

Aus der
Klinik für Allgemeine Innere Medizin
(Direktor: Prof. Dr. Ulrich R. Fölsch)
Forschungsgruppe Molekulare Gastroenterologie
(Leiter: PD Dr. rer. nat. Heiner Schäfer)
der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**„Funktionelle Charakterisierung des p53-Zielgens IEX-1
durch ribozymvermittelte Inhibition der Genexpression“**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Diplom Biologe Olaf Grobe
aus Kiel

Kiel 2001

Referent/in: Herr Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Schulz
Koreferent/in: Herr PD Dr. rer. nat. Guido Krupp
Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2001
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 25.07.2001

Der Dekan

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Einführung in die Thematik	1
1.2	IEX-1 und seine Homologe in Maus und Ratte	4
1.2.1	Entdeckung von IEX-1/Dif-2, gly96 und p22/PRG1	4
1.2.2	Aufbau des IEX-1/Dif-2-Gens exklusive der Promotorsequenz und Vergleich mit gly96 und p22/PRG1	5
1.2.3	Induzierbarkeit von IEX-1/Dif-2, p22/PRG1 und gly96 durch Wachstumsfaktoren	6
1.2.4	IEX-1 und seine Homologe sind p53- und NFκB-Zielgene	6
1.3	Ribozyme – Effiziente Werkzeuge zur Unterbindung der Genexpression	9
1.3.1	Die verschiedenen Gruppen katalytisch aktiver RNAs	9
1.3.2	<i>Hammerhead</i> -Ribozyme	11
1.4	Ziel der Arbeit	14
<u>2</u>	<u>Methoden</u>	15
2.1	Material	15
2.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Nukleinsäuren	15
2.1.2	Zellkultur	15
2.1.2.1	TOP10F ⁺ E. coli	15
2.1.2.2	T-REx TM -293-Zellen	15
2.1.3	Antikörper	16
2.1.4	Nukleinsäure- und Proteinstandards	16

2.1.5 Enzyme und Kits	16
2.1.6 Primer und Oligonukleotide	
2.1.7 Reagenzien für den Apoptose-Assay und die Zellzyklusanalyse	18
2.1.8 Geräte und sonstige Materialien	18
2.1.9 Puffer und Lösungen	19
2.1.9.1 Puffer und Lösungen für die Elektrophorese	19
2.1.9.2 Puffer und Lösungen für den Umgang mit RNA	21
2.1.9.3 Puffer und Lösungen für den Western-Blot	22
2.1.9.4 LBA-Medium zur Anzucht von TOP10F ['] -Zellen	23
2.2 Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1 Elektrophorese von Nukleinsäuren	24
2.2.1.1 Native und denaturierende PAA-Gelelektrophorese	24
2.2.1.2 Native und denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren	24
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	25
2.2.3.1 Standard DNA-Amplifikation	25
2.2.3.2 Durchführung der PCR unter Bedingungen, bei denen zusätzliche DNA-Abschnitte in das PCR-Produkt eingefügt werden sollten	26
2.2.3.3 Generierung von IEX-1-DNA-Templates für die <i>in vitro</i> -Transkription	27
2.2.4 RNA-Synthese und -Aufreinigung	28
2.2.4.1 Synthese der Ribozyme 1-12	28
2.2.4.2 Synthese der Exon1/IEX-1-RNA	30
2.2.4.3 Synthese eines IEX-1/Exon2-Fragments	31

2.2.4.4	Synthese der IEX-1-RNA	31
2.2.5 <i>in vitro</i>-Spaltung der RNA-Moleküle durch die Ribozyme 1-12		31
2.2.5.1	Spaltung der IEX-1/Exon1-RNA durch die Ribozyme 1-6	32
2.2.5.2	Spaltung der IEX-1/Exon2-RNA durch die Ribozyme 7-12	32
2.2.5.3	Spaltung der IEX-1-RNA durch die Ribozyme 1-12	32
2.2.6 Erstellung von Ribozymkinetiken		33
2.2.6.1	Erstellung von Kinetiken für die Ribozyme 1-6	33
2.2.6.2	Erstellung von Kinetiken für die Ribozyme 8-12	34
2.2.7 Northern-Blot		34
2.2.7.1	Spezifische IEX-1-Spaltung aus T-REx™-293-Gesamt-RNA	34
2.2.8 Klonierung von Ribozym-Template-DNA in den transienten Vektor pCR® 3.1		35
2.2.8.1	Phosphorylierung und Annealing der Ribozym-Oligonukleotide	36
2.2.8.2	Nhe-I- und Xba-I-Restriktion des Plasmids pCR® 3.1	36
2.2.8.3	Dephosphorylierung des Vektors, Elektrophorese und DNA-Elution	37
2.2.8.4	Ligation der phosphorylierten Inserts in den dephosphorylierten Vektor und Transformation von TOP10F'-Zellen	37
2.2.8.5	Koloniescreening zur Insert-Detektion	37
2.2.8.6	Plasmid-Präparation	38
2.2.8.7	Nhe-I- und Xba-I-Restriktion der Plasmide zur Ermittlung der Insert-Orientierung	38
2.2.8.8	Sequenzierung der Plasmide	38
2.2.8.9	Ansetzen von Hauptkulturen und Präparation der Plasmide pCR® 3.1/Ribozym2, pCR® 3.1/Ribozym8, pCR® 3.1/Ribozym9 und pCR® 3.1/Ribozym10	39

2.2.9 Konstruktion von Plasmiden (pCR[®] 3.1) mit Ribozym-Inserts und nachgeschaltetem IEX-1-Intron	39
2.2.9.1 PCR-Amplifikation des IEX-1-Introns mit 5'-Xba-I- und 3'-Pme-I-Schnittstelle	39
2.2.9.2 Klonierung des IEX-1-Introns in den Vektor pCR [®] 2.1 und anschließende Transformation von TOP10'F-Zellen	40
2.2.9.3 Plasmid-Präparation, Sequenzierung der isolierten Plasmide, Ansetzen einer Hauptkultur und erneute Plasmid-Isolierung	40
2.2.9.4 Xba-I- und Pme-I-Restriktion des Plasmids pCR [®] 2.1/IEX-1-Intron, PAA-Elektrophorese und Elution des IEX-1-Intron-Fragments	40
2.2.9.5 Restriktion der Plasmide pCR [®] 3.1/Ribozym2, pCR [®] 3.1/Ribozym8, pCR [®] 3.1/Ribozym9 und pCR [®] 3.1/Ribozym10, Ligation des IEX-1-Fragments in die geschnittenen Vektoren und Transformation von TOP10'F-Zellen	40
2.2.9.6 Koloniescreening, Plasmid-Präparation und Sequenzierung der Plasmide	41
2.2.10 Konstruktion von Plasmiden (pCR[®] 3.1) mit verschiedenen Ribozym-Konkatamer-Inserts	41
2.2.11 Umklonierung der Ribozym/IEX-1-Intron-Fragmente in den retroviralen Vektor pBabePuro	42
2.2.11.1 Amplifikation von Ribozym9/IEX-1-Intron-, Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron und Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron-Fragmenten, Klonierung in das Plasmid pCR [®] 2.1 und Umklonierung in den retroviralen Vektor pBabePuro	42
2.2.12 PCR-Nachweis des Provirus in genomischer DNA	43
2.2.13 Nachweis von Ribozym-RNA in den transduzierten T-REx[™]-293-Zellen durch Reverse Transkription und anschließende PCR-Amplifikation (RT-PCR)	43
2.2.14 Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus stabil transduzierten T-REx[™]-293-Zellen und einer [α-³²P]dCTP-marierten 235-Bp-Sonde	44

2.3 Zellbiologische Verfahren	45
2.3.1 Zellkultur	45
2.3.2 Transfektion von T-REx TM -293-Zellen mit Effektene TM -Reagent (QIAGEN)	45
2.3.3 Transduktion von T-REx TM -293-Zellen mit dem retroviralen Vektor pBabePuro	46
2.3.3.1 Generierung von Virusüberstand und Transduktion von T-REx TM -293-Zellen	46
2.3.4 Zellproliferations-Assay	46
2.3.5 Zellzyklus-Analyse durch Propidiumjodid-Färbung	47
2.3.6 Apoptose-Assay durch AnnexinV-FITC-Färbung	47
2.4 Immunbiologische Verfahren	48
2.4.1 Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte aus transient transfizierten T-REx TM -293-Zellen	48
2.4.1.1 Tetrazyklin-Stimulation und Protein-Aufarbeitung	48
2.4.1.2 Protein-Quantifizierung über analytische SDS-PAGE	48
2.4.1.3 SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran	49
2.4.1.4 Detektion von IEX-1-Protein und α -Tubulin auf der Membran	49
2.4.2 Western-Blot-Analyse von T-REx TM -293-Proteinextrakten nach stabiler pBabePuro-Transduktion	50
<u>3 Ergebnisse</u>	51
3.1 Einführung in den experimentellen Ablauf	51
3.2 Identifizierung potentieller Ribozym-Spaltungsstellen innerhalb der IEX-1-mRNA-Sequenz	51

3.3	Synthese und <i>in vitro</i>-Charakterisierung der Ribozyme	52
3.3.1	Synthese der Templates für die <i>in vitro</i> -Transkription	52
3.3.2	<i>in vitro</i> -Transkription	53
3.3.3	<i>in vitro</i> -Spaltung der RNA-Moleküle durch die Ribozyme 1-12	55
3.3.3.1	Spaltung der IEX-1/Exon1-RNA durch die Ribozyme 1-6	55
3.3.3.2	Spaltung der IEX-1/Exon2-RNA durch die Ribozyme 7-12	56
3.3.3.3	Spaltung der IEX-1-RNA durch die Ribozyme 1-12	57
3.3.4	Erstellung von Ribozym-Kinetiken	58
3.3.4.1	Erstellung von Kinetiken für die Ribozyme 1-6	58
3.3.4.2	Erstellung von Kinetiken für die Ribozyme 8-12	59
3.3.5	Spezifische IEX-1-Spaltung aus T-REx TM -293-Gesamt-RNA	61
3.3.5.1	Herstellung des Sonden-DNA-Templates mittels Polymerase-Kettenreaktion	61
3.3.5.2	<i>in vitro</i> -IEX-1-Spaltung aus T-REx TM -293-Gesamt-RNA	62
3.4	Einfluß von konstitutiv exprimierten Ribozymen auf die IEX-1-Proteinexpression in transient transfizierten T-RExTM-293-Zellen	63
3.5	Einfluß von endogen exprimierten Ribozymen auf stabil transduzierte T-RExTM-293-Zellen	65
3.5.1	Nachweis des Provirus in T-REx TM -293-Zellen	65
3.5.2	Nachweis von Ribozym-RNA in den transduzierten T-REx TM -293-Zellen durch Reverse Transkription und anschließende PCR-Amplifikation (RT-PCR)	66
3.5.3	Northern-Blot-Analyse von T-REx TM -293-Gesamt-RNA nach stabiler Transduktion mit pBabePuro und verschiedenen pBabePuro/Ribozym-konstrukten	68

3.5.4 Western-Blot-Analyse von T-REx™-293-Proteinextrakten nach stabiler Transduktion mit pBabePuro und verschiedenen pBabePuro/Ribozym-konstrukten	69
3.5.5 Einfluß der Ribozyme auf die Proliferationsrate von T-REx™-293-Zellen	70
3.5.5.1 „CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“	70
3.5.5.2 Zellzyklusanalyse der stabil transduzierten Zelllinien durch Propidiumjodid-Färbung und anschließende Durchflußzytometrie	71
3.5.6 Reaktion von stabil mit Ribozymkonstrukten transduzierten T-REx™-293-Zellen auf verschiedene apoptotische Stimuli	72
<u>4 Diskussion</u>	74
4.1 Auswahl der Ribozym-Zielsequenzen auf der IEX-1-mRNA, Ribozym-Design, <i>in vitro</i>-Testung und Erstellung von Kinetiken	74
4.2 Art der Ribozym-Verabreichung und Vektorwahl	76
4.3 Klonierung der Ribozyme in ausgewählte Vektorsysteme und Konstruktion von Ribozym-Konkatameren	78
4.4 Einfluß von IEX-1 auf das Zellwachstum	79
4.4.1 IEX-1 als ETS-1/AP-1-Zielgen	81
4.4.2 IEX-1 als p53-Zielgen	81
4.5 IEX-1 und Apoptose	84
4.5.1 Der proapoptotische Effekt von IEX-1	84
4.5.2 IEX-1 als NFκB-Zielgen	86
4.6 IEX-1 und die zelluläre Stressantwort	87

<u>5 Zusammenfassung</u>	89
<u>6 Literaturverzeichnis</u>	90
<u>7 Sonstiges</u>	
7.1 Abkürzungsverzeichnis	109
7.2 Curriculum vitae	113
7.3 Danksagung	115
7.4 Erklärung	116

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Multizelluläre Organismen verfügen über eine Vielzahl von Mechanismen, welche die Zellvitalität gewährleisten und das Zellwachstum regulieren. So muß die DNA einer Zelle vor deren Teilung in einem Prozeß, der als Replikation bezeichnet wird, verdoppelt werden. Erst wenn diese DNA-Synthese vollständig abgeschlossen ist, kann der nächste Schritt bei der Reproduktion der Zelle, die Mitose, eingeleitet werden. Ob und wann eine Zelle sich teilt, wird durch einen komplizierten, als Zellzyklus bezeichneten Mechanismus reguliert. Dieser wird in vier Phasen unterteilt: G1-, S-, G2- und M-Phase. Während der M-Phase wird nicht nur der Kern (Mitose), sondern auch das Zytoplasma einer Zelle geteilt (Zytokinese). Die G1-, S- und G2-Phase stellen die Zeitspanne zwischen zwei M-Phasen dar und werden als Interphase bezeichnet. Nach Abschluß ihrer Differenzierung sind Zellen in der Regel nicht mehr teilungsaktiv und treten in eine fünfte, einem Ruhezustand gleichende G0-Phase ein. Aus diesem postmitotischen Zustand können sie jedoch in den Zellzyklus zurückgeführt werden, etwa wenn wachstumsstimulatorische Faktoren auf die Zelle einwirken. Für die Koordination der in den einzelnen Phasen ablaufenden Prozesse sorgt ein effizientes Kontrollsystem, welches im Wesentlichen durch die drei G1-, G2/M- und Metaphase-Kontrollpunkte repräsentiert wird.

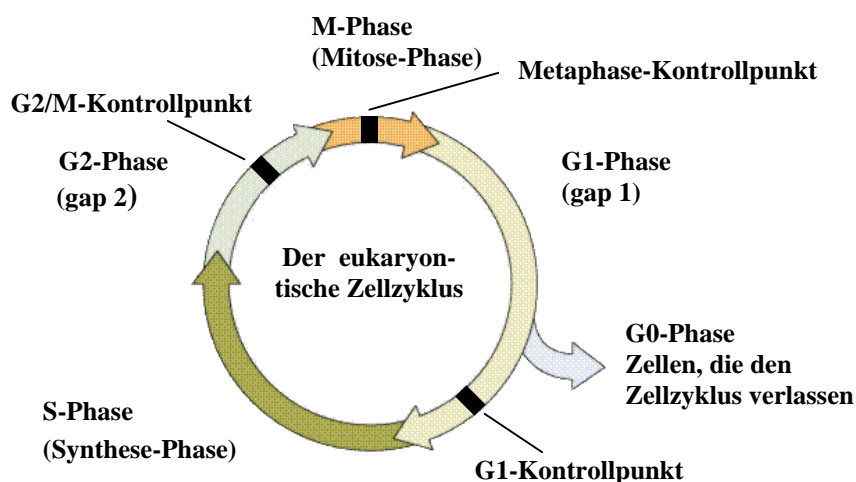


Abb. 1: Der Zellzyklus und seine Kontrollpunkte

Grüntöne = Abschnitte der Interphase

Orange = M-Phase

Die molekularen Vorgänge an diesen Kontrollpunkten entscheiden über ein Fortschreiten oder Anhalten des Zellzyklus. Am G1-Kontrollpunkt wird überprüft, ob die Milieubedingungen für eine Zellteilung günstig sind und ob die Zelle die hierfür erforderliche Größe erreicht hat (Zetterberg et al., 1995; Bartek et al., 1996). Die G1-Phase kann in zwei Stadien unterteilt werden. Der erste Abschnitt ist von mitogenen Signalen abhängig. Nach dem Überschreiten des G1-Kontrollpunktes sind jedoch keine weiteren Wachstumsstimuli mehr nötig. Mitogene Signale werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren vermittelt, deren Bindung an membranständige Rezeptoren eine Kaskade von Phosphorylierungsschritten auslöst, die schließlich zum Eintritt in den Zellzyklus führen. Am Ende dieser Kaskade werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die weitere, für das Fortschreiten des Zellzyklus essentielle Gene induzieren. Die regulatorischen Vorgänge am G2/M-Punkt stellen sicher, daß die Replikation fehlerlos und vollständig abgeschlossen wurde (Dunphy, 1994; King et al., 1994). Der Metaphase-Kontrollpunkt garantiert schließlich, daß sich die Chromosomen an der Kernspindel angeheftet und sich in der Metaphase-Platte angeordnet haben, bevor die Anaphase beginnt (Rudner & Murray, 1996). Die Kontrollpunkte verhindern also das Fortschreiten des Zellzyklus, wenn z.B. ein mutationsbedingt verändertes Genom vorliegt oder die Replikation nicht vollständig abgeschlossen wurde (Sionov & Haupt, 1999). Sind die DNA-Schäden jedoch irreparabel, so verfügt die Zelle über Kontrollmechanismen, die einen gezielten „Selbstmord“ der Zelle (Apoptose oder programmierten Zelltod) auslösen. Die Apoptose spielt im Organismus eine ebenso wichtige Rolle, wie das Zellwachstum (Hale et al., 1996). So werden im Verlauf der Embryogenese funktionslos gewordene Zellen genauso abgetötet, wie im Überschuß produzierte Keimzellen oder fehlentwickelte Zellen, wie etwa Tumorzellen. Ein besonders prominentes Beispiel ist die negative Selektion autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus.

Es ist leicht vorstellbar, daß dieses komplizierte Proliferationskontrollsystem sehr empfindlich auf Störungen reagiert. Mutationen, die zellzyklusregulierende Gene betreffen, können zu ungehemmtem Zellwachstum und somit zur Entstehung von Tumoren führen (Paulovich et al., 1997; Evan & Littlewood, 1998). So ist das zellzyklusregulierende Tumorsuppressorgen p53 in über 50 % aller bekannten Tumoren mutiert (Hollstein et al., 1991). P53 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus sowie ein entscheidender Vermittler der apoptotischen Antwort in DNA-geschädigten Zellen. Durch die mannigfaltigen Wirkungsweisen seiner Zielgene dient p53 dem Erhalt der genomischen Stabilität einer Zelle (Baker et al., 1990; Mercer et al., 1990).

Aus diesem Grunde ist es von großem medizinischen Interesse, die Zusammenhänge der Zellzykluskontrolle zu verstehen und Gene zu identifizieren, deren Produkte in diesen Kontext involviert sind. Von besonderer Bedeutung sind dabei Gene, deren Expression durch zellzyklusregulierende Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Sie sind für eine Anzahl zellulärer Antworten, z.B. Zellzyklusarrest, Aktivierung von DNA-Reparaturenzymen, Apoptose, Differenzierung oder Wachstum, auf extrazelluläre Stimuli, wie etwa Wachstumsfaktoren, Zytokine, UV-Licht und ionisierende Strahlung, verantwortlich (Weichselbaum et al., 1991). Die Art und das Zusammenspiel dieser Antworten determinieren das Überleben, den programmierten Zelltod (Apoptose) und malignes Wachstum einer Zelle. Gene, die durch zellulären Stress oder mitogene Signale induziert werden, unterscheidet man je nach der Geschwindigkeit ihrer Expression als „early-, intermediate-“ oder „late-response“-Gene (Sukhatme et al., 1990; Ziff et al., 1990). Dabei sind verschiedene „early-response“-Gene von großer Bedeutung, welche u.a. durch die Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 induziert werden.

Durch NFκB induzierbare Gene sind in die Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose involviert. Einige dieser Zielgene vermitteln eine Resistenz gegenüber rezeptorvermittelter Apoptose (Dudley et al., 1999) oder DNA-schädigenden Einflüssen (Wang et al., 1999). Die Blockierung der NFκB-Funktion führt zu einer verstärkten Sensibilität gegenüber apoptotischen Stimuli, wie TNFα und CD95L (Liu et al., 1996; Van Antwerp et al., 1996), während eine Überexpression von NFκB Apoptose verhindern kann (Barkett & Gilmore, 1999). Die Transkriptionsfaktoren der Ets-1-Familie vermitteln schließlich im Zusammenspiel mit den verschiedenen heterodimeren AP-1-Komplexen frühe Ereignisse des Zellwachstums.

Das von unserer Arbeitsgruppe erstmals in Rattenpankreaszinomzellen nachgewiesene, durch den Wachstumsfaktor PACAP induzierbare „early-response“-Gen PRG1 (Schäfer et al., 1996a) verfügt über aktive Ets-1/AP-1-, p53- (Schäfer et al., 1998a+b) und NFκB-Bindungsstellen (Schäfer et al., 1998c; Schmidt et al., 1999) in seinem Promotor. Homologe Gene wurden auch in der Maus (gly96 - Charles et al., 1993) und im Menschen (IEX-1 - Kondratyev et al., 1996; Dif-2 - Pietzsch et al., 1997 & 1998) gefunden.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es noch keine gesicherten Erkenntnisse über die IEX-1-Funktion. Lediglich verschiedene Sequenzen und Expressionsstudien waren veröffentlicht. Obwohl während der letzten Jahre eine Vielzahl von Daten über die Induzierbarkeit von IEX-1 gesammelt werden konnte, ist die genaue Funktion dieses Proteins noch immer nicht aufgeklärt.

1.2 IEX-1 und seine Homologe in Maus und Ratte

1.2.1 Entdeckung von IEX-1/Dif-2, gly96 und p22/PRG1

In den Jahren 1995 und 1996 fokussierten Schäfer et al. ihre Forschungstätigkeiten auf die Identifikation von Genen, die in Folge einer PACAP-Stimulation von Rattenpankreas-karzinomzelllinien exprimiert wurden. Frühere Untersuchungen von Buscail et al. (1992) ergaben, daß PACAP einen wachstumsfördernden Effekt auf AR4-2J-Zellen der Ratte ausübt, wobei jedoch der genaue Mechanismus ungeklärt blieb. Durch die Arbeiten von Schäfer et al. (1996b-d) konnte nachgewiesen werden, daß eine PACAP-Stimulation von AR4-2J-Zellen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktorkomplexes Ets-1/AP-1 führt. Offen war aber immer noch die Frage, welche AP-1-abhängigen oder -unabhängigen Gene an dieser proliferativen Antwort beteiligt sind. Um ein solches Gen zu identifizieren, wurde die „Differential RNA Display“-Methode (Liang & Pardee, 1992) eingesetzt, durch welche es möglich ist, ein unter zwei verschiedenen Milieubedingungen (z.B. PACAP-stimuliert und unstimuliert) differentiell exprimiertes Gen ausfindig zu machen. Tatsächlich konnte ein solches Gen kloniert werden. Dieses als „PACAP response gene 1“ (PRG1) oder wegen des relativen Molekulargewichtes des von ihm kodierten Proteins von 22 KDa als p22 bezeichnete Gen (Schäfer et al. 1996a) wies eine über 80%ige Homologie zu einem bereits einige Jahre zuvor beschriebenen, murinen Protein unbekannter Funktion auf, welches als gly96 bezeichnet wurde (Charles et al., 1993). Auch gly96 wurde durch verschiedene Wachstumsfaktoren hochreguliert. Ungefähr zur gleichen Zeit identifizierten und charakterisierten Kondratyev et al. (1996) in der Karzinomzelllinie SCC-35 ein durch γ -Strahlung induzierbares humanes „early-response“ Gen, welches eine 68%ige Sequenzhomologie zu gly96 und eine 72%ige Homologie zu p22/PRG1 aufwies. Im darauf folgenden Jahr konnten Pietzsch et al. (1997 & 1998) in humanen Monozyten ein Gen identifizieren, dessen Expression im Zusammenhang mit der Differenzierung verschiedener Zelllinien steht und mit dem zuvor beschriebenen IEX-1 identisch ist.

Wu et al. (1998) beschrieben eine IEX-1-Spleißvariante, die sie als IEX-1L (IEX-1-Long) bezeichneten und die in NFκB-vermittelte Resistenz gegen Apoptose involviert sein sollte. Die Existenz dieses Genprodukts wird kontrovers diskutiert. So konnten Schäfer et al. (1999a) zeigen, daß es sich bei IEX-1L um eine Mutante handelt, die *in vivo* nicht exprimiert wird.

1.2.2 Aufbau des IEX-1/Dif-2-Gens exklusive der Promotorsequenz und Vergleich mit gly96 und p22/PRG1

P22/PRG1 kodiert ein 160 AS langes Protein und ist somit sieben AS länger, als das murine gly96. Diese 3'-Verlängerung basiert auf einem U→C-Basenaustausch an Position 477 der cDNA, wodurch das in gly96 vorhandene Terminationskodon UAG in ein für Glutamin kodierendes CAG-Triplet umgewandelt wird. Somit kommt die Proteinbiosynthese des p22/PRG1 erst am UAA-Stopkodon an Position 498-500 zum Stillstand. Das IEX-1/Dif-2-Gen kodiert ein 156 AS langes Protein. Alle drei Gene bestehen aus zwei Exons, die von einem Intron getrennt werden. Dabei ist das Intron bei p22/PRG1, gly96 und IEX-1/Dif-2 107, 109 bzw. 112 Bp lang. Alle Gene verfügen über „A/T-rich elements“ in den 3'-untranslatierten Regionen, welche für „early response“-Gene charakteristisch sind und diese für einen raschen Abbau durch RNasen kennzeichnen (Fort et al., 1987; Shyu et al., 1991; Zubiaga et al., 1995).

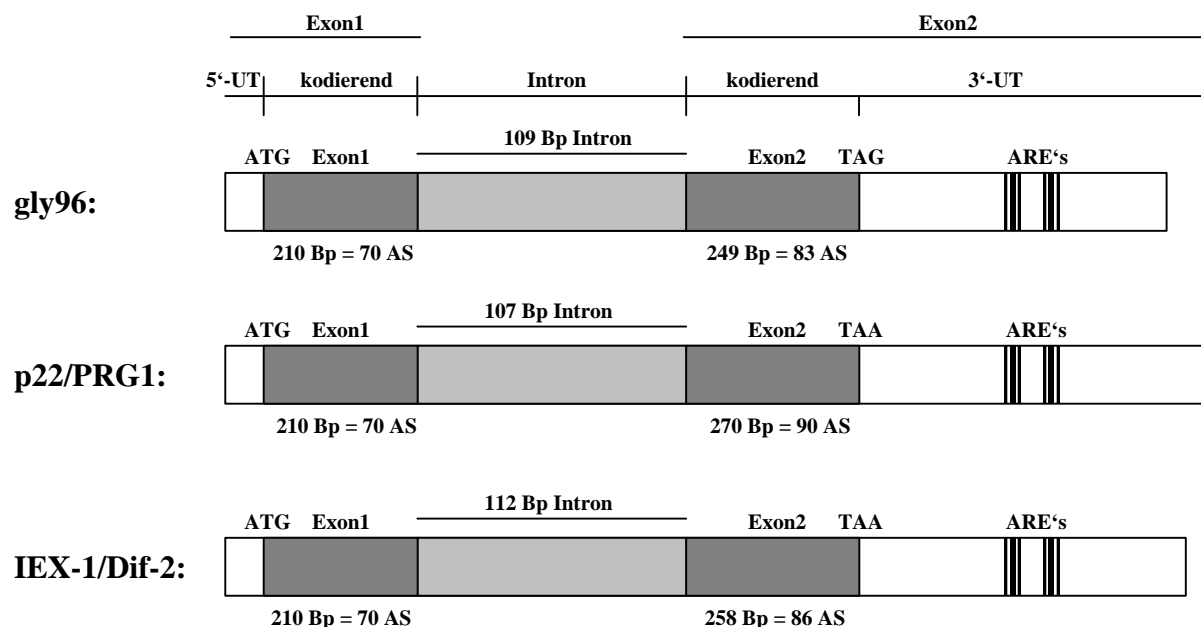


Abb. 2: Genstruktur von gly96, p22/PRG1 und IEX-1/Dif-2 exklusive der Promotoren

ATG = Startkodon; TAG bzw. TAA = Terminationskodon; 5'-UT = 5'-untranslatierter Bereich; 3'-UT = 3'-untranslatierter Bereich; ||| ARE's = „A/T rich elements“; ■ = kodierender Bereich; ▨ = Intron

1.2.3 Induzierbarkeit von IEX-1, p22/PRG1 und gly96 durch Wachstumsfaktoren

IEX-1 verhält sich u.a. gegenüber dem Proteinkinase-C-Aktivator 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), dem Proteinphosphatase-Inhibitor Okadainsäure und TNF α responsiv. Diese Befunde sowie die in der Literatur beschriebene Induzierbarkeit von p22/PRG1 durch PACAP (Schäfer et al., 1996a) und EGF (Kumar et al., 1998; Schäfer et al., 1999b) deuteten darauf hin, daß die Induktion von IEX-1 im Zusammenhang mit mitogenen Stimuli über den MAPK-Signalweg verlaufen könnte, der schließlich zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 führt.

Die Aktivierung von AP-1 stellt nach Schäfer et al. (1996a) ein frühes Schlüsselereignis der wachstumsfaktorvermittelten Proliferation in AR4-2J-Zellen dar, weshalb auch die AP-1-gesteuerte Induktion von IEX-1 als Hinweis auf eine proliferative Wirkung von IEX-1 interpretiert werden kann. Darüber hinaus lassen sich sowohl p22/PRG1 als auch IEX-1 in verschiedenen Geweben transient induzieren, wenn Wachstumsfaktoren, wie etwa EGF, HGF oder Serum, zugegeben werden (Schäfer et al., 1998b & 1999b). Pietzsch et al. (1997 & 1998) kamen zu Ergebnissen, die ebenfalls eine wachstumsassoziierte Funktion von IEX-1 vermuten lassen. In ausdifferenzierten Monozyten und HepG2-Zellen wurde im Vergleich zu proliferierenden Zellen ein verringerter Dif-2-Proteinspiegel detektiert. Zudem konnten Kobayashi et al. (1998) in Keratinozyten durch Zugabe von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ einen Wachstumsarrest induzieren, der mit einer Ausdifferenzierung dieser Zellen und einer Verringerung der IEX-1-Konzentration einherging.

1.2.4 IEX-1 und seine Homologe sind p53- und NF κ B-Zielgene

In den vergangenen zehn Jahren wurde das Tumorsuppressorgen p53 als ein essentieller Mediator der Zellzyklusregulation sowie der Kontrolle der Apoptose und zellulärer Vitalität identifiziert. Der Verlust der p53-Aktivität ist eine häufige Ursache für malignes Wachstum (Hollstein et al., 1991; Crook et al., 1994). Zudem konnte gezeigt werden, daß p53 in seiner primären Rolle als Transkriptionsfaktor verschiedene wichtige Funktionen vermittelt. So ist der Zellzyklus-Inhibitor p21 (El-Deiry et al., 1993) ebenso ein p53-Zielgen, wie der für die Regulation der Apoptose essentielle bcl-2-Antagonist bax (Miyashita & Reed, 1995). Auch verschiedene DNA-Reparaturenzyme wie PCNA (Morris et al., 1996) und GADD45 (Kastan et al., 1992) sind p53-responsiv.

Der Transkriptionsfaktor p53 selbst ist unter anderem durch zellulären Streß und hierbei insbesondere durch Ereignisse induzierbar, die zu DNA-Schädigungen führen (Di-Leonardo et al., 1994; Siegel et al., 1995).

Wie Schäfer und seine Mitarbeiter belegen konnten, enthalten sowohl der Promotor des p22/PRG1 (1998a+b) als auch der IEX-1-Promotor (1998c) eine funktionelle p53-Bindungsstelle. Diese verfügt über eine signifikante strukturelle Identität (16/18) mit der im p21-Promotor und in anderen p53-Zielsequenzen gefundenen, inklusive derer in bax, mdm2, PCNA und GADD45 (Schäfer et al., 1998a). Darüber hinaus konnte im p22/PRG1-Promotor eine zweite potentielle p53-Bindungsstelle identifiziert werden, welche jedoch in nur geringem Maße der Konsensussequenz entspricht. Eine solche, degenerierte p53-Bindungsstelle könnte die p53-Rekrutierung an die aktive Erkennungssequenz verstärken (Bourdon et al., 1997; Schäfer et al., 1998b). Zudem wird die p53-Bindungsstelle im p22/PRG1-Promotor durch eine proximale A-reiche Region flankiert, wie sie auch im bax-Promotor vorzufinden ist. Dieser Bereich kann zumindest dort zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivität führen (Friedländer et al., 1996).

Verschiedene Forschungsgruppen konnten eine IEX-1-Induktion auslösen, wenn sie die jeweils untersuchten Kulturen zellulärem Streß aussetzten. Schäfer et al. (1998b) gelang es, durch γ -Bestrahlung DNA-Schäden in Rattensplenozyten zu verursachen, in deren Folge ein verzögerter, p53-abhängiger Anstieg von p22/PRG1 zu beobachten war. Eine frühe, wahrscheinlich NF κ B-abhängige γ -Strahlungsinduktion konnte von Kondratyev et al. (1996) in Brustkrebszellen für humanes IEX-1 nachgewiesen werden. Kumar et al. (1998) konnten eine IEX-1-Expression schließlich durch UV-Bestrahlung von humanen Keratinozyten induzieren. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten Schäfer et al. (1998b) eine mögliche Involvierung von p22/PRG1 in den p53-vermittelten Zellzyklusarrest und/oder in apoptotische Signalwege.

Kurz nachdem p53-Erkennungssequenzen in den Promotoren von p22/PRG1 und IEX-1 nachgewiesen werden konnten, gelang es, in diesen auch funktionelle NF κ B-Bindungsstellen zu charakterisieren (Schäfer et al., 1998c; Schmidt et al., 1999). Hierdurch konnte auch der ältere Befund, daß sich IEX-1 in HepG2- und 818-4-Zellen durch TNF α induzieren ließ, erklärt werden. TNF α vermittelt seine zellulären Funktionen durch Bindung an den TNFR-1. Infolge dieser Bindung kann auch der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert werden.

Schmidt und Schäfer (s.o.) nahmen daher an, daß IEX-1 eine Rolle bei den durch TNF α über NF κ B vermittelten Reaktionen in der Zelle spielt, zu denen unter anderem antiapoptotische Überlebenssignale gehören. Gestützt wurden diese Vermutungen dadurch, daß auch γ - (Kondratyev et al., 1996) und UV-Strahlung (Kumar et al., 1998), die ebenfalls eine NF κ B-Aktivierung verursachen, zu einer IEX-1-Induktion führten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die IEX-1-Expression gezielt zu unterbinden, das Genprodukt dadurch funktionell auszuschalten und hierdurch Hinweise auf die Funktion des IEX-1-Proteins zu erhalten. Für die angestrebte Ausschaltung der IEX-1-mRNA eigneten sich neben Antisense-Oligonukleotiden auch verschiedene Ribozyme und unter diesen aufgrund ihrer geringen Größe insbesondere die *Hammerhead*-Ribozyme.

Antisense-Oligonukleotide sind spezifische und effektive Inhibitoren der Genexpression (Simons & Kleckner, 1988; Kimelman & Kirschner, 1989; Hildebrandt & Nellen, 1992), die aus ca. 20-40 nt langen DNA- oder RNA-Bausteinen bestehen und komplementär zu der mRNA-Sequenz sind. Sie können in beliebiger Sequenz synthetisiert werden und durch Watson-Crick-Basenpaarungen an jede gewünschte mRNA binden. Die Genexpression wird nach der Bindung der Antisense-Moleküle auf verschiedene Weisen unterbunden. So kann ein verfrühter Transkriptionsstop (Novick et al., 1989; Brantl & Wagner, 1994) ebenso die Folge sein, wie ein vorzeitiger Translationsstop (Ma & Simons, 1990) oder ein Abbau der durch die Bindung entstehenden Doppelstrang-Moleküle durch doppelstrangspezifische RNasen oder durch RNase H (Krinke & Wulff, 1987).

Ribozyme können aufgrund ihrer substratbindenden Antisense-Arme ebenfalls diese indirekten Effekte vermitteln, verfügen darüber hinaus jedoch über eine katalytische Aktivität und sind folglich auch zur direkten Restriktion der Ziel-RNA in der Lage.

1.3 Ribozyme - Effiziente Werkzeuge zur Unterbindung der Genexpression

Lange Zeit gingen Enzymologen davon aus, daß ausschließlich Proteine in der Lage wären, biologische Reaktionen zu katalysieren. Die Entdeckung von Ribozymen durch Cech et al. (1981) und Altman (Guerrier-Takada et al., 1983) hat die Sicht auf die Funktion von Ribonukleinsäure-Molekülen in der Biologie grundlegend geändert (Usman & Blatt, 2000). Im Vorfeld dieser Entdeckung wurde RNA als rein passiver Träger der genetischen Information angesehen. Inzwischen weiß man, daß es auch katalytische RNA-Moleküle gibt, die Enzymcharakter haben und andere RNAs sequenzspezifisch spalten können. Wie Enzyme beschleunigen auch Ribozyme biologische Reaktionen und zeigen eine außergewöhnliche Substratspezifität (James & Gibson, 1998). Diese Spezifität erhalten sie durch Watson-Crick-Basenpaarungen zwischen den Ribozym-Bindungsarmen und den die Spaltungsstelle auf der Ziel-RNA flankierenden Bereichen. Nach erfolgter Bindung an das Substrat werden die normalerweise nicht reaktiven Phosphodiesterbindungen im Rückgrat der Ziel-RNA gespalten.

Diese substratspezifische Fähigkeit zur Restriktion bestimmter mRNAs sowie die geringe Größe und damit einhergehend einfache Synthese einiger Ribozyme machen diese Gruppe katalytischer RNA-Moleküle zu einem effizienten Werkzeug der Geninaktivierung (Usman & Blatt, 2000) und können folgerichtig zur Aufklärung der Genfunktion eingesetzt werden.

1.3.1 Die verschiedenen Gruppen katalytisch aktiver RNAs

Katalytische RNAs lassen sich aufgrund ihrer Größe in zwei Gruppen unterteilen. Zu den „großen“ Ribozymen gehören die Gruppe-I- und -II-Introns sowie die RNase P. Das Hepatitis-Delta-Ribozym sowie die *Hairpin*- und *Hammerhead*-Ribozyme werden den „kleinen“ katalytischen RNA-Molekülen zugerechnet.

Gruppe-I- und -II-Introns werden auch als selbstspaltende RNAs bezeichnet, während *Hammerhead*-, *Hairpin*- und Hepatitis-Delta-Ribozyme zu den selbstspaltenden Ribozymen gerechnet werden. Selbstspaltende RNAs vermitteln eine Abfolge komplexer Reaktionen, an deren Ende eine reife mRNA und ein exzisiertes Intron mit einer 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-Gruppe stehen.

Für diese katalytische Reaktion ist kein zusätzliches Protein nötig. Selbstspaltende Ribozyme vermitteln hingegen eine Katalyse, an deren Ende Spaltprodukte mit 2',3'-Zyklophosphat- und 5'-OH-Ende stehen.

Gruppe-I-Introns wurden in einer nichtkodierenden Zwischensequenz der 26S-rRNA von *Tetrahymena thermophila* entdeckt (Cech et al., 1981; Kruger et al., 1982). Gruppe-II-Introns sind ebenfalls zu einer intramolekularen Selbstexzision aus einem längeren Transkript in der Lage. Sie unterscheiden sich jedoch in der Reaktionsabfolge und in der Art ihrer Produkte von den Gruppe-I-Introns (James & Turner, 1997) und wurden inzwischen sowohl in den RNAs verschiedener Organelle von Pilzen und Pflanzen als auch im Genom von Eu- und Cyanobakterien gefunden (Ferat & Michel, 1993 & 1994; Knoop & Brennicke, 1994).

RNase P ist für die Entfernung der 5'-Sequenz in den Vorstufen von tRNAs verantwortlich. Dieses Enzym besteht aus einer hochstrukturierten RNA von 250-450 Nukleotiden Länge und bei Bakterien aus einer zusätzlichen Proteinuntereinheit. In Hefen und höheren Organismen hingegen besteht die Proteinkomponente aus mehreren Untereinheiten (Brown & Pace, 1992; Chamberlain et al., 1998). Dabei konnte in Eu- und Archebakterien gezeigt werden, daß die Spaltung nicht von der Proteinkomponente, sondern von der RNA-Untereinheit katalysiert wird (Guerrier-Takada et al., 1983 & 1984; Pannucci et al., 1999).

Das Interesse an katalytischen RNAs stieg sprunghaft mit der Entdeckung kleinerer Ribozyme, wie dem Hepatitis-Delta-, den *Hairpin*- und vor allem den *Hammerhead*-Ribozymen an, da diese vergleichsweise einfach zu synthetisieren sind.

Das Hepatitis-Delta-Virus (HDV) verursacht beim Menschen schwere Lebererkrankungen. Eine HDV-Infektion kann nur in Gegenwart eines Hepatitis-B-Virus (HBV) erfolgen. HDV trägt zwei Ribozyme (Branch & Robertson, 1991), die beide für die Replikation essentiell sind (Macnaughton et al., 1993). Eines liegt auf dem genomischen, infektiösen Strang, während das andere auf dem komplementären Strang des ins Genom integrierten Provirus liegt. Wie die anderen Ribozyme benötigt das HDV-Ribozym divalente Kationen zur Spaltung von RNA (Wu et al., 1989). Dabei entsteht ein Produkt mit 2',3'-Zyklophosphat- und eines mit einem 5'-OH-Ende (Branch & Robertson, 1991).

Das *Hairpin*-Ribozym wurde erstmals im Minusstrang der TRSV-RNA entdeckt (Haseloff & Gerlach, 1989). Die Sekundärstruktur zwischen einem *Hairpin*-Ribozym und seiner Substrat-RNA besteht aus zwei intermolekularen Helices (H1 + H2) und zwei intramolekularen Ribozym-Helices (H3 + H4), welche jeweils durch eine der zwei internen Schleifen (A + B) voneinander getrennt werden. Die Spaltung erfolgt am 5'-Ende eines Guanosin-Restes in Schleife A (Chowrira & Burke, 1991), wobei ein 5'-Hydroxyl- und ein 2',3'-Zyklophosphat-Terminus entstehen. Durch Deletionsstudien konnte belegt werden, daß ein katalytisches *Hairpin*-Ribozym aus mindestens 50 Nukleotiden bestehen muß (Hampel & Tritz, 1989).

Aufgrund ihrer breiten Anwendung in der Biotechnologie wird nun auf die dritte Gruppe kleiner Ribozyme („*Hammerheads*“) ausführlicher eingegangen.

1.3.2 Hammerhead-Ribozyme

Hammerhead-Ribozyme wurden in verschiedenen Pflanzenpathogenen wie Viroiden (z.B. Avocado-Sunblotch-Viroid - Hutchins et al., 1986) und hilfsvirusabhängigen Satelliten-RNAs (Haseloff & Symons, 1982; Prody et al., 1986) entdeckt. Interessanterweise konnten sie später von Epstein & Gall (1987a & b) auch in verschiedenen Wassermolch-Spezies nachgewiesen werden, wobei deren genaue Funktion hierbei noch ungeklärt ist. Ein charakteristisches Merkmal für diese Ribozyme ist eine intramolekulare, autokatalytische Spaltung der RNA als abschließender Schritt einer „Rolling Cycle“-Replikation. Diese ursprünglich intramolekular oder *cis*-spaltenden katalytischen Domänen können jedoch auch synthetisch hergestellt werden und als *trans*-spaltende Ribozyme fungieren (Uhlenbeck, 1987; Haseloff & Gerlach, 1988). Für die katalytische Aktivität dieser Ribozyme sind divalente Kationen essentiell (Dahm & Uhlenbeck, 1991; Murray et al., 1998). Ferner muß die Substrat-RNA über spezifische Nukleotid-Triplets der Konsensussequenz 5'-NUH-3' verfügen, wobei N für alle vier Ribonukleoside und H für Adenosin, Cytidin und Uridin steht (Ruffner et al., 1990; Perriman et al., 1992; Shimayama et al., 1995; Zoumadakis & Tabler, 1995; Ludwig et al., 1998). Zudem hat sich gezeigt, daß ein U am 3'-Ende dieses Motifs zu einer deutlich gesteigerten Aktivität des Ribozyms führt (Clouet-d'Orval & Uhlenbeck, 1997). Dabei wird die Phosphodiesterbindung 3' des Triplets gespalten, wodurch ein 5'-Hydroxyl- und ein 2',3'-Zyklophosphodiester-Terminus entstehen (Forster & Symons, 1987; Epstein & Gall, 1987a & b). Das Ribozym bildet zusammen mit der Substrat-RNA die charakteristische *Hammerhead*-Sekundärstruktur aus (Abb.3).

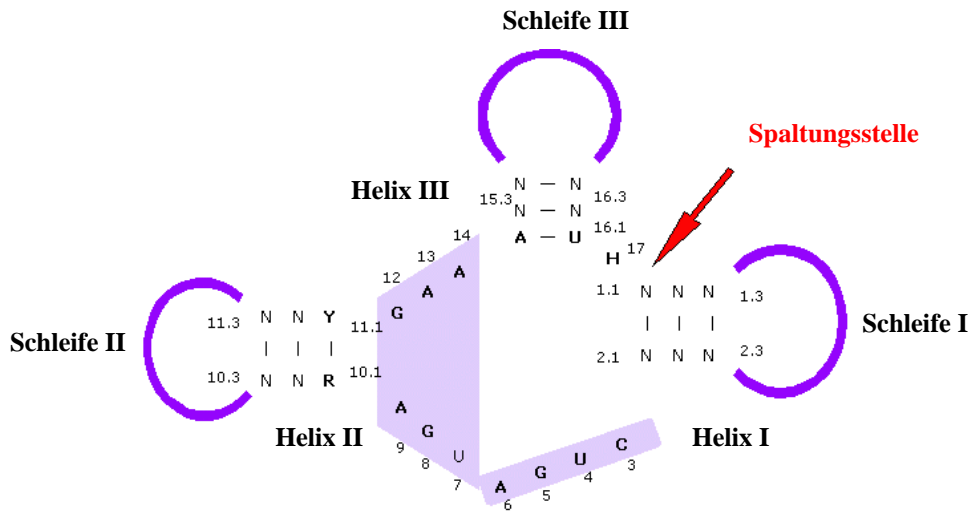


Abb. 3: Zweidimensionale Struktur eines *Hammerhead*-Ribozym/Substratkomplexes nach Birikh et al. (1997). Die Numerierung entspricht dem von Hertel et al. (1992) vorgeschlagenen Modell.

Der einzelsträngige Bereich des katalytischen Kerns des Ribozyms ist violett unterlegt. Konservierte Nukleotide sind dickgedruckt. N repräsentiert alle Nukleotide, während H für die Nukleotide C, U oder A steht.

Die dreidimensionale Struktur des Ribozym/Substratkomplexes ähnelt jedoch eher einer Wüschelrute (= wishbone), wie Pley et al. (1994) zeigen konnten (vgl. Abb. 4).

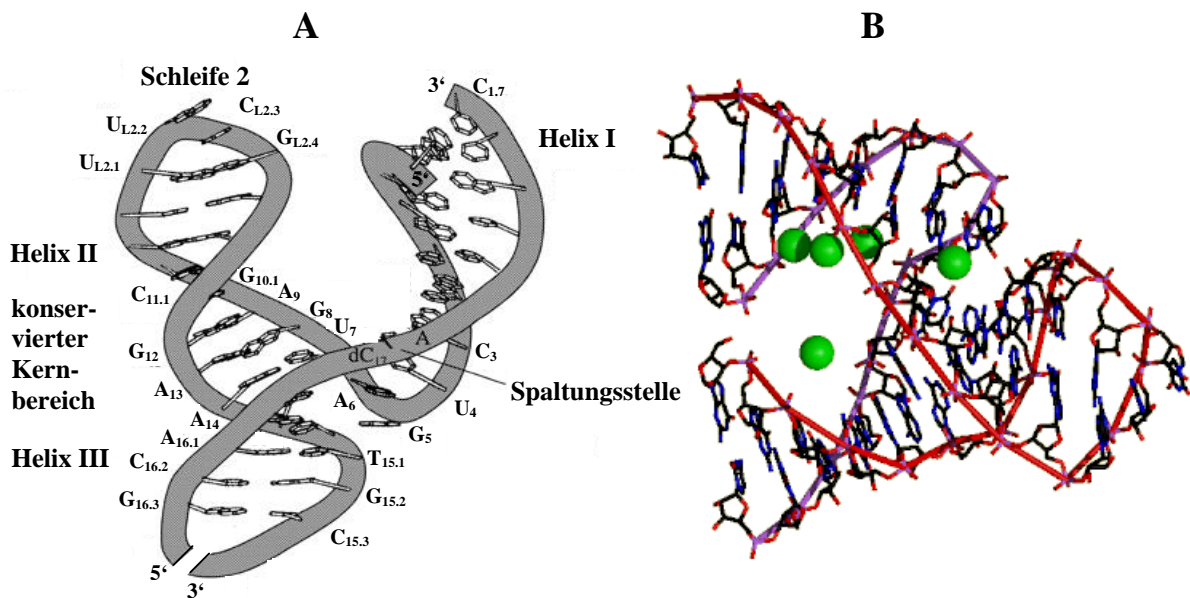


Abb. 4: Dreidimensionale Struktur eines *Hammerhead*-Ribozym/Substratkomplexes

A: Dreidimensionale Darstellung nach Menger et al. (2000). Die Numerierung entspricht dem von Hertel et al. (1992) vorgeschlagenen System. Der im Vordergrund von Helix I bis Helix III in 3'→5' verlaufende RNA-Abschnitt entspricht dem die NUH↓-Sequenz tragenden Bereich des Substrats, während die übrigen Nukleotide Teil des *Hammerhead*-Ribozyms sind. **B:** Dreidimensionale Darstellung eines Ribozym/Substratkomplexes mit gebundenen Magnesiumionen (grün). Das Ribozym ist in roter Farbe, die Substrat-RNA in violetter Farbe abgebildet. Abb. aus „<http://attila.stevens-tech.edu/chembio/rsamuel/index.html>“.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Themenstellung dieser Arbeit basiert auf verschiedenen Beobachtungen, die allesamt eine wachstumsfördernde Funktion von IEX-1 vermuten lassen. Diese These konnte jedoch bislang nur durch IEX-1-Stimulationsversuche mit verschiedenen Wachstumsfaktoren sowie Promotorstudien gestützt werden. Zur weiteren Klärung der IEX-1-Funktion wäre ein Modellsystem wünschenswert, in dem Zelllinien verschiedene Mengen IEX-1-Protein exprimieren. Dies läßt sich einerseits durch vektorvermittelte Überexpression und andererseits – wie in dieser Arbeit beschrieben – durch eine spezifische Inhibition der IEX-1-Expression erreichen.

Zur Lösung der Aufgabenstellung wurde die Arbeit in drei methodische Abschnitte unterteilt:

1. Generierung und *in vitro*-Charakterisierung von Ribozymen, die gezielt IEX-1-RNA zu spalten vermögen.
2. Transfektion und Transduktion von T-REx™-293-Zellen mit verschiedenen Ribozymkonstrukten und Nachweis einer *in vivo*-Aktivität.
3. Durchführung verschiedener Tests zur Klärung der IEX-1-Funktion. Diese Tests sollten insbesondere Aussagen darüber liefern, welchen Effekt IEX-1 auf die Proliferationsrate und den Zellzyklus ausübt bzw. wie sich eine Reduktion der IEX-1-Expression auf das apoptotische Verhalten dieser Zellen auswirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Nukleinsäuren

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma bezogen.

Name:	Katalognummer:	Hersteller:
Borsäure	1.00165.1000	Merck
Coomassie-Brillantblau R250	8543304	Merck
[α - 32 P]-dCTP	AA0075	Amersham Pharmacia
dNTP-Mix	N 808-0007	Perkin Elmer
Essigsäure	1.00063.2500	Merck
Ethanol	1.00983.2500	Merck
Express Hyb TM Hybridisierungs-Lösung	8015-2	Clontech
Glycin	04943	Biomol
Glycogen	901 393	Roche Diagnostics
LumiGlo [®] Reagent, 20 x Peroxide	7003	New England BioLabs [®] Inc.
Magermilchpulver		Nestle
β -Mercaptoethanol	50407	Biomol
Methanol	1.06009.2500	Merck
Natriumchlorid	1.06404.1000	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	6498.1000	Merck
Natronlauge (1 N)	1.09137.1000	Merck
2-Propanol	1.09634.2500	Merck
Salzsäure (37%ig)	1.00317.1000	Merck
Sequagel [®] Complete	EC-841	National diagnostics
Sequagel [®] XR	EC-842	National diagnostics
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	04051	Biomol
Tris ultra pure	08003	Biomol

2.1.2 Zellkultur

2.1.2.1 TOP10F['] *E. coli*

Stamm, Medium oder Medienkomponente:	Katalognummer:	Hersteller:
Ampicillin Natriumsalz	01503	Biomol
Bacto TM -Agar	0140-01	DIFCO
Bacto Hefeextrakt	0127-17	DIFCO
Natriumchlorid	1.06404.1000	Merck
One Shot [®] TOP10F ['] chemically competent <i>E. coli</i>	C3030-03	Invitrogen [®]
Trypton Pepton	0123-17	DIFCO

2.1.2.2 T-RExTM-293-Zellen

Sämtliche nicht aufgeführten Medien und Medienkomponenten wurden von der Firma Biochrom KG bezogen.

Zelllinie, Medium oder Medienkomponente:	Katalognummer:	Hersteller:
T-REX™-293-Zellen	R710-07	Invitrogen®
Blasticidin S/HCl	R210-01	Invitrogen®
L-Glutamin	25030-024	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin	15140-114	Life Technologies
Puromycin	P7255	Sigma
Tetrazyklin	Q100-19	Invitrogen®
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	35400-027	Life Technologies

2.1.3 Antikörper

Antikörper:	Katalognummer:	Hersteller:
Anti-Mouse IgG, HRP-linked	7052-1	New England BioLabs® Inc.
Anti-Goat IgG, HRP-linked	F-160	Santa Cruz Biotechnology
IEX-1 (C-20), goat polyclonal IgG	SC-8454	Santa Cruz Biotechnology
Anti-α-Tubulin, mouse monoclonal IgG	T-5168	Sigma

2.1.4 Nukleinsäure- und Proteinstandards

Standard:	Katalognummer:	Hersteller:
DNA-Leiter (100 Bp)	15628-019	Life Technologies
RNA-Leiter (160 - 1770 nt)	15623-010	Life Technologies
Prestained SDS-PAGE Standards, low range	161-0305	BioRad

2.1.5 Enzyme und Kits

Name:	Katalognummer:	Hersteller:
AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit	AS 3107	Epicentre Technologies
ApoAlert™ Annexin V-FITC	8133-1	Clontech
BamH I	E1010Z	Amersham Pharmacia
CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	G5421	Promega
EcoR V + 10 x One Phor All-Restriktionspuffer	27-0934-01	Amersham Pharmacia
Effectene™ Transfection Reagent	301427	QIAGEN
EndoFree Plasmid Maxi Kit	12362	QIAGEN
Eukaryotic TA Cloning® Kit	K3000-01	Invitrogen®
MegaScript™ <i>in vitro</i> Transcription Kit	1334	Ambion
M-MLV Reverse Transkriptase	M1701	Promega
M-MLV Reverse Transkriptase Buffer Pack	M5313	Promega
Nhe I + 10 x One Phor All-Restriktionspuffer	27-0974	Amersham Pharmacia
Oligo(dT) ₁₅ Primer	C1101	Promega
Original TA Cloning® Kit	K2000-01	Invitrogen®
Pme I + 10 x TA-Buffer + 10 x BSA	560S	New England BioLabs® Inc.
QIAEX II Gel Extraction Kit	20021	QIAGEN
QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Kit	13323	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	QIAGEN
QIAquick Nucleotide Removal Kit	28304	QIAGEN
QIAshredder	79656	QIAGEN
Ready To Go™ DNA Labelling Beads	27-9240-01	Amersham Pharmacia

Name:	Katalognummer:	Hersteller:
RNase A	4030-1	Clontech
RNasin Ribonuklease Inhibitor	N 211A	Promega
RNeasy Mini Kit	74106	QIAGEN
Sal I + 10 x One Phor All-Restriktionspuffer	E1080Y	Amersham Pharmacia
SequiTherm EXCEL™II Long-Read DNA Sequencing Kit-LC	SE 7701LC	Epicentre Technologies
Silver Stain Plus	161-0449	BioRad
T4 Polynukleotid-Kinase	18004-010	Life Technologies
Taq DNA-Polymerase + 10 x PCR-Puffer + 50 mM MgCl₂-Lösung	18038-026	Life Technologies
HK™ Thermolabile Phosphatase	H 92025	Epicentre Technologies
Xba I + 10 x One Phor All-Restriktionspuffer	27-0948	Amersham Pharmacia

2.1.6 Primer und Oligonukleotide

Name:	Sequenz:
Bamkon	5'-CGGATCCCAAGCTGGCTAGCAG-3'
E1-FW	5'-TAATACGACTCACTATAGGGACTTGGCCTTACACTCCGCT-3'
E1-R	5'-CACTCGAGGGTAGAGAACCCT-3'
IEX-II-FW	5'-TCTAGACTCGAGTGGTGAGTATCGC-3'
IEX-II-R	5'-GTTTAAACCGGACCTAAGGGGAGAC-3'
IEX-1-R	5'-GGCGATCTCGACAGTCGCTC-3'
Kin-FW	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTCCGGCGCCAGCTGCCAGTC-3'
Kin-R	5'-GTACGCCTGGTGTTCCTTTG-3'
NBP-1	5'-TAAGTGGACTCCCCGCACTC-3'
NBP-2	5'-GACGCTCTCCTTCCCACC-3'
pBabe2FW	5'-AGGTGAAGTATGATGATCCTT-3'
pBabe9FW	5'-GCAGAACTGATGAGTCCTTC-3'
pBabe9R	5'-CACCATCGTTTCGTCCCGAA-3'
pBabe10R	5'-ATCGTCTTTTCGTCCCGAAG-3'
pBabe-F*	5'-TTTAAACGTCGGATGGCCGCGA-3'
pBabe-R*	5'-GTCGACGCTGATCAGCGGGTTTAA-3'
PCR3-R	5'-TGGCAACTAGAAGGCACAGTC-3'
R1-RNA	5'-CGAGAGUCUGAUGAGUCCUUCGGGACGAAACACAUGGU-3'
R2-FW	5'-CTAGCAGGTGAACTGATGAGTCCTTCGGGACGAAATCTCAGGCT-3'
R2-R	5'-CTAGAGCCTGAGATTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTTCACCTG-3'
R8-FW	5'-CTAGCAGAAGACCTGATGAGTCCTTCGGGACGAAATGGTGAGCT-3'
R8-R	5'-CTAGAGCTCACCATTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGGTCTTCTG-3'
R9-FW	5'-CTAGCGGCAGAACTGATGAGTCCTTCGGGACGAAACGATGGTGT-3'
R9-R	5'-CTAGACACCATCGTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTTCTGCCG-3'
R10-FW	5'-CTAGCTCTGGCACTGATGAGTCCTTCGGGACGAAAAGACGATCT-3'
R10-R	5'-CTAGAGATCGTCTTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTGCCAGAG-3'
Ribo 1	5'-ACCATGTGTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGACTCTCGCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 2	5'-TCCTGAGATTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTTCACCTCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 3	5'-CTTACCTTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGGACCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 4	5'-TGTGTCACTTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTCGCAGCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 5	5'-TTCGACCCTTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTCCCGGACCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 6	5'-CCAGCGCCTTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTCGCGGGCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 7	5'-AAAAGGCTTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTCTTCTCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 8	5'-GCTCACCATTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGGTCTTCTCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 9	5'-CACCATCGTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTTCTGCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 10	5'-CATCGTCTTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTGCCAGACCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 11	5'-ATCTGACTTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGGGAGCCCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Ribo 12	5'-GGCCGCCTTTTCGTCCCGAAGGACTCATCAGTAACTGGCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
Salkon	5'-ACAGTCGACGCTGATCAGCGGG-3'
T7P	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'

Name:	Sequenz:
TAG5*	5'-ATACGACTCACTATAGGGAGACC-3'
TAGR*	5'-TAGAAGGCACAGTCCAGG-3'

Die Primer wurden von der Firma Biometra synthetisiert, wobei die Stammlösung 0,1 nmol/μl enthielt. Die mit * gekennzeichneten Primer waren IRD41-markiert und wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

2.1.7 Reagenzien für den Apoptose-Assay und die Zellzyklusanalyse

Reagenz:	Katalognummer:	Hersteller
anti-Fas 7C11 Monoclonal Antibody	2387	Immunotech
ApoAlert™ Annexin V-FITC	8133-1	Clontech
Doxorubicin HCl	GR-318	Biomol
Etoposid	GR-307	Biomol
MG-132	PI-102	Biomol
Propidiumjodid	P-4170	Sigma
Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)	T-6674	Sigma

2.1.8 Geräte und sonstige Materialien

Name:	Hersteller:
96-well-Platte	Costar®
Agagel Mini (6,5 x 9 cm)	Biometra
BioDoc-Video-System	Biometra
Biofuge fresco	Heraeus
Biofuge 28 RS	Heraeus
Brutschrank BBD 6220	Heraeus
Fastblot B 34	Biometra
Folienschweißgerät Folio	Severin
Galaxy Flow Cytometry System	Dako
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
GeneQuant II RNA/DNA-Calculator	Amersham Pharmacia
GS Gene Linker™	BioRad
Hera safe-Cleanbench	Heraeus
Hybond™N ⁺ Nylon-Transfermembranen	Amersham Pharmacia
Hybridisierungsöfen OV 3	Biometra
Scientific Imaging Film Biomax™ MR	Kodak
Immobilon™-P Transfer-Membranen	Millipore
75 cm ² -Kulturflaschen	Sarstedt
Laborautoklav GVA 570	Fritz Gössner GmbH & Co
Laborwaage PT 1200	Sartorius
LI-COR DNA-Sequencer Model 4000L	MWG Biotech
Lichtmikroskop ID03	Zeiss
Megafuge 1.0	Heraeus
Multigel-Long-Elektrophoresekammer (11 x 12 cm)	Biometra
Nalgene® Cryoware™ Cryogenic Vials	Nalge Nunc International
Nalgene® Sterilfilter 0,2 μm	Nalge Nunc International
Pipettenspitzen 10 μl, 200 μl und 1000 μl	Sarstedt
Plattenphotometer MR5000	Dynatech
50 ml Röhrchen mit Schraubverschluß	Sarstedt
Safe-Lock 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schütteltisch WT 16	Biometra

Name:	Hersteller:
PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml Petrischalen mit Nocken Pipetman P10, P20, P100, P200 und P1000 Sixwellplatten, Cell⁺, F-Boden Sterile Acrodisc[®] 0,45 µm Filter Thermomixer 5436 UV-Schirm T 2202 Video Copy Processor P66DE Vortexer VF 2 Wasserbad 1083	Roth Sarstedt Gilson Sarstedt Gelman Sciences Eppendorf Sigma Mitsubishi Janke & Kunkel GFL

2.1.9 Puffer und Lösungen

2.1.9.1 Puffer und Lösungen für die Elektrophorese

2.1.9.1.1 6 x Agarose-Auftragspuffer (nach Sambrook et al., 1989)

Glycerin:	3 ml (30 % v/v)
Bromphenolblau:	25 mg (0,25 % w/v)
Xylencyanol FF:	25 mg (0,25 % w/v)
destilliertes Wasser:	ad 10 ml

2.1.9.1.2 6 x PAA-Auftragspuffer (nach Sambrook et al., 1989)

Bromphenolblau:	10 mg (0,1 % w/v)
Xylencyanol FF:	10 mg (0,1 % w/v)
0,5 M EDTA (pH 8):	200 µl (10 mM)
Formamid:	ad 10 ml

2.1.9.1.3 HF-Auftragspuffer (Harnstoff-Formamid)

Harnstoff:	4,8 g (8 M)
Formamid:	5 ml (50 % v/v)
Bromphenolblau:	3 mg (0,03 % w/v)
Xylencyanol FF:	3 mg (0,03 % w/v)
RNase-freies Wasser (siehe 2.1.9.2.1):	ad 10 ml

2.1.9.1.4 2 x Laemmli-Lysis- und Auftragspuffer

Tris Base:	15,5 g (128 mM)
SDS:	46 g (4,6 % w/v)
Glycerin:	100 ml (10 % v/v)
Bromphenolblau:	50 mg (0,005 % w/v)
destilliertes Wasser:	ad 1000 ml
	pH 7,6

2.1.9.1.5 10 x Tris Buffered EDTA (TBE - nach Sambrook et al., 1989)

Tris Base:	108 g (0,9 M)
Borsäure:	55 g (0,9 M)
0,5 M EDTA (pH 8):	40 ml (20 mM)
destilliertes Wasser:	ad 1000 ml

2.1.9.1.6 5 x TBE, 1 x TBE und 0,5 x TBE

Die Puffer wurden durch Verdünnung von 10 x TBE mit sterilem Wasser hergestellt.

2.1.9.1.7 5 x Formaldehyd-Laufpuffer (nach Sambrook et al., 1989)

MOPS:	20,6 g (0,1 M)
Natriumazetat:	5,44 g (40 mM)
0,5 M EDTA (pH 8):	10 ml (5 mM)
destilliertes Wasser:	ad 1000 ml
	pH 7

2.1.9.1.8 1 x Western-Laufpuffer

Tris Base:	15,45 g (25 mM)
Glycin:	72,05 g (192 mM)
SDS:	5 g (0,1 % w/v)
destilliertes Wasser:	ad 5000 ml

2.1.9.1.9 Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid:	0,5 mg
1 x TBE:	1000 ml

2.1.9.1.10 native Polyacrylamid-Gele

	achtprozentig
37:1 Acrylamid/bis-acrylamid-Lösung (40%ig):	3 ml
5 x TBE-Puffer:	3 ml
destilliertes Wasser:	9 ml
10%ige AMPS-Lösung:	150 µl
TEMED:	15 µl

2.1.9.1.11 denaturierende Polyacrylamid-Gele (7 M Harnstoff)

	zwölfprozentig	achtprozentig	fünfprozentig
37:1 Acrylamid/bis-acrylamid-Lösung (40%ig):	4,5 ml	3 ml	1,9 ml
5 x TBE-Puffer:	3 ml	3 ml	3 ml
Harnstoff:	6,3 g	6,3 g	6,3 g
RNase-freies Wasser:	ad. 15 ml	ad. 15 ml	ad. 15 ml
10%ige AMPS-Lösung:	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED:	15 µl	15 µl	15 µl

2.1.9.2 Puffer und Lösungen für den Umgang mit RNA

2.1.9.2.1 RNase-freies Wasser

DEPC: 2,5 ml (0,1 % v/v)
 destilliertes Wasser: ad 2,5 Liter

Das Wasser wurde über Nacht bei 37 °C auf einem Schütteltisch bei 250 Upm. inkubiert und am folgenden Tag autoklaviert.

2.1.9.2.2 PAA-Elutionspuffer

Tris Base: 0,61 g (0,5 M)
 EDTA: 0,37 mg (0,1 mM)
 Magnesiumchlorid-Lösung (1 M): 10 µl (1 mM)
 RNase-freies Wasser: ad 10 ml

Nach dem Autoklavieren wurden der Lösung 10 mg SDS (0,1 % w/v) zugegeben.

2.1.9.2.3 10 x Ribozym-Reaktionspuffer

Tris Base: 48,6 g (0,4 M)
 RNase-freies Wasser: 1000 ml
 pH 7,5

2.1.9.2.4 20 x Standard Saline Citrate (SSC – nach Sambrook et al., 1989)

Natriumchlorid: 175,3 g (3 M)
 Natriumzitat: 88,2 g (0,3 M)
 RNase-freies Wasser: ad 1000 ml

2.1.9.2.5 2 x SSC und 0,1 x SSC

Die Puffer wurden aus 20 x SSC durch Verdünnung mit RNase-freiem Wasser hergestellt.

2.1.9.3 Puffer und Lösungen für den Western-Blot

2.1.9.3.1 Western-Trenngel-Puffer

Tris Base:	363,4 g (1,5 M)
SDS:	8 g (0,4 % w/v)
destilliertes Wasser:	ad 2000 ml. pH 8,8

2.1.9.3.2 Western-Sammelgel-Puffer

Tris Base:	121,1 g (0,5 M)
SDS:	8 g (0,4 % w/v)
destilliertes Wasser:	ad 2000 ml pH 6,8

2.1.9.3.3 12,5%iges Trenngel (15 ml)

30%ige PAA-Lösung:	5 ml
Trenngel-Puffer:	6,25 ml
destilliertes Wasser:	5 ml
10%ige AMPS-Lösung:	50 µl
TEMED:	20 µl

2.1.9.3.4 Sammelgel (5 ml)

destilliertes Wasser:	3 ml
30%ige PAA-Lösung:	0,75 ml
Sammelgel-Puffer:	1,25 ml
10%ige AMPS-Lösung:	15 µl
TEMED:	10 µl

2.1.9.3.5 Coomassie-Färbelösung (1 Liter)

Methanol:	200 ml (20 % v/v)
Essigsäure:	125 ml (12,5 % v/v)
Coomassie-Brillantblau R250:	2 g (0,2 % w/v)
destilliertes Wasser:	ad 1000 ml

2.1.9.3.6 Coomassie-Entfärber

Wie Coomassie-Färbelösung, nur ohne Coomassie-Brillantblau R250.

2.1.9.3.7 Transferpuffer

Tris Base:	3 g (25 mM)
Glycin:	56,3 g (150 mM)
Methanol:	100 ml (10 % v/v)
destilliertes Wasser:	ad 1000 ml
	pH 8,3

2.1.9.3.8 Ponceau-S-Färbelösung

Ponceau S:	2,5 g (0,25 % w/v)
Essigsäure:	150 ml (15 % v/v)
Methanol:	400 ml (40 % v/v)
destilliertes Wasser:	ad 1000 ml

2.1.9.3.9 Tris Buffer Saline (TBS)

Tris Base:	2,42 g (20 mM)
Natriumchlorid:	8,18 g (140 mM)
destilliertes Wasser:	ad 1000 ml
	pH 7,6

2.1.9.3.10 Western-Blockierungslösung

TBS:	1000 ml
Tween-20:	0,5 ml (0,05 % v/v)
Magermilchpulver:	50 g (5 % w/v)

2.1.9.4 LBA-Medium zur Anzucht von TOP10F'-Zellen

Bacto Trypton:	10 g (1 % w/v)
Bacto Hefeextrakt:	5 g (0,5 % w/v)
Natriumchlorid:	10 g (0,17 M)
destilliertes Wasser:	ad 1000 ml
	pH 7

bei Festmedium:	
Bacto Agar:	15 g

Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen des Mediums auf ca. 60 °C wurden 50 mg Ampicillin in 10 ml Wasser gelöst und dem Medium sterilfiltriert zugegeben (Endkonzentration: 50 µg/ml).

2.2 Molekularbiologische Methoden

Für viele der durchgeführten Methoden wurden kommerziell erhältliche Kits verwendet (siehe 2.1.5). Sofern nicht anders erwähnt, entsprach die Durchführung dieser Methoden den Angaben in den Herstellerprotokollen.

2.2.1 Elektrophorese von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Native und denaturierende Polyacrylamid(PAA)-Gelelektrophorese (PAGE)

DNA-Ansätze wurden mit 1/6 Volumen 6 x PAA-Auftragspuffer und RNA-Proben mit einem Volumen HF-Auftragspuffer gemischt. Vor dem Auftrag mußten RNA/HF-Auftragspuffergemische fünf Minuten bei 65 °C denaturiert werden. In der Regel fanden achtprozentige PAA-Gele für DNA-Proben und achtprozentige PAA-Gele, 7 M Harnstoff für RNA-Proben Verwendung. Als Laufpuffer diente 1 x TBE, wobei die Elektrophoresen bei 250 Volt liefen. Der Nachweis von Nukleinsäuren verlief in der Regel durch zwanzigminütige Inkubation der PAA-Gele in Ethidiumbromidlösung und anschließende UV-Exposition (312 nm).

2.2.1.2 Native und denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6 x Agarose-Auftragspuffer gemischt und auf einprozentigen Agarose-Gelen (0,5 g Agarose + 2,5 µg Ethidiumbromid in 50 ml 1 x TBE) bei 100 Volt aufgetrennt. Da die Gele bereits Ethidiumbromid enthielten, konnte DNA direkt auf einem UV-Schirm detektiert und mit einer Polaroid-Kamera photographiert werden. RNA-Proben wurden mit einem Volumen HF-Puffer gemischt, fünf Minuten bei 65 °C denaturiert und auf einprozentigen Agarose-Gelen, 20 % Formalin (v/v) aufgetrennt.

2.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte photometrisch mit dem „GeneQuant II RNA/DNA-Calculator“ der Firma Pharmacia. Hierzu wurden die Lösungen 1:50 mit sterilem Wasser verdünnt.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist seit Jahren die Standardmethode zur Amplifikation von DNA-Molekülen. Da hierbei die unterschiedlichsten Protokolle Verwendung finden, werden die für diese Arbeit gültigen Zusammensetzungen der PCR-Ansätze sowie die Bedingungen für die Amplifikation der jeweiligen DNA exemplarisch erläutert. Alle hier durchgeführten PCRs fanden im 30- μ l-Maßstab statt und folgten einem einheitlichen Schema.

2.2.3.1 Standard-DNA-Amplifikationen

2.2.3.1.1 Berechnung der Annealingtemperatur für die PCR

In einem ersten Schritt wurde die Schmelztemperatur (T_m) für die jeweils verwendeten Primer berechnet (DNA Sequencing Manual, LI-COR[®]):

$$T_m = 69,3 \text{ °C} + (0,41 \times \text{GC-Gehalt}) - (650/\text{Primerlänge})$$

Die Annealingtemperatur lag jeweils 3 °C unter dem Mittelwert der beiden primer-spezifischen T_m -Werte.

2.2.3.1.2 Amplifikation der DNA

Zu Beginn der PCR wurden die Proben fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Es folgten 25 Zyklen, bei denen die Proben jeweils 30 Sekunden bei 95 °C denaturiert, 30 Sekunden annealt und eine Minute lang bei 72 °C elongiert wurden. Schließlich wurde der letzte Elongations-schritt durch eine siebenminütige Inkubation der Proben bei 72 °C abgeschlossen.

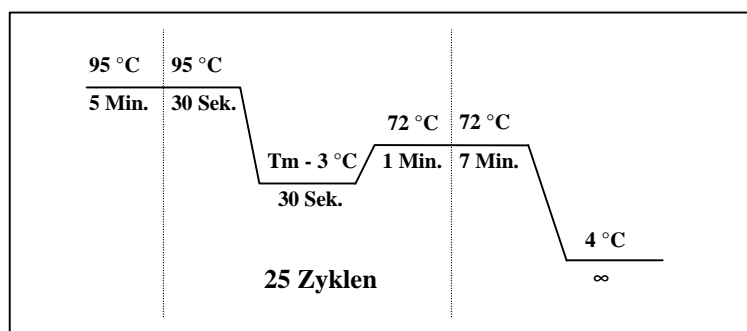


Abb. 6: Standard-PCR-Programm zur spezifischen Amplifikation von DNA-Abschnitten

2.2.3.1.3 Zusammensetzung eines einfachen PCR-Ansatzes

destilliertes Wasser:	12,4 µl
10 x PCR-Puffer (Life Technologies):	3 µl
50 mM MgCl ₂ -Lösung (Life Technologies):	0,9 µl
dNTP-Mix (Perkin Elmer: jedes dNTP = 2,5 mM):	2,4 µl
Vorwärts-Primer (Biometra: 5 pmol/µl):	3 µl
Rückwärts-Primer (Biometra: 5 pmol/µl):	3 µl
Plasmid-Template-DNA (1 ng/µl):	5 µl
Taq-DNA-Polymerase (Life Technologies: 5 U/µl):	0,3 µl

2.2.3.2 Durchführung der PCR unter Bedingungen, bei denen zusätzliche DNA-Abschnitte in das PCR-Produkt eingefügt werden sollten

Zur Erläuterung wird die Berechnung der Annealingtemperatur am Beispiel des Primerpaares E1-FW/E1-R durchgeführt. Um die IEX-1/Exon1-DNA am 5'-Ende mit einem T7-Promotor zu versehen, wurde einem der PCR-Primer (E1-FW) die entsprechende Sequenz vorgeschaltet und somit ins PCR-Produkt eingebaut (Mullis and Faloona, 1987; Stoflet et al., 1988). Der T7-Promotorsequenz folgte die Transkriptions-Initiationssequenz GGG (Milligan et al., 1987) und erst der dritte Abschnitt des Primers entsprach dem 5'-Ende des IEX-1/Exon1.

Die Bedingungen für die ersten drei Zyklen wurden so berechnet, daß nur die 20 Basenpaare des Exon1-Anteils des Primers E1-FW mit dem Template hybridisieren konnten, da das Template weder die T7-Promotor- noch die Initiationssequenz enthielt. Mit der unter 2.2.3.1.1 aufgeführten Formel wurde eine Annealingtemperatur von 58 °C errechnet. Bei der Berechnung der Bedingungen für die folgenden Zyklen wurde davon ausgegangen, daß der gesamte Primer E1-FW inklusive T7-Promotor und Initiationssequenz an das Template band, da durch die ersten drei Durchgänge genug entsprechendes Template entstanden war ($T_m = 68\text{ °C}$).

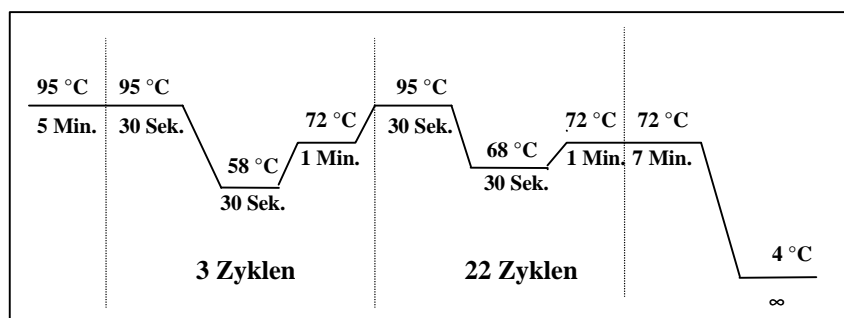


Abb. 7: E1-FW/E1-R-PCR zur Einfügung eines T7-Promotors ins PCR-Produkt

Die weitere Amplifikation der DNA sowie die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes entsprachen den Abschnitten 2.2.3.1.2 und 2.2.3.1.3.

2.2.3.3 Generierung von IEX-1-DNA-Templates für die *in vitro*-Transkription

Um die Aktivität von Ribozymen charakterisieren zu können, sind entsprechende RNA-Substrat-Moleküle nötig. Diese müssen durch *in vitro*-Transkription aus DNA-Matrizen generiert werden, die über einen vorgeschalteten Promotor verfügen. Über diesen Promotor wird die verwendete RNA-Polymerase an die Matrizen-DNA dirigiert.

2.2.3.3.1 *Generierung eines IEX-1/Exon1-DNA-Templates mit 5'-vorgeschaltetem T7-Promotor mittels PCR*

Die Berechnung der Annealingtemperatur sowie die Durchführung der PCR erfolgten wie unter 2.2.3.2 erläutert. Die Proben wurden im Anschluß auf einprozentige Agarose-Gele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, die DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) eluiert.

2.2.3.3.2 *Generierung eines IEX-1/Exon2-Fragments (Nukleotide 241-561) mit vorgeschaltetem T7-Promotor*

Die DNA-Amplifikation erfolgte mit den Primern Kin-FW und Kin-R. Das resultierende Fragment hatte inklusive T7-Promotor eine Länge von 340 Bp und enthielt neben dem Promotor und der Initiationssequenz GGG auch die Sequenz der ersten 320 Bp aus dem Exon 2 des IEX-1. Die Versuchsdurchführung entsprach der unter Abschnitt 2.2.3.3.1 beschriebenen.

2.2.3.3.3 *Generierung eines IEX-1-DNA-Templates mit vorgeschaltetem T7-Promotor*

Neben E1-FW kam hier der Primer IEX-1-R zum Einsatz. Im Anschluß an die Amplifikation wurden die DNA-Fragmente wie unter Abschnitt 2.2.3.3.1 beschrieben aufgetrennt und eluiert.

2.2.4 RNA-Synthese und -Aufreinigung

Aus den unter 2.2.3 generierten und aufgereinigten T7-DNA-Templates wurden durch *in vitro*-Transkription RNA-Moleküle synthetisiert, die unterschiedliche Abschnitte der IEX-1-RNA darstellten. Diese RNA-Fragmente dienten als Substrate für die Untersuchung der Aktivität verschiedener Ribozyme.

2.2.4.1 Synthese der Ribozyme 1-12

2.2.4.1.1 Auswahl und Konstruktion der Ribozyme

Nach Zoumadakis & Tabler (1995) spalten Ribozyme innerhalb einer RNA sogenannte NUH↓-Motive mit hoher Effektivität, wobei N für jedes der vier möglichen Nukleoside und H für Adenosin, Cytidin oder Uridin steht. Zudem beschrieben Clouet-d'Orval & Uhlenbeck (1997), daß ein 3' der NUH↓-Sequenz liegendes Uridin einen positiven Effekt auf die Ribozymaktivität ausüben würde. Aus diesem Grunde wurde die IEX-1-Sequenz in einem ersten Schritt gezielt nach NUH↓- und NUH↓U-Motiven untersucht. Gegen diese Motive mit ihren 5'- und 3'-flankierenden Heptanukleotiden konnten *Hammerhead*-Ribozyme konstruiert werden, die stets den gleichen Kernbereich (Position 3-15.1 - vgl. Hertel et al., 1992; Tuerk et al., 1988) enthielten. Die Sequenz der Antisense-Bereiche richtete sich nach der Sequenz der Heptanukleotide, welche das NUH↓-Motiv beidseitig flankierten. Die Ribozymsequenzen ließen sich am Computer auf ihre Sekundärstruktur hin untersuchen (DNASIS v2.5; RNAstructure v3.5). Zudem wurden die Ribozyme mit optimaler Sekundärstruktur in der Computersimulation über einen oligo-dA₂₅-Schwanz an ihre jeweilige Substrat-RNA (IEX-1/Exon1 bzw. IEX-1/Exon2) angehängt und die Faltung des Ribozym/Substratkomplexes berechnet. Von den Ribozym/Substratkomplexen mit optimaler Sekundärstruktur wurden zwölf ausgewählt und die notwendigen Oligonukleotide zur Synthese der Ribozyme bei der Firma Biometra synthetisiert (vgl. 2.1.6: Ribo1-12, T7P).

2.2.4.1.2 Annealing der Oligonukleotide

Die einzelnen Ribozymoligonukleotide wurden fünf Minuten bei 95 °C denaturiert, mit equimolaren Mengen T7P gemischt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Infolge dieser Abkühlung verbanden sich die T7P-Oligonukleotide mit den Ribozym-Templates im Promotorbereich zu partiellen Doppelstrang-Molekülen.

2.2.4.1.3 *In vitro*-Transkription der Ribozyme

Folgende Ribozyme wurden im Verlaufe der Transkriptionen synthetisiert:

Ribozym Nr.	Sequenz	Spaltet IEX-1-RNA an Position
1	5'-ggg-cgagagu-cugaugaguccuucgggacgaa-acacauggu-3'	36
2	5'- ggg-aggugaa-cugaugaguccuucgggacgaa-aucucagga-3'	134
3	5'- ggg-gaggguc-cugaugaguccuucgggacgaa-aaggugaag-3'	143
4	5'- ggg-gcugcga-cugaugaguccuucgggacgaa-agugacaca-3'	40
5	5'- ggg-uccggga-cugaugaguccuucgggacgaa-agggucgaa-3'	150
6	5'- ggg-cccgcga-cugaugaguccuucgggacgaa-aggcgcugg-3'	193
7	5'- ggg-aaaaaga-cugaugaguccuucgggacgaa-agccuuuu-3'	288
8	5'- ggg-agaagac-cugaugaguccuucgggacgaa-auggugagc-3'	308
9	5'- ggg-ggcagaa-cugaugaguccuucgggacgaa-acgauggug-3'	311
10	5'- ggg-ucuggca-cugaugaguccuucgggacgaa-aagacgaug-3'	314
11	5'- ggg-gggcucc-cugaugaguccuucgggacgaa-aagucagau-3'	436
12	5'- ggg-ccaguua-cugaugaguccuucgggacgaa-aaggcggcc-3'	497

Tab. 1: Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten Ribozyme sowie deren Spaltposition innerhalb der IEX-1-mRNA (vgl. Abb. 8 und Abb. 11)

Die in Tabelle 1 aufgeführten Ribozyme verfügten über einen konstanten Kernbereich (vgl. Abb. 8) und sollten zusammen mit ihrer Substrat-RNA im Idealfall folgende Sekundärstruktur annehmen:

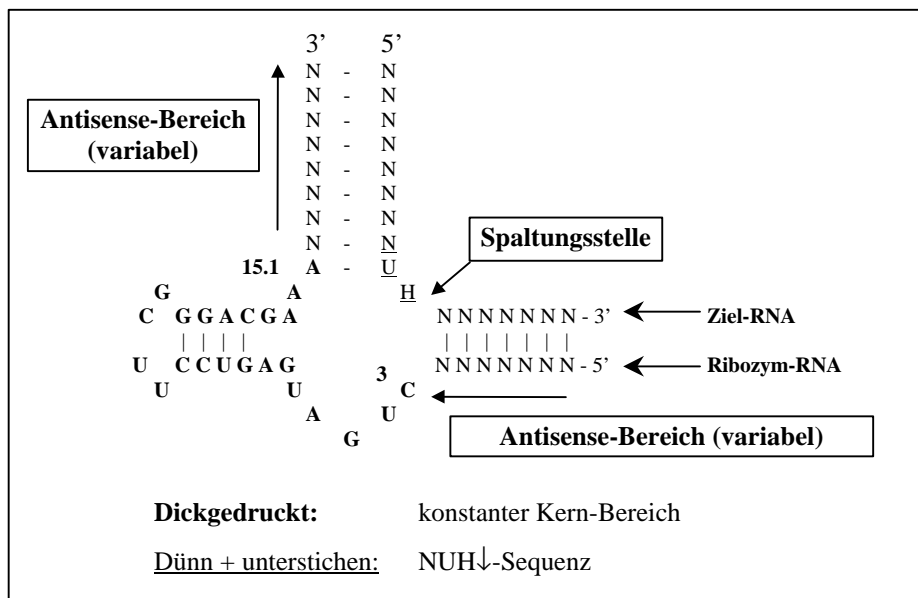


Abb. 8: Konsensus-Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten *Hammerhead*-Ribozyme

Die *in vitro*-Transkription der Ribozyme erfolgte mit dem „AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit“ (Epicentre Technologies). Für die Transkription eines jeden Ribozyms wurden vier µl der zuvor gepaarten Templates auf 40 µl Gesamtansatz verwendet. In Bezug auf Art und Menge der übrigen Komponenten entsprach der Ansatz dem Herstellerprotokoll. Um eine spätere Zuordnung des Transkriptes im Polyacrylamid-Gel zu erleichtern, wurde das DNA-Template im Anschluß an die Transkription durch Zugabe von 2 µl DNaseI/Ansatz (1 U/µl - Epicentre Technologies) und zwanzigminütige Inkubation bei 37 °C eliminiert.

2.2.4.1.4 *Fällung und Reinigung der Ansätze, Elektrophorese, Elution und Aufreinigung der Eluate*

Die Fällung und Aufreinigung der Transkripte verlief wie von Krupp (1997) beschrieben. Die getrockneten Pellets wurden in jeweils 200 µl HF-Auftragspuffer aufgenommen, 20 Minuten bei 37 °C und 250 Upm. auf einem Thermomixer resuspendiert und fünf Minuten bei 65 °C denaturiert. Für die elektrophoretische Auftrennung der Transkripte wurden zwölfprozentige PAA-Gele, 7 M Harnstoff verwendet. Als Längenstandard diente synthetisch hergestellte R1-RNA (vgl. 2.1.6). Die aufgereinigte RNA wurde in je 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und photometrisch quantifiziert.

2.2.4.2 *Synthese der IEX-1/Exon1-RNA*

2.2.4.2.1 *in vitro-Transkription der IEX-1/Exon1-RNA*

Die Versuchsdurchführung folgte dem „AmpliScribe™ T7 High Yield Transkription Kit“-Handbuch (Epicentre Technologies). Dabei wurde ein 100 µl-Ansatz pipettiert (5 µg T7-Exon1-DNA als Template) und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurde das DNA-Template durch DNaseI-Verdau aus dem Ansatz entfernt (vgl. 2.2.4.1.3).

2.2.4.2.2 *Fällung und Reinigung des Ansatzes sowie PAA-Gelelektrophorese*

Die Transkripte wurden wie unter 2.2.4.1.4 beschrieben aufgereinigt, auf ein achtprozentiges PAA-Gel, 7 M Harnstoff aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und eluiert. Als Längenstandard diente ein µg RNA-Leiter (Life Technologies).

2.2.4.3 Synthese eines IEX-1/Exon2-Fragments (Position 241-561)

Als Template diente hier das unter 2.2.3.3.2 generierte T7-Exon2-Fragment. Ansonsten entsprach die Durchführung dem unter 2.2.4.2 beschriebenen Transkriptionsprotokoll! Der Einfachheit halber wird die IEX-1/Exon2-Fragment-RNA in der Folge grundsätzlich als IEX-1/Exon2-RNA bezeichnet.

2.2.4.4 Synthese der IEX-1-RNA

2.2.4.4.1 *in vitro*-Transkription der IEX-1-RNA

Dem Herstellerprotokoll folgend (MEGAscript™ *in vitro* Transcription Kit) wurde ein 100- μ l-Ansatz mit fünf μ g Template-DNA (T7-IEX-1-DNA) pipettiert und drei Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.4.2 Fällung und Aufreinigung der Transkripte sowie PAA-Gelelektrophorese

Die RNA wurde durch Lithiumchlorid-Präzipitation ausgefällt („MegaScript™ *in vitro* Transcription Kit“-Handbuch), die aufgereinigten Pellets in je 200 μ l HF-Auftragspuffer aufgenommen und zwanzig Minuten bei 37 °C und 250 Upm. auf einem Thermomixer resuspendiert. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 65 °C erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der RNA auf einem fünfprozentigen PAA-Gel, 7 M Harnstoff. Die weitere Behandlung der Proben entsprach dem unter 2.2.4.1.4 beschriebenen Protokoll.

2.2.5 *In vitro*-Spaltung der RNA-Moleküle durch die Ribozyme 1-12

Um qualitative Hinweise auf die mögliche Aktivität der synthetisierten Ribozyme zu erhalten, wurden *in vitro*-Spaltungsreaktionen durchgeführt. Dabei wurden die verschiedenen RNA-Substratmoleküle mit jeweils einem der für diesen Abschnitt spezifischen Ribozyme in Gegenwart von Magnesiumchlorid inkubiert. Im Falle einer Spaltung der Substrat-RNA konnten sich die Spaltprodukte dann durch Gelelektrophorese und anschließende Färbung der RNA-Banden nachweisen lassen.

2.2.5.1 Spaltung der IEX-1/Exon1-RNA durch die Ribozyme 1-6

2.2.5.1.1 Durchführung der Spaltungsreaktion

In jedem der sechs Ansätze wurden zehn pmol IEX-1/Exon1-RNA, 20 pmol des zu testenden Ribozyms und zwei µl 10 x Ribozym-Reaktionspuffer mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 19,5 µl aufgefüllt. Ein weiterer Ansatz ohne Ribozym-RNA diente als Kontrolle. Die Komponenten wurden gemischt, fünf Minuten bei 65 °C denaturiert, auf 37 °C abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 µl 1 M Magnesiumchlorid-Lösung (Endkonzentration: 25 mM) gestartet. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 37 °C ließ sich die Reaktion durch Zugabe von zwei µl 300 mM EDTA (Endkonzentration: 30 mM) wieder stoppen.

2.2.5.1.2 Fällung und Aufreinigung der Ansätze sowie PAA-Gelelektrophorese

Die Fällung und Aufreinigung der Ansätze verlief wie von Krupp (1997) beschrieben. Die Pellets wurden in je 20 µl HF-Auftragspuffer aufgenommen und 20 Minuten bei 250 Upm. und 37 °C im Thermomixer resuspendiert. Die Elektrophorese der Spaltprodukte sowie deren Nachweis durch Ethidiumbromidfärbung erfolgte wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.5.2 Spaltung der IEX-1/Exon2-RNA durch die Ribozyme 7-12

Die Versuchsabfolge entsprach der der Exon1-Spaltung durch die Ribozyme 1-6, nur daß je zehn pmol IEX-1/Exon2-RNA und 20 pmol RNA der Ribozyme 7-12 eingesetzt wurden.

2.2.5.3 Spaltung der IEX-1-RNA durch die Ribozyme 1-12

2.2.5.3.1 Durchführung der Spaltungsreaktion und Silberfärbung

Da die IEX-1-RNA nur in geringem Umfang synthetisiert werden konnte, wurden für die *in vitro*-Spaltung ein pmol IEX-1-RNA und zehn pmol Ribozym-RNA verwendet. Die Durchführung der Restriktion entsprach der IEX-1/Exon1-RNA-Spaltung durch die Ribozyme 1-6. Die Fällung, Aufreinigung und Elektrophorese der Spaltprodukte erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Färbung des PAA/Harnstoffgels wurde mit dem „Silver Stain Plus-Kit“ (BioRad) durchgeführt.

2.2.6 Erstellung von Ribozymkinetiken

Die Erstellung von Ribozymkinetiken diente dem quantitativen Nachweis der katalytischen Aktivität der Ribozyme. Sie wurde in Anlehnung an das von Hendry et al. (1997) publizierte Protokoll durchgeführt. Um auf eine radioaktive Endmarkierung der Substrat-RNA verzichten zu können, wurden Substratmengen verwendet, die sich auch durch Ethidiumbromidfärbung nachweisen ließen.

2.2.6.1 Erstellung von Kinetiken für die Ribozyme 1-6

2.2.6.1.1 Durchführung der Spaltungsreaktion und der Elektrophorese

Als Substrat für die Ribozyme 1-6 diente IEX-1/Exon1-RNA (240 Bp). Die Erstellung der Kinetiken verlief weitestgehend wie unter 2.2.5.1.1 beschrieben, nur daß pro Ansatz 30 pmol Substrat und 60 pmol Ribozym eingesetzt wurden. Sofort nach der Zugabe von Magnesiumchlorid wurden zwei µl des Ansatzes entnommen und die Reaktion in diesem Aliquot durch Zugabe von zwei µl HF-Auftragspuffer gestoppt (Null-Minuten-Wert). Diese Prozedur wiederholte sich nach 30 Sekunden sowie 2, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten, wobei die Aliquots nach zweiminütiger Denaturierung bei 65 °C auf ein achtprozentiges PAA-Gel, 7 M Harnstoff aufgetragen wurden. Im Anschluß an die Elektrophorese erfolgte die Ethidiumbromidfärbung der RNA-Banden.

2.2.6.1.2 Auswertung der Kinetiken

Die Gele ließen sich mit dem BioDoc-Video-System von Biometra photographieren, als Bitmap-Dateien abspeichern und am Computer auswerten (ScanPack Version 3.0 - Biometra). Dabei wurden die Intensitäten der Bande mit dem Spaltprodukt und der Substratbande (IEX-1/Exon1-RNA) ermittelt und die Intensität der Spaltproduktbande aufgrund ihrer geringeren Länge mit einem Korrekturfaktor multipliziert, so daß sie mit der Substratbandenintensität vergleichbar war. So wurde z.B. im Falle des Ribozyms 2 (Substratbande = 240 nt, Spaltprodukt = 134 nt) ein Korrekturfaktor von $240/134 = 1,765$ ermittelt. Mit den so errechneten Werten konnte unter Zuhilfenahme des Programms „Microsoft Excel für Windows 98“ ein Kurvendiagramm erstellt werden.

2.2.6.2 Erstellung von Kinetiken für die Ribozyme 8-12

Für die Kinetiken der Ribozyme 8-12 wurde IEX-1/Exon2-RNA (Position 241-561) als Substrat verwendet. Die Durchführung der Spaltungsreaktion, die Elektrophorese und die Auswertung der Kinetiken entsprachen dem Abschnitt 2.2.6.1.

2.2.7 Northern-Blot

In einem nächsten Schritt der *in vitro*-Charakterisierung sollte sichergestellt werden, daß die Ribozyme nicht nur synthetisch hergestellte Substrat-RNA schneiden, sondern auch in der Lage sind, IEX-1-RNA in einem zellulären Gesamt-RNA-Ansatz zu erkennen und zu spalten. Hierfür wurde T-REx™-293-RNA isoliert, mit verschiedenen Ribozymen inkubiert, auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und die IEX-1-RNA sowie eventuelle Spaltprodukte mit einer spezifischen [α -³²P]dCTP-markierten DNA-Sonde detektiert.

2.2.7.1 Spezifische IEX-1-Spaltung aus T-REx™-293-Gesamt-RNA

2.2.7.1.1 Zellkultur und Isolierung von Gesamt-RNA aus T-REx™-293-Zellen

Die Zellkultur erfolgte wie im Handbuch (Invitrogen) beschrieben. Eine 75cm²-Kulturflasche mit T-REx™-293-Zellen wurde durch Zugabe von 300 ng TNF α zur Expression von IEX-1 stimuliert, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, das Medium abgesogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN), wobei QIAshredder-Säulen (QIAGEN) zur Homogenisierung des Lysats Verwendung fanden.

2.2.7.1.2 Ribozymvermittelte IEX-1-Spaltung in T-REx™-293-Gesamt-RNA

In getrennten Ansätzen wurden jeweils 30 pmol der Ribozyme 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11 und 12 mit 20 μ g T-REx™-293-Gesamt-RNA sowie zwei μ l 10 x Ribozym-Reaktionspuffer gemischt und die Ansätze mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 19,5 μ l aufgefüllt. Ein Ansatz ohne Ribozym-RNA diente als Kontrolle. Die Spaltungsreaktion verlief wie unter 2.2.5.1.1 beschrieben. Die Aufarbeitung der Ansätze entsprach einem von Krupp (1997) beschriebenen Protokoll.

2.2.7.1.3 Herstellung der Sonden-DNA

Zur Amplifikation des Sonden-DNA-Templates mittels PCR wurden pCR[®]2.1/IEX-1-DNA als Matrize und die beiden Primer NBP-1 und NBP-2 verwendet. Die Ermittlung der Annealingtemperatur, die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie die Abfolge der Zyklen entsprachen dem unter 2.2.3.1 beschriebenen Standardprotokoll. Die Ansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Fragmente (235 Nukleotide) mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) eluiert. 50 ng dieses Eluates dienten als Template zur Herstellung [α -³²P]dCTP-markierter Sonden-DNA. Hierzu wurde das „Ready to go DNA Labelling Kit“ (Amersham Pharmacia) verwendet. Die Aufreinigung der Sonden-DNA erfolgte mit dem „QIAquick Nukleotide Removal Kit“ (QIAGEN).

2.2.7.1.4 Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese, Transfer der Proben auf eine Hybond-N⁺-Nylonmembran (Kapillarblot) und Methylenblau-Färbung der Membran

Die Protokolle für diese Versuche lassen sich in Sambrook et al. (1989, Seiten 7.37 – 7.50) nachlesen. Für die Fixierung der RNA auf der Nylonmembran wurde ein „GS Gene Linker™“ (BioRad) benutzt (150 mJoule/cm²).

2.2.7.1.5 Prähybridisierung, Hybridisierung, Waschen der Membran und Detektion der Signale

Die Hybridisierung erfolgte in „ExpressHyb™ Hybridization Solution“ (Clontech). Die Durchführung der Versuche entsprach der mitgelieferten Herstellervorschrift. Im Anschluß an die verschiedenen Waschschrte wurden die Signale auf einem „Scientific Imaging Film Biomax™ MR“ der Firma Kodak detektiert.

2.2.8 Klonierung von Ribozym-Template-DNA (R2, R8, R9 und R10) in den transienten Vektor pCR[®]3.1

Die Ribozyme 2, 8, 9 und 10 wurden aufgrund verschiedener Überlegungen (vgl. 3.4) für die Durchführung der Folgeversuche ausgewählt. Um die genannten Ribozyme auch in der Zellkultur unter *in vivo*-Bedingungen einsetzen zu können, wurden sie in den Expressionsvektor pCR[®]3.1 (Invitrogen[®]) kloniert.

Dieser Vektor konnte dann durch eine als Transfektion bekannte Methodik transient in T-REx™-293-Zellen geschleust werden und dort die gezielte Expression der in ihn ligierten Ribozyme steuern.

2.2.8.1 Phosphorylierung und Annealing der Ribozym-Oligonukleotide

Verschiedene Ribozymoligonukleotide (R2-FW, R2-R, R8-FW, R8-R, R9-FW, R9-R, R10-FW und R10-R) wurden so konstruiert, daß sie im Anschluß an eine Paarung der jeweils zwei zusammengehörigen Einzelstränge über 5'-Nhe-I- und 3'-Xba-I-Überhänge verfügten. Über diese Restriktionsschnittstellen war dann nach erfolgter Phosphorylierung der Ribozym-DNA eine Ligation in den Vektor möglich. Die Phosphorylierung von je 50 pmol der Oligonukleotide verlief der Herstellervorschrift folgend in getrennten Ansätzen mit T4-Polynukleotid-Kinase (Life Technologies). Die jeweils zusammengehörigen Oligonukleotid-Ansätze wurden nach zehnmütiger Hitzedenaturierung bei 65 °C vereinigt und auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei sich die Einzelstränge zu Doppelsträngen verbanden.

2.2.8.2 Nhe-I- und Xba-I-Restriktion des Plasmids pCR®3.1

Um die Ribozym-Templates in das Plasmid ligieren zu können, mußte dieses Nhe-I/Xba-I-geschnitten werden. Zur Berechnung der für die Spaltung von fünf µg pCR®3.1-DNA notwendigen Mengen Restriktionsendonuklease wurde folgende Formel benutzt:

$$X \text{ Units} = \frac{\text{Menge der Schnittstellen auf dem Plasmid}}{\text{Menge der Schnittstellen auf der Phagen-DNA}} \times \frac{\text{Größe des Phagengenoms}}{\text{Größe des Plasmids}}$$

Nach Einsetzen der Werte in obige Formel ergaben sich folgende Mengen:

$$\text{Nhe I: } 1/4 \times 36/5,6 = 1,6 \text{ U}/\mu\text{g Plasmid} \Rightarrow 8 \text{ U}/5 \mu\text{g Plasmid}$$

$$\text{Xba I: } 1/5 \times 36/5,6 = 1,3 \text{ U}/\mu\text{g Plasmid} \Rightarrow 6,5 \text{ U}/5 \mu\text{g Plasmid}$$

Die Zusammensetzung des Ansatzes entsprach dem Herstellerprotokoll. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz 15 Minuten bei 65 °C denaturiert, um die Enzyme zu deaktivieren.

2.2.8.3 Dephosphorylierung des Vektors, Elektrophorese und DNA-Elution

Da sich die überhängenden Enden an der Nhe-I- und Xba-I-Schnittstelle aufgrund ihrer Sequenzen miteinander paaren konnten (vgl. 2.2.8.7), mußte das Plasmid dephosphoryliert werden, um eine Selbstligation zu verhindern. Hierzu wurden dem Restriktionsansatz fünf µl 20 mM CaCl₂-Lösung zugegeben und das Gemisch im Thermoblock auf 30 °C abgekühlt. Durch Zugabe von fünf µl HKTM-Thermolabiler Phosphatase (Epicentre Technologies) und einstündige Inkubation bei 30 °C erfolgte die Dephosphorylierung der Plasmide. Im Anschluß an eine fünfzehnminütige Hitzedeaktivierung des Reaktionsansatzes bei 65 °C wurde die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt, das linearisierte Plasmid aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) eluiert.

2.2.8.4 Ligation der phosphorylierten Inserts (vgl. 2.2.8.2) in den dephosphorylierten Vektor (vgl. 2.2.8.3) und Transformation von TOP10F'-Zellen

Ligation und Transformation folgten dem „Eukaryotic TA Cloning[®] Kit Instruction Manual“ (Invitrogen). Je 50 µl der transformierten TOP10F'-Zellen wurden auf LBA-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.8.5 Koloniescreening zur Insert-Detektion

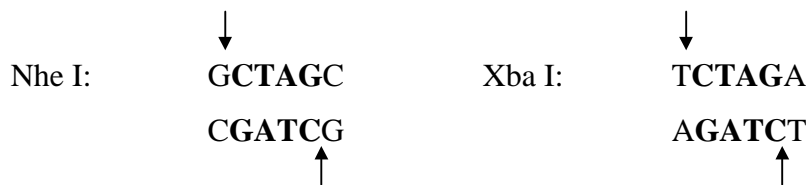
Das Screening erfolgte mit den Primern T7P und PCR3R (vgl. 2.1.6), wobei die Kolonien (TOP10F'/pCR[®]3.1/Ribozym2, TOP10F'/pCR[®]3.1/Ribozym8, TOP10F'/pCR[®]3.1/Ribozym9 und TOP10F'/pCR[®]3.1/Ribozym10) mit je einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und ein Teil der daran haftenden Zellen in ein PCR-Cap überführt wurde. Die restlichen Zellen konnten in ein Röhrchen mit fünf ml LBA-Medium abgeworfen und diese Vorkultur über Nacht bei 37 °C bebrütet werden. Jedem PCR-Cap wurden 30 µl eines Standard-PCR-Ansatzes (vgl. 2.2.3.1.3) ohne Plasmid-Template zugefügt. Die Errechnung der Annealingtemperatur sowie die Amplifikation der DNA folgten dem unter 2.2.3.1 beschriebenen Standardprotokoll. Nach der Amplifikation wurden die Ansätze durch PAA-Elektrophorese getrennt, die DNA-Banden ethidiumbromidgefärbt und photographiert.

2.2.8.6 Plasmid-Präparation

Eine Plasmid-Präparation erfolgte nur bei denjenigen Kulturen, deren DNA in Versuch 2.2.8.5 zu einem PCR-Signal korrekter Länge geführt hatten. Je ein ml der Vorkultur diente als Impfgut für eine später anzusetzende Hauptkultur. Zur Isolierung der Plasmide wurde das „QIAprep Plasmid Purification Mini Kit“ (QIAGEN) verwendet.

2.2.8.7 Nhe-I- und Xba-I-Restriktion der Plasmide zur Ermittlung der Insert-Orientierung

Obwohl das Insert von zwei verschiedenen Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen flankiert wurde, war eine Ligation in falscher Orientierung möglich, da sich die Erkennungssequenzen des Nhe I und des Xba I im Kern entsprachen.



Im Falle einer Ligation in falscher Orientierung konnte das Plasmid mit keiner der beiden Restriktionsendonukleasen geschnitten werden, da sich die Erkennungssequenz geändert hatte.



Die Restriktion der Plasmide (pCR[®]3.1/Ribozym2, pCR[®]3.1/Ribozym8, pCR[®]3.1/Ribozym9 und pCR[®]3.1/Ribozym10) verlief wie unter 2.2.8.2 beschrieben. Im Anschluß wurden die Ansätze durch PAA-Gelelektrophorese getrennt und ethidiumbromidgefärbt. Diejenigen Plasmide, aus denen sich ein Insert korrekter Länge ausschneiden ließ, wurden sequenziert.

2.2.8.8 Sequenzierung der Plasmide

Durch die Sequenzierung der Vektoren konnte sowohl die Orientierung als auch die korrekte Sequenz der Ribozym-Inserts kontrolliert werden, was unter Verwendung des „SequiTherm EXCEL™ II Long Read DNA Sequencing Kit-LC“ der Firma Epicentre Technologies geschah. Dabei wurde der Herstellervorschrift gefolgt. Die Annealingtemperaturen der Sequenzierprimer TAG5* und TAGR* ließen sich wie unter 2.2.3.1.1 beschrieben errechnen.

Im Anschluß an die PCR wurden die Ansätze fünf Minuten bei 85 °C denaturiert und je 1,5 µl auf ein Sequenziergel (Sequagel[®] XR, National Diagnostics) aufgetragen. Die Sequenzierung lief über Nacht (LI-COR DNA-Sequencer Model 4000L). Die Auswertung der Banden erfolgte automatisch.

2.2.8.9 Ansetzen von Hauptkulturen und Präparation der Plasmide pCR[®]3.1/Ribozym2, pCR[®]3.1/Ribozym8, pCR[®]3.1/Ribozym9 und pCR[®]3.1/Ribozym10

Je 200 ml LBA-Medium wurden mit einem ml Vorkultur (siehe 2.2.8.6) beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm. auf einem Schütteltisch inkubiert. Das Zellmaterial ließ sich durch zehnmütige Zentrifugation bei 4000 Upm. ernten und die Plasmide konnten mit dem „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) isoliert werden.

2.2.9 Konstruktion von Plasmiden (pCR[®]3.1) mit Ribozym-Inserts und nachgeschaltetem IEX-1-Intron

Um die Transkriptionseffizienz in der Zelle zu erhöhen, wurde das IEX-1-Intron an das 3'-Ende der Ribozymkonstrukte ligiert (Lee et al., 1997; Zheng et al., 1997). Das IEX-1-Intron konnte durch Verwendung von Primern (IEX-1I-FW und IEX-1I-R - siehe 2.1.6) mit 5'-Xba-I- und 3'-Pme-I-Schnittstellen amplifiziert, in den TA-Vektor pCR[®]2.1 kloniert und nach Xba-I/Pme-I-Restriktion in die pCR[®]3.1/Ribozym-Konstrukte umkloniert werden.

2.2.9.1 PCR-Amplifikation des IEX-1-Introns mit 5'-Xba-I- und 3'-Pme-I-Schnittstelle

Der Primer IEX-1I-FW bestand aus einer Xba-I-Erkennungssequenz (TCTAGA), einem für den Spleißvorgang wichtigen Sequenzabschnitt auf dem Exon1 (CTCGAGTG) und den ersten elf Basen des Introns (GAGAGTATCGC). IEX-1I-R setzte sich entsprechend aus einer Pme-I-Erkennungssequenz (GTTTAAAC), dem für den Spleißvorgang essentiellen Abschnitt des Exon2 (CGGAC) und den letzten zwölf Basen des Introns (CTAAGGGGAGAC) zusammen. Die PCR verlief unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.3.1). Im Anschluß an die Agarose-Gelelektrophorese wurde die DNA ethidiumbromidgefärbt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) eluiert.

2.2.9.2 Klonierung des IEX-1-Introns in den Vektor pCR[®]2.1 und anschließende Transformation von TOP10F'-Zellen

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit dem „Original TA Cloning[®] Kit“ (Invitrogen) in den TA-Vektor pCR[®]2.1 kloniert und anschließend in TOP10F'-Zellen geschleust.

2.2.9.3 Plasmid-Präparation, Sequenzierung der isolierten Plasmide, Ansetzen einer Hauptkultur und erneute Plasmid-Isolierung (Maxiprep)

Die Durchführung dieser Versuche entsprach den unter 2.2.8.6 und 2.2.8.8-2.2.8.9 aufgeführten Methoden.

2.2.9.4 Xba-I- und Pme-I-Restriktion des Plasmids pCR[®]2.1/IEX-1-Intron, PAA-Elektrophorese und Elution des IEX-1-Intron-Fragments

Die Berechnung der notwendigen Mengen Restriktionsendonuklease erfolgte wie unter 2.2.8.2 beschrieben:

$$\text{Xba I: } 2/5 \times 36/4 = 3,6 \text{ Units}/\mu\text{g Plasmid} \Rightarrow 72 \text{ U}/20 \mu\text{g Plasmid}$$

$$\text{Pme I: } 1/2 \times 50/4 = 6,25 \text{ Units}/\mu\text{g Plasmid} \Rightarrow 125 \text{ U}/20 \mu\text{g Plasmid}$$

20 μg pCR[®]2.1/IEX-1-Intron mußten im Anschluß an die Restriktion für 20 Minuten bei 65 °C inkubiert werden, um die Restriktionsendonukleasen zu deaktivieren. Die DNA wurde im Anschluß an die Elektrophorese ethidiumbromidgefärbt. Die Elution der IEX-1-Intron-Fragmente verlief wie von Krupp (1997) beschrieben.

2.2.9.5 Restriktion der Plasmide pCR[®]3.1/Ribozym2, pCR[®]3.1/Ribozym8, pCR[®]3.1/Ribozym9 und pCR[®]3.1/Ribozym10, Ligation des IEX-1-Intron-Fragments in die geschnittenen Vektoren und Transformation von TOP10F'-Zellen

Die Berechnung der zur Restriktion von fünf μg Plasmid notwendigen Mengen Restriktionsenzym orientierte sich an der unter 2.2.8.2 beschriebenen Formel (Xba I: 7,5 Units/5 μg Plasmid; Pme I: 25 Units/5 μg Plasmid). Die Restriktion, die Elektrophorese, die Elution der linearisierten Plasmide und die Transformation von TOP10F'-Zellen wurden wie unter 2.2.8.2 und 2.2.8.4 erläutert durchgeführt.

2.2.9.6 Koloniescreening, Plamid-Präparation und Sequenzierung der Plasmide

Die Durchführung dieser Versuche entsprach den Abschnitten 2.2.8.5, 2.2.8.6 und 2.2.8.8.

2.2.10 Konstruktion von Plasmiden (pCR[®]3.1) mit verschiedenen Ribozym-Konkater-Inserts

Neben den Plasmid/Ribozym/IEX-1-Intron-Konstrukten wurden drei Konkater hergestellt, die mehrere hintereinander geschaltete Ribozyme und das IEX-1-Intron enthielten. Diese Konstrukte basierten auf dem Vektor pCR[®]3.1/Ribozym2/IEX-1-Intron und ließen sich durch schrittweise Umklonierung aus anderen unter 2.2.9 generierten Plasmiden herstellen. Dabei wurde die Tatsache genutzt, daß sich Nhe-I- und Xba-I-geschnittene DNA-Fragmente miteinander ligieren lassen, wobei jedoch die Restriktionsschnittstelle verloren geht (vgl. 2.2.8.7). Der IEX-1-Intron-Bereich konnte durch Xba I/Pme I-Restriktion aus dem pCR[®]3.1/Ribozym2/IEX-1-Intron-Konstrukt entfernt und dann ein Nhe-I/Pme-I-geschnittenes Insert aus einem anderen Vektor (z.B. pCR[®]3.1/Ribozym8/IEX-1-Intron) hinter den Ribozym2-Bereich ligiert werden etc. (Abb. 9).

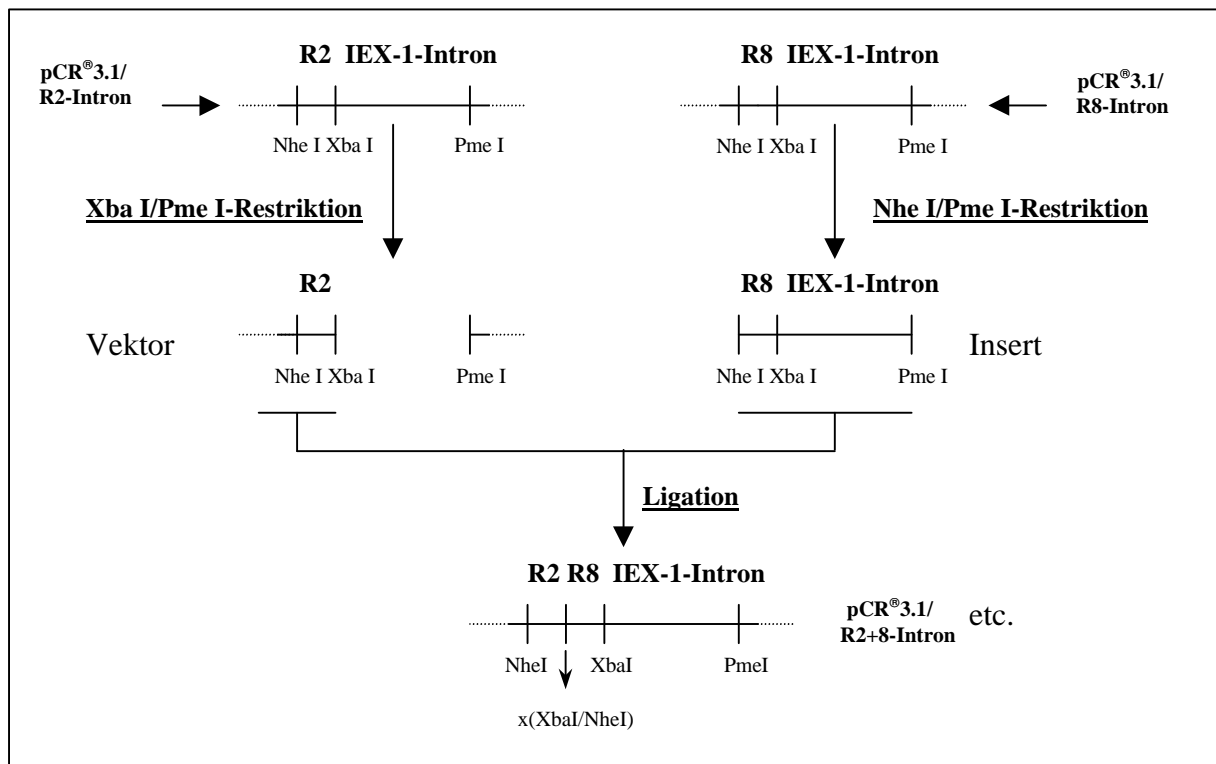


Abb. 9: Konstruktion von Ribozym-Konkateren mit nachgeschaltetem IEX-1-Intron

Auf diese Weise wurden folgende Plasmide konstruiert: pCR[®]3.1/Ribozym2+8/IEX-1-Intron, pCR[®]3.1/Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron und pCR[®]3.1/Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron. Die hierfür notwendigen Methoden wie Restriktion, Agarose-Elektrophorese, DNA-Elution, Ligation, Transformation, Insert-Screening, Sequenzierung sowie Plasmid-Isolierung können aus den Kapiteln 2.2.8 und 2.2.9 ersehen werden.

2.2.11 Umklonierung der Ribozym/IEX-1-Intron-Fragmente in den retroviralen Vektor pBabePuro

Um neben dem transienten Transfektionsmodell über eine Möglichkeit des stabilen Gentransfers zu verfügen, wurde das retrovirale Expressionsmodell pBabePuro gewählt. Durch Kotransfektion einer Verpackungszelllinie mit pBabePuro und anderen Hilfsvektoren konnte ein Kulturüberstand gewonnen werden, der infektiöse Retroviren enthielt, welche das gewünschte Insert in sich trugen. Nach Transduktion und Selektion der T-REx[™]-293-Zellen enthielten diese ein stabil ins Genom integriertes Provirus, das verschiedene Ribozymkonstrukte exprimierte.

2.2.11.1 Amplifikation von Ribozym9/IEX-1-Intron-, Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron- und Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron-Fragmenten, Klonierung in das Plasmid pCR[®]2.1 und Umklonierung in den retroviralen Vektor pBabePuro

2.2.11.1.1 PCR-Amplifikation der Fragmente und Klonierung in den Vektor pCR[®]2.1

Da die in pCR[®]3.1 klonierten Ribozymkonstrukte über keine passenden Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen für eine Umklonierung in pBabePuro verfügten, wurden durch PCR mit den Primern Bamkon und Salkon (vgl. 2.1.6) Ribozym/IEX-1-Intron-Fragmente generiert, die über eine 5'-BamH-I- und eine 3'-Sal-I-Schnittstelle verfügten. Diese PCR-Produkte mußten in den TA-Vektor pCR[®]2.1 kloniert, durch die entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor ausgeschnitten, aufgereinigt und in den BamH-I- und Sal-I-geschnittenen Vektor pBabePuro kloniert werden. Als Template dienten die Vektoren pCR[®]3.1/Ribozym9/IEX-1-Intron, pCR[®]3.1/Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron und pCR[®]3.1/Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron. Die PCR wurde wie unter 2.2.3.2 beschrieben durchgeführt und die PCR-Produkte in das Plasmid pCR[®]2.1 ligiert (vgl. 2.2.9.2).

2.2.11.1.2 Restriktion der zuvor generierten Vektoren sowie des retroviralen Vektors pBabePuro mit BamH I und Sal I, PAA-Gelelektrophorese und Elution der ausgeschnittenen Fragmente

Diese Versuche orientierten sich an der unter 2.2.8.2 beschriebenen Methodik, nur daß anstelle von Nhe I und Xba I die Restriktionsendonukleasen BamH I und Sal I Verwendung fanden. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden der linearisierte Vektor pBabePuro sowie die Fragmente Ribozym9/IEX-1-Intron, Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron und Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron mit dem „QIAEX-II Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) aus den Gelen eluiert.

2.2.11.1.3 Ligation der Fragmente in pBabePuro, Transformation von TOP10F⁻-Zellen, Plasmid-Isolierung, Kontrollrestriktion mit BamH I und Sal I, Sequenzierung der Vektoren und erneute Plasmid-Präparation

Die Durchführung dieser Versuche orientierte sich unter Verwendung der Sequenzierprimer pBabe-F* und pBabe-R* (vgl. 2.1.6) an den Kapiteln 2.2.9.2-2.2.9.7.

2.2.12 PCR-Nachweis des Provirus in genomischer DNA

Im Anschluß an die Transduktion (vgl. 2.3.3) wurde genomische DNA aus den transduzierten T-RExTM-293-Zellen isoliert („QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Kit“). Um zu testen, ob der Provirus in die DNA integriert war, mußte eine PCR (vgl. 2.2.3.1) mit den proviruspezifischen Primern Bamkon und Salkon (vgl. 2.1.6) durchgeführt werden. Die Detektion der Amplifikate erfolgte durch PAA-Gelelektrophorese und anschließende Ethidiumbromidfärbung.

2.2.13 Nachweis von Ribozym-RNA in den transduzierten T-RExTM-293-Zellen durch Reverse Transkription und anschließende PCR-Amplifikation (RT-PCR)

Ribozym-RNA ließ sich in den Zellen durch die Isolierung von Gesamt-RNA (RNeasy Mini Kit - QIAGEN), einstündige DNase-I-Behandlung (AmpliScribeTM T7 High Yield Transkription Kit - Epicentre Technologies), zweiminütige Denaturierung der RNA bei 95 °C und die Synthese von cDNA (Reverse Transkription) nachweisen.

Hierfür wurden je zwei µg RNA und zwei µl Oligo(dT)₁₅-Primer mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 13,4 µl aufgefüllt, mit fünf µl 5 x M-MLV-Reaktionspuffer, fünf µl dNTP-Mix, 0,6 µl RNasin (25 Units) und einem µl M-MLV Reverser Transkriptase gemischt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Je zwei µl der cDNA- sowie der Gesamt-RNA-Ansätze wurden per PCR spezifisch auf die Nachweisbarkeit von Ribozym-DNA untersucht:

Negativ-Kontrollen:

pBabePuro/R9-RNA:	Nachweis R9:	Primer pBabe9FW + pBabe9R
pBabePuro/R2+8+9-RNA:	Nachweis R2+8+9:	Primer pBabe2FW + pBabe9R
pBabePuro/R2+8+9+10-RNA:	Nachweis R2+8+9+10:	Primer pBabe2FW + pBabe10R
pBabePuro-cDNA:	Nachweis R9:	Primer pBabe9FW + pBabe9R
	Nachweis R2+8+9:	Primer pBabe2FW + pBabe9R
	Nachweis R2+8+9+10:	Primer pBabe2FW + pBabe10R

Ribozym-Nachweise:

pBabePuro/R9-cDNA:	Nachweis R9:	Primer pBabe9FW + pBabe9R
pBabePuro/R2+8+9-cDNA:	Nachweis R2+8+9:	Primer pBabe2FW + pBabe9R
pBabePuro/R2+8+9+10-cDNA:	Nachweis R2+8+9+10:	Primer pBabe2FW + pBabe10R

Die Durchführung der PCRs folgte dem Standardprotokoll (2.2.3.1). Die Amplifikate wurden durch PAA-Gelelektrophorese getrennt und ethidiumbromidgefärbt.

2.2.14 Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus stabil transduzierten T-RExTM-293-Zellen und einer [α -³²P]dCTP-markierten 235-Bp-Sonde

Stabil transduzierte T-RExTM-293-Zellen wurden 24 Stunden serumstarviert (DMEM, 0,5 % FCS, 2 mM Glutamin, 5 µg/ml Puromycin) und im Anschluß durch Zugabe von Serum (DMEM, 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 5 µg/ml Puromycin) zur IEX-1-Expression stimuliert. Die Gesamt-RNA-Extraktion („RNeasy Mini Kit“ - QIAGEN) erfolgte nach zweistündiger Inkubation.

Je 20 µg Gesamt-RNA der vier Zelllinien (T-RExTM-293/pBabe, T-RExTM-293/pBabe/Ribozym9, T-RExTM-293/pBabe/Ribozym2+8+9 und T-RExTM-293/pBabe/Ribozym2+8+9+10) wurden für den Northern-Blot verwendet. Ansonsten entsprach das Protokoll der unter 2.2.7 beschriebenen Methodik.

2.3 Zellbiologische Verfahren

2.3.1 Zellkultur

Die T-RExTM-293-Zellen wurden dem Invitrogen-Handbuch „Growth and Maintenance of T-RExTM Cell Lines“ folgend in DMEM (10 % FCS, 2 mM Glutamin, 5 µg/ml Blastocidin) kultiviert.

2.3.2 Transfektion von T-RExTM-293-Zellen mit EffecteneTM-Reagent (QIAGEN)

Die Transfektion folgte dem „EffecteneTM Transfection Reagent Handbook“ des Herstellers. Je 2 x 10⁵ Zellen/well wurden über Nacht in Sixwell-Platten inkubiert und am nächsten Tag mit den pCR[®]3.1/Ribozym/IEX-1-Intron-Konstrukten (vgl. 2.2.9 und 2.2.10), dem Kontrollvektor pCR[®]3.1 und dem tetrazyklininduzierbaren Expressionsvektor pcDNA4/TO/IEX-1 (Arlt et al., 2001) transfiziert. Die beiden Zellpopulationen, die mit pCR[®]3.1 und pcDNA4/TO/IEX-1 transfiziert wurden, dienten als Positiv- (stimuliert) bzw. Negativkontrollen (unstimuliert).

Kultur 1:	0,2 µg pCR [®] 3.1 + 0,2 µg pcDNA4/TO/IEX-1	+Tet
Kultur 2:	0,2 µg pCR [®] 3.1 + 0,2 µg pcDNA4/TO/IEX-1	-Tet
Kultur 3:	0,2 µg pCR [®] 3.1/R2/IEX-1-Intron + 0,2 µg pcDNA4/TO/IEX-1	+Tet
Kultur 4:	0,2 µg pCR [®] 3.1/R8/IEX-1-Intron + 0,2 µg pcDNA4/TO/IEX-1	+Tet
Kultur 5:	0,2 µg pCR [®] 3.1/R9/IEX-1-Intron + 0,2 µg pcDNA4/TO/IEX-1	+Tet
Kultur 6:	0,2 µg pCR [®] 3.1/R10/IEX-1-Intron + 0,2 µg pcDNA4/TO/IEX-1	+Tet
Kultur 7:	0,2 µg pCR [®] 3.1/R2+8/IEX-1-Intron + 0,2 µg pcDNA4/TO/IEX-1	+Tet
Kultur 8:	0,2 µg pCR [®] 3.1/R2+8+9/IEX-1-Intron + 0,2 µg pcDNA4/TO/IEX-1	+Tet
Kultur 9:	0,2 µg pCR [®] 3.1/R2+8+9+10/IEX-1-Intron + 0,2 µg pcDNA4/TO/IEX-1	+Tet

Die Zellen wurden zwölf Stunden bei 37 °C inkubiert, 24 Stunden serumstarviert, tetrazyklin-stimuliert und nach weiteren zwölf Stunden Inkubation für die Western-Blot-Analyse aufgearbeitet (siehe 2.4.1.1).

2.3.3 Transduktion von T-RExTM-293-Zellen mit dem retroviralen Vektor pBabePuro

Um über ein Zellsystem zu verfügen, daß die Ribozyme stabil exprimiert, wurden drei verschiedene in T-RExTM-293-Zellen aktive Ribozymkonstrukte (Ribozym9/IEX-1-Intron, Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron und Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron) in den retroviralen Vektor pBabePuro kloniert (vgl. 2.2.11). Mit diesen Vektoren und dem Kontrollvektor pBabePuro (ohne Insert) wurde die Verpackungszelllinie 293-T transfiziert, welche daraufhin infektiöse Viren in den Kulturüberstand sezernierte. Die viralen Überstände dienten der Transduktion von T-RExTM-293-Zellen.

2.3.3.1 Generierung von Virusüberstand und Transduktion von T-RExTM-293-Zellen

Diese Arbeiten wurden von Frau Christiane Sandberg aus der Arbeitsgruppe für Molekulare Onkologie (Leiter Prof. Kalthoff) an der Klinik für Allgemeine Chirurgie durchgeführt und erfolgten wie zuvor beschrieben (Hinz et al., 2000). Nach zehn selektiven Teilungsschritten der transduzierten Zellen mit entsprechenden Medienwechseln (DMEM, 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 5 µg/ml Blasticidin, 1 µg/ml Puromycin) konnte davon ausgegangen werden, daß die verbliebenen Zellen stabil transduziert und keine infektiösen Viruspartikel mehr vorhanden waren.

2.3.4 Zellproliferations-Assay

In zwei 96-well-Platten wurden je 5000 Zellen/well (in 200 µl Medium) ausgesät, wobei jede der vier zu testenden Zelllinien in 4 x 8 Löchern wuchs. Die verbliebenen Löcher wurden als Negativkontrollen mit je 200 µl Medium befüllt. Nach zwölfstündiger Inkubation wurde das Medium abgesogen und durch 200 µl Medium mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (0,5 %, 2,5 %, 5 % und 10 %) ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Zugabe von 25 µl MTS-Substrat/well („CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ - Promega) und nach einstündiger Inkubation die photometrische Messung des Farbumschlags (Plattenphotometer Dynatech MR5000).

Die Absorption bei 490 nm war der Anzahl lebender Zellen in der Kultur direkt proportional. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, die Meßwerte jeder Zelllinie gemittelt und aus den errechneten Werten mit Excel für Windows 98 ein Balkendiagramm erstellt.

2.3.5 Zellzyklus-Analyse durch Propidiumjodid-Färbung

Je vier wells einer Sixwell-Platte der transduzierten Zelllinien (T-REx™-293/pBabe, T-REx™-293/pBabe/Ribozym9, T-REx™-293/pBabe/Ribozym2+8+9 und T-REx™-293/pBabe/Ribozym 2+8+9+10) wurden mit 4×10^5 Zellen/well beimpft und diese über Nacht bei 37 °C in Vollmedium (DMEM, 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 5 µg/ml Blasticidin, 1 µg/µl Puromycin) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen serumstarviert (DMEM, 0,5 % FCS, 2 mM Glutamin, 5 µg/ml Blasticidin, 1 µg/ml Puromycin), zwei Tage unter Serumentzug in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert und zwölf Stunden mit Vollmedium inkubiert. Im Anschluß ließ sich das Medium in 15-ml-Sarstedt-Röhrchen überführen und die Zellen konnten durch fünfminütige Inkubation mit je zwei ml PBS/10 % Trypsin/EDTA vom Boden der Sixwell-Platte gelöst werden. Der Überstand wurde mit den dazugehörigen Medien vereinigt und die Zellen fünf Minuten bei 1800 Upm. abzentrifugiert. Nach Resuspendierung der Pellets in je zwei ml PBS/5 mM EDTA, erneuter Zentrifugation und Resuspendierung der Pellets in einem ml PBS/5 mM EDTA erfolgte die Fixierung der Zellen durch schrittweise Zugabe von einem ml Ethanol (absolut). Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 4 °C gelagert, wie zuvor zentrifugiert, die Zellen in je 500 µl PBS/5 mM EDTA resuspendiert, 25 µl RNase A (1 mg/ml) zugegeben und die Ansätze 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß an die Zugabe von 500 µl Propidiumjodid (250 µg/ml) pro Ansatz und eine dreißigminütige Inkubation der Proben wurde die relative DNA-Menge in den einzelnen Zellen im „Dako Galaxy Flow Cytometry System“ (Dako) durch FACS-Analyse ausgewertet. Dabei enthielten Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus weniger DNA als solche in der S-Phase, und diese wiederum weniger DNA als G2/M-Phase-Zellen.

2.3.6 Apoptose-Assay durch AnnexinV-FITC-Färbung

Die Zellen wurden wie unter 2.3.5 beschrieben ausgesät, inkubiert, serumstarviert und durch Zugabe verschiedener Stimuli Apoptose induziert.

Probe 1: keine apoptotischen Stimuli

Probe 2: Zugabe von 2 µl Fas-aktivierendem Antikörper (0,2 µg/µl) für 18 Stunden

Probe 3: Zugabe von 2 µl Etoposid (35 mM) für 24 Stunden (Endkonzentration: 35 nM)

Probe 4: Zugabe von 5 µl TNF α (0,32 µM) für 18 Stunden (Endkonzentration: 0,8 nM)

Probe 5: Zugabe von 2 µl MG-132 (10 mM) für 24 Stunden (Endkonzentration: 10 nM)

Probe 6: Zugabe von 1 µl Doxorubicin (0,2 mM) für 24 Stunden (Endkonzentration: 0,1 nM)

Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurde die Zahl apoptotischer Zellen in Anlehnung an das von Vermes et al. (1995) publizierte Protokoll mit dem „ApoAlert™ Annexin V-FITC“-Kit (Clontech) und anschließende Durchflußzytometrie (Dako) bestimmt.

2.4 Immunbiologische Verfahren

2.4.1 Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte aus transient transfizierten T-REx™-293-Zellen

2.4.1.1 Tetrazyklin-Stimulation und Protein-Aufarbeitung

Im Anschluß an die Transfektion (vgl. 2.3.2) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, zwölf Stunden bei 37 °C in Kulturmedium inkubiert, 24 Stunden serumstarviert (0,5 % FCS) und dann mit 25 ng Tetrazyklin/ml Medium zur IEX-1-Expression stimuliert. Lediglich die als Negativkontrolle gedachte Zellpopulation blieb unstimuliert. Nach zwölfstündiger Inkubation bei 37 °C und einem einmaligen Waschschrift mit PBS erfolgte die Aufarbeitung der Proteinextrakte. Pro Sixwell wurden 200 µl 2 x Laemmli-Lysis-Puffer auf die Zellen gegeben, die Lysate in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

2.4.1.2 Protein-Quantifizierung über analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Je zehn µl der Proteinextrakte wurden auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen und bei 100 Volt (Sammelgel) bzw. 150 Volt (Trenngel) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine im Trenngel ließen sich durch Coomassie-Färbung und anschließende Entfärbung nachweisen. Anhand der Intensität der gefärbten Proteinbanden konnte eine Einschätzung der Verhältnisse der Proteinmengen in den einzelnen Extrakten vorgenommen werden.

2.4.1.3 SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

Jeweils gleiche Proteinmengen aller Proben und 15 µl „Prestained SDS-PAGE Standards, low range“ (BioRad) wurden auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief wie unter 2.4.1.2 beschrieben. Im Anschluß wurde eine PVDF-Membran kurz in Methanol gelegt, mit Wasser gewaschen und eine Minute in Transferpuffer inkubiert. Für den Transfer der Proteine (Semi-Dry-Blotting) wurden drei Stücke Whatman-Filterpapier-3 mit Transferpuffer getränkt, auf die Anode des Elektrophoretengerätes gelegt, die PVDF-Membran, das Trenngel, drei Stück Whatman-Papier (in Transferpuffer getränkt) sowie der Deckel des Elektrophoretengerätes (Kathode) aufgelegt und die Proteine acht Minuten bei fünf mA/cm² transferiert (kontinuierlicher Semi-Dry-Blot).

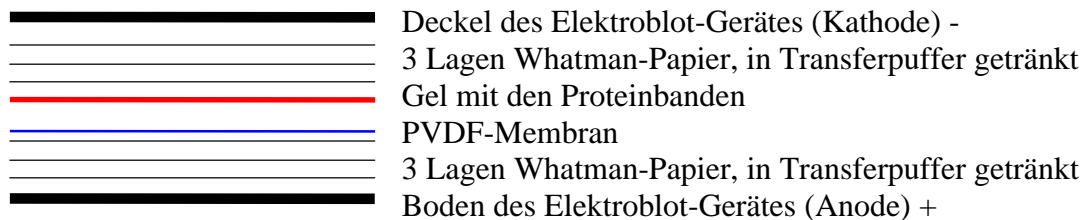


Abb. 10: Aufbau eines kontinuierlichen Semi-Dry-Blottes

2.4.1.4 Detektion von IEX-1-Protein und α-Tubulin auf der Membran

Die Durchführung sämtlicher Arbeitsschritte verlief bei Raumtemperatur. Primärer Antikörper wurde 1:200 in TBS/5 % BSA/0,05 % Tween-20 verdünnt und sekundärer Antikörper 1:2000 in Blockierungslösung. Im Anschluß an den Proteintransfer wurde die Membran kurz in TBS gewaschen, eine Stunde lang in Blockierungslösung inkubiert, eine Stunde lang mit primärem Antikörper (anti-IEX-1, C-20) inkubiert und drei mal 15 Minuten in TBS/0,05 % Tween-20 gewaschen. Es folgten eine dreißigminütige Inkubation der Membran in sekundärer Antikörperlösung (anti-goat, HRP-linked), drei fünfzehnminütige Waschschrte in TBS/0,05 % Tween-20 und eine fünfminütige Inkubation in Substratlösung. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt, in eine Photobox geklebt, ein Film (Biomax™ MR - Kodak) aufgelegt und entwickelt. Zusätzlich wurden die α-Tubulin-Proteinbanden detektiert, um über einen internen Standard zu verfügen (Antikörper siehe 2.1.3).

2.4.2 Western-Blot-Analyse von T-RExTM-293-Proteinextrakten nach stabiler pBabe-Transduktion

Die Zellen wurden 24 Stunden lang serumstarviert (0,5 % FCS) und im Anschluß 24 Stunden lang in Vollmedium (10 % FCS) inkubiert. Die Proteinextrakte wurden wie unter 2.4.1.1 beschrieben aufgearbeitet. Die analytische SDS-PAGE, der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran sowie die Detektion von IEX-1 und α -Tubulin erfolgten wie unter 2.4.1.2-2.4.1.4 protokolliert.

3 Ergebnisse

3.1 Einführung in den experimentellen Ablauf

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Expression von IEX-1-Protein in T-REx™-293-Zellen durch gezielte ribozymvermittelte Restriktion der entsprechenden mRNA zu unterbinden und somit Hinweise auf eine mögliche zelluläre Funktion dieses Proteins zu erhalten. Dabei mußten anfänglich bestimmte Ribozymspaltungsstellen auf der mRNA identifiziert und gegen diese Sequenzen gerichtete Ribozyme synthetisiert werden. Eine computergestützte Berechnung der wahrscheinlichsten Sekundärstruktur der verschiedenen IEX-1-mRNA/Ribozym-Komplexe diente der Selektion potentiell aktiver Ribozyme. Im Anschluß wurden sowohl unterschiedliche Abschnitte der IEX-1-mRNA als auch die Ribozyme *in vitro* transkribiert und durch qualitative (Spaltungsreaktionen) und quantitative (Ribozym-Kinetiken) Nachweisverfahren außerhalb des Zellsystems charakterisiert. Nun folgte die Klonierung der potentesten Ribozyme in den eukaryontischen Expressionsvektor pCR®3.1, wobei einige der katalytischen Einheiten durch mehrere Umklonierungsschritte zu Konkameren verknüpft wurden. Schließlich ließen sich diese Vektoren nach transienter Transfektion in einem zellulären System unter *in vivo*-Bedingungen testen. Die hierbei aktivsten Konstrukte wurden in den retroviralen Vektor pBabePuro umkloniert und T-REx™-293-Zellen stabil transduziert. Dieses Testsystem diente schließlich der Klärung der IEX-1-Funktion, wobei Wachstumsassays, Zellzyklusanalysen sowie ein Nachweis apoptotischer Zellen durchgeführt wurden.

3.2 Identifizierung potentieller Ribozym-Spaltungsstellen innerhalb der IEX-1-mRNA-Sequenz

Die bereits bekannte IEX-1-Sequenz (Konratyev et al., 1996; Pietzsch et al., 1997) wurde bezüglich der Präsenz von NUH↓- und insbesondere von NUH↓U-Motiven untersucht und verschiedene Ribozyme gegen diese Sequenzabschnitte konstruiert (vgl. Methoden: 2.2.4.1.1). Dabei erwiesen sich die in Abb. 11 grau unterlegten Spaltungsstellen nach computergestützter Berechnung der wahrscheinlichsten Sekundärstruktur des Ribozym/Substratkomplexes als potentiell zugänglich.

Die Synthese der Templates erfolgte durch eine PCR, wobei das Plasmid pCR[®]3.1/IEX-1 (Schäfer et al., 1999b) als Matrize fungierte. Abb. 12 zeigt die einzelnen auf Agarose- (A + B) bzw. auf PAA-Gelen (C) aufgetrennten DNA-Templates.

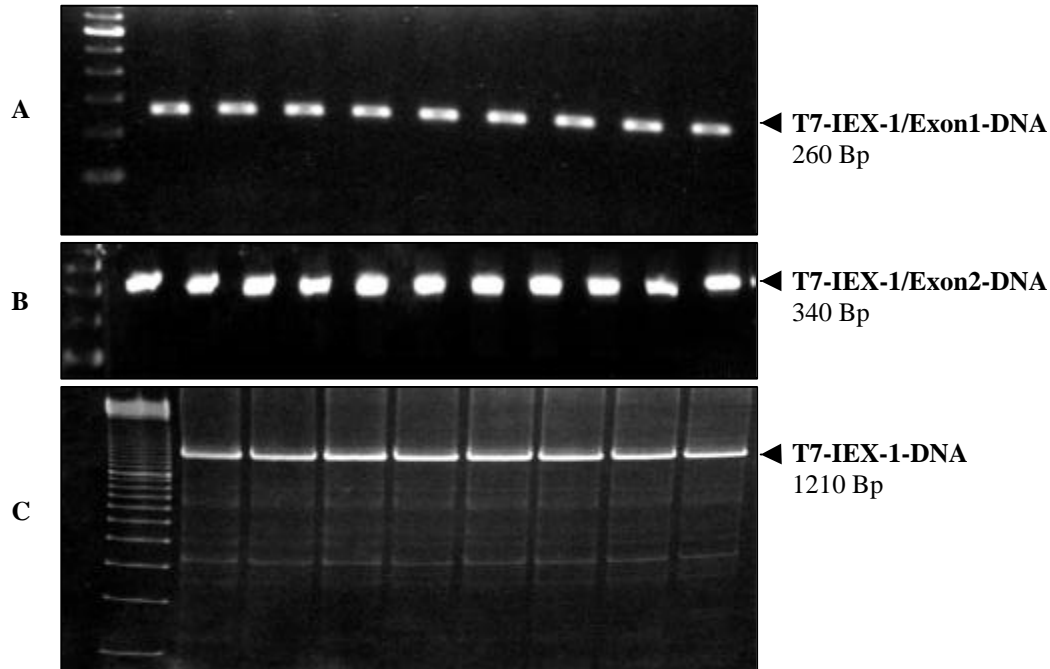


Abb. 12: Generierung von DNA-Templates mit vorgeschaltetem T7-Promotor mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Drei verschiedene IEX-1-DNA-Fragmente mit vorgeschaltetem T7-Promotor wurden per PCR generiert, wobei je 25 ng pCR[®]3.1/IEX-1-DNA pro Einzelansatz als Template dienen. Die jeweils erste Geltasche enthält einen µg 100-Bp-DNA-Leiter.

- A:** T7-IEX-1/Exon1-DNA (260 Bp), Agarosegel, ethidiumbromidgefärbt
B: T7-IEX-1/Exon2-DNA (340 Bp), Agarosegel, ethidiumbromidgefärbt
C: T7-IEX-1-DNA (1210 Bp), PAA-Gel, ethidiumbromidgefärbt

Bei den unspezifischen DNA-Banden in Abb. 12 C handelte es sich entweder um Abbruchprodukte oder aber um unspezifische Nebenprodukte der PCR. Da die 1210-Bp-DNA jedoch im Anschluß an die Elektrophorese aus dem Gel eluiert wurde, störten diese DNA-Fragmente die anschließende Transkription nicht.

3.3.2 *in vitro*-Transkription

Als Templates dienten die zuvor generierten T7-IEX-DNA-Fragmente sowie im Falle der Ribozyme synthetische Oligonukleotide (Biometra). Die Durchführung der *in vitro*-Transkriptionen folgte den jeweiligen Herstellervorschriften. Im Anschluß wurden die Ribozyme auf zwölfprozentige PAA-Gele, 7 M Harnstoff aufgetragen.

Als Standard diente hierbei synthetisch hergestellte Ribozym1-RNA (Biometra). Die Elution der Transkripte aus den Gelen richtete sich nach einem von Krupp (1997) beschriebenen Protokoll. Die Elektrophorese und Elution der übrigen Transkripte erfolgte auf fünfprozentigen bzw. achtprozentigen PAA-Gelen, 7 M Harnstoff. Bei diesen Transkripten diente eine RNA-Leiter (160, 280, 400, 530, 780, 1280, 1520 und 1770 nt) der Kontrolle der Transkriptlängen (Abb. 13).

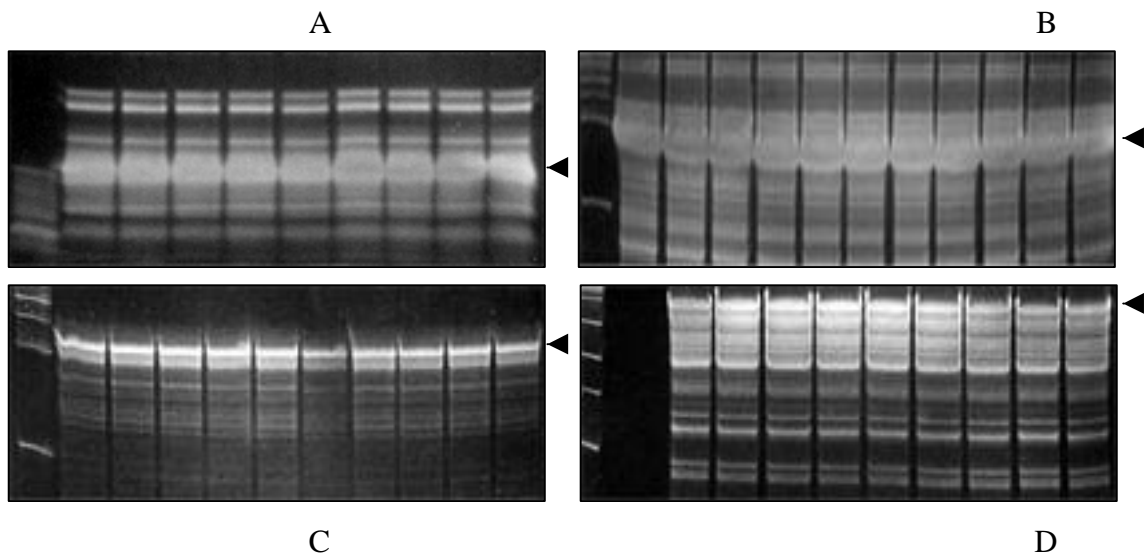


Abb. 13: *in vitro*-Transkription der Ribozyme, der IEX-1/Exon1-, der IEX-1/Exon2- sowie der IEX-1-RNA

A: Ribozym2-RNA. Die Transkription erfolgte mit dem „Ampli Scribe™ T7 High Yield Transcription Kit“ (Epicentre Technologies), wobei synthetisch hergestellte DNA (Biometra) als Template diente. Die Ansätze wurden auf einem zwölfprozentigen PAA-Gel, 7 M Harnstoff aufgetrennt und ethidiumbromidgefärbt. Die mit einem Pfeil (◄) gekennzeichnete Bande markiert die Ribozym-RNA (41 nt).

B: IEX-1/Exon1-RNA. Das Transkriptionsprotokoll entsprach dem unter A beschriebenen, wobei jedoch ein T7-IEX-1/Exon1-DNA-Template verwendet wurde. Die elektrophoretische Trennung der Transkripte erfolgte auf einem achtprozentigen PAA-Gel, 7 M Harnstoff. Die mit einem Pfeil (◄) gekennzeichnete Bande hat eine Länge von 240 nt und entspricht der Exon1-RNA.

C: IEX-1/Exon2-RNA. Hierfür wurde T7-IEX-1/Exon2-DNA als Template verwendet. Ansonsten entsprach das Protokoll dem unter B beschriebenen. Die 320 nt lange Exon2-RNA ist durch einen Pfeil (◄) gekennzeichnet.

D: IEX-1-RNA. Die Transkription wurde mit dem „MEGAscript™ *in vitro* Transcription Kit“ (Ambion) durchgeführt, wobei T7-IEX-1-DNA als Template diente. Die elektrophoretische Trennung des Ansatzes erfolgte auf einem fünfprozentigen PAA-Gel, 7 M Harnstoff. Die IEX-1-RNA (1190 nt) ist mit einem Pfeil (◄) markiert.

Bei den in Abb. 13 sichtbaren unspezifischen RNA-Fragmenten handelte es sich um Abbruchprodukte der Transkription. Diese wurden durch gezielte Elution der korrekten Transkripte von den Folgeversuchen ausgeschlossen.

3.3.3 *in vitro*-Spaltung der RNA-Moleküle durch die Ribozyme 1-12

3.3.3.1 Spaltung der IEX-1/Exon1-RNA durch die Ribozyme 1-6

Je zehn pmol IEX-1/Exon1-RNA wurden mit 20 pmol eines der Ribozyme 1-6 gemischt und nach Zugabe von Magnesiumchlorid-Lösung und dreißigminütiger Inkubation auf achtprozentigen PAA-Gelen, 7 M Harnstoff aufgetrennt (siehe Abb. 14).

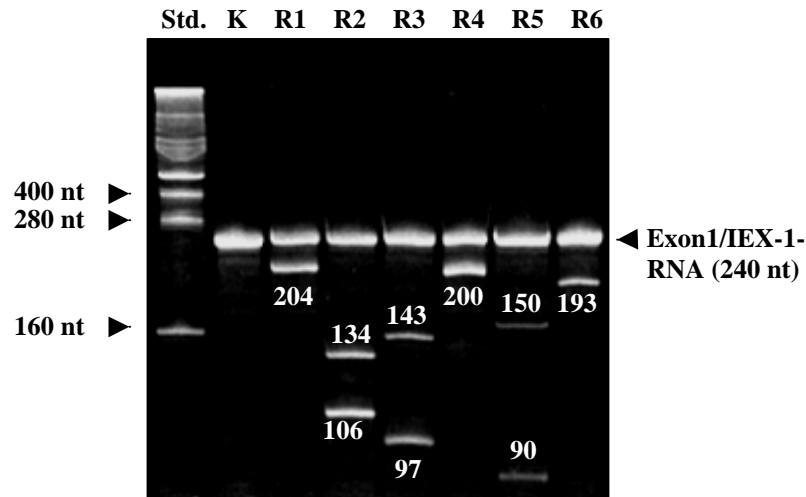


Abb. 14: *in vitro*-Spaltung von IEX-1/Exon1-RNA durch die Ribozyme 1-6

Je zehn pmol IEX-1/Exon1-RNA wurden mit 20 pmol Ribozym-RNA gemischt, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und ethidiumbromidgefärbt.

Std.	RNA-Leiter	
K	IEX-1/Exon1-RNA ohne Ribozym (Negativkontrolle)	
R1	IEX-1/Exon1-RNA + Ribozym 1	spaltet IEX-1/Exon1-RNA an Position 36
R2	IEX-1/Exon1-RNA + Ribozym 2	spaltet IEX-1/Exon1-RNA an Position 134
R3	IEX-1/Exon1-RNA + Ribozym 3	spaltet IEX-1/Exon1-RNA an Position 143
R4	IEX-1/Exon1-RNA + Ribozym 4	spaltet IEX-1/Exon1-RNA an Position 40
R5	IEX-1/Exon1-RNA + Ribozym 5	spaltet IEX-1/Exon1-RNA an Position 150
R6	IEX-1/Exon1-RNA + Ribozym 6	spaltet IEX-1/Exon1-RNA an Position 193

Die Abbildung zeigt deutlich, daß alle sechs getesteten Ribozyme *in vitro* in der Lage waren, die IEX-1/Exon1-RNA zu spalten. Die hohe Spezifität dieser Reaktion zeigt sich anhand der exakt vorherbestimmten Länge der Spaltprodukte sowie an der Abwesenheit unspezifischer RNA-Banden sowohl in der Kontrolle (Reihe 2) als auch in den Ribozymansätzen selbst.

3.3.3.2 Spaltung der IEX-1/Exon2-RNA durch die Ribozyme 7-12

Die Durchführung dieser Reaktion erfolgte analog zu 3.3.3.1, wobei jedoch IEX-1/Exon2-RNA (kodierender Bereich) als Substrat und die Ribozyme 7-12 Verwendung fanden. Im Anschluß an die Spaltungsreaktion wurden die Ansätze auf einem achtprozentigen PAA-Gel, 7 M Harnstoff aufgetrennt und ethidiumbromidgefärbt (Abb. 15).

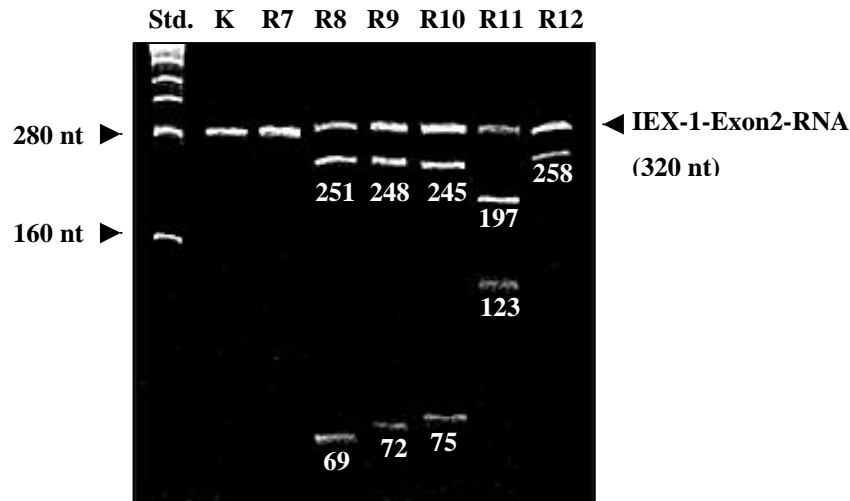


Abb. 15: *in vitro*-Spaltung von IEX-1/Exon2-RNA durch die Ribozyme 7-12

Je zehn pmol IEX-1/Exon2-RNA wurden mit 20 pmol verschiedener Ribozyme gemischt, 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und ethidiumbromidgefärbt.

Std.	RNA-Leiter	
K	IEX-1/Exon2-RNA ohne Ribozym	(Negativkontrolle)
R7	IEX-1/Exon2-RNA + Ribozym 7	keine Spaltung der IEX-1/Exon2-RNA an Position 49
R8	IEX-1/Exon2-RNA + Ribozym 8	spaltet IEX-1/Exon2-RNA an Position 69
R9	IEX-1/Exon2-RNA + Ribozym 9	spaltet IEX-1/Exon2-RNA an Position 72
R10	IEX-1/Exon2-RNA + Ribozym 10	spaltet IEX-1/Exon2-RNA an Position 75
R11	IEX-1/Exon2-RNA + Ribozym 11	spaltet IEX-1/Exon2-RNA an Position 197
R12	IEX-1/Exon2-RNA + Ribozym 12	spaltet IEX-1/Exon2-RNA an Position 258

Mit Ausnahme des Ribozyms 7 waren alle getesteten Ribozyme katalytisch aktiv. Auch hier ließ sich die hohe Substratspezifität der Ribozyme nachweisen, da ausschließlich die erwarteten Fragmentlängen und keinerlei Nebenprodukte detektiert werden konnten.

3.3.3.3 Spaltung der IEX-1-RNA durch die Ribozyme 1-12

Da sich die vollständige IEX-1-RNA *in vitro* nur in geringen Mengen transkribieren ließ, wurden je ein pmol Substrat-RNA und zehn pmol eines der zu testenden zwölf Ribozyme gemischt, in Gegenwart von Magnesiumchlorid 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Proben auf einem achtprozentigen PAA-Gel, 7 M Harnstoff elektrophoretisch getrennt. Die Detektion der Spaltprodukte erfolgte durch Silberfärbung. Abb. 16 zeigt nur diejenigen Ansätze, bei denen ein Spaltprodukt nachweisbar war (Ribozyme 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11 und 12).

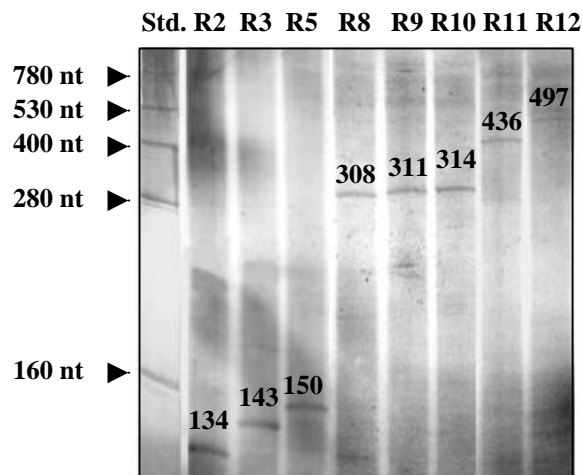


Abb. 16: *in vitro*-Spaltung von IEX-1-RNA durch verschiedene Ribozyme

Je ein pmol IEX-1-RNA wurde 30 Minuten lang zusammen mit zehn pmol verschiedener Ribozyme bei 37 °C inkubiert und die Ansätze elektrophoretisch getrennt. Silberfärbung.

Std.	RNA-Leiter	
R2	IEX-1-RNA + Ribozym 2	spaltet IEX-1-RNA an Position 134
R3	IEX-1-RNA + Ribozym 3	spaltet IEX-1-RNA an Position 143
R5	IEX-1-RNA + Ribozym 5	spaltet IEX-1-RNA an Position 150
R8	IEX-1-RNA + Ribozym 8	spaltet IEX-1-RNA an Position 308
R9	IEX-1-RNA + Ribozym 9	spaltet IEX-1-RNA an Position 311
R10	IEX-1-RNA + Ribozym 10	spaltet IEX-1-RNA an Position 314
R11	IEX-1-RNA + Ribozym 11	spaltet IEX-1-RNA an Position 436
R12	IEX-1-RNA + Ribozym 12	spaltet IEX-1-RNA an Position 497

Nicht alle Ribozyme, die zu einer exonspezifischen Spaltung der IEX-1-RNA in der Lage waren, waren auch zur Restriktion der vollständigen IEX-1-RNA befähigt. So ließ sich für das Ribozym 7 - wie bereits aus Abb. 15 ersichtlich - kein Spaltprodukt nachweisen. Zudem erwiesen sich die Ribozyme 1, 4 und 6 als ineffektiv (nicht gezeigt). Offensichtlich nimmt die IEX-1-RNA eine Sekundärstruktur an, die einige Abschnitte, die in den Fragmenten exponiert vorliegen, ins Innere des Moleküls verlegt und damit für die genannten Ribozyme unzugänglich macht. Die übrigen Ribozyme zeigten eine hohe Substratspezifität.

3.3.4 Erstellung von Ribozym-Kinetiken

3.3.4.1 Erstellung von Kinetiken für die Ribozyme 1-6

Für jedes zu testende Ribozym wurde ein Ansatz mit 30 pmol IEX-1/Exon1-RNA und 60 pmol Ribozym-RNA pipettiert. Die weitere Durchführung der Spaltungsreaktion entsprach der unter 3.3.3 beschriebenen Methodik, nur daß von jedem Ansatz zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots entnommen wurden. Diese wurden auf ein achtprozentiges PAA-Gel, 7 M Harnstoff aufgetragen, elektrophoretisch getrennt, ethidiumbromidgefärbt und computergestützt mit der „ScanPack Version 3.0“-Software (Biometra) und Excel für Windows 98 in ein Kurven-diagramm umgesetzt. Die Kinetiken für die Ribozyme 1-6 sind in Abb. 17 dargestellt.

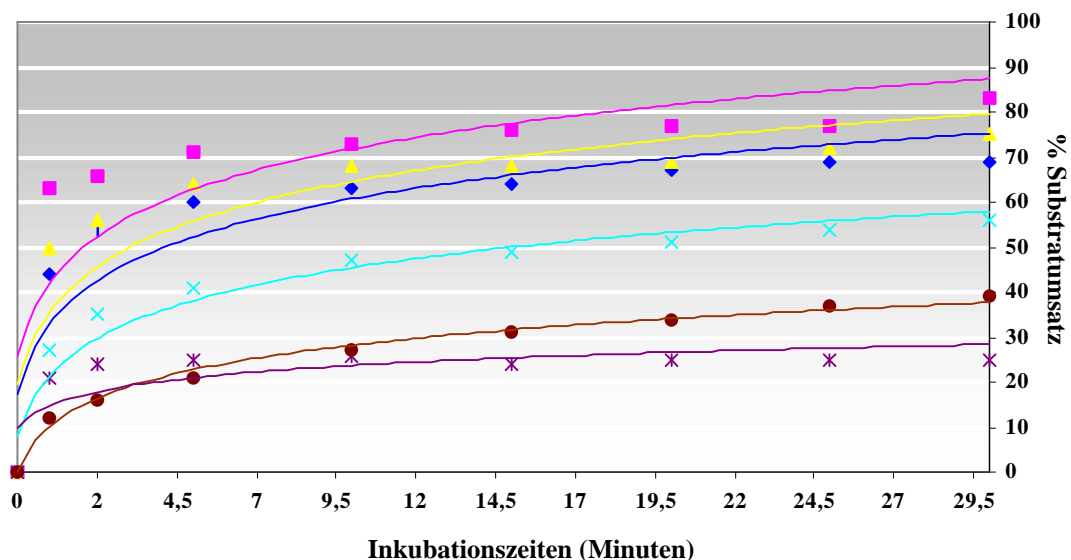


Abb. 17: Kinetiken der Ribozyme 1-6

Je 30 pmol IEX-1/Exon1-RNA wurden 30 Minuten bei 37 °C mit 60 pmol der Ribozyme 1-6 inkubiert. Direkt nach dem Start der Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes entnommen (0-Wert) und die Reaktion durch Zugabe von HF-Puffer und zweiminütige Denaturierung der RNA bei 65 °C gestoppt. Die Entnahme weiterer acht Aliquots erfolgte nach 30 Sekunden sowie 2, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten. Die Proben wurden elektrophoretisch getrennt, ethidiumbromidgefärbt und die Intensität der Substrat- sowie der Spaltproduktbanden am Computer ausgewertet. Die jeweiligen prozentualen Substratumsätze konnten mit Microsoft Excel für Windows 98 in obigem Kurvendiagramm dargestellt werden.

◆ Ribozym 1 ■ Ribozym 2 ▲ Ribozym 3 ✕ Ribozym 4 ✱ Ribozym 5 ● Ribozym 6

Die einzelnen Ribozyme spalteten die IEX-1/Exon1-RNA mit signifikant unterschiedlicher Effektivität. So erreichte das Ribozym 2 nach dreißigminütiger Inkubation einen Substratumsatz von ca. 83 %, während das Ribozym 3 75 % und Ribozym 1 69 % der RNA gespalten hatten. Die Ribozyme 4, 5 und 6 waren dabei weniger effektiv, erreichten aber immerhin noch einen Substratumsatz von 56, 25 bzw. 39 %.

Zudem gab es auch in der Geschwindigkeit der RNA-Spaltung wesentliche Differenzen. Legt man z.B. einen Substratumsatz von 50 % zugrunde, so wurde dieser Wert von den Ribozymen 2 und 3 bereits nach ca. 30 Sekunden erreicht. Das Ribozym 1 erreichte diese Umsatzrate nach ca. zwei Minuten, während das Ribozym 4 erst nach 20 Minuten 50 % der RNA gespalten hatte. Die beiden Ribozyme 5 und 6 waren katalytisch so schwach, daß sie diesen Substratumsatz überhaupt nicht erreichten.

3.3.4.2 Erstellung von Kinetiken für die Ribozyme 8-12

Je 30 pmol IEX-1/Exon2-RNA (kodierender Bereich) wurden mit 60 pmol eines Ribozyms gemischt, die Reaktion gestartet und zu den unter 3.3.4.1 genannten Zeiten Aliquots entnommen. Diese konnten auf achtprozentige PAA-Gele, 7 M Harnstoff aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und ethidiumbromidgefärbt werden. Die Abb. 18 zeigt exemplarisch ein solches Gel. Die Auswertung der Kinetiken erfolgte wie zuvor beschrieben (Abb. 19).

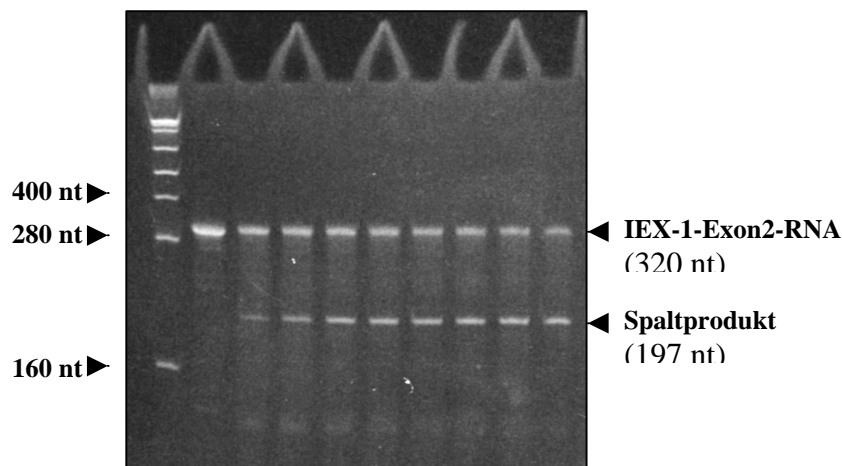


Abb. 18: Ribozym-11-Kinetik

30 pmol IEX-1/Exon2-RNA und 60 pmol Ribozym-11-RNA wurden zusammen bei 37 °C inkubiert. Sofort nach dem Start der Reaktion wurden dem Ansatz zwei Mikroliter entnommen und die Reaktion in diesem Aliquot gestoppt. Weitere Aliquots wurden zu den genannten Zeiten entnommen, elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel ethidiumbromidgefärbt.

Wie aus Abb. 18 zu ersehen ist, verlief die Spaltung der IEX-1/Exon2-RNA spezifisch und zeitabhängig. Dabei war eine deutliche Abnahme der Substratbandenintensität (320 nt) und damit einhergehend eine Zunahme in der Intensität der Bande mit dem Spaltprodukt (197 nt) zu beobachten. In ganz ähnlicher Weise stellten sich auch die Kinetiken der übrigen Ribozyme dar.

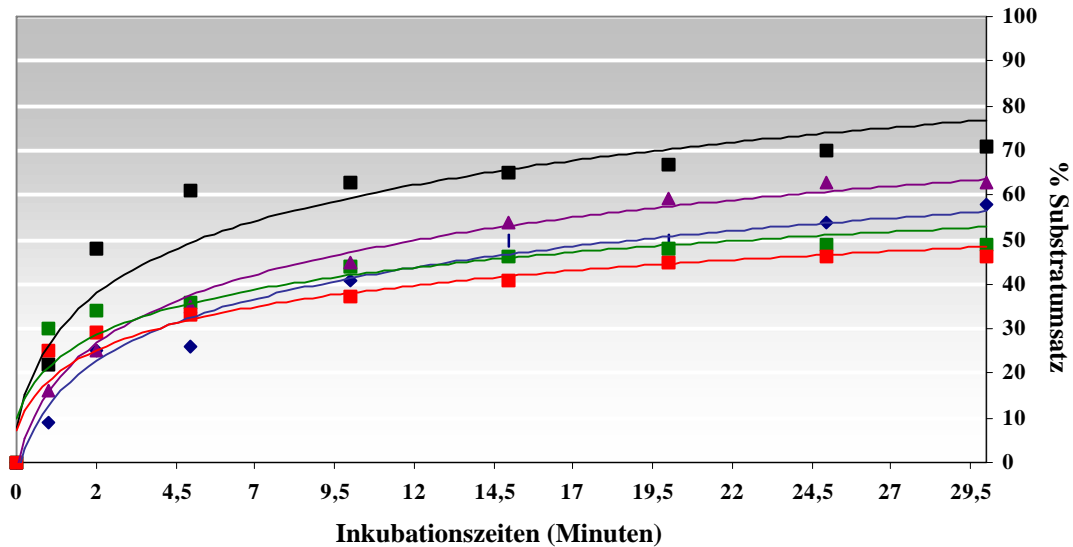


Abb. 19: Kinetiken der Ribozyme 8-12

Je 30 pmol IEX-1/Exon2-RNA wurden 30 Minuten bei 37 °C mit 60 pmol der Ribozyme 8-12 inkubiert. Direkt nach dem Start wurde ein Aliquot des Ansatzes entnommen und die Reaktion durch Zugabe von HF-Puffer und zweiminütige Denaturierung der RNA bei 65 °C gestoppt. Weitere acht Aliquots wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen, elektrophoretisch aufgetrennt, ethidiumbromidgefärbt und die Intensität der Substrat- sowie der Spaltproduktbanden am Computer ausgewertet. Die jeweiligen prozentualen Substratumsätze konnten mit Microsoft Excel für Windows 98 in obigem Kurvendiagramm dargestellt werden.

◆ Ribozym 8 ■ Ribozym 9 ▲ Ribozym 10 ■ Ribozym 11 ■ Ribozym 12

Auch die IEX-1/Exon2-spaltenden Ribozyme 8-12 verfügen über unterschiedliche Kinetiken. Hier zeigte besonders das Ribozym 11 eine hohe katalytische Aktivität (71 % Substratumsatz nach 30 Minuten), in der genannten Reihenfolge gefolgt von den Ribozymen 10 (63 %), 8 (58 %), 9 (49 %) und 12 (46 %). Auch hier unterschieden sich die Kinetiken bezüglich der Katalysegeschwindigkeit signifikant voneinander. So spaltete das Ribozym 11 innerhalb von viereinhalb Minuten 50 % der Substrat-RNA, während das Ribozym 10 hierfür ca. zwölf und das Ribozym 8 sogar 15 Minuten benötigte. Die übrigen Ribozyme 9 und 12 erreichten diesen Substratumsatz nicht innerhalb des gemessenen Zeitfensters. Auffällig ist jedoch, daß das Ribozym 9 trotz seines insgesamt vergleichsweise schwachen Gesamtumsatzes innerhalb der ersten Minute den größten Umsatz zu verzeichnen hatte.

3.3.5 Spezifische IEX-1-Spaltung aus T-REx™-293-Gesamt-RNA

Durch diesen *in vitro*-Test sollte belegt werden, daß die genannten Ribozyme nicht nur *in vitro*-synthetisierte IEX-1-RNA abbauen können, sondern auch gezielt IEX-1-mRNA aus einem Gesamt-RNA-Ansatz erkennen und spalten. Dieses Modell kommt den Verhältnissen im zellulären System weitaus näher als die Verwendung *in vitro* transkribierter IEX-1-Substrat-RNA, da der Ansatz neben der Ziel-RNA auch eine Vielzahl anderer Moleküle enthält, die mit den Ribozymen interagieren könnten.

3.3.5.1 Herstellung des Sonden-DNA-Templates mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die IEX-1-RNA durch Northern-Hybridisierung nachweisen zu können, mußte zuvor ein geeignetes Sonden-DNA-Template generiert werden. Damit die Sonde sowohl an ungespaltene RNA als auch eventuelle Spaltprodukte binden konnte, wurde ein 235 Bp langer Bereich im 3'-UT-Bereich des IEX-1-Gens amplifiziert und auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abb. 20). Je 50 ng der aus diesem Gel eluierten und frisch denaturierten 235-Bp-DNA dienten als Template für die Synthese von [α - 32 P]dCTP-markierter Sonden-DNA („Ready To Go™ DNA Labelling Kit“ – Amersham Pharmacia).

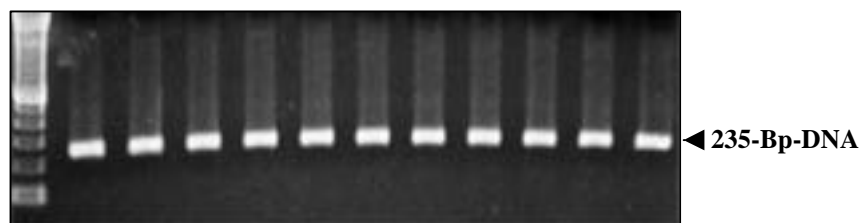


Abb. 20: Synthese einer 235-Bp langen Template-DNA zur Herstellung [α - 32 P]dCTP-markierter Sonden-DNA für den Northern-Blot mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Synthese des 235-Bp-Templates erfolgte unter Standardbedingungen, wobei je fünf pmol der Primer NBP-1 und NBP-2 sowie 25 ng pCR[®]3.1/IEX-1-DNA pro Ansatz Verwendung fanden. Im Anschluß wurde die DNA auf einprozentigen Agarosegelen aufgetrennt und ethidiumbromid-gefärbt.

3.3.5.2 *In vitro*-IEX-1-Spaltung aus T-RExTM-293-Gesamt-RNA

Je 20 µg T-RExTM-293-Gesamt-RNA wurden in getrennten Ansätzen 30 Minuten bei 37 °C in Gegenwart von 30 pmol der Ribozyme 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11 und 12 inkubiert, fünf Minuten bei 65 °C denaturiert, auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und die IEX-1-RNA sowie Spaltprodukte mit einer [α -³²P]dCTP-markierten Sonde detektiert. Zwei repräsentative Blots für die Ribozyme 2, 3, 5 und 8 bzw. 9, 10, 11 und 12 wurden in Abb. 21 zusammengefaßt.

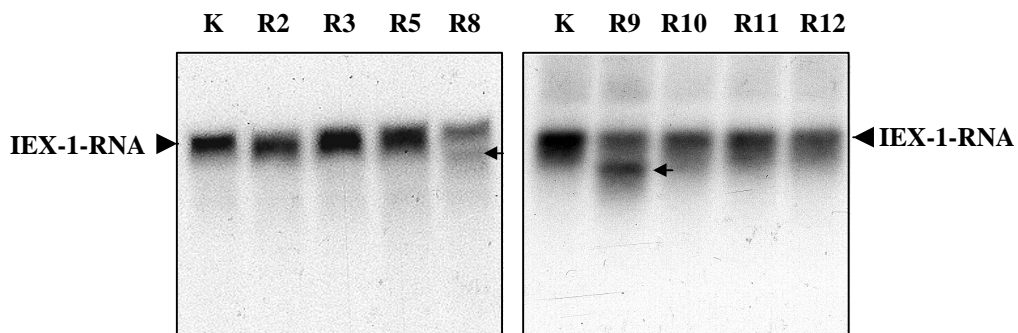


Abb. 21: IEX-1-RNA-Nachweis mittels Northern-Blot-Hybridisierung einer [α -³²P]dCTP-markierte Sonde mit ribozymbehandelter T-RExTM-293-Gesamt-RNA

Je 20 µg T-RExTM-293-Gesamt-RNA wurden mit 30 pmol verschiedener Ribozyme gemischt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurden die RNA-Ansätze elektrophoretisch getrennt und die IEX-1-RNA sowie eventuelle Spaltprodukte im Northern-Blot durch eine [α -³²P]dCTP-markierte Sonde detektiert. Spaltprodukte sind durch einen Pfeil kenntlich gemacht.

K	Kontrolle (T-REx TM -293-Gesamt-RNA ohne Ribozym)
R2	T-REx TM -293-Gesamt-RNA + Ribozym 2
R3	T-REx TM -293-Gesamt-RNA + Ribozym 3
R5	T-REx TM -293-Gesamt-RNA + Ribozym 5
R8	T-REx TM -293-Gesamt-RNA + Ribozym 8
R9	T-REx TM -293-Gesamt-RNA + Ribozym 9
R10	T-REx TM -293-Gesamt-RNA + Ribozym 10
R11	T-REx TM -293-Gesamt-RNA + Ribozym 11
R12	T-REx TM -293-Gesamt-RNA + Ribozym 12

Wie aus Abb. 21 ersichtlich ist, waren die Ribozyme 8 und 9 auch in Gegenwart von Gesamt-RNA in der Lage, die IEX-1-mRNA spezifisch zu spalten. Bei den Ribozymen 2, 3 und 5 war der Befund nicht so eindeutig. Diese drei Ribozyme schneiden die IEX-1-mRNA so dicht am 5'-Ende, daß sich das Restriktionsprodukt im Northern-Blot nur schwer von der ungespaltenen Substrat-RNA unterscheiden läßt.

Dennoch scheint es, als würden die Substratbanden nach Behandlung mit diesen drei Ribozymen breiter als die Kontrollbande sein, was für ein zweites, unwesentlich kleineres Spaltprodukt spricht. Bei den Ribozymen 10, 11 und 12 ließ sich jedoch kein Spaltprodukt nachweisen. Hier spricht bestenfalls das schwächere Signal der Substratbande für eine katalytische Aktivität dieser Ribozyme.

3.4 Einfluß von konstitutiv exprimierten Ribozymen auf die IEX-1-Expression in transient transfizierten T-RExTM-293-Zellen

Wie die *in vitro*-Charakterisierung der Ribozyme ergab, schienen besonders die Ribozyme 8 und 9 geeignet, die IEX-1-mRNA auch *in vivo* zu spalten. Zudem sollte das Ribozym 2 für weiterführende Versuche Verwendung finden, da es über die aktivste Zeitkinetik verfügte und überdies auch im Northern-Blot (vgl. Abb. 21) aktiv zu sein schien. Zuletzt wurde das Ribozym 10 für den Einsatz in der Zellkultur ausgewählt. Zwar konnte im Northern-Blot keine Aktivität nachgewiesen werden, jedoch sprach die Tatsache, daß die Zielsequenzen der hochaktiven Ribozyme 8 und 9 nur wenige Nukleotide 5' der Ribozym-10-Spaltungsstelle lagen, dafür, daß der in Frage kommende Bereich der IEX-1-mRNA *in vivo* für Ribozyme frei zugänglich ist. Aus diesen Gründen wurden die Ribozyme 2, 8, 9 und 10 sowie drei verschiedene Ribozym-Konkatamere, die sich aus Kombinationen dieser vier katalytischen Einheiten zusammensetzten, in den Expressionsvektor pCR[®]3.1 kloniert. Zusätzlich wurde das IEX-1-Intron an das 3'-Ende der verschiedenen Konstrukte angefügt, um die Transkriptionsrate zu erhöhen (Lee et al., 1997; Zheng et al., 1997). Mit den auf diese Weise konstruierten Vektoren sowie dem tetrazyklininduzierbaren Expressionsvektor pcDNA4/TO/IEX-1 (Arlt et al., 2001) wurden T-RExTM-293-Zellen transient transfiziert. Zwei Kulturen wurden lediglich mit pcDNA4/TO/IEX-1 und dem Leervektor pCR[®]3.1 transfiziert und dienten als Positiv- (tetrazyklinstimuliert) bzw. Negativkontrolle (unstimuliert). Im Anschluß an eine zwölfstündige Inkubation bei 37 °C wurde die Ansätze 24 Stunden serumstarviert und dann mit Ausnahme der Negativkontrolle Tetrazyklin (1 µg/ml) zugegeben. Tetrazyklin führt in diesem Expressionssystem zu einer Induktion des in den Vektor pcDNA4/TO ligierten Gens. Zwölf Stunden später wurde Gesamtprotein extrahiert und im Western-Blot sowohl das IEX-1-Protein als auch α -Tubulin durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Die α -Tubulinbande diente als Mengenkontrolle, da es als strukturgebendes Protein in allen Zellen in etwa gleichbleibenden Mengen vorkommt.

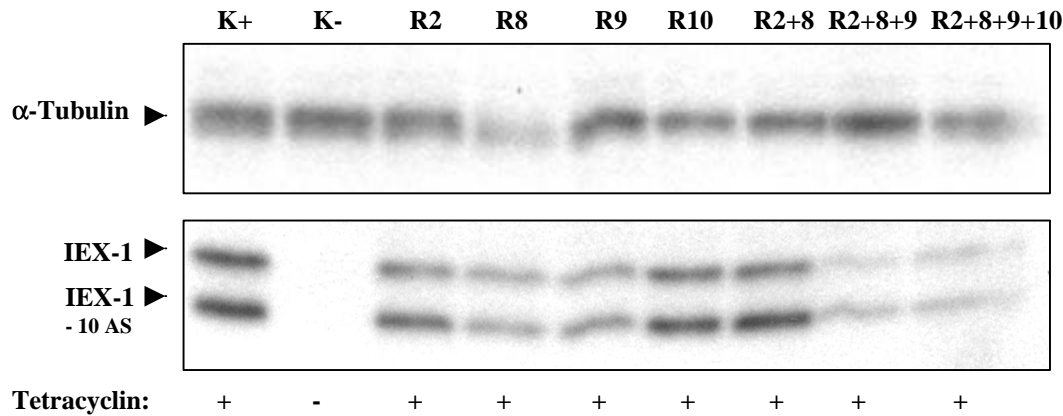


Abb. 22: Western-Blot mit Proteinextrakten aus IEX-1- und ribozymtransfizierten T-REx™-293-Zellen

T-REx™-293-Zellen wurden transient mit pcDNA4/TO/IEX-1 und verschiedenen pCR®3.1/Ribozym-Konstrukten transfiziert, nach zwölfstündiger Inkubation bei 37 °C (10 % FCS) für 24 Stunden serumstarviert, durch Zugabe von einem µg Tetracyclin/ml Medium zur IEX-1-Expression stimuliert und nach weiteren zwölf Stunden aufgearbeitet. Die Proteine α-Tubulin (interner Mengenstandard) und IEX-1 wurden durch Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

K+	Positivkontrolle: pCR®3.1- und pcDNA4/TO/IEX-1-transfiziert
K-	Negativkontrolle: pCR®3.1- und pcDNA4/TO/IEX-1-transfiziert, unstimuliert
R2	pCR®3.1/Ribozym2/IEX-1-Intron- und pcDNA4/TO/IEX-1-transfiziert
R8	pCR®3.1/Ribozym8/IEX-1-Intron- und pcDNA4/TO/IEX-1-transfiziert
R9	pCR®3.1/Ribozym9/IEX-1-Intron- und pcDNA4/TO/IEX-1-transfiziert
R10	pCR®3.1/Ribozym10/IEX-1-Intron- und pcDNA4/TO/IEX-1-transfiziert
R2+8	pCR®3.1/Ribozym2+8/IEX-1-Intron- und pcDNA4/TO/IEX-1-transfiziert
R2+8+9	pCR®3.1/Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron- und pcDNA4/TO/IEX-1-transfiziert
R2+8+9+10	pCR®3.1/Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron- und pcDNA4/ TO/IEX-1-transfiziert.

Die IEX-1-Doppelbande in Abb. 22 erklärt sich aus der Tatsache, daß das verwendete Vektorkonstrukt 30 Nukleotide 3' des ATG ein zweites Startkodon für die Translation trug, so daß ein weiteres, um 10 AS verkürztes Genprodukt entstehen konnte. In allen mit Ribozym behandelten Zellen zeigte sich ein verminderter IEX-1-Proteinspiegel. Vor allem die Ribozyme 9/IEX-1-Intron, 2+8+9/IEX-1-Intron und 2+8+9+10/IEX-1-Intron verfügten über eine hohe katalytische Aktivität, da in den mit diesen Ribozymen behandelten Zellen eine deutliche Abnahme des IEX-1-Proteinspiegels zu verzeichnen war. Das schwächere IEX-1-Signal in den mit Ribozym 8 behandelten Zellen beruht auf einer geringeren Auftragsmenge, wie aus der ebenfalls schwächeren α-Tubulin-Bande zu ersehen ist. Identische Befunde wurden auch anhand von aus T-REx™-HeLa-Zellen gewonnenen Proteinextrakten gewonnen (nicht gezeigt). Da die ribozymvermittelte Reduktion des IEX-1-Proteinspiegels jedoch bei T-REx™-293-Zellen effektiver war, wurde diese Zelllinie für weiterführende Versuche benutzt.

3.5 Einfluß von endogen exprimierten Ribozymen auf stabil mit den verschiedenen Ribozymkonstrukten transduzierte T-RExTM-293-Zellen

Da im transient transfizierten System vor allem das Ribozym9/IEX-1-Intron sowie die beiden Konkatomere Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron und Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron zu einer verringerten IEX-1-Expression führten, wurden diese Konstrukte in den retroviralen Vektor pBabePuro umkloniert und zur stabilen Transduktion von T-RExTM-293-Zellen eingesetzt.

3.5.1 Nachweis des Provirus in T-RExTM-293-Zellen

Im Anschluß an die Umklonierung von Ribozym9/IEX-1-Intron, Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron und Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron in den retroviralen Vektor pBabePuro wurde eine Verpackungszelllinie mit diesen Vektoren und anderen Hilfsvektoren transfiziert. So konnte infektiöser Virusüberstand gewonnen werden, welcher sich für die Transduktion von T-RExTM-293-Zellen eignete. Aus den stabil transduzierten Zelllinien (T-RExTM-293/pBabePuro, T-RExTM-293/pBabePuro/Ribozym9, T-RExTM-293/pBabePuro/Ribozym2+8+9 und T-RExTM-293/pBabePuro/Ribozym2+8+9+10) konnte genomische DNA isoliert und ins Genom integrierte Ribozym-DNA durch spezifische Primer amplifiziert werden (Abb. 23).

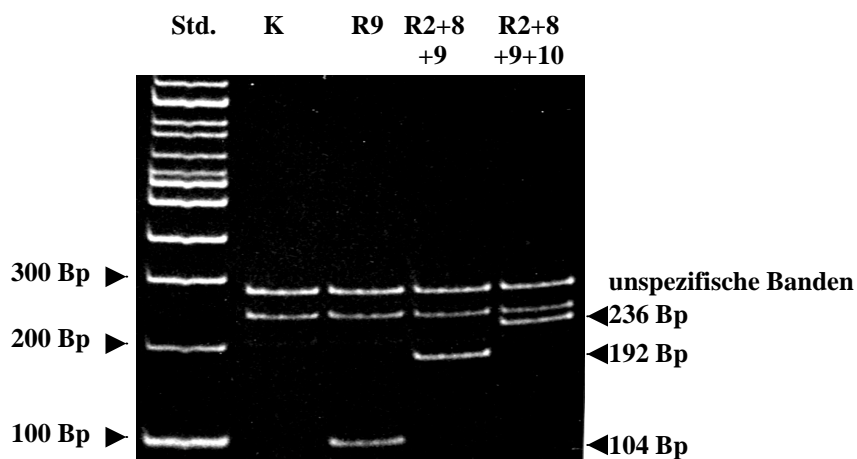
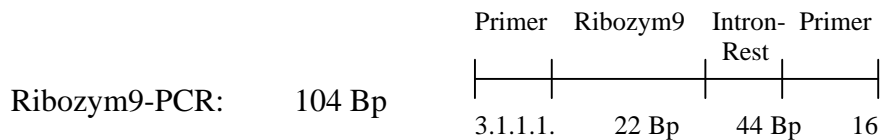


Abb. 23: Nachweis des Provirus in den T-RExTM-293-Zellen mittels PCR

Aus den transduzierten T-RExTM-293-Zellen (pBabePuro, pBabePuro/Ribozym9, pBabePuro/Ribozym2+8+9 und pBabePuro/Ribozym2+8+9+10) wurde genomische DNA isoliert. Diese diente als Template für eine primerspezifische Amplifikation der Ribozym-Inserts in der Provirus-DNA.

Std.	DNA-Leiter
K	Provirus-Amplifikation mit T-REx TM -293/pBabePuro-DNA
R9	Provirus-Amplifikation mit T-REx TM -293/pBabePuro/Ribozym9-DNA (104 Bp)
R2+8+9	Provirus-Amplifikation mit T-REx TM -293/pBabePuro/Ribozym2+8+9-DNA (192 Bp)
R2+8+9+10	Provirus-Amplifikation mit T-REx TM -293/pBabePuro/Ribozym2+8+9+10-DNA (236 Bp)

Die generierten Fragmente (Abb. 23) waren ca. 100 Bp kürzer, als ursprünglich angenommen wurde. Da es sich bei Retroviren um einzelsträngige RNA-Viren handelt, erscheint es jedoch plausibel, daß der den Ribozymen nachgeschaltete IEX-1-Intron-Bereich im Verlauf der Infektion aus der viralen RNA herausgespleißt wurde, bevor diese in cDNA umgeschrieben und ins Genom integriert werden konnte. Sollte dies der Fall sein, so mußten die per PCR generierten Fragmente folgende Längen aufweisen:



Für jedes weitere Ribozym mußten 44 Bp zugezählt werden, so daß das zu erwartende PCR-Produkt für die Ribozym₂₊₈₊₉-DNA eine Länge von 192 Bp und das für Ribozym₂₊₈₊₉₊₁₀ eine Länge von 236 Bp hatte. Aus der T-RExTM-293/pBabe-Kontroll-DNA sollte sich kein ribozymspezifisches PCR-Produkt generieren lassen. Da sich in den genomischen DNAs die geforderten Fragmente nachweisen ließen, konnte davon ausgegangen werden, daß die Zelllinien das gewünschte Provirus stabil ins Genom aufgenommen hatten. Zudem wurden die den Ribozymen nachgeschalteten IEX-1-Intron-RNAs aus den Konstrukten herausgespleißt. Dies war jedoch für die Versuchsanordnung nicht von Nachteil, wie spätere Ergebnisse zeigen werden.

3.5.2 Nachweis von Ribozym-RNA in den transduzierten T-RExTM-293-Zellen durch Reverse Transkription und anschließende PCR-Amplifikation (RT-PCR)

Nachdem die über den Provirus ins Genom eingebaute Ribozym-Template-DNA erfolgreich in den transduzierten T-RExTM-293-Zellen nachgewiesen werden konnte, war es von fundamentalem Interesse, auch die Ribozym-RNA selbst nachweisen zu können. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus den betreffenden Zelllinien isoliert, mit DNase I behandelt und in cDNA umgeschrieben. Durch spezifische Primerkombinationen wurde sowohl aus den Gesamt-RNA-Ansätzen als auch den cDNAs der verschiedenen Zelllinien Ribozym-DNA amplifiziert, auf einem achtprozentigem PAA-Gel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-färbung nachgewiesen. Da die Intronsequenzen aus den Konstrukten herausgeschnitten wurden, waren aufgrund der verwendeten Primerkombinationen die in Abb. 24 dargestellten Fragmentlängen zu erwarten.

Ribozym9-cDNA-Amplifikation:	37 Bp
Ribozym2+8+9-cDNA-Amplifikation:	126 Bp
Ribozym2+8+9+10-cDNA-Amplifikation:	169 Bp

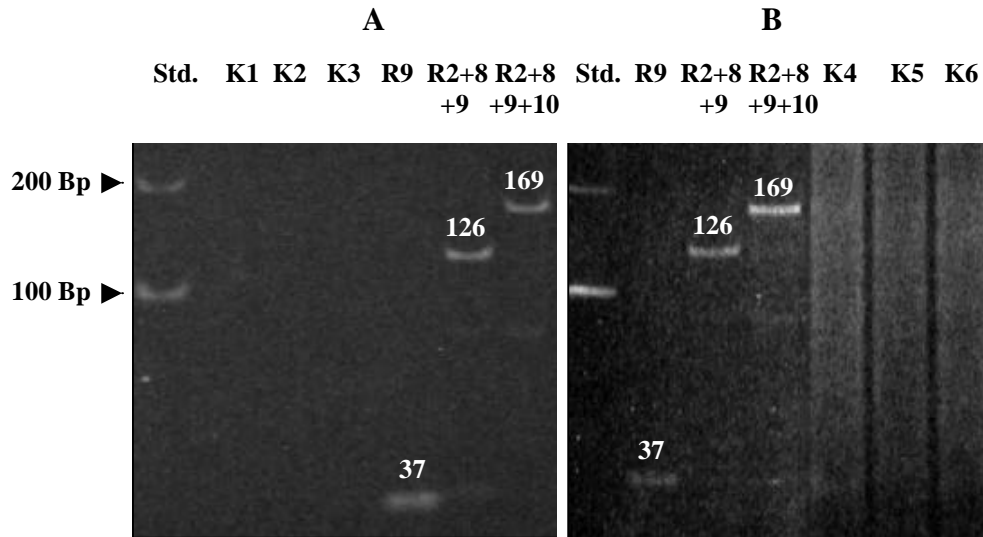


Abb. 24: Nachweis von Ribozym-RNA in T-REx™-293-Zellen durch RT-PCR

A: Gesamt-RNA aus stabil transduzierten T-REx™-293-Zellen wurde im Anschluß an eine DNase I-Behandlung durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und aus dieser durch PCR die verschiedenen Ribozym-DNAs amplifiziert. **B:** PCR-Amplifikation der Ribozymkonstrukte aus DNase-behandelter Gesamt-RNA der Zelllinien T-REx™-293/pBabe/Ribozym9, T-REx™-293/pBabe/Ribozym2+8+9 und T-REx™-293/pBabe/Ribozym2+8+9+10 (K4-6) sowie aus cDNA, die durch Reverse Transkription aus diesen RNA-Ansätzen gewonnen wurde.

Std.	DNA-Leiter
K1	Negativkontrolle 1: Ribozym9-Nachweis aus T-REx™-293/pBabePuro-cDNA
K2	Negativkontrolle 2: Ribozym2+8+9-Nachweis aus T-REx™-293/pBabePuro-cDNA
K3	Negativkontrolle 3: Ribozym2+8+9+10-Nachweis aus T-REx™-293/pBabePuro-cDNA
R9	Ribozym9-Nachweis aus T-REx™-293/pBabePuro/Ribozym9-cDNA
R2+8+9	Ribozym2+8+9-Nachweis aus T-REx™-293/pBabePuro/Ribozym2+8+9-cDNA
R2+8+9+10	Ribozym2+8+9+10-Nachweis aus T-REx™-293/pBabe/Ribozym2+8+9+10-cDNA
K4	Negativkontrolle 4: Ribozym9-Nachweis aus T-REx™-293/pBabePuro/R9-RNA
K5	Negativkontrolle 5: Ribozym2+8+9-Nachweis aus T-REx™-293/pBabePuro/R2+8+9-RNA
K6	Negativkontrolle 6: Ribozym2+8+9+10-Nachweis aus T-REx™-293/pBabePuro/R2+8+9+10-RNA

Durch die RT-PCR konnten die für die einzelnen Zelllinien charakteristischen Ribozymkonstrukte nachgewiesen werden. Wie erwartet ließ sich aus der T-REx™-293/pBabePuro-cDNA sowie den Gesamt-RNA-Ansätzen keinerlei Ribozym-DNA amplifizieren.

3.5.3 Northern-Blot-Analyse von T-RExTM-293-Gesamt-RNA nach stabiler Transduktion mit pBabePuro und verschiedenen pBabePuro/Ribozymkonstrukten

Die Zellen wurden 24 Stunden lang serumstarviert (0,5 % FCS), zwei Stunden in Vollmedium inkubiert (10 % FCS) und aus je einer 75cm²-Kulturflasche der Zelllinien T-RExTM-293/pBabePuro, T-RExTM-293/pBabePuro/Ribozym9, T-RExTM-293/pBabePuro/Ribozym2+8+9 und T-RExTM-293/pBabePuro/Ribozym2+8+9+10 Gesamt-RNA isoliert. Die IEX-1-RNA aus je 20 µg dieser Gesamt-RNAs wurde durch Northern-Blot-Analyse mit einer [α -³²P]dCTP-markierten Sonde nachgewiesen. Zudem wurde der Northern-Blot mit der „ScanPack Version 3.0“ (Biometra) als Bitmap-Datei abgespeichert, die Intensität der IEX-1-RNA-Banden am Computer ausgewertet und mit Excel für Windows 98 ein Balkendiagramm erstellt, welches die prozentualen Relationen der einzelnen RNA-Banden zueinander darstellt.

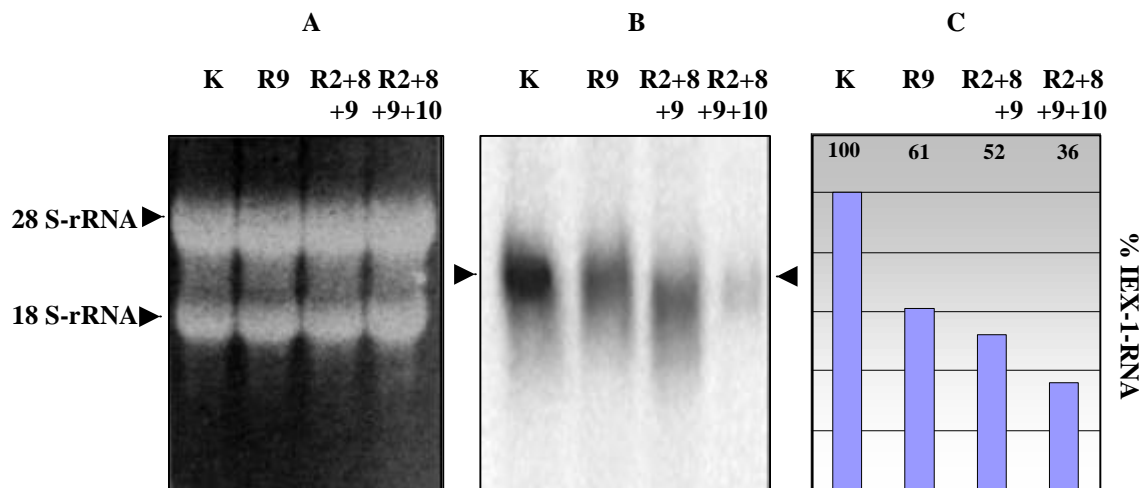


Abb. 25: IEX-1-RNA-Nachweis in Gesamt-RNA aus mit Ribozymkonstrukten transduzierten T-RExTM-293-Zellen mittels Northern-Blot-Hybridisierung

A: Gesamt-RNA aus stabil transduzierten T-RExTM-293-Zellen (pBabePuro, pBabePuro/Ribozym9, pBabePuro/Ribozym2+8+9 und pBabePuro/Ribozym2+8+9+10) wurde elektrophoretisch getrennt, und ethidiumbromidgefärbt **B:** Die RNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und die IEX-1-mRNA im Northern-Blot durch eine [α -³²P] dCTP-markierte DNA-Sonde detektiert. Die IEX-1-mRNA-Banden (1,3 kb) sind durch die Pfeile beidseitig der Abbildung kenntlich gemacht **C:** Prozentuale Relation der Intensität der einzelnen IEX-1-RNA-Banden zueinander.

K	T-REx TM -293/pBabePuro-Gesamt-RNA
R9	T-REx TM -293/pBabePuro/Ribozym9-Gesamt-RNA
R2+8+9	T-REx TM -293/pBabePuro/Ribozym2+8+9-Gesamt-RNA
R2+8+9+10	T-REx TM -293/pBabePuro/Ribozym2+8+9+10-Gesamt-RNA

Wie aus Abb. 25 A zu ersehen ist, wurden gleiche RNA-Mengen für den Northern-Blot eingesetzt. Im Vergleich zur Kontrolle war in allen ribozymtransduzierten Zelllinien eine Verringerung des IEX-1-mRNA-Levels nachweisbar. Vor allem in den Ribozym2+8+9+10-exprimierenden Zellen konnte die Ziel-RNA effektiv gespalten und auf 36 % der Menge in der Referenzzelllinie reduziert werden, gefolgt von mit Ribozym2+8+9- (52 %) und Ribozym9-transduzierten Zellen (61 %).

3.5.4 Western-Blot-Analyse von T-RExTM-293-Proteinextrakten nach stabiler Transduktion mit pBabePuro und verschiedenen pBabePuro/Ribozymkonstrukten

Die vier transduzierten Zelllinien wurden 24 Stunden lang serumstarviert (0,5 % FCS), weitere 24 Stunden in Vollmedium (10 % FCS) inkubiert und im Anschluß eine Proteinextraktion durchgeführt. Sowohl das IEX-1-Protein als auch α -Tubulin wurden über spezifische Antikörper im Western-Blot-Verfahren nachgewiesen (Abb. 26). Anschließend wurde der Western-Blot mit der „ScanPack Version 3.0“ von Biometra ausgewertet.

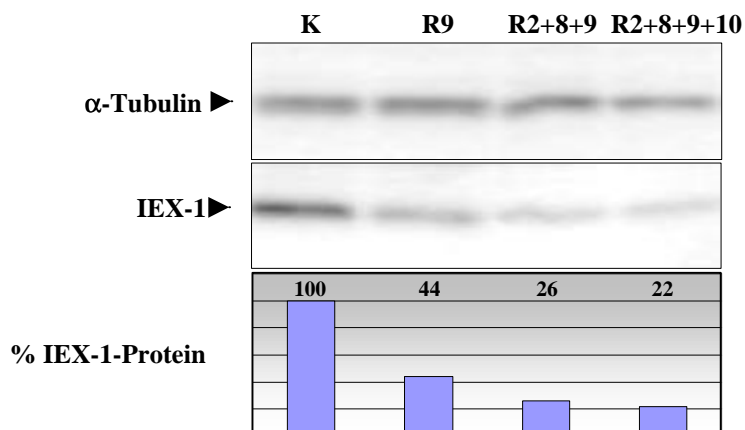


Abb. 26: Western-Blot mit Proteinextrakten aus stabil ribozymtransduzierten T-RExTM-293-Zellen

Aus stabil transduzierten T-RExTM-293-Zellen (pBabePuro, pBabePuro/Ribozym9, pBabePuro/Ribozym2+8+9 und pBabePuro/Ribozym2+8+9+10) wurden Proteinextrakte gewonnen und sowohl α -Tubulin als auch IEX-1 durch Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Das Balkendiagramm zeigt, auf welches Niveau der Proteinspiegel infolge der Ribozymexpression im Vergleich zur Referenzzelllinie (T-RExTM-293/pBabePuro = 100 %) gesenkt werden konnte.

K	T-REx TM -293/pBabePuro
R9	T-REx TM -293/pBabePuro/Ribozym9
R2+8+9	T-REx TM -293/pBabePuro/Ribozym2+8+9
R2+8+9+10	T-REx TM -293/pBabePuro/Ribozym2+8+9+10

Die ermittelten Intensitäten der einzelnen IEX-1-Proteinbanden wurden durch die Auswertung der entsprechenden α -Tubulin-Mengen angeglichen. Die Menge des von den T-RExTM-293/pBabePuro exprimierten IEX-1-Proteins wurde gleich 100 % gesetzt und die Mengen an IEX-1 in den ribozymexprimierenden Zellen ermittelt (Microsoft Excel für Windows 98). Im Western-Blot war in allen ribozymexprimierenden Zelllinien ein deutlich verringerter IEX-1-Proteinspiegel gegenüber den Referenzzellen nachweisbar. Interessant war dabei, daß die Effektivität, mit der die Ribozymkonstrukte die Genexpression unterdrückten, der durch die Northern-Blot-Analyse gefundenen Reihenfolge entsprach. So erwies sich das Ribozym 2+8+9+10 in T-RExTM-293-Zellen als potentester Inhibitor der IEX-1-Expression (lediglich 22 % IEX-1-Protein im Vergleich zur Kontrolle), gefolgt von Ribozym 2+8+9 (26 %) und Ribozym 9 (44 %).

3.5.5 Einfluß der Ribozyme auf die Proliferationsrate von T-RExTM-293-Zellen

3.5.5.1 „CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ (Promega)

Identische T-RExTM-293-Zellzahlen wurden auf 96-well-Platten kultiviert und am folgenden Tag unterschiedliche FCS-Konzentrationen (0,5 %, 2,5 %, 5 % und 10 %) im Medium eingestellt. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation konnte die Lebendzellzahl durch oben genanntes Testsystem gemessen werden. Aus den dabei ermittelten Werten wurde mit Excel für Windows 98 ein Balkendiagramm erstellt (Abb. 27).

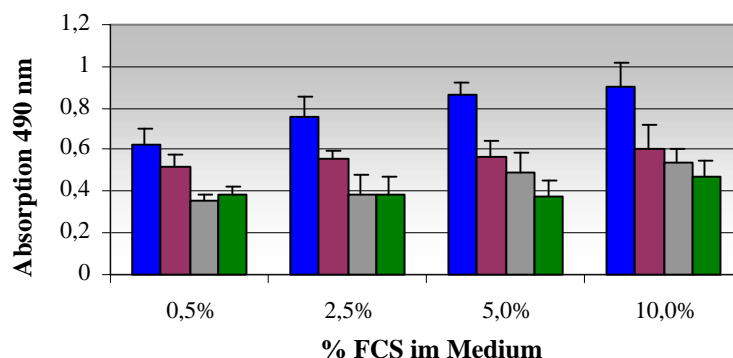


Abb. 27: „CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ (Promega)

Die vier verschiedenen T-RExTM-293-Kulturen (5000 Zellen/well) wurden in 96-well-Platten mit Medium vier verschiedener FCS-Konzentrationen inkubiert und die Anzahl lebender Zellen nach vierundzwanzigstündiger Inkubation bei 37 °C mit dem „CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ durch Zugabe von je 25 μ l MTS-Reagenz/well, einstündiger Inkubation der Kulturen sowie Messung des Farbumschlags im Medium bei 490 nm bestimmt. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, die Ergebnisse gemittelt und ein Balkendiagramm erstellt.

■ pBabePuro ■ pBabePuro/R9 ■ pBabePuro/R2+8+9 ■ pBabePuro/R2+8+9+10

Da identische Zellmengen eingesetzt wurden, sprechen die Ergebnisse dafür, daß die Kulturen mit pBabePuro-transduzierten Zellen nach vierundzwanzigstündiger Inkubation bei allen getesteten FCS-Konzentrationen über höhere Lebendzellzahlen verfügten, als die mit Ribozym transduzierten Zelllinien. Zudem war bei allen FCS-Konzentrationen über 2,5 % die Tendenz zu beobachten, daß der vermehrte Einsatz von katalytischen Zentren in den Ribozym-Inserts zu einer Verringerung der Proliferationsrate führte. So reduzierte der Einsatz des Konkamers Ribozym2+8+9+10 die Proliferationsrate in T-REx™-293-Zellen am deutlichsten, während das Ribozym9-Insert den geringsten Effekt auf das Wachstum der Zellen hatte. Setzt man eine wachstumsfördernde Funktion von IEX-1 voraus, so decken sich auch diese Ergebnisse in hohem Maße mit den durch den Northern- und Western-Blot ermittelten Befunden.

3.5.5.2 Zellzyklusanalyse der stabil transduzierten Zelllinien durch Propidiumjodid-Färbung und anschließende Durchflußzytometrie

In je vier Löcher einer Sixwellplatte wurden 4×10^5 Zellen jeder transduzierten Zelllinie überführt, diese über Nacht inkubiert, 48 Stunden serumstarviert (0,5 % FCS) und schließlich zwölf Stunden in Vollmedium (10 % FCS) inkubiert. Im Anschluß an die Zellernte, verschiedene Waschschriffe und die Fixierung der Zellen in Ethanol konnte die DNA-Menge in den Zellen durch Propidiumjodidfärbung im Durchflußzytometer (Dako) gemessen werden.

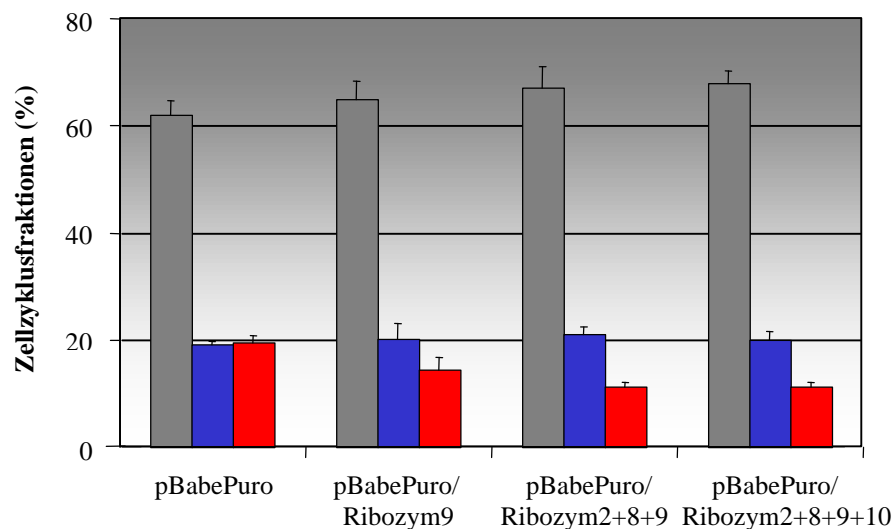


Abb. 28: Zellzyklusanalyse der verschiedenen transduzierten Zelllinien durch Propidiumjodidfärbung und anschließende FACS-Analyse

Gleiche Zellzahlen der vier stabil transduzierten Zelllinien wurden in Sixwellplatten ausgesät, 48 Stunden lang serumstarviert (G1-Arrest) und zwölf Stunden in Vollmedium (10 % FCS) kultiviert. Der DNA-Gehalt der Zellen gab daraufhin Aufschluß über die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Stadien des Zellzyklus. Die Auswertung erfolgte im Anschluß an eine Propidiumjodidfärbung mittels Durchflußzytometrie (Dako).

■ G1-Phase ■ Synthese(S)-Phase ■ G2/M-Phase

Da Propidiumjodid (PI) ähnlich wie Ethidiumbromid in DNA interkaliert und sich durch Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen läßt, kann so die relative Menge der in den einzelnen Zellen vorhandenen DNA nachgewiesen werden. Durch diese FACS-Analyse ließen sich verschiedene Zellfraktionen einer bestimmten Phase des Zellzyklus zuordnen (Abb. 28), da Zellen in der G1-Phase einen einfachen Chromosomensatz besitzen, während Zellen zu Beginn der M-Phase über die doppelte DNA-Menge verfügen. Zellen der S-Phase liegen mit ihrem DNA-Gehalt zwischen G1 und G2/M. Abb. 28 zeigt, daß die mit pBabePuro transduzierten Zellen den Zellzyklus schneller durchliefen, als diejenigen Zellen, die Ribozymkonstrukte exprimierten. So befanden sich in den ribozymtransduzierten Zelllinien mehr Zellen in der S-Phase und weniger Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus, während ein verhältnismäßig größerer Teil der pBabePuro-transduzierten Zellen die DNA-Synthese abgeschlossen hatte und sich bereits in der Mitose befand. Entsprechend war bei den ribozymexprimierenden Kulturen ein größerer G1-Phase-Peak zu beobachten. Diese Ergebnisse belegen, daß die geringeren Lebendzellzahlen bei den ribozymbehandelten Zelllinien in Versuch 3.5.5.1 auf einer verringerten Zellzyklusprogression und nicht etwa auf einer erhöhten Apoptoserate basieren.

3.5.6 Reaktion von stabil mit Ribozymkonstrukten transduzierten T-REx™-293-Zellen auf verschiedene apoptotische Stimuli

Die Kultivierung und Serumstarvation der Zellen erfolgte wie unter 3.5.5.2 beschrieben, wobei jedoch in alle sechs Löcher der Platte Zellmaterial ausgesät wurde. Im Anschluß wurden die Zellen verschiedenen apoptotischen Stimuli ausgesetzt. Da Zellen im Zuge der Apoptose früh damit beginnen, Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran nach außen zu verlagern, können apoptotische Zellen gezielt durch Annexin V detektiert werden, da Annexin spezifisch an Phosphatidylserin bindet (Vermees et al., 1995). Die DNA in den Zellen wurde zusätzlich mit Propidiumjodid angefärbt, um nekrotische Zellen (starkes PI-Signal, starkes Annexin-V-Signal) von apoptotischen Zellen (schwaches PI-Signal, starkes Annexin-V-Signal) unterscheiden zu können. Die Verteilung apoptotischer und gesunder Zellen konnte im Durchflußzytometer (Dako) ermittelt und mit Excel für Windows 98 in Form eines Balkendiagramms dargestellt werden (Abb. 29). Die Fraktion nekrotischer Zellen wurde in diesem Zusammenhang nicht berücksichtigt.

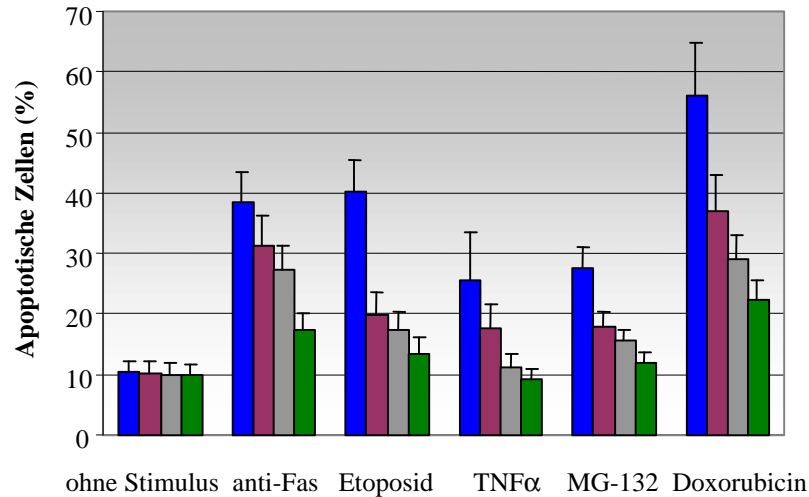


Abb. 29: Zusammenhang zwischen IEX-1-Restriktion und der Sensibilität gegenüber apoptotischen Stimuli in T-REx™-293-Zellen

Je 2×10^5 Zellen jeder Zelllinie wurden in die sechs Vertiefungen einer Sixwellplatte ausgesät, die Zellen über Nacht inkubiert, 48 Stunden serumstarviert und mit verschiedenen apoptotischen Stimuli beimpft. Das an der äußeren Membran apoptotischer Zellen befindliche Phosphatidylserin wurde mit dem „ApoAlert™ Annexin V-FITC“-Kit der Firma Clontech detektiert und die apoptotischen Zellen mittels Durchflußzytometrie von der Fraktion gesunder Zellen getrennt. Schließlich wurde mit Excel für Windows 98 ein Balkendiagramm erstellt.

- Probe 1: keine apoptotischen Stimuli (Kontrolle)
- Probe 2: Zugabe von 2 μ l anti-Fas (0,2 μ g/ μ l) für 18 Stunden
- Probe 3: Zugabe von 2 μ l Etoposid (35 mM) für 24 Stunden
- Probe 4: Zugabe von 5 μ l TNF α (0,32 μ M) für 18 Stunden
- Probe 5: Zugabe von 2 μ l MG-132 (10 mM) für 24 Stunden
- Probe 6: Zugabe von 1 μ l Doxorubicin (0,2 mM) für 24 Stunden

■ pBabePuro ■ pBabePuro/R9 ■ pBabePuro/R2+8+9 ■ pBabePuro/R2+8+9+10

Das Diagramm in Abb. 29 zeigt, daß die Zelllinien mit unterschiedlicher Intensität auf die verschiedenen apoptotischen Stimuli reagierten. So führte vor allem die Doxorubicin-Behandlung zum programmierten Zelltod, gefolgt vom Fas-aktivierenden Antikörper, Etoposid, MG-132 und TNF α . Der interessantere Aspekt dieses Versuches ist jedoch, daß signifikant weniger Zellen in die Apoptose überführt werden konnten, wenn diese IEX-1-spaltende Ribozyme exprimierten. Auch hier ist wieder die in den vorhergegangenen Versuchen beobachtete Reihenfolge der katalytischen Effektivität der Ribozymkonstrukte nachweisbar. So schützte das Konkatamer Ribozym2+8+9+10 die Zellen effektiver vor Apoptose als Ribozym2+8+9 und Ribozym9. Offensichtlich hängt diese verminderte Apoptoserate mit dem durch die Ribozyme vermittelt reduzierten IEX-1-Spiegel zusammen.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die IEX-1-Expression in T-REx™-293-Zellen durch den Einsatz verschiedener *Hammerhead*-Ribozyme gezielt zu unterbinden, um hierdurch einen Einblick in mögliche zelluläre Funktionen des IEX-1-Proteins zu erhalten.

4.1 Auswahl der Ribozym-Zielsequenzen auf der IEX-1-mRNA, Ribozym-Design, *in vitro*-Testung und Erstellung von Kinetiken

Hammerhead-Ribozyme können eine beliebige RNA am 3'-Ende von Nukleosid-Triplets des Typs 5'-NUH↓-3' spalten, wobei N für jedes der vier möglichen Nukleoside, U für Uridin und H für Cytidin, Uridin und Adenosin steht. Diese Regel wurde von verschiedenen Autoren formuliert (Ruffner et al., 1990; Perriman et al., 1992; Shimayama et al., 1995; Zoumadakis & Tabler, 1995; Ludwig et al., 1998). Vergleichende Studien ergaben, daß Substrate mit einem Purin an der ersten Position des Triplets und einem Cytosin oder Adenin an der dritten Position besonders effektiv gespalten werden (Koizumi et al., 1988; Ruffner et al., 1990; Perriman et al., 1992; Zoumadakis & Tabler, 1995). Diesen Studien nach läßt sich die Effektivität, mit der 5'-NUH↓-3'-Motive gespalten werden, in folgender Reihenfolge ausdrücken: AUC, GUC > GUA, AUA, CUC > AUU, UUC, UUA > GUU, CUA > UUU, CUU (Sun et al., 2000). Zoumadakis & Tabler (1995) fanden in ihren Beispielen, daß 5'-NUC↓-3'-Motive am effektivsten gespalten würden. Clouet-d'Orval & Uhlenbeck (1997) beschrieben eine deutliche Steigerung der Ribozymaktivität, wenn das NUH↓-Motiv 3' von einem U flankiert wurde. Aufgrund dieser vergleichenden Studien wurde die IEX-1-mRNA-Sequenz in einem ersten Schritt auf sämtliche mögliche 5'-NUC↓-3'-Triplets und insbesondere auf 5'-NUC↓U-3'-Motive hin untersucht. In einem zweiten Schritt wurden *Hammerhead*-Ribozyme gegen die ausgewählten Triplets konstruiert. *Hammerhead*-Ribozyme haben gegenüber *Hairpin*-Ribozymen den Vorteil, daß sie besser untersucht und aufgrund ihrer geringeren Grösse leichter und billiger zu synthetisieren sind (James und Gibson, 1998). Die Effizienz von Ribozymen hängt neben der ausgewählten Spaltungsstelle entscheidend von der Substratbindung ab. Diese wird durch die Länge und Sequenz der beiden Antisense-Arme des Ribozyms, die beidseitig der Spaltungsstelle binden, definiert.

Dabei können Ribozyme mit kurzen Antisense-Armen nach erfolgter Spaltung leichter vom Substrat abdiffundieren und haben folglich einen höheren Substratumsatz als entsprechende Ribozyme mit längeren Armen (Bertrand et al., 1994; Hertel et al., 1994), gleichzeitig ist die Substratspezifität jedoch herabgesetzt. In der Regel erweisen sich Ribozyme mit einer Antisense-Länge von sieben bis acht Nukleotiden beidseitig des NUH↓-Triplets als effektiv (Bertrand et al., 1994; Herschlag, 1991). Daß solche Antisense-Arme eine hinreichende Spezifität garantieren, läßt sich durch die jüngsten Ergebnisse des internationalen Konsortiums für die Sequenzierung des humanen Genoms belegen. Demnach besteht das menschliche Genom nur aus ca. 30 000 – 40 000 proteinkodierenden Genen, wobei die kodierende Sequenz eines humanen Gens im Schnitt 1 340 Bp lang ist (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Folglich besteht das für Proteine kodierende Genom des Menschen aus ca. $40\,000 \times 1\,340 = 5,36 \times 10^7$ Basenpaaren. Aus einem Ribozym, daß beidseitig von je sieben Antisensenukleotiden flankiert wird, lassen sich theoretisch $4^{14} = 2,7 \times 10^8$ Varianten herstellen. Da dieser Wert über dem ermittelten Wert für die kodierende Region des humanen Genoms liegt, sollte ein solches Ribozym neben seiner Ziel-RNA statistisch gesehen keine zusätzliche unspezifische proteinkodierende Region spalten.

Zudem konnten Tabler et al. (1994) zeigen, daß die Substratbindung über asymmetrische Arme effektiver als die über symmetrische verläuft. Um den angesprochenen Anforderungen an ein Ribozym mit hohem Substratumsatz und hoher Substratspezifität zu genügen, wurden Ribozyme mit asymmetrischen Antisense-Armen (5'-Arm = 7 Nukleotide; 3'-Arm = 9 Nukleotide) gewählt. Die Sequenz der Antisense-Bereiche ergab sich aus der komplementären Ziel-mRNA-Sequenz. Der Kernbereich der Ribozyme entsprach an den Positionen 3-10.4 und 11.4-15.1 (Numerierung nach Hertel et al., 1992) einem von Singh et al. (1996) beschriebenen Ribozym (Rb124), wobei die Schleife-II-Sequenz nach Tuerk et al. (1988) modifiziert wurde, um die Stabilität der Sekundärstruktur zu stärken.

Erst kürzlich verglichen Amarzguioui et al. (2000) die zwei gängigsten Methoden zur Identifizierung zugänglicher mRNA-Zielsequenzen (computergestützte Vorhersage von Sekundärstrukturen und *in vitro* Accessibility Assays). Diese Arbeiten verwiesen auf eine nur schwache Korrelation zwischen der tatsächlichen Zugänglichkeit von RNA-Abschnitten und den durch „*in vitro* Accessibility Assays“ ermittelten Daten, wohingegen eine computergestützte Vorhersage der wahrscheinlichen Sekundärstruktur zu einem zuverlässigen Design von katalytisch aktiven *Hammerhead*-Ribozymen führte.

Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die Sekundärstruktur der Ribozyme als auch die der Ziel-RNA mit den Programmen DNASIS v2.5 und RNAstructure v3.5 (Mathews et al., 1999) ermittelt. Schließlich ließ sich mit den gleichen Programmen untersuchen, ob die Ribozyme mit optimaler Sekundärstruktur auch in Gegenwart von Substrat-RNA die katalytisch aktive Struktur annehmen. Hierzu wurden die kodierenden Exon1- und Exon2-Sequenzen der IEX-1-RNA im Computer-Modell über einen oligo-dA₂₅-Schwanz mit den entsprechenden Ribozym-Konstrukten verbunden.

Zwölf verschiedene Ribozyme erfüllten zusammen mit ihren Zielsequenzen in der Theorie alle an sie gestellten Anforderungen. Von diesen sechs Exon1- und sechs Exon2-spezifischen Ribozymen waren elf Ribozyme *in vitro* in der Lage, die jeweiligen Exon-RNA-Moleküle zu spalten. Acht dieser Ribozyme spalteten darüber hinaus auch die *in vitro*-transkribierte, 1190 nt lange IEX-1-RNA. Mindestens zwei dieser acht Ribozyme (Ribozym 8 + Ribozym 9) spalteten *in vitro* auch in Gegenwart von Gesamt-RNA aus T-REx™-293-Zellen spezifisch IEX-1-mRNA, was durch Northern-Blot-Analysen nachgewiesen werden konnte. Bei den Ribozymen 2, 3 und 5 war der Befund diesbezüglich nicht eindeutig, da die Spaltprodukte hier nur unwesentlich kleiner (1168, 1159 und 1152 nt) als die IEX-1-mRNA (1302 nt) und deshalb im Northern-Blot schwer von der Substratbande zu unterscheiden waren.

Die Erstellung der Ribozym-Kinetiken orientierte sich an dem von Hendry et al. (1997) beschriebenen Protokoll, wobei die Substrat-RNA jedoch nicht ³²P-5'-endmarkiert wurde.

4.2 Art der Ribozym-Verabreichung und Vektorwahl

Ribozyme können den Zielzellen als vorgefertigte Ribozyme (exogene Zugabe) oder als vektorvermittelte Ribozym-Gene (endogene Expression) verabreicht werden. Für die erstgenannte Darreichungsform ist die Wahl der Transfektionsmethode wichtig, während bei der endogenen Expression die Wahl des Promotors und somit des Vektors von Bedeutung ist (Bertrand et al., 1997). Die exogene Zugabe von synthetisch hergestellten Ribozymen erfordert mannigfaltige Modifikationen der nukleasesensitiven RNA, deren Termini weder durch ein 5'-Cap noch durch einen 3'-poly-A-Schwanz geschützt sind. Um Ribozyme resistent gegen eine Degradation durch Wirtsnukleasen zu machen, werden Modifikationen überwiegend an der 2'-OH-Position der Ribose verschiedener Nukleotide vorgenommen (Beigelman et al., 1995; Usman & Blatt, 2000).

Solche Modifikationen lassen sich an beinahe allen Nukleotiden vornehmen. Davon ausgenommen sind lediglich sechs konservierte Positionen im Kernbereich des Ribozyms (Paolella et al., 1992), deren Modifikation zu einem starken, wenn nicht vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität führt. Gängige Nukleotidanaloga sind 2'-O-Allyl-, 2'-O-Alkyl- und 2'-O-Methyl-Ribonukleotide. Auf diese Weise können Ribozyme hergestellt werden, die eine hinreichende Aktivität besitzen und dennoch nukleaseresistent sind. Neben der durch die Modifikationen herabgesetzten Aktivität der Ribozyme hat diese Vorgehensweise den Nachteil, daß die Synthese über die Festphasen-Phosphoramidit-Methode (Wincott et al., 1995) erfolgt. Diese schrittweise Addition einzelner Nukleotide an die wachsende RNA-Kette ist in kaum einem Labor etabliert und muß deshalb über kommerzielle Anbieter erfolgen.

Zur endogenen Expression von Ribozymen in Säugerzellen eignen sich diverse Vektoren, wobei viele gängige Plasmide über einen Cytomegalovirus(CMV)-Promotor verfügen. In der vorliegenden Arbeit wurde der CMV-gesteuerte Vektor pCR[®]3.1 (Invitrogen) verwendet. Dieser enthält keine Lokalisationssequenzen, so daß die hierüber exprimierten Ribozyme in einer „mRNA-Kassette“ mit 5'-Cap und 3'-poly-A-Schwanz zytoplasmatisch lokalisiert sind. Neben diesen Vektorsystemen werden zunehmend retrovirale und adenovirale Vektoren verwendet, welche die Ribozym-Expression über die viralen LTR-Promotoren steuern. Dabei sind retrovirale Vektoren effizient, sicher und darüber hinaus in der Lage, stabil ins Genom zu integrieren (James & Gibson, 1998). Verschiedene Autoren beobachteten bei unterschiedlichen viralen Promotoren voneinander abweichende Ribozym-Expressionsraten. So beschrieben Zhou et al. (1996) eine hohe Expression von MMLV-LTR-Promotorgesteuerten Ribozymen, während Bertrand et al. (1997) RSV-LTR-Promotoren untersuchten und dabei eine niedrige Ribozym-Expression feststellten.

Um über ein Zellsystem zu verfügen, welches stabil ins Genom integrierte Ribozym-Gene enthält, wurde in der vorliegenden Arbeit das retrovirale Vektorsystem pBabePuro (Morgenstern & Land, 1990) verwendet. Dieses Konstrukt exprimiert große Mengen der inserierten Gene über einen MMLV-LTR-Promotor.

4.3 Klonierung der Ribozyme in ausgewählte Vektorsysteme und Konstruktion von Ribozym-Konkatameren

Die Ribozyme 2, 8, 9 und 10 wurden über 5'-Nhe-I- und 3'-Xba-I-Schnittstellen in den Vektor pCR[®]3.1 kloniert. Im Anschluß wurde die IEX-1-Intron-DNA über 5'-Xba-I- und 3'-Pme-I-Schnittstellen hinter die Ribozyme in die Vektoren ligiert. Diese nachgeschalteten Intron-Sequenzen können zu einer erhöhten Transkriptionseffizienz führen (Lee et al., 1997; Zheng et al., 1997).

Chen et al. (1992a & b) sowie Leopold et al. (1995 & 1996) verwendeten neben einzelnen Ribozym-Konstrukten sogenannte Multiunit- oder Konkatamer-Ribozyme. Diese bestehen aus mehreren hintereinander geschalteten Einzelribozymen. Dabei verwendeten Chen et al. Konkatamere mit bis zu neun Ribozymen, während Leopold und Mitarbeiter sich auf Multiunit-Ribozyme aus drei katalytischen Domänen beschränkten. Beide Gruppen konnten dabei nachweisen, daß die Konkatamere über eine höhere Substratspaltungsaktivität verfügten, als die einzelnen Ribozyme, aus denen sie bestanden. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit Ribozym-Konkatamere aus zwei, drei und vier katalytischen Einheiten konstruiert (pCR[®]3.1/R2+8/IEX-1-Intron, pCR[®]3.1/R2+8+9/IEX-1-Intron und pCR[®]3.1/R2+8+9+10/IEX-1-Intron). Dabei konnten die zuvor generierten Vektoren für die verschiedenen Umklonierungen verwendet werden. Alle Konkatamere basierten auf dem Vektor pCR[®]3.1/R2/IEX-1-Intron. Durch Xba-I- und Pme-I-Restriktion konnte das Intron aus diesem Konstrukt entfernt und im Anschluß das aus dem Vektor pCR[®]3.1/R8/IEX-1-Intron stammende 5'-Nhe-I-/R8/IEX-1-Intron/Pme-I-3'-Fragment in den Vektor kloniert werden. Auf die gleiche Weise wurden dann die Ribozyme 9- + 10/IEX-1-Intron angefügt.

Wie durch Western-Blot-Analyse (vgl. Abb. 22) gezeigt werden konnte, führte die Transfektion von T-REx[™]-293-Zellen mit vektorgesteuertem Ribozym9/IEX-1-Intron, Ribozym2+8+9/IEX-1-Intron und Ribozym2+8+9+10/IEX-1-Intron zu einem verringerten IEX-1-Proteinspiegel. Aus diesem Grunde wurden die Konstrukte aus den pCR[®]3.1-Vektoren in den retroviralen Vektor pBabePuro umkloniert und T-REx[™]-293-Zellen über retroviralen Gentransfer stabil mit den Einzel- bzw. Multiunit-Ribozymen transduziert.

4.4 Einfluß von IEX-1 auf das Zellwachstum

In der vorliegenden Arbeit wurde ein kolorimetrischer MTS-Test („CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ - Promega) verwendet. Vitale Zellen setzen dabei das Tetrazolium-Salz MTS in ein UV-absorbierendes Formazan-Produkt um. Diese Umsetzung basiert auf der Freisetzung von NADH und NADPH durch Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen (Berridge et al., 1993) und ist direkt proportional zu der Zahl lebender Zellen in der getesteten Kultur (Cory et al., 1991; Riss et al., 1992).

Der Einfluß einer ribozymvermittelten Reduktion der IEX-1-Expression auf das Wachstum von stabil mit Ribozymen transduzierten T-REx[™]-293-Zellen wurde durch Detektion und Quantifizierung der Lebendzellzahl nachgewiesen. Darüber hinaus wurde durch Propidiumjodid-Färbung ein Zellzyklusprofil der jeweiligen Kulturen erstellt.

Wie die Daten zeigen, führt eine ribozymvermittelte Verminderung der IEX-1-Expression in beiden Testsystemen zu einer Wachstumsinhibition von T-REx[™]-293-Zellen (vgl. Abb. 27 und 28). So konnte im Wachstumsassay gezeigt werden, daß die Gegenwart der Ribozyme nach vierundzwanzigstündiger Inkubation zu einer verringerten Lebendzellzahl führte. Daß dieser Befund nicht auf einer erhöhten Apoptoserate, sondern auf einer verlangsamten Zellzyklusprogression beruht, konnte durch die Ermittlung der Zellzyklusprofile eindeutig gezeigt werden. Alle ribozymexprimierenden Zelllinien zeigten dabei gegenüber den Kontrollzellen einen erhöhten G1-Phase-Peak, der mit einer Verringerung der Zellzahlen in der S- und G2/M-Phase einherging. Interessanterweise korrelierte die Effizienz der Ribozyme bezüglich der Inaktivierung von IEX-1 im Northern- und Western-Blot (vgl. Abb. 25 und 26) gut mit der verringerten Proliferationsrate der entsprechend transduzierten Zelllinien, und zwar in folgender Reihenfolge: R2+8+9+10 > R2+8+9 > R9.

Erst kürzlich wurde der Einfluß von in T-REx[™]-HeLa-Zellen überexprimiertem IEX-1 auf den Zellzyklus beschrieben (Arlt et al. 2001). Dabei war eine deutliche Abnahme von G1-arretierten Zellen nach achtstündiger IEX-1-Induktion zu beobachten, während der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase zunahm. Durch parallele Zugabe des Mitosegiftes Vinblastin wurden alle proliferierenden Zellen in der M-Phase arretiert (Kaltschmidt et al., 1999). Hierbei kam es im Vergleich zu lacZ-transfizierten Zellen zu einem deutlichen Anstieg von Zellen in der G2/M-Phase, wenn zuvor IEX-1 induziert wurde.

Auch diese Daten sprechen dafür, daß IEX-1 die Zellzyklusprogression beschleunigt und wahrscheinlich Bestandteil eines Wachstumssignals ist.

Dies steht im Einklang mit früheren Befunden, die zeigten, daß die Expression des IEX-1-Homologons p22/PRG1 nach Zugabe des proliferationsinduzierenden Peptidhormons PACAP in der Rattenpankreasarkinom-Zelllinie AR4-2J erhöht war. PACAP wird von der Zelle über drei verschiedene Rezeptoren aufgenommen, wobei der PACAP/VIP-Rezeptor 1 ausschließlich PACAP bindet (Pisegna & Wank, 1993; Spengler et al., 1993), während die anderen Rezeptoren (PACAP/VIP-2 + -3) auch VIP- und sekretinvermittelte Signale weiterleiten. Wie Schäfer et al. (1996a) nachweisen konnten, findet die PACAP-induzierte IEX-1-Expression über den PACAP/VIP-1-Rezeptor statt, da eine IEX-1-Expression nach Zugabe von VIP oder Sekretin nicht beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis korreliert mit verschiedenen Studien, die dem PACAP/VIP-1-Rezeptor eine Rolle bei der Regulation der Proliferation zuordnen (Buscail et al., 1992).

Kumar et al. (1998) konnten durch Überexpression von IEX-1 eine erhöhte Proliferationsrate in Keratinozyten beobachten. Umgekehrt ließ sich durch Zugabe von $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 eine Wachstumsinhibition erzielen, wobei die IEX-1-mRNA-Konzentration deutlich reduziert war (Kobayashi et al., 1998).

Schäfer et al. (1999b) gelang anhand verschiedener serumstarvierter Pankreasarkinomzelllinien (818-4 und PancTu1) der Beleg, daß eine Zugabe von FCS oder verschiedenen Wachstumsfaktoren (EGF, HGF) zu einem Anstieg von IEX-1-mRNA und -Protein führte, welcher offensichtlich von einer verstärkten Proliferation begleitet war. Ferner führte eine Zugabe von $TNF\alpha$ in PT45-Zellen, die auf dieses Zytokin mit Wachstum reagierten, zu einer Induktion von IEX-1, während in von $TNF\alpha$ -wachstumsinhibierten 818-4-Zellen keine Induktion von IEX-1 beobachtet werden konnte (Schäfer et al., 1999b). Ein solch induktiver Effekt von Wachstumsfaktoren (PDGF und FGF) auf die Expression von IEX-1 wurde zuvor auch für das murine IEX-1-Homologon gly96 beschrieben (Charles et al., 1993).

4.4.1 IEX-1 als ETS-1/AP-1-Zielgen

Nach Kondratyev et al. (1996) ist IEX-1 durch den Phorbolster TPA, den Proteinphosphatase-Inhibitor Okadainsäure und TNF α induzierbar. TPA hat eine hohe Ähnlichkeit mit Diacylglycerin, dem natürlichen Aktivator der Proteinkinase C (PKC). Im Gegensatz zu Diacylglycerin ist TPA sehr langlebig, weshalb es zu einer dauerhaften Aktivierung der PKC kommt. Diese Kinase hat verschiedene Substrate, deren Phosphorylierung sich auf das Wachstum einer Zelle auswirken kann. Ein bedeutendes Substrat ist dabei die MAP3K RAF-1, welche auch nach Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF, TGF α , TNF α) an deren Rezeptoren über RAS aktiviert wird. RAF-1 phosphoryliert nun die MAP2Ks MEK1/2 (Daum et al., 1994; Avruch et al., 1994), wodurch wiederum die MAPKs ERK1/2 und JNK/SAPK (Fanger et al., 1997) aktiviert werden. Diese phosphorylieren schließlich verschiedene Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren, die daraufhin in den Zellkern translozieren und dort Gene induzieren, die u.a. zu Wachstum und Differenzierung der Zelle führen.

Wichtige, durch die MAPK aktivierte Transkriptionsfaktoren, sind ETS-1 (Wasylyk et al., 1998), ELK-1 (Hill & Treisman, 1995; Fanger et al., 1997) und c-Jun (Fanger et al., 1997). ETS-1 bildet Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie etwa AP1. Wie Schäfer et al. (1998c) zeigen konnten, verfügt der IEX-1-Promotor über benachbarte ETS-1- und AP1-Bindungsstellen. Aufgrund seiner deutlichen Induzierbarkeit durch TPA sowie verschiedene Wachstumsfaktoren erscheint es wahrscheinlich, daß die IEX-1-Expression unter solchen Stimulationsbedingungen über den MAPK-Weg reguliert wird. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß IEX-1 durch den Proteinphosphatase-Inhibitor Okadainsäure induziert wird (Kondratyev et al., 1996).

4.4.2 IEX-1 als p53-Zielgen

Sowohl das IEX-1- als auch das aus der Ratte stammende p22/PRG1-Gen verfügen über aktive p53-Bindungsstellen in ihren Promotoren (Schäfer et al., 1998a-c; Schmidt et al., 1999). Die palindromische p53-Erkennungssequenz (CCACATGTCTCGACATGTGC) im IEX-1-Promotor zeigt eine sehr hohe Übereinstimmung mit der aus zwei 10 Bp langen Elementen (RRRC(A/T)(A/T)GYYY) der p21-Promotorsequenz (El-Deiry et al., 1992; Zambetti et al., 1992).

In seiner vorherrschenden Funktion als Transkriptionsfaktor (Unger et al., 1992) rekrutiert p53 Gene, deren Produkte so wichtige Aufgaben wie den Zellzyklusarrest (p21/WAF1 - El-Deiry et al., 1992), die DNA-Reparatur (GADD45 - Kastan et al., 1992; PCNA - Morris et al., 1996) oder Apoptose (bax - Miyashita & Reed, 1995) vermitteln.

Wie Schäfer et al. (1998a) zeigen konnten, führt γ -Bestrahlung in Rattensplenozyten neben einer Induktion von p53 (nach ca. drei Stunden) zu einem biphasischen IEX-1-Expressionsmuster, wobei nach ca. 30 Minuten eine vermutlich NF κ B-abhängige „early response“ erfolgt. In der Folge wird IEX-1 rasch wieder abgebaut und erreicht nach ca. 12-16 Stunden ein erneutes Maximum. Dieser zweite Peak ist auf eine verzögerte, p53-vermittelte Induktion von IEX-1 zurückzuführen, da dieser Anstieg der IEX-1-Expression in p53-defizienten Zellen (z.B. Splenozyten von p53-Knockoutmäusen, SAOS-2- oder Hep3B-Zellen) ausbleibt (Schäfer et al., 1998b). Eine solche verzögerte Expression eines potentiellen Proliferationsgens würde dann einen Sinn ergeben, wenn eine γ -strahlungsbedingte DNA-Schädigung durch eine ebenfalls p53-vermittelte DNA-Reparatur (z.B. durch PCNA) beseitigt worden wäre. Solche Zellen könnten dann infolge einer IEX-1-Expression in den Zellzyklus zurückkehren. Durch die Aktivierung von Genen, die zu einer Umgehung des Zellzyklusarrests führen (z.B. MDM2 - Wu et al., 1993; Xiao et al., 1995) und die Wachstum induzieren (TGF α und IEX-1), könnte p53 also eine Signalkaskade auslösen, die nach Wiederherstellung der zellulären Integrität zum Wiedereintritt in den Zellzyklus führt und das Überleben der Zellen sichert (Schäfer et al., 1998a; Schmidt et al., 1999). Eine solche Vermutung wird dadurch gestützt, daß für das murine gly96 eine Induktion am G0/G1-Übergang nachgewiesen wurde (Charles et al., 1993).

Zusammenfassend spricht einiges dafür, daß eine p53-abhängige Expression von IEX-1 verzögert, etwa nach abgeschlossener DNA-Reparatur, als Folge direkter oder indirekter p53-Wirkung auftritt. IEX-1 übt möglicherweise eine proliferative Funktion aus, indem es Zellen – wie für gly96 nachgewiesen (Charles et al., 1993) – aus der G0-Phase zum Wiedereintritt in den Zellzyklus veranlaßt oder aus dem G1-Arrest in die S-Phase des Zellzyklus überführt.

Gestützt wird diese These auch durch Ergebnisse, welche die Gruppe um Pietzsch (1997) sammelte. Demnach hängt die Expression von IEX-1 in starkem Maße vom Differenzierungsgrad einer Zelle ab. In proliferierenden Monozyten waren große Mengen IEX-1-mRNA nachweisbar, während die mRNA stark herabreguliert wurde, wenn diese Zellen ausdifferenziert waren und sich somit in der G0-Phase befanden. Eine identische Verteilung von IEX-1 ließ sich auch in undifferenzierten und ausgereiften Hepatozyten zeigen. In ruhenden Zellen ist also kaum noch IEX-1 detektierbar, während es in sich teilenden Zellen in deutlich größeren Mengen vorhanden ist.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte später in humanen Keratinozyten einen identischen Effekt von IEX-1 nachweisen. So beobachteten Kobayashi et al. (1998) nach Inkubation von Keratinozyten mit $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 ($1\alpha,25(OH)_2D_3$) eine Verringerung des IEX-1-Proteinspiegels. In Gegenwart von Serum führt $1\alpha,25(OH)_2D_3$ in Keratinozyten und Brustkrebszellen zu einem Wachstumsarrest (Gross et al., 1986; Itin et al., 1994; Haugen et al., 1996; Wu et al., 1997), während die Zellen einen ausdifferenzierteren Phänotyp entwickeln (Hosomi et al., 1983; Gross et al., 1986; Itin et al., 1994; Wu et al., 1997).

Diese Befunde decken sich mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten und stützen eine wachstumsassoziierte IEX-1-Funktion, da in sich ausdifferenzierenden Keratinozyten offensichtlich eine verringerte IEX-1-Expression stattfindet. Eine Blockierung der IEX-1 Expression könnte in diesem Zellsystem mit dem Eintritt in die G0-Phase des Zellzyklus verbunden sein. In T-REx™-293-Zellen führt eine ribozymvermittelte Verminderung des IEX-1-Proteinlevels zwar nicht zur Ausdifferenzierung von Zellen, wohl aber zu einer Drosselung der Proliferationsrate.

Es gibt jedoch auch Befunde, die sich mit den durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnissen nicht zur Deckung bringen lassen. Durch Zugabe von TPA ließ sich in Monozyten ein Verlust der Proliferation, der mit einer Ausdifferenzierung der Zellen einherging, induzieren (Tsuchiya et al., 1982). Infolge einer TPA-Stimulation konnten Pietzsch et al. (1997) eine Induktion der IEX-1-Expression beobachten, die sie mit einer möglichen Involvierung von IEX-1 in den Reifungsprozess von Monozyten in Verbindung brachten. Dieser Befund ist jedoch kritisch zu betrachten, da Kondratyev et al. (1996) - wie schon unter 4.4.1 diskutiert - eine wachstumsassoziierte TPA-Induktion von IEX-1 beschrieben.

4.5 IEX-1 und Apoptose

4.5.1 Der proapoptotische Effekt von IEX-1

Segev et al. (2000) belegten, daß MIS, ein Mitglied der TGF β -Superfamilie, selektiv zu einer NF κ B-vermittelten Überexpression von IEX-1 führt, in deren Folge ein dreifacher Anstieg apoptotischer Zellen beobachtet wurde. Um den Einfluß von IEX-1 auf das apoptotische Verhalten von T-RExTM-293-Zellen näher zu untersuchen, wurden die stabil transduzierten Zelllinien T-RExTM-293/pBabePuro, T-RExTM-293/pBabePuro/Ribozym9, T-RExTM-293/pBabePuro/Ribozym2+8+9 und T-RExTM-293/pBabePuro/Ribozym2+8+9+10 mit verschiedenen apoptotischen Stimuli behandelt. Zur Induktion rezeptorvermittelter Apoptose wurden TNF α (TNFR-1-vermittelte Apoptose) und ein Fas-aktivierender Antikörper (CD95-abhängige Apoptose) eingesetzt. Sowohl Doxorubicin (Lothstein et al., 2000) als auch Etoposid (Fulda et al., 1998) sind potente Inhibitoren der Topoisomerase II α . Sie blockieren dabei spezifisch die Ligase-Aktivität dieses Enzyms, wodurch es zu Doppelstrangbrüchen in der DNA kommt. Dies kann u.a. eine p53-abhängige Apoptose nach sich ziehen. Zudem interkaliert Doxorubicin in die DNA-Doppelhelix (Lin et al., 1995 & 1996), wodurch die Neusynthese von DNA im Zuge der Replikation gestört wird. Schließlich wurde den Zellen noch MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO) zugegeben. MG-132 ist ein Inhibitor des Proteasoms. Infolge der Zugabe wird die I κ B α -Degradation im Proteasom verhindert, was zu einer anhaltenden Inaktivierung von NF κ B führt (Grisham et al., 1999). Somit wird ein potenter Regulator antiapoptotischer Signale deaktiviert.

All diese Stimuli induzierten Apoptose in den untersuchten Zelllinien. Dabei war die apoptotische Antwort in den ribozymtransduzierten Zellen durchweg geringer, als in T-RExTM-293/pBabePuro-Zellen. Interessanterweise war dieser Schutz vor Apoptose abhängig von der Effizienz der IEX-1-Spaltung, da die Ribozymkonstrukte die Zellen entsprechend ihrer Potenz, IEX-1 auszuschalten, vor programmiertem Zelltod schützten. So war der apoptoseinduzierende Effekt der Zytostatika in R2+8+9+10-exprimierenden Zellen am geringsten, gefolgt von R2+8+9- und R9-synthetisierenden Zellen. Parallel dazu konnte gezeigt werden, daß eine vektorvermittelte, konditionierte Überexpression von IEX-1 in einem ähnlichen Versuchsaufbau zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer T-RExTM-HeLa-Zellen führte (Arlt et al., 2001).

Auch diese Daten spiegeln eine zellzyklusinduzierende Wirkung von IEX-1 wider, da eine Überexpression von IEX-1 in Gegenwart apoptotischer Stimuli offensichtlich zu einem Signalkonflikt führt, in dessen Folge die betroffenen Zellen mit der Induktion von Apoptose reagieren. Solche Signalkonflikte entstehen immer dann, wenn proliferationsfördernde Gene exprimiert werden, während ungünstige Wachstumsbedingungen vorherrschen. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn keine weiteren proliferativen Signale wie Wachstumsfaktoren vorhanden sind, nutrigene Faktoren fehlen, die DNA irreparabel beschädigt ist oder proapoptische Stimuli vorliegen (Evan et al., 1992; Sakamuro et al., 1995; Jiang et al., 1996; Evan & Littlewood, 1998). Einige mögliche Zusammenhänge zwischen Zellzyklus und Apoptose in Verbindung mit einer IEX-Induktion sind in Abb. 30 dargestellt.

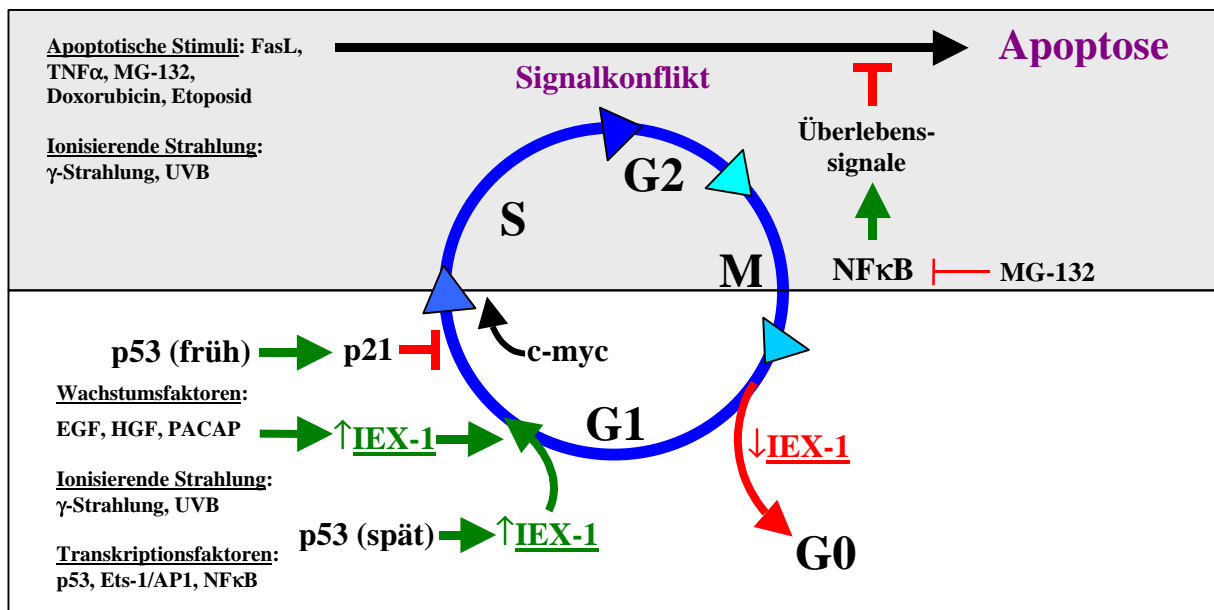


Abb. 30: Zusammenhang zwischen Zellzyklus und Apoptose. Mögliche Einbindung von IEX-1 auf eine gesteigerte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli durch Provokation eines Signalkonfliktes. \uparrow = Erhöhung des Proteinspiegels \downarrow = Erniedrigung des Proteinspiegels

Frühere Arbeiten beschreiben diese Bifunktionalität von Zellprogression und proapoptischer Wirkung auch für andere Proteine. So ist das Onkogen c-myc in der Lage, Zellen sogar in Abwesenheit mitogener Stimuli in die S-Phase zu überführen (Evan und Littlewood, 1998). Unter ungünstigen Umständen, z.B. nach Zugabe verschiedener apoptotischer Stimuli, verstärkt c-myc jedoch die apoptotische Antwort (Evan et al., 1992; Shi et al., 1992; Sakamuro et al., 1995). Auch für das adenovirale Onkogen E1A (Raychaudhuri et al., 1991) und die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie (Adams & Kaelin, 1996) wurde infolge einer Überexpression ein proliferatorischer Effekt beschrieben, der unter inadäquaten Wachstumsbedingungen mit der Induktion von Apoptose einherging.

4.5.2 IEX-1 als NFκB-Zielgen

Der IEX-1-Promotor verfügt neben einer p53- auch über eine aktive NFκB-Bindungsstelle (Schäfer et al., 1998c; Schmidt et al., 1999). Wie in diesen Veröffentlichungen gezeigt werden konnte, wurde IEX-1 in Jurkat- oder HeLa-Zellen durch Zugabe von TNFα innerhalb von 30 Minuten stark induziert und erreichte nach einer Stunde ein Maximum. In der Folge sank der IEX-1-mRNA-Spiegel innerhalb von zwei bis drei Stunden wieder auf den Basalwert ab. In Gegenwart verschiedener NFκB-Inhibitoren (z.B. Gliotoxin, MG-132) war jedoch keine signifikante IEX-1-Expression in diesem Zeitfenster mehr nachweisbar. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß die TNFα-vermittelte IEX-1-Expression NFκB-abhängig ist. Ferner darf angenommen werden, daß IEX-1 in die von TNFα über NFκB ausgeübten biologischen Funktionen involviert ist. Dabei könnte die Rekrutierung von IEX-1, ähnlich wie die ebenfalls über NFκB induzierte Stressantwort (Wilson et al., 1993; Kondratyev et al., 1996), Teil eines zellulären Überlebens- und Regenerationssignals sein (Schäfer et al., 1998c).

Erst kürzlich wurde von Wu et al. (1998) eine IEX-1-Variante beschrieben, die an Position 211 über eine „in frame“-Insertion von 111 Basenpaaren verfügte. Diese Variante kodierte ein um 37 AS längeres IEX-1-Protein, war durch TNFα induzierbar und wurde als IEX-1L (IEX-1-Long) bezeichnet. Durch vektorvermittelte Überexpression von IEX-1L wurde in verschiedenen Zelllinien ein antiapoptotischer Effekt beobachtet, wenn diese mit TNFα behandelt wurden, während IEX-1 in Gegenwart von TNFα Apoptose induzierte. Leider lieferten Wu und Mitarbeiter keinerlei Daten, die einen Nachweis endogen exprimierten IEX-1L erbracht hätten. Wie Schäfer et al. (1999a) zeigen konnten, handelte es sich bei IEX-1L um eine ungespleißte Mutante von IEX-1, die *in vivo* nicht existiert. Ein Vergleich der Sequenz von IEX-1L (Wu et al., 1998) mit den von verschiedenen Arbeitsgruppen (Kondratyev et al., 1996; Schäfer et al., 1996a; Pietzsch et al., 1997 & 1998; Kobayashi et al., 1998) veröffentlichten IEX-1-Sequenzen ergab eine identische Nukleotidabfolge in beiden Exons, dem Intron und der Promotorregion mit Ausnahme von drei substantiellen Abweichungen (Schäfer et al., 1999a). Dabei handelte es sich um eine folgenschwere Deletion eines Guanins am Intron/Exon2-Übergang, wodurch die 3'-Spleißstelle inaktiviert wurde. Folglich konnte die IEX-1-prä-mRNA nicht reifen und war um 111 Bp (= 37 AS) länger, als die IEX-1-mRNA (Intron = 112 Bp, abzüglich der Deletion).

Zudem finden sich in der IEX-1L-Sequenz eine weitere Deletion an Position 303 (Intron) und eine Insertion im Exon 1 (Position 215), die dazu führen, daß es bei einer Nettoinsertion von 111 Basenpaaren bleibt und das Exon 2 im ursprünglichen Leseraster („in frame“) translatiert wird. In verschiedenen Zelllinien konnten *in vivo* weder eine IEX-1L-RNA noch ein entsprechendes Protein nachgewiesen werden (Schäfer et al., 1999a, Segev et al., 2000; Arlt et al., 2001). Zudem konnten Schäfer et al. (1999a) anhand eigener Transfektionen von CHO-Zellen mit IEX-1L nachweisen, daß der antiapoptotische Effekt von IEX-1L auf transdominant negativer Inhibition der Wildtyp-Variante beruht, was wiederum für eine proapoptotische Wirkung von IEX-1 infolge einer TNF α -Stimulation spricht.

4.6 IEX-1 und die zelluläre Stressantwort

Säugerzellen reagieren auf chemische und physikalische Reize wie z.B. ionisierende Strahlung mit der sogenannten Stressantwort. Dabei werden auch „early response“ Gene exprimiert, die einen Zellzyklusarrest oder Apoptose vermitteln können und zum Teil als Transkriptionsfaktoren fungieren. Potentielle Zielgene für diese Transkriptionsfaktoren sind u.a. Zytokine, Wachstumsfaktoren und DNA-Reparaturenzyme (Weichselbaum et al., 1994). Wie Baeuerle & Baltimore (1996) darstellen konnten, ist NF κ B ein besonders bedeutsamer strahlungsinduzierter Transkriptionsfaktor. Infolge der Strahlungseinwirkung transloziert der aktive Komplex in den Zellkern und bindet an die Promotoren spezifischer Zielgene, zu denen auch IEX-1 gehört (Schäfer et al., 1998c; Schmidt et al., 1999).

Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten in der Vergangenheit, strahlungsinduzierbare Gene zu identifizieren und zu charakterisieren. Boothman et al. (1989) haben dabei röntgenstrahlaktivierte Proteine in humanen Melanomzellen identifiziert und vermuteten, daß diese eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden spielen könnten. Papatnasiou et al. (1991) identifizierten mit GADD45 ein Reparaturenzym, welches durch UV- und Röntgenstrahlung und damit einhergehend durch Wachstumsarrest und DNA-Schädigungen induziert wurde. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß IEX-1 ursprünglich von Kondratyev et al. (1996) als γ -strahlungsinduzierbares „early-response“-Gen beschrieben wurde. Diese Befunde wurden von Pietzsch et al. (1997) bestätigt und Kumar et al. (1998) konnten die IEX-1-Expression später auch durch UV-Bestrahlung in Keratinozyten auslösen.

Neben diesem wichtigen Merkmal der Induzierbarkeit durch DNA-schädigende Strahlung hat IEX-1 noch eine andere entscheidende Gemeinsamkeit mit einigen etablierten DNA-Reparaturenzymen, nämlich eine aktive p53-Bindungsstelle im Promotor. In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor induziert p53 die Expression sowohl wachstums- als auch apoptose-regulierender Gene und erfüllt dadurch die Funktion eines „Wächters des Genoms“ (Baker et al., 1990; Mercer et al., 1990).

Schäfer et al. (1998a) konnten zeigen, daß IEX-1 in HeLa-Zellen durch überexprimiertes p53 in einer dosisabhängigen Weise induziert wird. Dabei war der induzierende Effekt von p53 auf die IEX-1-Expression bei einer Plasmidmenge von einem Mikrogramm maximal. Plasmidmengen über und unter diesem Wert führten zu einer geringeren IEX-1-Expression. Ein solch biphasischer, dosisabhängiger Effekt von p53 auf Zielgene wurde auch für PCNA beschrieben (Shivakumar et al., 1995). Aufgrund seiner biphasischen Aktivierung ließe sich darüber spekulieren, ob IEX-1 - ähnlich wie PCNA - sowohl als DNA-Reparaturenzym als auch als Hilfsprotein für Polymerasen fungiert. Dabei könnte die durch γ - und UV-Strahlung induzierte frühe, vermutlich NF κ B-responsible Antwort der DNA-Reparatur dienen, während die spätere, p53-vermittelte Antwort nach der Wiederherstellung der zellulären Integrität Teil eines proliferativen Signals ist. Gegen diese These spricht jedoch, daß IEX-1 in dieser Funktion antiapoptotische Effekte vermitteln müßte, was nachweislich nicht der Fall ist.

5 Zusammenfassung

Während der letzten fünf Jahre haben verschiedene Arbeitsgruppen ihre Forschungen auf das „early response“-Gen IEX-1 fokussiert, da das von ihm kodierte Protein offensichtlich in die Regulation des Zellzyklus involviert ist. So ist inzwischen gesichert, daß es sich bei IEX-1 um ein Gen handelt, dessen Expression durch verschiedene Wachstums- und Stressfaktoren induziert wird. Zudem konnte gezeigt werden, daß IEX-1 der Regulation durch einige wichtige Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF κ B und p53 unterliegt. Um Hinweise auf die genaue Funktion von IEX-1 zu erhalten, wurde die Expression des IEX-1-Gens im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf mRNA-Ebene durch verschiedene hochspezifische *Hammerhead*-Ribozyme unterbunden. Dabei konnte die IEX-1-RNA nicht nur *in vitro*, sondern nachweislich auch bei in Kultur gehaltenen T-REx™-293-Zellen gespalten werden. Durch diese gezielte Inhibition der Genexpression wurden Daten gewonnen, die zeigen, daß IEX-1 primär an der Initiation und Progression des Zellzyklus beteiligt ist. Unter günstigen Bedingungen geht dies mit einer gesteigerten Zellteilungsrate einher. Ribozymbehandelte Zellen zeigen bei vermindertem IEX-1-Proteinspiegel ein deutlich verlangsamtes Wachstum gegenüber unbehandelten Zellen, was anhand von Wachstumsassays und Zellzyklusprofilen nachgewiesen werden konnte. Erfolgt der Eintritt der Zellen in den Zellzyklus unter inadäquaten Bedingungen, etwa in Gegenwart zytotoxischer Substanzen, so zeigen IEX-1-exprimierende Zellen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli. Diese gesteigerte Apoptoserate könnte durch einen Signalkonflikt ausgelöst werden, der immer dann auftritt, wenn unvorteilhafte Umweltbedingungen vorherrschen, gleichzeitig aber proliferative Signale wie eine IEX-1-Expression auf die Zelle einwirken. Entsprechend sind Zellen, die IEX-1-spaltende Ribozyme exprimieren, weniger apoptoseanfällig. So konnte die Zahl apoptotischer Zellen nach Behandlung mit TNF α , Fas-aktivierendem Antikörper, MG-132, Etoposid und Doxorubicin durch den Einsatz verschiedener Ribozymkonstrukte gegenüber unbehandelten Zellen deutlich verringert werden.

6 Literaturverzeichnis

Adams, P.D. & Kaelin, W.G., Jr. (1996): The cellular effects of E2F overexpression. *Curr Top Microbiol Immunol*, **208**, 79-93.

Amarzguioui, M., Brede, G., Babaie, E., Grotli, M., Sproat, B. & Prydz, H. (2000): Secondary structure prediction and in vitro accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4113-24.

Arlt, A., Grobe, O., Sieke, A., Kruse, M.L., Fölsch, U.R., Schmidt, W.E. & Schäfer, H. (2001): Expression of the NF-kappaB target gene IEX-1 (p22/PRG1) does not prevent cell death but instead triggers apoptosis in Hela cells. *Oncogene*, **20**, 69-76.

Avruch, J., Zhang, X.F. & Kyriakis, J.M. (1994): Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci*, **19**, 279-83.

Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. (1996): NF-kappa B: ten years after. *Cell*, **87**, 13-20.

Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K. & Vogelstein, B. (1990): Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, **249**, 912-15.

Barkett, M. & Gilmore, T.D. (1999): Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6910-24.

Bartek, J., Bartkova, J. & Lukas, J. (1996): The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 805-14.

Beigelman, L., McSwiggen, J.A., Draper, K.G., Gonzalez, C., Jensen, K., Karpeisky, A.M., Modak, A.S., Matulic-Adamic, J., DiRenzo, A.B., Haeberli, P. & et al. (1995): Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance. *J Biol Chem*, **270**, 25702-08.

Berridge, M.V. & Tan, A.S. (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, **303**, 474-82.

Bertrand, E., Pictet, R. & Grange, T. (1994): Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function? [published erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1994 Apr 11;22(7):1326]. *Nucleic Acids Res*, **22**, 293-300.

Bertrand, E., Castanotto, D., Zhou, C., Carbonnelle, C., Lee, N.S., Good, P., Chatterjee, S., Grange, T., Pictet, R., Kohn, D., Engelke, D. & Rossi, J.J. (1997): The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *Rna*, **3**, 75-88.

Birikh, K.R., Heaton, P.A. & Eckstein, F. (1997): The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur J Biochem*, **245**, 1-16.

Boothman, D.A., Bouvard, I. & Hughes, E.N. (1989): Identification and characterization of X-ray-induced proteins in human cells. *Cancer Res*, **49**, 2871-78.

Bourdon, J.C., Deguin-Chambon, V., Lelong, J.C., Dessen, P., May, P., Debuire, B. & May, E. (1997): Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene*, **14**, 85-94.

Branch, A.D. & Robertson, H.D. (1991): Efficient trans cleavage and a common structural motif for the ribozymes of the human hepatitis delta agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10163-67.

Brantl, S. & Wagner, E.G. (1994): Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation occurs faster than stable antisense/target RNA pairing: an in vitro study of plasmid pIP501. *Embo J*, **13**, 3599-607.

Brown, J.W. & Pace, N.R. (1992): Ribonuclease P RNA and protein subunits from bacteria. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1451-56.

Buscail, L., Cambillau, C., Seva, C., Scemama, J.L., De Neef, P., Robberecht, P., Christophe, J., Susini, C. & Vaysse, N. (1992): Stimulation of rat pancreatic tumoral AR4-2J cell proliferation by pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *Gastroenterology*, **103**, 1002-08.

Cech, T.R., Zaug, A.J. & Grabowski, P.J. (1981): In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, **27**, 487-96.

Chamberlain, J.R., Lee, Y., Lane, W.S. & Engelke, D.R. (1998): Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev*, **12**, 1678-90.

Charles, C.H., Yoon, J.K., Simske, J.S. & Lau, L.F. (1993): Genomic structure, cDNA sequence, and expression of gly96, a growth factor-inducible immediate-early gene encoding a short-lived glycosylated protein. *Oncogene*, **8**, 797-801.

Chen, C.J., Banerjea, A.C., Haglund, K., Harmison, G.G. & Schubert, M. (1992a): Inhibition of HIV-1 replication by novel multitarget ribozymes. *Ann N Y Acad Sci*, **660**, 271-73.

Chen, C.J., Banerjea, A.C., Harmison, G.G., Haglund, K. & Schubert, M. (1992b): Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication--potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates. *Nucleic Acids Res*, **20**, 4581-89.

Chowrira, B.M. & Burke, J.M. (1991): Binding and cleavage of nucleic acids by the "hairpin" ribozyme. *Biochemistry*, **30**, 8518-22.

Clouet-d'Orval, B. & Uhlenbeck, O.C. (1997): Hammerhead ribozymes with a faster cleavage rate. *Biochemistry*, **36**, 9087-92.

Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A. & Cory, J.G. (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*, **3**, 207-12.

Crook, T., Marston, N.J., Sara, E.A. & Vousden, K.H. (1994): Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation. *Cell*, **79**, 817-27.

Dahm, S.C. & Uhlenbeck, O.C. (1991): Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry*, **30**, 9464-69.

Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H.W., Troppmair, J. & Rapp, U.R. (1994): The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci*, **19**, 474-80.

Di-Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K. & Wahl, G.M. (1994): DNA damage triggers a prolonged p53-dependent arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*, **8**, 2540-51.

Dudley, E., Hornung, F., Zheng, L., Scherer, D., Ballard, D. & Lenardo, M. (1999): NF-kappaB regulates Fas/APO-1/CD95- and TCR- mediated apoptosis of T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **29**, 878-86.

Dunphy, W.G. (1994): The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol.*, **4**, 202-07.

El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1992): Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, **1**, 45-49.

El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-25.

Epstein, L.M. & Gall, J.G. (1987a): Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell*, **48**, 535-43.

Epstein, L.M. & Gall, J.G. (1987b): Transcripts of newt satellite DNA self-cleave in vitro. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **52**, 261-65.

Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. & Hancock, D.C. (1992): Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, **69**, 119-28.

Evan, G. & Littlewood, T. (1998): A matter of life and cell death. *Science*, **281**, 1317-22.

Fanger, G.R., Johnson, N.L. & Johnson, G.L. (1997): MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *Embo J*, **16**, 4961-72.

Ferat, J.L. & Michel, F. (1993): Group II self-splicing introns in bacteria [see comments]. *Nature*, **364**, 358-61.

Ferat, J.L., Le Gouar, M. & Michel, F. (1994): Multiple group II self-splicing introns in mobile DNA from Escherichia coli. *C R Acad Sci III*, **317**, 141-48.

Forster, A.C. & Symons, R.H. (1987): Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell*, **49**, 211-20.

Fort, P., Rech, J., Vie, A., Piechaczyk, M., Bonniou, A., Jeanteur, P. & Blanchard, J.M. (1987): Regulation of c-fos gene expression in hamster fibroblasts: initiation and elongation of transcription and mRNA degradation. *Nucleic Acids Res*, **15**, 5657-67.

Friedländer, P., Haupt, Y., Prives, C. & Oren, M. (1996): A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol*, **16**, 4961-71.

Fulda, S., Scaffidi, C., Susin, S.A., Krammer, P.H., Kroemer, G., Peter, M.E. & Debatin, K.M. (1998): Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem*, **273**, 33942-48.

Grisham, M.B., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Conner, E.M., Brand, S., Wong, H.L., Pien, C., Mazzola, L.M., Destree, A., Parent, L. & Adams, J. (1999): Inhibition of NF-kappa B activation in vitro and in vivo: role of 26S proteasome. *Methods Enzymol*, **300**, 345-63.

Gross, M., Kost, S.B., Ennis, B., Stumpf, W. & Kumar, R. (1986): Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on mouse mammary tumor (GR) cells: evidence for receptors, cellular uptake, inhibition of growth and alteration in morphology at physiologic concentrations of hormone. *J Bone Miner Res*, **1**, 457-67.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S. (1983): The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849-57.

Guerrier-Takada, C., McClain, W.H. & Altman, S. (1984): Cleavage of tRNA precursors by the RNA subunit of E. coli ribonuclease P (M1 RNA) is influenced by 3'-proximal CCA in the substrates. *Cell*, **38**, 219-24.

Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E.A., Longthorne, V.L., Culhane, A.C. & Williams, G.T. (1996): Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*, **236**, 1-26.

Hampel, A. & Tritz, R. (1989): RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence. *Biochemistry*, **28**, 4929-33.

Haseloff, J. & Symons, R.H. (1982): Comparative sequence and structure of viroid-like RNAs of two plant viruses. *Nucleic Acids Res*, **10**, 3681-91.

Haseloff, J. & Gerlach, W.L. (1988): Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, **334**, 585-91.

Haseloff, J. & Gerlach, W.L. (1989): Sequences required for self-catalyzed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Gene*, **82**, 43-52.

Haugen, J.D., Pittelkow, M.R., Zinsmeister, A.R. & Kumar, R. (1996): 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits normal human keratinocyte growth by increasing transforming growth factor beta 2 release. *Biochem Biophys Res Commun*, **229**, 618-23.

Hendry, P., McCall, M.J. & Lockett, T.J. (1997): Characterizing ribozyme cleavage reactions. *Methods Mol Biol*, **74**, 221-29.

Herschlag, D. (1991): Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules in vivo: more isn't always better. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6921-25.

Hertel, K.J., Pardi, A., Uhlenbeck, O.C., Koizumi, M., Ohtsuka, E., Uesugi, S., Cedergren, R., Eckstein, F., Gerlach, W.L., Hodgson, R. & et al. (1992): Numbering system for the hammerhead. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3252.

Hertel, K.J., Herschlag, D. & Uhlenbeck, O.C. (1994): A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry*, **33**, 3374-85.

Hildebrandt, M. & Nellen, W. (1992): Differential antisense transcription from the Dictyostelium EB4 gene locus: implications on antisense-mediated regulation of mRNA stability. *Cell*, **69**, 197-204.

Hill, C.S. & Treisman, R. (1995): Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, **80**, 199-211.

Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H. & Ungefroren, H. (2000): Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis.[In Process Citation]. *Oncogene*, **19**, 5477-86.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. (1991): p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.

Hosomi, J., Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. & Kuroki, T. (1983): Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*, **113**, 1950-57.

Hutchins, C.J., Rathjen, P.D., Forster, A.C. & Symons, R.H. (1986): Self cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado and sun blotch viroid. *Nucl Acids Res*, **14**, 3627-3640.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.

Itin, P.H., Pittelkow, M.R. & Kumar, R. (1994): Effects of vitamin D metabolites on proliferation and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free or defined culture medium. *Endocrinology*, **135**, 1793-8.

James, H.A. & Turner, P.C. (1997): Ribozymes. *Methods Mol Biol*, **74**, 1-9.

James, H.A. & Gibson, I. (1998): The therapeutic potential of ribozymes. *Blood*, **91**, 371-82.

Jiang, M.C., Yang-Yen, H.F., Lin, J.K. & Yen, J.J. (1996): Differential regulation of p53, c-Myc, Bcl-2 and Bax protein expression during apoptosis induced by widely divergent stimuli in human hepatoblastoma cells. *Oncogene*, **13**, 609-16.

Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Hehner, S.P., Droge, W. & Schmitz, M.L. (1999): Repression of NF-kappaB impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators. *Oncogene*, **18**, 3213-25.

Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. & Fornace, A.J., Jr. (1992): A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, **71**, 587-97.

Kimelman, D. & Kirschner, M.W. (1989): An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell*, **59**, 687-96.

- King, R.W., Jackson, P.K. & Kirschner, M.W. (1994): Mitosis in transition. *Cell*, **79**, 563-71.
- Knoop, V. & Brennicke, A. (1994): Evidence for a group II intron in *Escherichia coli* inserted into a highly conserved reading frame associated with mobile DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1167-71.
- Kobayashi, T., Pittelkow, M.R., Warner, G.M., Squillace, K.A. & Kumar, R. (1998): Regulation of a novel immediate early response gene, IEX-1, in keratinocytes by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem Biophys Res Commun*, **251**, 868-73.
- Koizumi, M., Iwai, S. & Ohtsuka, E. (1988): Cleavage of specific sites of RNA by designed ribozymes. *FEBS Lett*, **239**, 285-88.
- Kondratyev, A.D., Chung, K.N. & Jung, M.O. (1996): Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene. *Cancer Res*, **56**, 1498-502.
- Krinke, L. & Wulff, D.L. (1987): OOP RNA, produced from multicopy plasmids, inhibits lambda cII gene expression through an RNase III-dependent mechanism. *Genes Dev*, **9**, 1005-13.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. & Cech, T.R. (1982): Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, **31**, 147-57.
- Krupp, G. (1997): Enzymatic synthesis and characterization of unmodified ribozymes and substrates. *Methods Mol Biol*, **74**, 79-89.
- Kumar, R., Kobayashi, T., Warner, G.M., Wu, Y., Salisbury, J.L., Lingle, W. & Pittelkow, M.R. (1998): A novel immediate early response gene, IEX-1, is induced by ultraviolet radiation in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **253**, 336-41.

Lee, A.H., Suh, Y.S., Sung, J.H., Yang, S.H. & Sung, Y.C. (1997): Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization. *Mol Cells*, **7**, 495-501.

Leopold, L.H., Shore, S.K., Newkirk, T.A., Reddy, R.M. & Reddy, E.P. (1995): Multi-unit ribozyme-mediated cleavage of bcr-abl mRNA in myeloid leukemias. *Blood*, **85**, 2162-70.

Leopold, L.H., Shore, S.K. & Reddy, E.P. (1996): Multi-unit anti-BCR-ABL ribozyme therapy in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*, **22**, 365-73.

Liang, P. & Pardee, A.B. (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [see comments]. *Science*, **257**, 967-71.

Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R. & Hawiger, J. (1995): Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem*, **270**, 14255-58.

Lin, Y.Z., Yao, S.Y. & Hawiger, J. (1996): Role of the nuclear localization sequence in fibroblast growth factor-1-stimulated mitogenic pathways. *J Biol Chem*, **271**, 5305-08.

Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. & Karin, M. (1996): Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-76.

Lothstein, L., Israel, D.P. & Sweatman, T.W. (2000): Catalytic inhibition of DNA topoisomerase II by N-benzyladriamycin (AD 288) [In Process Citation]. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1621-28.

Ludwig, J., Blaschke, M. & Sproat, B.S. (1998): Extending the cleavage rules for the hammerhead ribozyme: mutating adenosine15.1 to inosine15.1 changes the cleavage site specificity from N16.2U16.1H17 to N16.2C16.1H17. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2279-85.

Ma, C. & Simons, R.W. (1990): The IS10 antisense RNA blocks ribosome binding at the transposase translation initiation site. *Embo J*, **9**, 1267-74.

Macnaughton, T.B., Wang, Y.J. & Lai, M.M. (1993): Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites. *J Virol*, **67**, 2228-34.

Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D.H. (1999): Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol*, **288**, 911-40.

Menger, M., Eckstein, F. & Porschke, D. (2000): Multiple conformational states of the hammerhead ribozyme, broad time range of relaxation and topology of dynamics. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4428-34.

Mercer, W.E., Shields, M.T., Amin, M., Sauve, G.J., Appella, E., Romano, J.W. & Ullrich, S.J. (1990): Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 6166-70.

Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W. & Uhlenbeck, O.C. (1987): Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res*, **15**, 8783-98.

Miyashita, T. & Reed, J.C. (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-99.

Morgenstern, J.P. & Land, H. (1990): Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res*, **18**, 3587-96.

Morris, G.F., Bischoff, J.R. & Mathews, M.B. (1996): Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 895-99.

Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-50.

Murray, J.B., Seyhan, A.A., Walter, N.G., Burke, J.M. & Scott, W.G. (1998): The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem Biol*, **5**, 587-95.

Novick, R.P., Iordanescu, S., Projan, S.J., Kornblum, J. & Edelman, I. (1989): pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell*, **59**, 395-404.

Pannucci, J.A., Haas, E.S., Hall, T.A., Harris, J.K. & Brown, J.W. (1999): RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7803-08.

Paolella, G., Sproat, B.S. & Lamond, A.I. (1992): Nuclease resistant ribozymes with high catalytic activity. *Embo J*, **11**, 1913-19.

Papathanasiou, M.A., Kerr, N.C., Robbins, J.H., McBride, O.W., Alamo, I., Jr., Barrett, S.F., Hickson, I.D. & Fornace, A.J., Jr. (1991): Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. *Mol Cell Biol*, **11**, 1009-16.

Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. & Hartwell, L.H. (1997): When checkpoints fail. *Cell*, **88**, 315-21.

Perriman, R., Delves, A. & Gerlach, W.L. (1992): Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme. *Gene*, **113**, 157-63.

Pietsch, A., Buchler, C., Aslanidis, C. & Schmitz, G. (1997): Identification and characterization of a novel monocyte/macrophage differentiation-dependent gene that is responsive to lipopolysaccharide, ceramide, and lysophosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun*, **235**, 4-9.

Pietzsch, A., Buchler, C. & Schmitz, G. (1998): Genomic organization, promoter cloning, and chromosomal localization of the Dif-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 651-57.

Pisegna, J.R. & Wank, S.A. (1993): Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6345-49.

Pley, H.W., Flaherty, K.M. & McKay, D.B. (1994): Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature*, **372**, 68-74.

Prody, G.A., Bakos, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R. & Brüning, G. (1986): Autolytic procession of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*, **231**, 1577-80.

Raychaudhuri, P., Bagchi, S., Devoto, S.H., Kraus, V.B., Moran, E. & Nevins, J.R. (1991): Domains of the adenovirus E1A protein required for oncogenic activity are also required for dissociation of E2F transcription factor complexes. *Genes Dev*, **5**, 1200-11.

Riss, T.L. & Moravec, R.A. (1992): comparison of MTT, XTT and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell*, **3**, 184.

Rudner, A.D. & Murray, A.W. (1996): The spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 773-80.

Ruffner, D.E., Stormo, G.D. & Uhlenbeck, O.C. (1990): Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry*, **29**, 10695-702.

Sakamuro, D., Eviner, V., Elliott, K.J., Showe, L., White, E. & Prendergast, G.C. (1995): c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene*, **11**, 2411-18.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Press, 2nd edition.

Schäfer, H., Trauzold, A., Siegel, E.G., Fölsch, U.R. & Schmidt, W.E. (1996a): PRG1: a novel early-response gene transcriptionally induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a pancreatic carcinoma cell line. *Cancer Res*, **56**, 2641-48.

Schäfer, H., Trauzold, A., Fölsch, U.R. & Schmidt, W.E. (1996b): Identification of novel growth-related genes linked to the mitogenic effect of PACAP on the rat pancreatic acinar cell line, AR4-2J. *Ann N Y Acad Sci*, **805**, 760-67.

Schäfer, H., Zheng, J., Gundlach, F., Günther, R. & Schmidt, W.E. (1996c): PACAP stimulates transcription of c-Fos and c-Jun and activates the AP-1 transcription factor in rat pancreatic carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **221**, 111-16.

Schäfer, H., Zheng, J., Gundlach, F., Günther, R., Siegel, E.G., Fölsch, U.R. & Schmidt, W.E. (1996d): Pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide stimulates proto-oncogene expression and activates the AP-1 (c-Fos/c-Jun) transcription factor in AR4-2J pancreatic carcinoma cells. *Eur J Biochem*, **242**, 467-76.

Schäfer, H., Trauzold, A., Sebens, T., Deppert, W., Fölsch, U.R. & Schmidt, W.E. (1998a): p22/PACAP response gene 1 (PRG1): a putative target gene for the tumor suppressor p53. *Ann N Y Acad Sci*, **865**, 27-36.

Schäfer, H., Trauzold, A., Sebens, T., Deppert, W., Fölsch, U.R. & Schmidt, W.E. (1998b): The proliferation-associated early response gene p22/PRG1 is a novel p53 target gene. *Oncogene*, **16**, 2479-87.

Schäfer, H., Diebel, J., Arlt, A., Trauzold, A. & Schmidt, W.E. (1998c): The promoter of human p22/PACAP response gene 1 (PRG1) contains functional binding sites for the p53 tumor suppressor and for NFkappaB. *FEBS Lett*, **436**, 139-43.

Schäfer, H., Arlt, A., Trauzold, A., Hünermann-Jansen, A. & Schmidt, W.E. (1999a): The putative apoptosis inhibitor IEX-1L is a mutant nonspliced variant of p22(PRG1/IEX-1) and is not expressed in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **262**, 139-45.

Schäfer, H., Lettau, P., Trauzold, A., Banasch, M. & Schmidt, W.E. (1999b): Human PACAP response gene 1 (p22/PRG1): proliferation-associated expression in pancreatic carcinoma cells. *Pancreas*, **18**, 378-84.

Schmidt, W.E., Arlt, A., Trauzold, A. & Schäfer, H. (1999): p22/PRG1: a novel early response gene in pancreatic cancer cells regulated by p53 and NF kappa B. *Ann N Y Acad Sci*, **880**, 147-56.

Segev, D.L., Ha, T.U., Tran, T.T., Kenneally, M., Harkin, P., Jung, M., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K. & Maheswaran, S. (2000): Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway. *J Biol Chem*, **275**, 28371-79.

Shi, Y., Glynn, J.M., Guilbert, L.J., Cotter, T.G., Bissonnette, R.P. & Green, D.R. (1992): Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science*, **257**, 212-14.

Shimayama, T., Nishikawa, S. & Taira, K. (1995): Generality of the NUX rule: kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes. *Biochemistry*, **34**, 3649-54.

Shivakumar, C.V., Brown, D.R., Deb, S. & Deb, S.P. (1995): Wild-type human p53 transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *Mol Cell Biol*, **12**, 6785-93.

Shyu, A.B., Belasco, J.G. & Greenberg, M.E. (1991): Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev*, **5**, 221-31.

Siegel, J., Fritsche, M., Mai, S., Brandner, G. & Hess, R.D. (1995): Enhanced p53 activity and accumulation in response to DNA damage upon DNA transfection. *Oncogene*, **11**, 1363-70.

Simons, R.W. & Kleckner, N. (1988): Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes. *Annu Rev Genet*, **22**, 567-600.

Singh, K.K., Schluff, P., Lehnert, L. & Krupp, G. (1996): Design of hammerhead ribozymes to distinguish single base changes in substrate RNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **6**, 165-68.

Sionov, R.V. & Haupt, Y. (1999): The cellular response to p53: a decision between life and death. *Oncogene*, **18**, 6145-6157.

Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H. & Journot, L. (1993): Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature*, **365**, 170-75.

Stoflet, E.S., Koeberl, D.D., Sarkar, G. & Sommer, S.S. (1988): Genomic amplification with transcript sequencing. *Science*, **239**, 491-94.

Sukhatme, V.P. (1990): Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *J Am Soc Nephrol*, **1**, 859-66.

Sun, L.Q., Cairns, M.J., Saravolac, E.G., Baker, A. & Gerlach, W.L. (2000): Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol Rev*, **52**, 325-47.

Tabler, M., Homann, M., Tzortzakaki, S. & Sczakiel, G. (1994): A three-nucleotide helix I is sufficient for full activity of a hammerhead ribozyme: advantages of an asymmetric design. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3958-65.

Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. & Tada, K. (1982): Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res*, **42**, 1530-36.

Tuerk, C., Gauss, P., Thermes, C., Groebe, D.R., Gayle, M., Guild, N., Stormo, G., d'Aubenton-Carafa, Y., Uhlenbeck, O.C., Tinoco, I., Jr. & et al. (1988): CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1364-68.

Uhlenbeck, O.C. (1987): A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, **328**, 596-600.

Unger, T., Nau, M.M., Segal, S. & Minna, J.D. (1992): p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *Embo J*, **11**, 1383-90.

Usman, N. & Blatt, L.M. (2000): Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics. *J Clin Invest*, **106**, 1197-1202.

Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R. & Verma, I.M. (1996): Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB [see comments]. *Science*, **274**, 787-89.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, **184**, 39-51.

Wang, C.Y., Cusack, J.C., Jr., Liu, R. & Baldwin, A.S., Jr. (1999): Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med*, **5**, 412-17.

Wasylyk, B., Hagman, J. & Gutierrez-Hartmann, A. (1998): Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci*, **23**, 213-16.

Weichselbaum, R.R., Hallahan, D.E., Sukhatme, V., Dritschilo, A., Sherman, M.L. & Kufe, D.W. (1991): Biological consequences of gene regulation after ionizing radiation exposure. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 480-84.

Weichselbaum, R.R., Hallahan, D., Fuks, Z. & Kufe, D. (1994): Radiation induction of immediate early genes: effectors of the radiation-stress response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **30**, 229-34.

Wilson, R.E., Taylor, S.L., Atherton, G.T., Johnston, D., Waters, C.M. & Norton, J.D. (1993): Early response gene signalling cascades activated by ionising radiation in primary human B cells. *Oncogene*, **8**, 3229-37.

Wincott, F., DiRenzo, A., Shaffer, C., Grimm, S., Tracz, D., Workman, C., Sweedler, D., Gonzalez, C., Scaringe, S. & Usman, N. (1995): Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. *Nucleic Acids Res*, **23**, 2677-84.

Wu, H.N., Lin, Y.J., Lin, F.P., Makino, S., Chang, M.F. & Lai, M.M. (1989): Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1831-35.

Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. & Levine, A.J. (1993): The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, **7**, 1126-32.

Wu, Y., Haugen, J.D., Zinsmeister, A.R. & Kumar, R. (1997): 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 increases transforming growth factor and transforming growth factor receptor type I and II synthesis in human bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **239**, 734-39.

Wu, M.X., Ao, Z., Prasad, K.V., Wu, R. & Schlossman, S.F. (1998): IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science*, **281**, 998-1001.

Xiao, Z.X., Chen, J., Levine, A.J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W.R. & Livingston, D.M. (1995): Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*, **375**, 694-98.

Zambetti, G.P., Bargonetti, J., Walker, K., Prives, C. & Levine, A.J. (1992): Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev*, **6**, 1143-52.

Zetterberg, A., Larsson, O. & Wiman, K.G. (1995): What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 835-42.

Zheng, B., Qiu, X.Y., Tan, M., Xing, Y.N., Lo, D., Xue, J.L. & Qiu, X.F. (1997): Increment of hFIX expression with endogenous intron 1 *in vitro*. *Cell Res*, **7**, 21-29.

Zhou, C., Bahner, I., Rossi, J.J. & Kohn, D.B. (1996): Expression of hammerhead ribozymes by retroviral vectors to inhibit HIV-1 replication: comparison of RNA levels and viral inhibition. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **6**, 17-24.

Ziff, E.B. (1990): Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site. *Trends Genet*, **6**, 69-72.

Zoumadakis, M. & Tabler, M. (1995): Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX consensus target motif for hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1192-96.

Zubiaga, A.M., Belasco, J.G. & Greenberg, M.E. (1995): The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol*, **15**, 2219-30.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AMPS	Ammonium Persulfat
AP-1	Activator Protein 1
AREs	A/T Rich Elements
AS	Aminosäure(n)
bax	bcl-2 associated X protein
bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD95	Cluster of Differentiation 95 (Mitglied der „Tumor Necrosis Factor Receptor“-Superfamilie)
CD95L	CD95-Ligand
c-jun	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
CMV	Cytomegalovirus
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
Dif-2	Differentiation Inducible Factor 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraazetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELK-1	Ein Mitglied der Ets-Transkriptionsfaktor-Superfamilie
ERK	Extracellular signal Regulated Kinases
et al.	und Mitarbeiter
Ets-1	Ein Mitglied der Ets-Transkriptionsfaktor-Superfamilie
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fas	CD95 (siehe dort)
FasL	CD95-Ligand (siehe dort)
FCS	Fetal Calf Serum

FGF	Fibroblast Growth Factor
G	Guanin
G0-Phase	Gap („Lücke“) 0 – „Ruhephase“ des Zellzyklus
G1-Phase	Gap („Lücke“) 1 – „Zwischenphase 1“ des Zellzyklus
G2-Phase	Gap („Lücke“) 2 – „Zwischenphase 2“ des Zellzyklus
GADD45	Growth Arrest and Damage Dependent
HBV	Hepatitis B Virus
HCl	Salzsäure
HDV	Hepatitis D Virus
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRP	Horseradish Peroxidase
IEX-1	Immediate Early Gene on X-Radiation 1
IEX-1L	Immediate Early Gene on X-Radiation 1 Long
IgG	Immunglobulin G
I κ B	Inhibitor of NF κ B
JNK	c-jun NH ₂ -terminal Kinase
LBA	Luria-Bertani-Medium + Ampicillin
LTR	Long Terminal Repeats
M-Phase	Mitose-Phase – „Teilungsphase“ des Zellzyklus
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase (MAP2K)
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAP3K)
mdm2	mouse double minute 2
MEK	MAPK/ERK-Kinase (eine MAPKK)
μ g	Mikrogramm
Min.	Minuten
MIS	Müllerian Inhibiting Substance
μ l	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMLV	Molony Murine Leukemia Virus
MOPS	[3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfon-Säure]
MTS	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium]-Salz

NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NFκB	Nuclear Factor of the κ light chain enhancer in B-cells
ng	Nannogramm
nt	Nukleotide
p21	21 KDa Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
p53	53 KDa Phosphoprotein
PAA	Polyacrylamid
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PKC	Proteinkinase C
pmol	Pikomol
PRG1	PACAP Response Gene 1
PVDF	Polyvenylidenfluorid
R	Purine (A oder G)
RAF	Receptor Activated Factor
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
rRNA	ribosomal-RNA (ribosomale RNA)
tRNA	transport-RNA
RNase	Ribonuklease
RSV	Rous Sarkoma Virus
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)
Sek.	Sekunden
s.o.	siehe oben
S-Phase	Synthese-Phase
SSC	Standard Saline Citrate
Tab.	Tabelle

TBE	Tris Buffered EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TNFR-1	TNF-Rezeptor 1
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TRSV	Tobacco Ringspot Satellite Virus
U	Uracil
u.a.	unter anderem
Upm.	Umdrehungen pro Minute
UT	untranslatiert
UV	Ultraviolett
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
vgl.	vergleiche
Y	Pyrimidine (C oder T)
z.B.	zum Beispiel

Curriculum vitae:

Name: Grobe
Vorname: Olaf
Geburtsdatum: 10.04.1969
Geburtsort: Kiel
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Heinz-Jürgen Grobe, *31.12.1936 in Neustadt (Odenwald),
Maschinenbau-Ingenieur
Anneliese Margarete Grobe, geborene Kraus, *06.01.1937 in
Wuppertal
Geschwister: Kay Grobe, *08.03.1966 in Kiel, Dr. rer. nat.
Lars Grobe, *10.04.1969 in Kiel, Kaufmann

Schulische und berufliche Ausbildung:

Mai 1998: Abitur an der Integrierten Gesamtschule Neumünster
1988-1990: Wehrdienst bei der Bundesmarine
Wintersemester 1990: Beginn des Studiums der Biologie an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Zoologie und Biochemie
15.07.-15.09.1992: Hilfwissenschaftler am Projektzentrum für Ökosystem-
forschung des Instituts für Pflanzenernährung und Bodenkunde
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
01.10.1992-31.10.1993: Hilfwissenschaftler am Forschungszentrum für marine
Geowissenschaften (GEOMAR) der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
April 1993: Vordiplom in Biologie
(Prüfungsfächer: Zoologie, Botanik, Mathematik und Chemie)
Dezember 1993: Hilfwissenschaftler des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und
Meeresforschung, Forschungsstelle Potsdam
26.09.1994-31.10.1994: Volontariat am Institut für Mikrobiologie der Bundesanstalt für
Milchforschung
01.04.1994-31.12.1996: Hilfwissenschaftler am Institut für Allgemeine Mikrobiologie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
November 1995: Mündliche Diplomprüfungen
(Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Zoologie und Biochemie)

- 01.01.1996-29.01.1997:** Durchführung der Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Thema: „*Charakterisierung lipidabbauender Mikroorganismen*“
Diplomvater: Prof. Dr. Michael Thomm
- Seit Mai 1997:** Promotion am Institut für Molekulare Gastroenterologie (Abteilung Tumorbiologie) am I. Medizinischen Klinikum der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Fölsch

Thema: „*Funktionelle Charakterisierung des p53-Zielgens IEX-1 durch ribozymvermittelte Inhibition der Genexpression*“
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Schulz
- September 1998:** Prämierung eines Posters mit dem Titel „*Generierung spezifischer Hammerhead-Ribozyme zur temporären funktionellen Ausschaltung des p53-Zielgens IEX-1*“ auf der 53. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten

Kiel, den 25.07.2001 _____

Danksagung

Für die kurzfristige Bereitschaftserklärung, diese Abhandlung als Erstreferent zu begutachten, gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Schulz.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Guido Krupp für die stetige Diskussionsbereitschaft und Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang E. Schmidt möchte ich für die Bereitstellung des Themas und Herrn PD Dr. rer. nat. Heiner Schäfer für die anteilnahmevolle und engagierte Betreuung dieser Dissertation während der letzten vier Jahre danken.

Ferner möchte ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Hendrik Ungefroren und Frau Christiane Sandberg für die Unterstützung bei den S2-Arbeiten mit dem retroviralen Vektorsystem pBabePuro erkenntlich zeigen.

Einer Reihe von Mitarbeitern und Freunden gebührt meine Verbundenheit für Ihre Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit, insbesondere meinem langjährigen Freund und Studienkollegen Dr. rer. nat. Holger Zill, Frau Dr. rer. nat. Maike Keunecke und Herrn Alexander Arlt.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor für Molekulare Gastroenterologie bedanke ich mich bei meinen Kollegen PD Dr. rer. nat. Heiner Schäfer, Dr. rer. nat. Susanne Mürköster, Dr. med. Torsten Sebens, Alexander Arlt, Maike Breitenbroich, Anke Hünermann-Jansen, Eike Jürgen, Jens Vorndamm und Alexander Sieke.

Schließlich gebührt mein ganz besonderer Dank meiner Freundin Imke Claassen, die mich die ganzen Jahre über hervorragend unterstützt und mich durch ihre unbändige Frohnatur auch in den erfolglosen Abschnitten dieser Doktorarbeit immer wieder motiviert und aufgebaut hat.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist.

Ich erkläre hiermit ferner, daß diese Abhandlung - weder ganz noch in Teilen - an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat.

Kiel, den 25.07.2001

Olaf Grobe, Diplom-Biologe