweisen und tendieren eher dazu, dass sich unter Antioxidanzien kein günstigerer Zustand auszubilden scheint.

Allerdings stellt sich die Frage nach einer zeitlichen Komponente in der Wirkungsbildung. Zum Zeitpunkt der Verabreichung scheint die Antioxidanzengabe nicht effektiv zu sein, jedoch mit geringer zeitlicher Verzögerung von wenigen Wochen (hier: 3 Wochen), stellt sich ein schwacher protektiver Effekt ein. Darum wäre es interessant, weitere Untersuchungen zum zeitlichen Optimum einer Antioxidanzengabe anzustellen. Lag es schon in der Zeit vor unserem Messzeitpunkt innerhalb der ersten 3 Wochen, oder stellt sich die absolute Wirkung sogar erst noch später ein?

4.2.4 NA-Stimulation

Als typischer Stellvertreter der physiologischen Stresshormone verwendeten wir das Katecholamin Noradrenalin, um eine Stresssituation *in vitro* zu erzeugen. Es zeigte sich für die SGK1, wie erwartet, eine deutliche Reaktion aller Primer auf die Stimulation. Schon nach einstündiger Exposition zeigten sich in allen drei untersuchten Varianten eine signifikante Expressionsabnahme. Dieser Effekt verdeutlichte sich nach weiteren 2 Stunden Stimulation [SGK1-lv(1h/3h): 0,55-/0,28-fach; SGK1 3'-UTR(1h/3h): 0,59-/0,22-fach; SGK1-5'(1h/3h): 0,64-/0,47-fach erniedrigt).

Wir untersuchten weiter den Einfluß von α - und β -Rezeptorblockern und konnten feststellen, dass eine α -Blockade eine stärkere Wirkung auf die Expression der SGK1-Primer zeigte als eine β -Blockade. Unter der β -Blockade durch Pronanolol zeigten sich die Messwerte auf ähnlich erniedrigten Niveau wie unter einer reinen Noradrenalin-Stimulation. So dass wir davon ausgehen, dass eine β -Blockade keine Wirkung auf die Regulation der SGK1 hat. Dagegen scheint eine 1-stündige Stimulation mit NA + Phentolamin (α -Blocker) einen protektiven Effekt zu haben, so dass die Expressionen zu diesem Zeitpunkt nicht abfielen. Nach 3-stündiger Stimulation zeigte sich allerdings ebenfalls eine signifikant erniedrigte Expression der SGK1-lv und der SGK1-5', im Vergleich zur Propanolol-Studie fiel diese allerdings geringer aus [SGK1-lv(Prop./Phen.): 0.43/0.22; SGK1-5'(Prop./Phen.): 0.51/0,44) (s. Abb. 21). Für diesen Versuch konnten wir keine differenzielle Regulation unserer SGK1-Primer feststellen, so dass die Ergebnisse wiederum im Gegensatz zu denen unter Differenzierungs- und Entzündungsbedingungen stehen, bei denen sich die SGK1-lv als gegenläufig exprimiert finden ließ.

4.2.5 Ausdauerbelastung

Die Versuchsreihe zur Ausdauerbelastung unter Marathonbedingungen *in vivo* zeigte uns ebenfalls keine differenziell regulierte SGK1-mRNA. Der Vergleich der Expressionen vor zu nach dem Lauf konnte keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Wie in Abb. 22 gezeigt findet sich hier auch für EGR1 keine differenziell regulierte mRNA.

Auffällig in diesem Versuch war allerdings, dass sich insgesamt, im Gegensatz zu den anderen Versuchen, eine im Vergleich zur 5'-Variante (in Exon 6 gelegen)

stärker exprimierte 3'-UTR finden ließ. Dieses Phänomen zeigte sich nicht nur für die SGK1, sondern auch für EGR1. Für EGR1 ist dabei eine im 3' UTR kürzere mRNA Variante bekannt, wodurch sich dieser Effekt prinzipiell erklären lässt. Für die SGK1 lässt sich der deutliche Expressionsunterschied womöglich auch durch das Vorliegen von verkürzten Splice-Varianten der SGK1 erklären. Weitere Untersuchungen, die sich unmittelbar an diese Arbeit experimentell anschließen, konnten dann auch das Vorliegen von drei im 5'-Bereich alternativ gespliceten mRNA Varianten der SGK1 belegen (Simon et al. 2007; siehe auch Kapitel 4.4). In wieweit alle diese Varianten die volle Sequenzlänge der SGK1 Referenz-mRNA aufweisen müssen weitere Untersuchungen zum Ziel haben.

4.3 SGK1-lv – Funktion / Bedeutung?

In unseren *in vitro*-Versuche konnten wir unter den Bedingungen Differenzierung und LPS-Stimulation eine differenziell regulierte SGK1 nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit ist es uns allerdings nicht gelungen, eine vollständige Sequenzierung des Genabschnittes der SGK1-lv zu bekommen. Schwierigkeiten ergaben sich unter anderem darin, festzustellen, welche Leserichtung bei dieser SGK1-Variante vorherrscht. So könnte es sich unserer Meinung nach unter Umständen um eine anti-sense mRNA handeln. Dies konnte für Hif1 α erstmals von Thrash-Bingham im Jahre 1999 gefunden werden (Thrash-Bingham & Tartof 1999). Sie beschrieben im klarzelligen Nierenkarzinom die Überexpression einer Hif1 α -Variante mit einer Länge von 1577bp, wovon sich 882bp zum 3'UTR von Hif1 α komplementär erwiesen, der Rest dieser mRNA in Richtung 5' des kodierenden Stranges allerdings nicht mehr zu 100% komplementär war. Eine Ursache hierfür könnte im „*A to I Editing*“ einzelner Basen der aHif1 α liegen. Darunter versteht man den Austausch einzelner Basen von Adenosin in Inosin, einem Prozess, den man vor allem von doppelsträngiger RNA kennt. RNA-Hybride, wie diese bei einer Sense-Antisense-Situation vorliegen würden, stellen ebenfalls doppelsträngige RNA dar. Wird das Inosin erkannt, kann die damit gekennzeichnete RNA zum Beispiel im Zellkern zurückgehalten werden und nach einer weiteren Modifikation (Abspaltung, Deletion oder erneute Edition) in ein anderes Zellkompartiment translokiert werden. Auch Rossignol et al. beschrieben 2002, dass anti-Hif1 α zu einer Bindung mit Hif1 α im überlappenden Bereich fähig sei, wodurch AU-reiche Elemente (Adenosin/Uracil) in der Struktur freigelegt werden.

Solche Strukturen verbergen sich ohne Hybridisierung funktionell in so genannten *hairpins* (Haarnadelstrukturen des Basenstranges). Eine Freilegung führt zur Proteinbindung mit nachfolgendem vermehrten Abbau von Hif1 α . Somit kommt es mit einer anti-Hif1 α zum vermehrten Abbau von Hif1 α (Law, Allchin, & Morris 1995). Durch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe im Rahmen von Promotionsarbeiten konnten zwei neue Hif-Varianten nachgewiesen (Dissertation David Callau, 2008), sowie deren differenzielle Regulation gezeigt werden (Dissertation Alexander Böhringer, 2008). Allerdings ließen sich auch hier keine vollständigen Sequenzen der beiden Varianten gewinnen, und es stellte sich auch hierbei die Frage einer Regulation der Hif1 α im Sinne einer antisense-Variante.

Eine weitere Schwierigkeit in der Charakterisierung der SGK1-lv stellt die Möglichkeit zur Ausbildung von Loop-Strukturen durch die *inverted repeats* dar. Auch diese Strukturen sind partiell doppelsträngig und zeigen sich, da eine fehlerfreie Synthese über einen Bereich der Doppelsträngigkeit nicht gewährleistet werden kann, schon bei der Transkription als sensible Stellen für die dafür verwendete Polymerase dar. Dieses Problem setzt sich dann weiter durch den gesamten Verwendungsbereich der Proben (PCR, Sequenzierung,...) fort. Stellt man sich nun die Situation vor, dass neben einer ausgebildeten Loop-Struktur auch noch eine Hybridisierung im Sinne einer antisense-RNA vorherrschen kann, muss man von einer sehr hohen Fehlerquote der Messreihen bei nicht eindeutig bekannter Struktur ausgehen.

Eine weitere interessante Überlegung ist die Frage, ob es sich bei diesen kurzen Sequenzabschnitten des 3'-Bereichs tatsächlich um eine eigenständige RNA oder eher um Anteile einer *intergenic region* handelt. Unter einer *intergenic region* versteht man einen DNA-Bereich, der sich dadurch auszeichnet, dass keines oder nur sehr wenige ESTs zwischen zwei DNA-Sequenzbereichen höherer Gen-Konzentration vorkommen. *Intergenic regions* gehören wie die Introns der Gene zur so genannten „*junk DNA*“, welche 97% des Genoms ausmacht und für welche größtenteils keine spezifische Funktion bekannt ist, wobei manchen *intergenic regions* auch eine Art Kontrollfunktion über bestimmte Gene zugesagt wird.

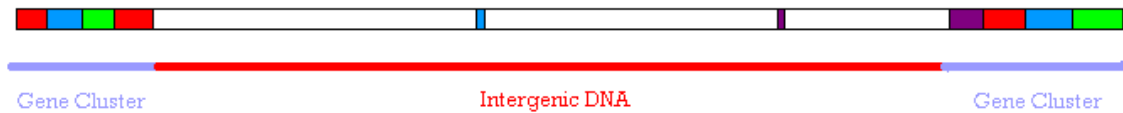


Abb. 26: Schema einer „intergenic region“; an beide Enden des dargestellten Genomstrangs befinden sich Bereiche höherer Genkonzentrationen („Gene Cluster“ = bunt markierten Gene). Dazwischen liegt ein Bereich in welchem nur zwei ESTs enthalten sind. Dieser Bereich stellt eine „intergenic region“ dar.

Ebenfalls in diesem Sinne veröffentlichte Claverie 2005 eine Arbeit, in welcher er auf das Problem hinweist, dass durch neue, immer sensibler werdende Methoden die Anzahl der gefundenen mRNAs stetig steigt, eine wirklich Funktion und Bedeutung allerdings nur für einen kleinen Bruchteil dieser gefunden werden kann. Er spricht dabei von einer sehr hohen Hintergrundexpression in Mäusen, die einen Anteil von bis zu 90% ausmachen könnte. Somit ist es heute eine der großen Herausforderungen, die Vielfältigkeit der gefundenen Ergebnisse mit einer tatsächlichen Funktion in Einklang zu bringen (Claverie 2005).

4.4 5´-Bereich / Promotorregion

Diese Arbeit sollte sich vor allem mit dem 3´-Ende der SGK1-mRNA beschäftigen und eine mögliche differenzielle Regulation der mRNA auf die unterschiedlichsten Reize untersuchen. Wie eingangs in den *in silico*-Untersuchungen schon erwähnt, konnten wir allerdings am 5´-Ende der SGK1 zwei in diesem Bereich stark gehäuft vorkommende und innerhalb verschiedenster Spezies stark konservierte Varianten der SGK1 finden (s. Abb. 15). Somit diene die vorliegende Arbeit als Grundlage für weitere Untersuchung des 5´-Bereiches und enthüllte uns interessante Ergebnisse, welche von unserer Arbeitsgruppe bereits 2007 in *Cellular Physiology and Biochemistry* publiziert wurden und welche ich hier der Vollständigkeit halber zusammenfassend darstellen möchte (Simon et al. 2007).

Die beiden in diesem Bereich stark gehäuft vorkommenden Varianten zeichnen sich durch unterschiedliche Promotorregionen aufgrund alternativer Transkriptionsstarts bei -2981 bzw. -850 upstream des Transkriptionsstartbereichs [SGK1(+1)] der Referenz mRNA aus. Beide Varianten charakterisieren sich durch das Fehlen des ersten Exons der Referenzsequenz. (Simon et al. 2007). Bei erhaltenem *open reading frame* (ORF) kodieren die Sequenzen für zwei unterschiedliche Proteine,

welche sich lediglich am äußersten N-Terminus unterscheiden. Diese Unterschiede finden sich in Sequenzen, welche wichtig für die Proteinstabilität (Degradierung) und Zelllokalisierung sind (Engelsberg, Kobelt, & Kuhl 2006), (Arteaga et al. 2006), (Bogusz et al. 2006). Teile der Sequenz, welche wichtig für die Kinaseaktivität, den ENaC-abhängigen Na⁺-Transport oder die Forkhead-abhängige Gentranskription sind, werden davon allerdings nicht betroffen. Die Stimulation mit Glukokortikoiden zeigte eine bei all diesen Varianten eine ähnliche Antwort, Hypoxie- und zellulärer Differenzierungsstress dagegen führten zu einer unterschiedlichen Expression (Simon, Schneck, Hochstetter, Koutsouki, Mittelbronn, Merseburger, Weigert, Niess, & Lang 2007) (s. Abb. 27.a für die Differenzierung und Abb. 27.b für die Hypoxiebelastung unter CoCl₂-Stimulation).

In der angeschlossenen Darstellung (Abb. 28) ist die Reaktion unserer Positivkontrolle TNFα im Vergleich der SGK1-Varianten des 5'-Endes während der Versuchsreihe zur LPS-Stimulation abgebildet. Neben der klaren Expressionssteigerung des TNFα, konnte unter diesen Bedingungen eine differenzielle Expression der untersuchten SGK1-Primer aufgezeigt werden.

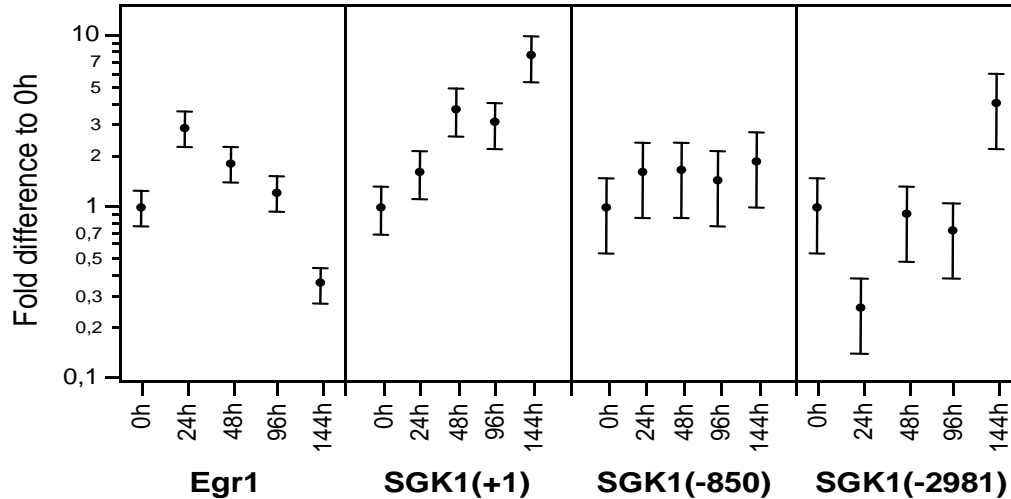


Abb. 27.a: Expression der 5'-Primer der SGK1-Primer unter Differenzierungsbedingungen in Myoblasten im Vergleich zum 0h-Kontrollwert. Darstellung des EGR1 als bekanntlich differenziell reguliertes Protein.

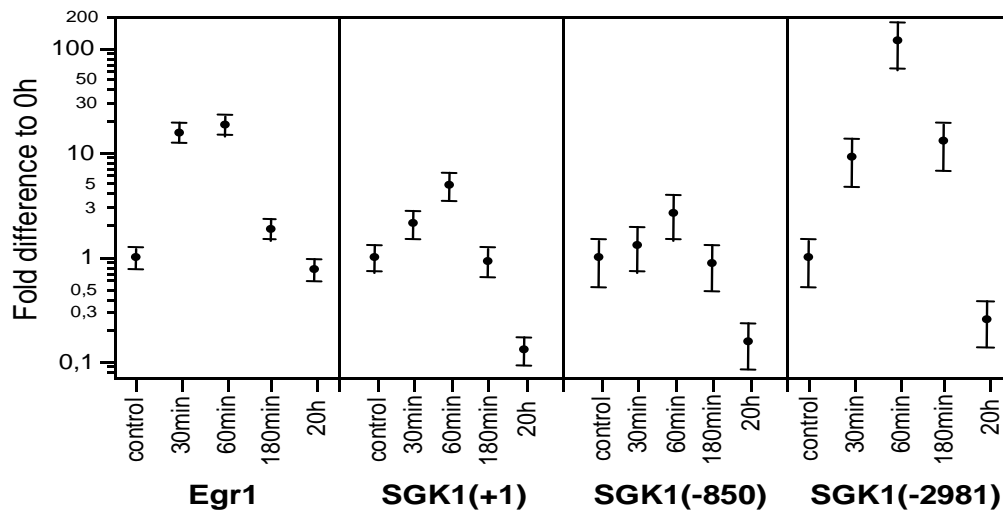


Abb. 27.b: Expression der 5'-Primer der SGK1 unter Kobaldchlorid-Stimulation in Myotuben im Vergleich zum 0h-Kontrollwert.

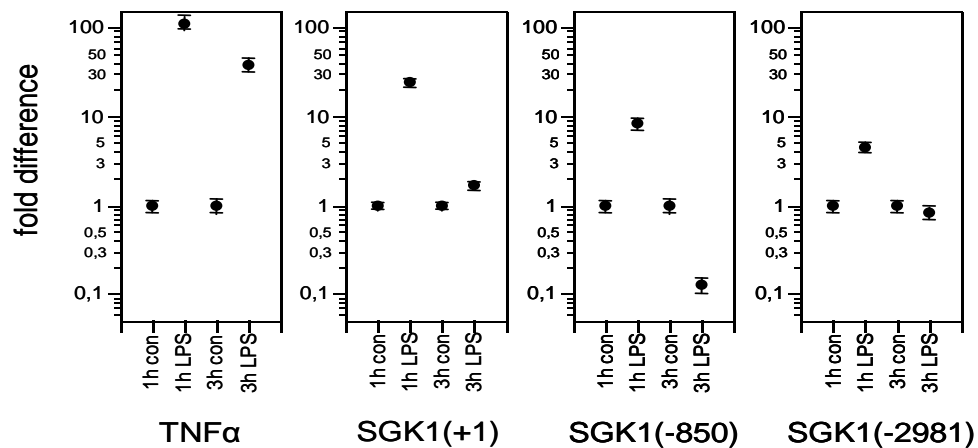


Abb. 28: Expression unter LPS-Stimulation der Positivkontrolle TNFα, sowie der SGK1-Varianten des 5'-Endes in logarithmisierte Darstellung im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollwerten.

Auch ließ sich eine deutlich höhere Expression dieser Varianten im klarzelligen Nierenkarzinom (4,1-fach [SGK1(+1)] bzw. 3,1-fach [SGK1(-850) höher]; s. Abb. 29.a) bzw. in hochmalignen humanen Gliomzellen (42-fach [SGK1(+1)], 26-fach [SGK1(-850)] bzw. 17-fach [SGK(-2981)] höher; s. Abb. 29.b) im Vergleich zu den normalen, organtypischen Geweben messen (Simon, Schneck, Hochstetter, Koutsouki, Mittelbronn, Merseburger, Weigert, Niess, & Lang 2007).

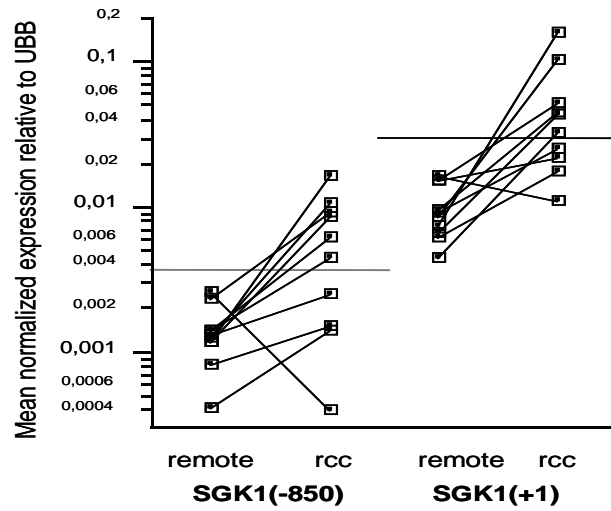


Abb. 29.a: Expressionsunterschiede der SGK1(-850) im Vergleich zur SGK1(+1) in klarzelligem Nierenzellkarzinom bzw. gesundem Gewebe, gemessen als Mean normalized Expression relativ zu dem Referenzgen ubiquitin B (UBB).

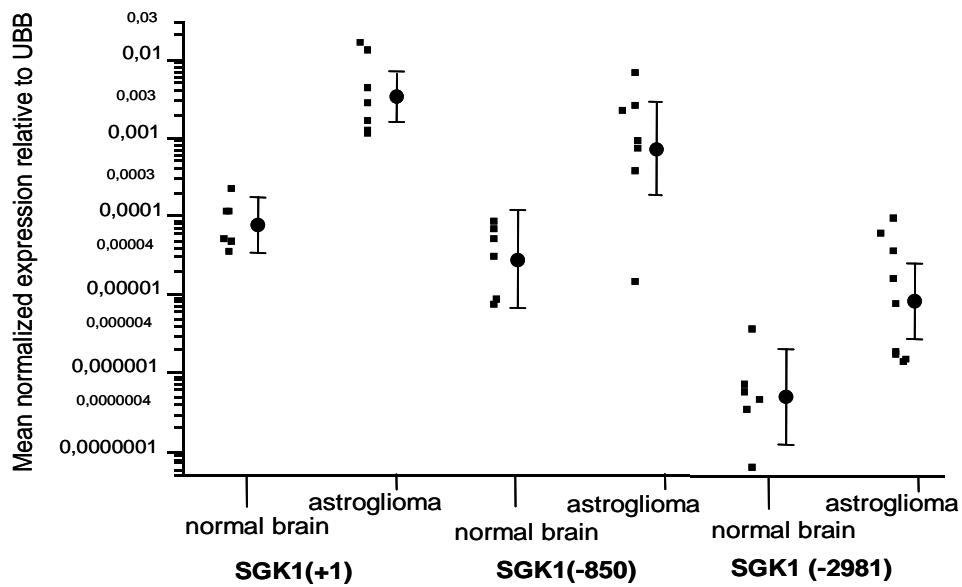


Abb. 29.b: Expressionsunterschiede der 5'-Primer der SGK1 [SGK1(+1), SGK1(-850) und SGK1(-2981) in Astrogliazellproben im Vergleich zu gesundem Gewebe, dargestellt als Mean normalized Expression relativ zu dem Referenzgen ubiquitin B (UBB).

4.5 subzelluläre Lokalisation & inverted repeats

Unsere Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der SGK1-Primer der 3'-Region zeigten uns, dass sich die SGK1-5' in beiden Zellkompartimenten erhöht wieder finden lässt, wobei vor allem der Zellkern im Vordergrund zu stehen scheint (Zytoplasma: 2,6-fach erhöht; Zellkern: 3,6-fach erhöht). Dagegen zeigte sich die SGK1 3'-UTR in beiden Kompartimenten nicht signifikant erhöht. Die lange SGK1-lv fand sich hierbei sehr deutlich, um den Faktor 12,4 im Zellkern erhöht (s. Abb. 27). Zu beachten gilt dabei, dass schon in Abhängigkeit des Stimulus die SGK1 in den verschiedenen Zellkompartimenten gefunden werden kann. So fanden Maiyar et al. die SGK1 nach Stimulation mit Serum eine überwiegend nukleäre Lokalisation der SGK1 (Maiyar, Leong, & Firestone 2003), unter Glukokortikoiden zeigte sich die SGK1 allerdings überwiegend im Zytoplasma (Buse, Tran, Luther, Phu, Aponte, & Firestone 1999).

Ein interessantes Erklärungsmodell für ein gehäuftes Vorkommen der SGK1-lv-Variante im Zellkern bietet uns die Arbeit von Prasnath et al. aus dem Jahre 2005. Wie schon unter 1.2.3. ausführlich beschrieben, stellen sie ein neues Modell des alternativen Splicings vor. Dabei wird eine längere mRNA (mRNA-lv) im Zellkern gespeichert und auf einem bestimmten Stimulus hin durch eine Endonuklease so gespalten, dass eine translationsfähige mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma ausgeschleust werden kann.

In der SGK1 3'-UTR lassen sich zwei einander zu 81% komplementäre Wiederholungssequenzen vom SINE-Typ (*short interspersed nuclear element*) finden (siehe Abb. 15). Pallindromsequenzen in diesem Bereich lassen auf eine Trunkierungsstelle der mRNA im Sinne der oben genannten Arbeit schließen. Durch Berechnungen der dreidimensionalen Struktur des SGK1-Gens mit Hilfe von *m-fold*, unter Berücksichtigung der energetisch günstigsten Zustände, zeigte sich die in Abb. 32 dargestellte Form. Die unprozessierte, lange Variante der SGK1-mRNA (SGK1-lv) zeichnet sich hierbei durch das Vorhandensein eines gestielten Ausläufers aus. Dieser kann an den Pallindrom-Sequenzen durch eine Endonuklease abgespalten werden. Dadurch entsteht eine kürzere Variante der SGK1-lv, die mit einem hoch konservierten 3'-UTR-Bereich endet und durch die Abspaltung aus dem Zellkern ausgeschleust werden kann (vgl. Abb. 31). Die Vorstellung ist dabei, dass der Zellkern als ein Speicherort für mRNAs dient, welche im Notfall schnell, ohne

vorherige Transkription, zur Verfügung stehen können und somit dem Charakter eines IEGs entsprechen würde. Dass diese Situation bei der SGK1-lv vorherrschen könnte, unterstützen zum einen die Untersuchungsergebnisse der *in silico*-Sequenzanalysen mit dem Vorfinden der *inverted repeats*, zum anderen aber auch die starke nukleäre Lokalisation dieser Variante.

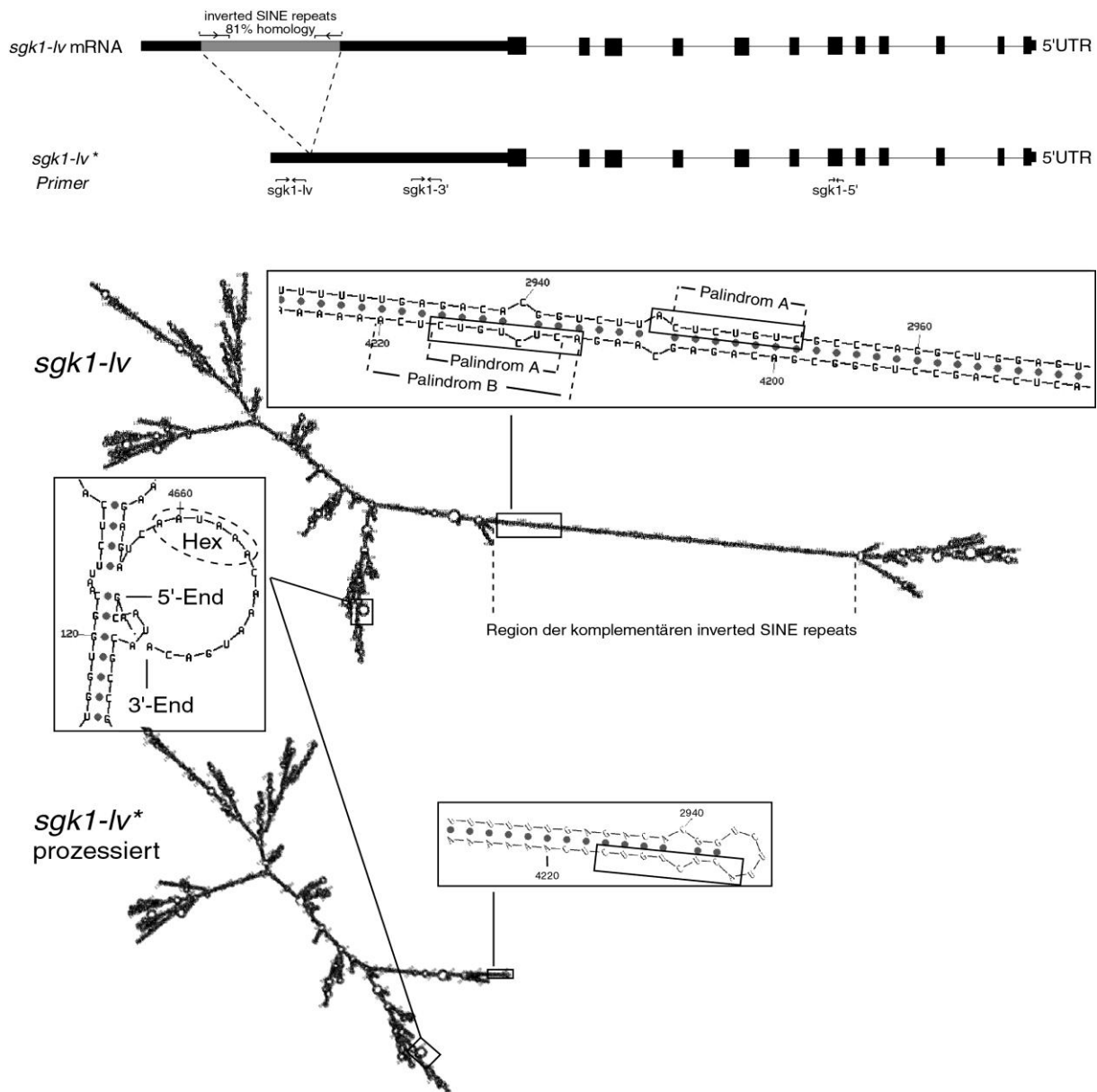


Abb. 30: Der obere Bildanteil stellt die gefundenen *inverted repeats*-Bereiche upstream der 3'-UTR der SGK1-mRNA dar (*sgk1-lv mRNA*). Darunter stellt sich die um eben diese Bereiche verkürzte mRNA dar (*sgk1-lv**), wobei zur Orientierung nochmals die in der Arbeit verwendeten Primer unterhalb der prozessierten Variante eingezeichnet sind. Im unteren Bildanteil sieht man die Ergebnisse der Berechnungen zur energetisch wahrscheinlichsten Form der *sgk1-lv*-mRNA unter Zuhilfenahme von *m-fold*. Die unprozessierte Form zeichnet sich durch einen gestielten Ausläufer in der 3'-UTR aus. Darunter *sgk1-lv* nach Trunkierung der repeat-Region (*sgk1-lv**).

In vergleichenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zu anderen IEGs, konnten wir diese Entdeckung auch in der α -Untereinheit des Hypoxie-induzierten Faktor 1 (Hif1 α) finden. Auch hier zeigten sich im 3'-UTR-Bereich inverted repeats vom SINE-Typ und eine überwiegend nukleäre Lokalisation der Hif1 α -lv (Dissertation Alexander Böhlinger, 2008).

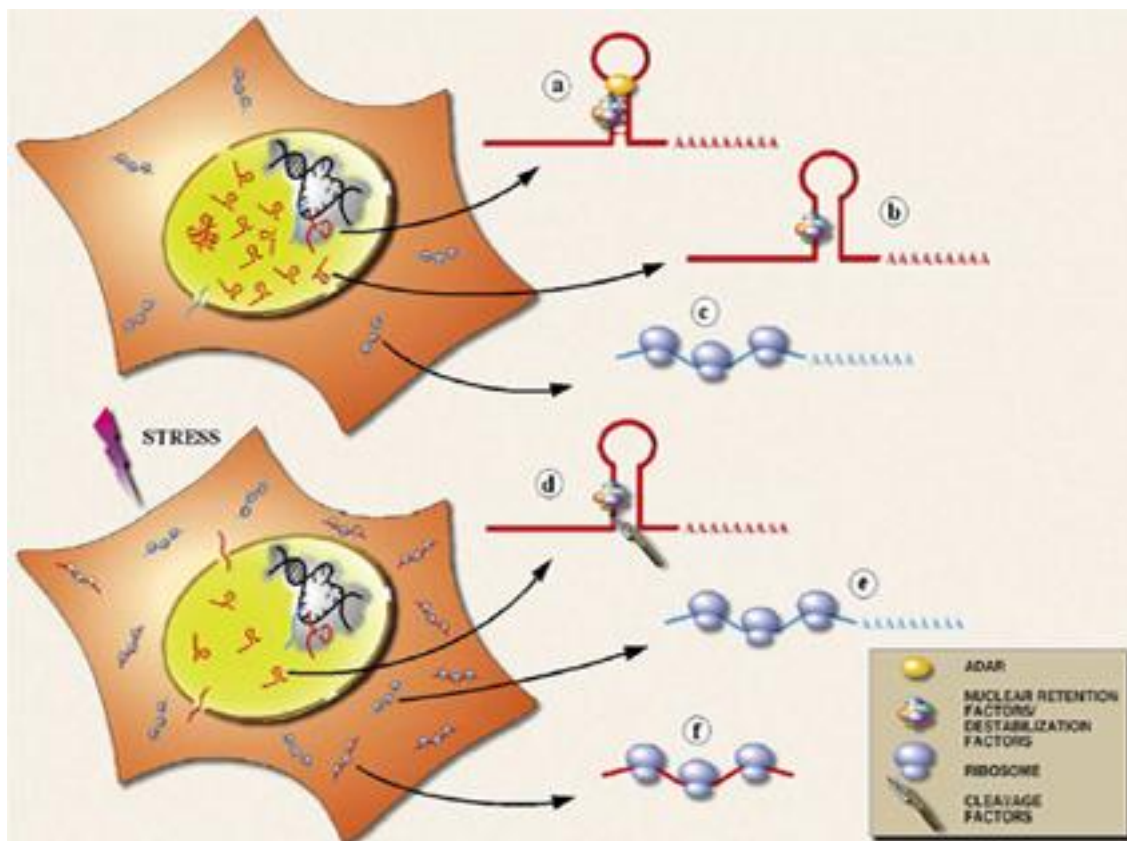


Abb. 31: Schaubild von Prasanth et al. (2005). Gezeigt werden zwei Zellmodelle. Das obere Zellmodell stellt die Situation ohne einen adäquaten Stressstimulus dar. a) stellt die Transkription der CTN-mRNA (mRNA-IV) dar. Die einen Loop ausbildende CTN-mRNA (rot, mit polyadenyliertem 3'Ende) wird im Zellkern zurückgehalten. b) verdeutlicht, dass der Loop im 3'UTR von CTN-mRNA stabilisiert erhalten bleibt. c) Es findet lediglich eine Translation von ausschließlich aus dem Zytoplasma stammender mCAT2-mRNA (hellblauer, polyadenylierter Strang wird von Ribosomen translatiert). Im unteren Zellmodell ist die stressinduzierte Prozession von CTN-mRNA gezeigt. d) durch Abspaltung des Loops wird die RNA in das Zytoplasma entlassen und dort der Translation zugeführt. e) stellt die auch unter Stress fortlaufende Translation von mCAT2-mRNA dar, wohingegen f) die dazukommende Translation der prozessierten und ins Zytoplasma entlassenen CTN-mRNA zeigt.

5 Zusammenfassung

Die SGK1 stellt eine Proteinkinase dar, welche eine wichtige Rolle im Rahmen der Zellhomöostase durch Aktivierung von Kalium-, Natrium- und Chloridkanälen spielt. Durch Phosphorylierung des NEDD4L kommt es zu seiner Inaktivierung woraufhin verschiedenste Ionenkanäle und Transporter wie ENaC, Kv1.3 oder EAAT1 aktiviert werden. Immer häufiger konnte ihre Bedeutung als Mediator des *cell survivals*, durch Phosphorylierung und Negativ-Regulation des proapoptotischen FOXO3A aufgezeigt werden. Weiter zeigte sich ihre Beteiligung an der neuronalen Erregungsübertragungen, sowie der zellulären Stressantwort. Auch unter hypertensiven Bedingungen und bei der diabetischen Nephropathie kann man hohe Aktivitätslevel finden.

In silico fanden wir in vergleichenden Untersuchungen zu anderen IEGs strukturelle Auffälligkeiten am 3'-Ende der SGK1-Referenzsequenz, die uns vermuten ließen, dass es möglicherweise ein alternatives 3'-Ende der SGK1-mRNA geben könnte. Durch eine Reihe von Zellkulturversuchen konnten wir die Existenz eines solchen ca. 1900bp downstream des offiziellen 3'-Endes vorkommenden Transkriptes nachweisen (SGK1-lv). Auch konnte gezeigt werden, dass es auf bestimmte Reize hin zu einer differenziellen Regulation dieses Transkriptes in Konkordanz mit Amplikons des 3'-UTR-Bereichs (SGK1 3'-UTR) und der *coding sequence* (cd) der Referenz-mRNA kommt. So zeigten sich unter Differenzierungsbedingungen im Laufe des Versuchs ein Expressionsabfall um den Faktor 0,25 für die SGK1-lv wohingegen es für die Variante der Referenz-mRNA (SGK1-5') zu einem Ansteigen der Werte kam. Dieses Verhalten konnte weiter auch unter einer Stimulation mit LPS gefunden werden (Abfall der SGK1-lv um den Faktor 0,48; Ansteigen der SGK1-5' um das 1,5-fache). Eine Kobaldchloridstimulation, sowie die Behandlung mit Noradrenalin alleine und in Kombination mit spezifischen α - bzw. β -Blockern hatte hingegen keine differenzielle Regulation zur Folge.

Weiter führten wir *in vitro* - Untersuchungen zur Abklärung der subzellulären Lokalisation der Amplikons durch. Während sich hier die Sequenzen des Referenz-mRNA-Bereichs (cds und 3'-UTR) nicht klar zytoplasmatisch bzw. nukleär lokalisieren lassen, zeigte sich das Ergebnis für die SGK1-lv klar nukleär um den Faktor 12 erhöht.

In vivo - Untersuchungen der SGK1 zu einer möglichen differenziellen Regulation unter Ausdauer-Laufbelastung bzw. Hypoxie erbrachte keine signifikanten Ergebnisse. Lediglich nach 3-wöchiger Einnahme von Antioxidazien kam es für das in der Referenzsequenz liegende Amplikon (SGK1-5') zu signifikant höheren Expressionswerten als in der Placebogruppe.

Eine klare Aussage zur Bedeutung des hier erstbeschriebenen im 3'UTR-Bereich längeren Transkriptes der SGK1-mRNA konnte in dieser Arbeit leider nicht getroffen werden. Auch ist das Vorliegen von SGK1-lv im Sinne einer antisense-mRNA wie zum Beispiel für den Transkriptionsfaktor Hif1 α beschrieben nach dem Stand unserer Versuche nicht ausgeschlossen. *In silico* Untersuchungen der *inverted repeats* im 3'-Bereich von SGK1-lv legen darüberhinaus die Ausbildung von Loop-Strukturen nahe, die nach neuen Erkenntnissen passend zu der nukleären Lokalisation der SGK1-lv sind. Ob diese Loop-Strukturen ähnlich wie die stark sequenzhomologen Loop-Strukturen der kürzlich beschriebenen Vorläufer mRNA der mCAT2 eine Zurückhaltung der mRNA im Zellkern und Ausschleusung auf einen bestimmten Reiz ermöglichen, wäre in Folgeuntersuchungen zu belegen.

6 Literaturverzeichnis

Alessio, H. M., Hagerman, A. E., Fulkerson, B. K., Ambrose, J., Rice, R. E., & Wiley, R. L. 2000, "Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise", *Med.Sci.Sports Exerc.*, vol. 32,no. 9, pp. 1576-1581.

Appenzeller, O., Minko, T., Qualls, C., Pozharov, V., Gamboa, J., Gamboa, A., & Wang, Y. 2006, "Gene expression, autonomic function and chronic hypoxia:lessons from the Andes", *Clin.Auton.Res.*, vol. 16,no. 3, pp. 217-222.

Arteaga, M. F., Wang, L., Ravid, T., Hochstrasser, M., & Canessa, C. M. 2006, "An amphipathic helix targets serum and glucocorticoid-induced kinase 1 to the endoplasmic reticulum-associated ubiquitin-conjugation machinery", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 103,no. 30, pp. 11178-11183.

Bailey, D. M. & Davies, B. 2001, "Acute mountain sickness; prophylactic benefits of antioxidant vitamin supplementation at high altitude", *High Alt.Med.Biol.*, vol. 2,no. 1, pp. 21-29.

Bickel, C. S., Slade, J. M., Haddad, F., Adams, G. R., & Dudley, G. A. 2003, "Acute molecular responses of skeletal muscle to resistance exercise in able-bodied and spinal cord-injured subjects", *J.Appl.Physiol*, vol. 94,no. 6, pp. 2255-2262.

Bogusz, A. M., Brickley, D. R., Pew, T., & Conzen, S. D. 2006, "A novel N-terminal hydrophobic motif mediates constitutive degradation of s", *FEBS J.*, vol. 273,no. 13, pp. 2913-2928.

Brooks, G. A. 1998, "Mammalian fuel utilization during sustained exercise", *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.*, vol. 120,no. 1, pp. 89-107.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. 1999, "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor", *Cell*, vol. 96,no. 6, pp. 857-868.

Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., & Greenberg, M. E. 2001, "Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a)", *Mol.Cell Biol.*, vol. 21,no. 3, pp. 952-965.

Buse, P., Tran, S. H., Luther, E., Phu, P. T., Aponte, G. W., & Firestone, G. L. 1999, "Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the s", *J.Biol.Chem.*, vol. 274,no. 11, pp. 7253-7263.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., & Keshert, E. 1998, "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis", *Nature*, vol. 394,no. 6692, pp. 485-490.

- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., Sementchenko, V., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Ganesh, M., Ghosh, S., Bell, I., Gerhard, D. S., & Gingeras, T. R. 2005, "Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution", *Science*, vol. 308,no. 5725, pp. 1149-1154.
- Chun, Y. S., Choi, E., Kim, T. Y., Kim, M. S., & Park, J. W. 2002, "A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1alpha gene", *Biochem.J.*, vol. 362,no. Pt 1, pp. 71-79.
- Claverie, J. M. 2005, "Fewer genes, more noncoding RNA", *Science*, vol. 309,no. 5740, pp. 1529-1530.
- Connett, R. J., Gayeski, T. E., & Honig, C. R. 1984, "Lactate accumulation in fully aerobic, working, dog gracilis muscle", *Am.J.Physiol*, vol. 246,no. 1 Pt 2, p. H120-H128.
- Connolly, P. H., Caiozzo, V. J., Zaldivar, F., Nemet, D., Larson, J., Hung, S. P., Heck, J. D., Hatfield, G. W., & Cooper, D. M. 2004, "Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells", *J.Appl.Physiol*, vol. 97,no. 4, pp. 1461-1469.
- Davison, G. & Gleeson, M. 2006, "The effect of 2 weeks vitamin C supplementation on immunoendocrine responses to 2.5 h cycling exercise in man", *Eur.J.Appl.Physiol*.
- De Feo, P., Di Loreto, C., Lucidi, P., Murdolo, G., Parlanti, N., De Cicco, A., Piccioni, F., & Santeusano, F. 2003, "Metabolic response to exercise", *J.Endocrinol.Invest*, vol. 26,no. 9, pp. 851-854.
- de Waal, M. R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., & de Vries, J. E. 1991, "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes", *J.Exp.Med.*, vol. 174,no. 5, pp. 1209-1220.
- DeRijk, R. H., Boelen, A., Tilders, F. J., & Berkenbosch, F. 1994, "Induction of plasma interleukin-6 by circulating adrenaline in the rat", *Psychoneuroendocrinology*, vol. 19,no. 2, pp. 155-163.
- Duntas, L. H. 2005, "Oxidants, antioxidants in physical exercise and relation to thyroid function", *Horm.Metab Res.*, vol. 37,no. 9, pp. 572-576.
- Dunzendorfer, S., Lee, H. K., Soldau, K., & Tobias, P. S. 2004, "TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor", *J.Immunol.*, vol. 173,no. 2, pp. 1166-1170.
- Elley, R., Bagrie, E., & Arroll, B. 2006, "Do snacks of exercise lower blood pressure? A randomised crossover trial", *N.Z.Med.J.*, vol. 119,no. 1235, p. U1996.
- Embark, H. M., Bohmer, C., Vallon, V., Luft, F., & Lang, F. 2003, "Regulation of KCNE1-dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms", *Pflugers Arch.*, vol. 445,no. 5, pp. 601-606.

Engelsberg, A., Kobelt, F., & Kuhl, D. 2006, "The N-terminus of the s", *Biochem.J.*, vol. 399,no. 1, pp. 69-76.

Firestone, G. L., Giampaolo, J. R., & O'Keeffe, B. A. 2003, "Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity", *Cell Physiol Biochem.*, vol. 13,no. 1, pp. 1-12.

Fluck, M. & Hoppeler, H. 2003, "Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function", *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.*, vol. 146, pp. 159-216.

Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y. D., Ellis, L. M., & Semenza, G. L. 2002, "Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells", *J.Biol.Chem.*, vol. 277,no. 41, pp. 38205-38211.

Gamboa, A., Gamboa, J. L., Holmes, C., Sharabi, Y., Leon-Velarde, F., Fischman, G. J., Appenzeller, O., & Goldstein, D. S. 2006, "Plasma catecholamines and blood volume in native Andeans during hypoxia and normoxia", *Clin.Auton.Res.*, vol. 16,no. 1, pp. 40-45.

Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. 1987, "CpG islands in vertebrate genomes", *J.Mol.Biol.*, vol. 196,no. 2, pp. 261-282.

Godfrey, R. J., Madgwick, Z., & Whyte, G. P. 2003, "The exercise-induced growth hormone response in athletes", *Sports Med.*, vol. 33,no. 8, pp. 599-613.

Goldspink, G. 2005, "Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation", *Physiology.(Bethesda.)*, vol. 20, pp. 232-238.

Gothie, E., Richard, D. E., Berra, E., Pages, G., & Pouyssegur, J. 2000, "Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha", *J.Biol.Chem.*, vol. 275,no. 10, pp. 6922-6927.

Hagobian, T. A., Jacobs, K. A., Subudhi, A. W., Fattor, J. A., Rock, P. B., Muza, S. R., Fulco, C. S., Braun, B., Grediagin, A., Mazzeo, R. S., Cymerman, A., & Friedlander, A. L. 2006, "Cytokine responses at high altitude: effects of exercise and antioxidants at 4300 m", *Med.Sci.Sports Exerc.*, vol. 38,no. 2, pp. 276-285.

Hambleton, J., Weinstein, S. L., Lem, L., & DeFranco, A. L. 1996, "Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 93,no. 7, pp. 2774-2778.

Hambrecht, R. 2004, "[Sports as therapy]", *Herz*, vol. 29,no. 4, pp. 381-390.

Hambrecht, R., Walther, C., Mobius-Winkler, S., Gielen, S., Linke, A., Conradi, K., Erbs, S., Kluge, R., Kendziorra, K., Sabri, O., Sick, P., & Schuler, G. 2004, "Percutaneous coronary angioplasty compared

with exercise training in patients with stable coronary artery disease: a randomized trial", *Circulation*, vol. 109,no. 11, pp. 1371-1378.

Jelkmann, W. 2003, "Erythropoietin", *J.Endocrinol.Invest*, vol. 26,no. 9, pp. 832-837.

Jurka, J. 2000, "Rebase update: a database and an electronic journal of repetitive elements", *Trends Genet.*, vol. 16,no. 9, pp. 418-420.

Karolchik, D., Baertsch, R., Diekhans, M., Furey, T. S., Hinrichs, A., Lu, Y. T., Roskin, K. M., Schwartz, M., Sugnet, C. W., Thomas, D. J., Weber, R. J., Haussler, D., & Kent, W. J. 2003, "The UCSC Genome Browser Database", *Nucleic Acids Res.*, vol. 31,no. 1, pp. 51-54.

Kellner, M., Peiter, A., Hafner, M., Feuring, M., Christ, M., Wehling, M., Falkenstein, E., & Losel, R. 2003, "Early aldosterone up-regulated genes: new pathways for renal disease?", *Kidney Int.*, vol. 64,no. 4, pp. 1199-1207.

Kent, W. J. 2002, "BLAT--the BLAST-like alignment tool", *Genome Res.*, vol. 12,no. 4, pp. 656-664.

Kent, W. J., Baertsch, R., Hinrichs, A., Miller, W., & Haussler, D. 2003, "Evolution's cauldron: duplication, deletion, and rearrangement in the mouse and human genomes", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 100,no. 20, pp. 11484-11489.

Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, D. 2002, "The human genome browser at UCSC", *Genome Res.*, vol. 12,no. 6, pp. 996-1006.

Kobayashi, T. & Cohen, P. 1999, "Activation of s", *Biochem.J.*, vol. 339 (Pt 2), pp. 319-328.

Konig, D., Wagner, K. H., Elmadfa, I., & Berg, A. 2001, "Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress", *Exerc.Immunol.Rev.*, vol. 7, pp. 108-133.

Koulmann, N. & Bigard, A. X. 2006, "Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise", *Pflugers Arch.* pp. 1-15.

Kraemer, W. J. & Ratamess, N. A. 2005, "Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training", *Sports Med.* , vol. 35,no. 4, pp. 339-361.

Krappmann, D., Wegener, E., Sunami, Y., Esen, M., Thiel, A., Mordmuller, B., & Scheidereit, C. 2004, "The I κ B kinase complex and NF- κ B act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1", *Mol.Cell Biol.*, vol. 24,no. 14, pp. 6488-6500.

Kratz, A., Wood, M. J., Siegel, A. J., Hiers, J. R., & Van Cott, E. M. 2006, "Effects of marathon running on platelet activation markers : direct evidence for in vivo platelet activation", *Am.J.Clin.Pathol.*, vol. 125,no. 2, pp. 296-300.

- Lang, F., Henke, G., Embark, H. M., Waldegger, S., Palmada, M., Bohmer, C., & Vallon, V. 2003, "Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase - implications for transport, excitability and cell proliferation", *Cell Physiol Biochem.*, vol. 13,no. 1, pp. 41-50.
- Lauzier, M. C., Page, E. L., Michaud, M. D., & Richard, D. E. 2007, "Differential regulation of hypoxia-inducible factor-1 through receptor tyrosine kinase transactivation in vascular smooth muscle cells", *Endocrinology*, vol. 148,no. 8, pp. 4023-4031.
- Law, R. J., Allchin, C. R., & Morris, R. J. 1995, "Uptake of organochlorines (chlorobiphenyls, dieldrin, total pcb and ddt) in bottle-nosed dolphins (*tursiops-truncatus*) from Cardigan Bay, west Wales", *Chemosphere*, vol. 30, pp. 547-560.
- Leach, R. M. & Treacher, D. F. 1998, "Oxygen transport-2. Tissue hypoxia", *BMJ*, vol. 317,no. 7169, pp. 1370-1373.
- Leong, M. L., Maiyar, A. C., Kim, B., O'Keeffe, B. A., & Firestone, G. L. 2003, "Expression of the s", *J.Biol.Chem.*, vol. 278,no. 8, pp. 5871-5882.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. 2005, "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets", *Cell*, vol. 120,no. 1, pp. 15-20.
- Liu, M. K., Herrera-Velitz, P., Brownsey, R. W., & Reiner, N. E. 1994, "CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide", *J.Immunol.*, vol. 153,no. 6, pp. 2642-2652.
- Long, K. D. & Salbaum, J. M. 1998, "Evolutionary conservation of the immediate-early gene ZENK", *Mol.Biol.Evol.*, vol. 15,no. 3, pp. 284-292.
- Lu, N., Zhou, H., Lin, Y. H., Chen, Z. Q., Pan, Y., & Li, X. J. 2007, "Oxidative stress mediates CoCl₂-induced prostate tumour cell adhesion: role of protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase", *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.*, vol. 101,no. 1, pp. 41-46.
- Luger, A., Deuster, P. A., Debolt, J. E., Loriaux, D. L., & Chrousos, G. P. 1988, "Acute exercise stimulates the renin-angiotensin-aldosterone axis: adaptive changes in runners", *Horm.Res.*, vol. 30,no. 1, pp. 5-9.
- Lukashev, D., Caldwell, C., Ohta, A., Chen, P., & Sitkovsky, M. 2001, "Differential regulation of two alternatively spliced isoforms of hypoxia-inducible factor-1 alpha in activated T lymphocytes", *J.Biol.Chem.*, vol. 276,no. 52, pp. 48754-48763.
- Maimoun, L., Lumbroso, S., Manetta, J., Paris, F., Leroux, J. L., & Sultan, C. 2003, "Testosterone is significantly reduced in endurance athletes without impact on bone mineral density", *Horm.Res.*, vol. 59,no. 6, pp. 285-292.
- Maiyar, A. C., Leong, M. L., & Firestone, G. L. 2003, "Importin-alpha mediates the regulated nuclear

targeting of s", *Mol.Biol.Cell*, vol. 14,no. 3, pp. 1221-1239.

Mastorakos, G. & Pavlatou, M. 2005, "Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes", *Horm.Metab Res.*, vol. 37,no. 9, pp. 577-584.

Matsakas, A., Friedel, A., Hertrampf, T., & Diel, P. 2005, "Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat", *Acta Physiol Scand.*, vol. 183,no. 3, pp. 299-307.

McCullagh, K. J., Calabria, E., Pallafacchina, G., Ciciliot, S., Serrano, A. L., Argentini, C., Kalhovde, J. M., Lomo, T., & Schiaffino, S. 2004, "NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 101,no. 29, pp. 10590-10595.

Michiels, C., Arnould, T., & Remacle, J. 2000, "Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1497,no. 1, pp. 1-10.

Mortensen, O. H., Frandsen, L., Schjerling, P., Nishimura, E., & Grunnet, N. 2006, "PGC-1{alpha} and PGC-1{beta} have both similar and distinct effects upon myofiber switching towards an oxidative phenotype", *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.*

Nielsen, H. G., Hagberg, I. A., & Lyberg, T. 2004, "Marathon running leads to partial exhaustion of ROS-generating capacity in leukocytes", *Med.Sci.Sports Exerc.*, vol. 36,no. 1, pp. 68-73.

Niess, A. M., Dickhuth, H. H., Northoff, H., & Fehrenbach, E. 1999, "Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects", *Exerc.Immunol.Rev.*, vol. 5, pp. 22-56.

Niess, A. M., Fehrenbach, E., Lorenz, I., Muller, A., Northoff, H., Dickhuth, H. H., & Schneider, E. M. 2004, "Antioxidant intervention does not affect the response of plasma erythropoietin to short-term normobaric hypoxia in humans", *J.Appl.Physiol*, vol. 96,no. 3, pp. 1231-1235.

Page, E. L., Robitaille, G. A., Pouyssegur, J., & Richard, D. E. 2002, "Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms", *J.Biol.Chem.*, vol. 277,no. 50, pp. 48403-48409.

Papanicolaou, D. A., Petrides, J. S., Tsigos, C., Bina, S., Kalogeras, K. T., Wilder, R., Gold, P. W., Deuster, P. A., & Chrousos, G. P. 1996, "Exercise stimulates interleukin-6 secretion: inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines", *Am.J.Physiol*, vol. 271,no. 3 Pt 1, p. E601-E605.

Park, J., Leong, M. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L., & Hemmings, B. A. 1999, "Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway", *EMBO J.*, vol. 18,no. 11, pp. 3024-3033.

Pearce, D. 2001, "The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport", *Trends Endocrinol.Metab*, vol. 12,no. 8, pp. 341-347.

- Pearce, D. 2003, "SGK1 regulation of epithelial sodium transport", *Cell Physiol Biochem.*, vol. 13,no. 1, pp. 13-20.
- Pedersen, B. K. & Hoffman-Goetz, L. 2000, "Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation", *Physiol Rev.*, vol. 80,no. 3, pp. 1055-1081.
- Pedersen, B. K. & Steensberg, A. 2002, "Exercise and hypoxia: effects on leukocytes and interleukin-6-shared mechanisms?", *Med.Sci.Sports Exerc.*, vol. 34,no. 12, pp. 2004-2013.
- Pedersen, B. K. & Toft, A. D. 2000, "Effects of exercise on lymphocytes and cytokines", *Br.J.Sports Med.*, vol. 34,no. 4, pp. 246-251.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. 2002, "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR", *Nucleic Acids Res.*, vol. 30,no. 9, p. e36.
- Pialoux, V., Mounier, R., Ponsot, E., Rock, E., Mazur, A., Dufour, S., Richard, R., Richalet, J. P., Coudert, J., & Fellmann, N. 2006, "Effects of exercise and training in hypoxia on antioxidant/pro-oxidant balance", *Eur.J.Clin.Nutr.*
- Powers, S. K. & Lennon, S. L. 1999, "Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle", *Proc.Nutr.Soc.*, vol. 58,no. 4, pp. 1025-1033.
- Prasanth, K. V., Prasanth, S. G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S. M., Bennett, C. F., Zhang, M. Q., & Spector, D. L. 2005, "Regulating gene expression through RNA nuclear retention", *Cell*, vol. 123,no. 2, pp. 249-263.
- Pyne, D. B. 1994, "Regulation of neutrophil function during exercise", *Sports Med.*, vol. 17,no. 4, pp. 245-258.
- Qiao, L., Zhang, H., Yu, J., Francisco, R., Dent, P., Ebert, M. P., Rocken, C., & Farrell, G. 2006, "Constitutive activation of NF-kappaB in human hepatocellular carcinoma: evidence of a cytoprotective role", *Hum.Gene Ther.*, vol. 17,no. 3, pp. 280-290.
- Ramel, A., Wagner, K. H., & Elmadfa, I. 2004, "Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men", *Br.J.Sports Med.*, vol. 38,no. 5, p. E22.
- Reimann, T., Buscher, D., Hipskind, R. A., Krautwald, S., Lohmann-Matthes, M. L., & Baccarini, M. 1994, "Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway. A putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1 beta and the TNF-alpha genes", *J.Immunol.*, vol. 153,no. 12, pp. 5740-5749.
- Sakamoto, K. & Goodyear, L. J. 2002, "Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle", *J.Appl.Physiol*, vol. 93,no. 1, pp. 369-383.

- Schoenebeck, B., Bader, V., Zhu, X. R., Schmitz, B., Lubbert, H., & Stichel, C. C. 2005, "Sgk1, a cell survival response in neurodegenerative diseases", *Mol.Cell Neurosci.*, vol. 30,no. 2, pp. 249-264.
- Schwartz, S., Kent, W. J., Smit, A., Zhang, Z., Baertsch, R., Hardison, R. C., Haussler, D., & Miller, W. 2003, "Human-mouse alignments with BLASTZ", *Genome Res.*, vol. 13,no. 1, pp. 103-107.
- Shanmugam, I., Cheng, G., Terranova, P. F., Thrasher, J. B., Thomas, C. P., & Li, B. 2007, "Serum/glucocorticoid-induced protein kinase-1 facilitates androgen receptor-dependent cell survival", *Cell Death.Differ.*, vol. 14,no. 12, pp. 2085-2094.
- Simon, P. 2003, "Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data", *Bioinformatics.*, vol. 19,no. 11, pp. 1439-1440.
- Simon, P., Schneck, M., Hochstetter, T., Koutsouki, E., Mittelbronn, M., Merseburger, A., Weigert, C., Niess, A., & Lang, F. 2007, "Differential regulation of s", *Cell Physiol Biochem.*, vol. 20,no. 6, pp. 715-728.
- Simon, P., Schott, K., Williams, R. W., & Schaeffel, F. 2004, "Posttranscriptional regulation of the immediate-early gene EGR1 by light in the mouse retina", *Eur.J.Neurosci.*, vol. 20,no. 12, pp. 3371-3377.
- Stockand, J. D. 2005, "Preserving salt: in vivo studies with Sgk1-deficient mice define a modern role for this ancient protein", *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, vol. 288,no. 1, p. R1-R3.
- Subudhi, A. W., Jacobs, K. A., Hagobian, T. A., Fattor, J. A., Fulco, C. S., Muza, S. R., Rock, P. B., Hoffman, A. R., Cymerman, A., & Friedlander, A. L. 2004, "Antioxidant supplementation does not attenuate oxidative stress at high altitude", *Aviat.Space Environ.Med.*, vol. 75,no. 10, pp. 881-888.
- Tagarakis, C. V., Bloch, W., Hartmann, G., Hollmann, W., & Addicks, K. 2000, "Anabolic steroids impair the exercise-induced growth of the cardiac capillary bed", *Int.J.Sports Med.*, vol. 21,no. 6, pp. 412-418.
- Thrash-Bingham, C. A. & Tartof, K. D. 1999, "aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia", *J.Natl.Cancer Inst.*, vol. 91,no. 2, pp. 143-151.
- Tidball, J. G. 2005, "Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation", *J.Appl.Physiol*, vol. 98,no. 5, pp. 1900-1908.
- Turpaev, K. T. 2002, "Reactive oxygen species and regulation of gene expression", *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 67,no. 3, pp. 281-292.
- Vallon, V., Wulff, P., Huang, D. Y., Loffing, J., Volkl, H., Kuhl, D., & Lang, F. 2005, "Role of Sgk1 in salt and potassium homeostasis", *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, vol. 288,no. 1, pp. R4-10.
- Vij, A. G., Dutta, R., & Satija, N. K. 2005, "Acclimatization to oxidative stress at high altitude", *High*

Alt.Med.Biol., vol. 6,no. 4, pp. 301-310.

Waerntges, S., Klingel, K., Weigert, C., Fillon, S., Buck, M., Schleicher, E., Rodemann, H. P., Knabbe, C., Kandolf, R., & Lang, F. 2002, "Excessive transcription of the human serum and glucocorticoid dependent kinase hSGK1 in lung fibrosis", *Cell Physiol Biochem.*, vol. 12,no. 2-3, pp. 135-142.

Webster, M. K., Goya, L., & Firestone, G. L. 1993, "Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase", *J.Biol.Chem.*, vol. 268,no. 16, pp. 11482-11485.

Wenger, R. H. & Gassmann, M. 1997, "Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1", *Biol.Chem.*, vol. 378,no. 7, pp. 609-616.

Witt, E. H., Reznick, A. Z., Viguie, C. A., Starke-Reed, P., & Packer, L. 1992, "Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation", *J.Nutr.*, vol. 122,no. 3 Suppl, pp. 766-773.

Ye, K. 2005, "PIKE/nuclear PI 3-kinase signaling in preventing programmed cell death", *J.Cell Biochem.*, vol. 96,no. 3, pp. 463-472.

Yokoyama, H., Emoto, M., Fujiwara, S., Motoyama, K., Morioka, T., Koyama, H., Shoji, T., Inaba, M., & Nishizawa, Y. 2004, "Short-term aerobic exercise improves arterial stiffness in type 2 diabetes", *Diabetes Res.Clin.Pract.*, vol. 65,no. 2, pp. 85-93.

You, H., Jang, Y., You, T., Okada, H., Liepa, J., Wakeham, A., Zaugg, K., & Mak, T. W. 2004, "p53-dependent inhibition of FKHL1 in response to DNA damage through protein kinase SGK1", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 101,no. 39, pp. 14057-14062.

Zecevic, M., Heitzmann, D., Camargo, S. M., & Verrey, F. 2004, "SGK1 increases Na,K-ATP cell-surface expression and function in *Xenopus laevis* oocytes", *Pflugers Arch.*, vol. 448,no. 1, pp. 29-35.

Zetser, A., Gredinger, E., & Bengal, E. 1999, "p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor", *J.Biol.Chem.*, vol. 274,no. 8, pp. 5193-5200.

Zhang, L., Cui, R., Cheng, X., & Du, J. 2005, "Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I κ B kinase", *Cancer Res.*, vol. 65,no. 2, pp. 457-464.

Zhu, W., Downey, J. S., Gu, J., Di Padova, F., Gram, H., & Han, J. 2000, "Regulation of TNF expression by multiple mitogen-activated protein kinase pathways", *J.Immunol.*, vol. 164,no. 12, pp. 6349-6358.

Zou, H., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., Fogarty, K. E., & Singer, J. J. 2002, "Visualization of Ca²⁺ entry through single stretch-activated cation channels", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 99,no. 9, pp. 6404-6409.

7 Abkürzungsverzeichnis

AMP / ADP / ATP.....	Adenosin-Mono- / Di- / Triphosphat
AMPK.....	AMP-abhängige Kinase
AMS.....	acute mountain sickness, akute Bergkrankheit
Akt.....	Proteinkinase B
Bp.....	Basenpaare
CSF.....	colony stimulating factor
Ca ²⁺	Kalzium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CaMK.....	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CHF.....	chronic heart failure
CFTR.....	cystic fibrosis transmembrane regulator
Cl ⁻	Chlorid
cDNA.....	complementary DNA
CT-Werte.....	cycle threshold values
CPE.....	zytoplasmatisches Polyadenylierungselement
CoCl ₂	Kobaltchlorid
CI.....	Konfidenzintervall
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DHPG.....	Dihydroxyphenylglycerol
DAG.....	directed acyclic graphs
EPO.....	Erythropoietin
EMS.....	Elektromyostimulation
EGR1.....	early growth response gene
ENaC.....	epithelialer Natriumkanal
ERK.....	extracellular signal-regulated kinase
EST.....	expressed sequence tag
FKHRL1.....	forkhead transcription factor 1 = FOXO3a
GLUT.....	Glukosetransporter
GTP.....	Guanosintriphosphat
GO.....	GeneOntology
GAPDH.....	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCLM.....	Glutamat-Cystein-Ligase, γ -Glutamylcystein Synthetase
HIF1.....	hypoxia inducible factor 1
HRE.....	hypoxia response element
hnRNA.....	heteronukleäre RNA
HWZ.....	Halbwertszeit
HEX.....	Polyadenylierungs-Hexanukleotid

IGF.....	insulin like growth factor
IL.....	Interleukine
IRS.....	insulin response substrate
IEG.....	immediate early gene
JNK.....	c-Jun N-terminal kinase
K ⁺	Kalium
KHK.....	Koronare Herzkrankheit
LPS.....	Lipopolysaccharid
MIP-1.....	Monozyten chemotaktisches Protein-1
MEF.....	myocyte enhancing factor
mTFA.....	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
MHC.....	myosin heavy chain
MGF.....	machano growth factor (= IGF-IEc)
MAPK.....	mitogen activated protein kinase
mTOR.....	mammalian target of rapamycin
mRNA.....	messenger RNA
mCAT2.....	mouse cationic amino acid transporter 2
MNE.....	mean normalized expression
NK-Zellen.....	non-killer Zellen
Na ⁺	Natrium
NFAT.....	nuclear factor of activated T-cells
NRF.....	nuclear respiratory factor
NMDA.....	N-Methyl-D-Aspartat
NLS.....	nukleäres Lokalisierungssignal
NaCl.....	Natriumchlorid
NF-κB.....	nukleärer Transkriptionsfaktor κB
NA.....	Noradrenalin
ODDD.....	oxygen dependent degradation domain
PBMC.....	periphere mononukleäre Blutzellen
PDGF.....	platlet derived growth factor
PKC.....	Proteinkinase C
PGC-1.....	peroxysome proliferator-activated-receptor co-activator 1
PI3K.....	Phyosphitydyl-Inositol 3 Kinase
PTCA.....	perkutane transluminale coronare Angioplastie
PDK1.....	Phosphoinositid abhängige Kinase 1
PCR.....	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
Phen.....	Phentolamin
Prop.....	Propanolol
RAAS.....	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS.....	reactive oxygen species
RNS.....	reactive nitric species

RNA.....	ribonucleotid acid, Ribonukleinsäure
ROMK1.....	renal outer medullary K ⁺ -channel
Rpm.....	rounds per minute
RT.....	reverse transcriptase
3'-RACE.....	3'-rapid amplification of cDNA ends
SGK1.....	Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase
SINE.....	short interspersed nuclear elements
TNF α	Tumor-Nekrose Faktor α
TAS.....	totaler antioxidativer Status
TAD.....	Transaktivierungsdomäne
TLR-4.....	toll like receptor 4
UTR.....	untranslated region
VEGF.....	vascular endothelial growth factor

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung die Bearbeitung und Fertigstellung dieser Dissertation nicht vorstellbar gewesen wäre.

An erster Stelle ist hier Hr. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Perikles Simon zu nennen, ohne dessen großes Engagement sowie seine herausragende fachliche und persönliche Betreuung die Durchführung dieser Arbeit nahezu unmöglich gewesen wäre.

Vielen Dank an Hr. Prof. Dr. A. Nieß für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung von Material und Räumlichkeiten.

Ebenfalls geht mein Dank an meine drei Mitdoktoranden: Annette Blösch, David Callau und Alexander Böhringer. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung!

Herzlich danken möchte ich an dieser Stelle auch den medizinisch-technischen Assistentinnen der Sportmedizin Tübingen, insb. Lenka Stockinger, welche uns in unserer Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite standen sowie der Arbeitsgruppe um Fr. Dr. rer. nat. E. Fehrenbach für die freundliche Bereitstellung unsäglicher Blutproben.

Nicht zu vergessen geht ein großes Dankeschön an all die Probanden und Athleten, welche sich für unsere Studienzwecke zur Verfügung gestellt haben.

Zu guter Letzt, jedoch keinesfalls zu verachten, möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während dieser Dissertation sowie meiner gesamten Ausbildung bedanken. Jeder von euch hat auf seine Weise dazu beigetragen, dass ich nun am vorläufigen Ende eines weiteren, aufregenden Kapitels meines Lebens stehe!