

Untersuchungen zur regulierbaren transgenen Expression von Ribozymen und
„Antisense“-Transkripten mit dem Ziel einer Reduktion der Prm3-Expression

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Martin Kämper
aus Soest

Göttingen 2001

D7

Referent: Prof. Dr. W. Engel

Korreferent: Prof. Dr. U. Grossbach

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2001

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Untersuchung der Genfunktionen mit Hilfe von „Knockout“-Mutanten	1
1.2 „Knockout“-Strategien	1
1.3 Reversibler „Knockout“ durch induzierbare Expression von Anti-RNA-Effektormolekülen	6
1.4 Anwendung eines induzierbaren, reversiblen „Knockout“-Systems in der Spermatogenese	8
1.4.1 Spermatogenese	8
1.4.2 Tetracyclin-regulierbares „Knockout“-System zur Untersuchung des Protamin-Genclusters der Maus	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien	11
2.2 Gebrauchswaren	13
2.3 Sterilisation	14
2.4 Puffer und Stammlösungen	14
2.5 Medien und Zusätze	19
2.5.1 Medien für Bakterien	19
2.5.2 Medien für Hefen	20

2.5.3	Medien für die Zellkultur	20
2.6	Verwendete Bakterien-, Hefestämme, eukaryotische Zelllinien	21
2.6.1	Bakterienstämme	21
2.6.2	Hefestämme	21
2.6.3	Eukaryotische Zelllinien	22
2.7	Synthetische Oligonukleotide	22
2.8	Verwendete Vektoren, Gensonden und Antikörper	23
2.8.1	Vektoren für Standardklonierungen	23
2.8.2	Expressionsvektoren/ Expressionssysteme	24
2.8.3	Gensonden	25
2.8.4	Antikörper	26
2.9	Mausstämme	26
2.10	Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.10.1	Isolierung von genomischer DNA aus Geweben	26
2.10.2	Präparation von Plasmid-DNA	27
2.10.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	27
2.10.4	Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.10.5	Isolierung von Poly A(+)-RNA	28
2.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.13	Enzymatische Modifikation von DNA	30
2.13.1	Restriktionsspaltungen	30
2.13.2	Auffüllreaktion	30
2.13.3	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	30
2.13.4	Ligation	31
2.13.5	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	31

2.13.5.1	„Random prime“ Markierung	31
2.13.5.2	Radioaktive Endmarkierung von Bandshift-Fragmenten	32
2.14	Ribozyme	32
2.14.1	Herstellung spezifischer „Hammerhead“-DNA-Templates	32
2.14.2	<i>In vitro</i> -Transkription	34
2.14.3	<i>In vitro</i> -Aktivitätstests	35
2.15	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	36
2.15.1	Horizontale Agarosegelelektrophorese	36
2.15.2	Denaturierende Agarosegelelektrophorese	36
2.15.3	Polyacrylamid Gelelektrophorese	37
2.16	Transfertechniken von Nukleinsäuren	38
2.16.1	Dot-Blotting	38
2.16.1.1	Dot-Blot zum Nachweis eines Transgens	38
2.16.1.2	Dot-Blot zur Abschätzung der Anzahl inserierter Kopien	38
2.16.2	Northern-Blotting	39
2.17	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	39
2.18	Klonierung von DNA-Fragmenten	40
2.18.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	40
2.18.2	Transformation kompetenter Bakterien	40
2.19	Sequenzanalyse	41
2.20	Isolierung von Proteinen	42
2.20.1	Gesamtproteinisolierung aus Zellkulturen und Geweben	42
2.20.2	Extraktion von Kernproteinen aus Geweben	43
2.20.3	Isolierung von Kernproteinen aus kultivierten Zellen	43
2.21	Proteinanalysen	44
2.21.1	SDS-PAGE	44

2.21.2	Coomassie-Färbung	44
2.21.3	Acetonfällung von Proteinen	45
2.21.4	Dialyse von Proteinlösungen	45
2.21.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	45
2.22	Expression von rekombinantem Protein in <i>S. cerevisiae</i>	46
2.22.1	Klonierung eines Hefe-Expressionskonstruktes	46
2.22.2	Herstellung kompetenter Hefezellen	47
2.22.3	Transformation von Hefen	47
2.22.4	Induktion der Proteinexpression und Aufschluß der Hefezellen	47
2.22.5	Aufreinigung von rekombinantem Protein	48
2.22.6	Herstellung polyklonaler Antiseren	49
2.23	Immunoblots	49
2.23.1	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose	49
2.23.2	Transferkontrolle mit Ponceau-Rot	50
2.23.3	Immunodetektion	50
2.24	Quantitativer Nachweis von Reporterenzymen	51
2.24.1	Luciferase-„Assay“	52
2.24.2	β -Galactosidase-„Assay“	52
2.25	Gel „Retardation Assay“	52
2.26	Zelllinien und Gewebekultur	53
2.26.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	53
2.26.2	Isolierung und Kultivierung primärer Fibroblasten	53
2.26.3	Transfektion eukaryotischer Zellen	54
2.26.4	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	55
2.26.5	Einfrieren eukaryotischer Zellen	56
2.27	Erzeugung transgener Mäuse	57
2.27.1	Vorbereiten der DNA zur Mikroinjektion	57
2.27.2	Superovulation	58

2.27.3	Gewinnung befruchteter Oocyten	58
2.27.4	Mikroinjektion	59
2.27.5	Retransfer mikroinjizierter Oocyten	60
3	Ergebnisse	61
3.1.	Ribozyme gegen Prm3-mRNA der Maus	61
3.1.1.	Feststellung möglicher Ribozym-Schnittstellen der Prm3-mRNA der Maus	61
3.1.2	Synthese spezifischer Ribozyme	62
3.1.3	<i>In vitro</i> -Spaltungen unter „single turnover“-Bedingungen	65
3.1.3.1	Feststellung der Aktivität einzelner Ribozyme	65
3.1.3.2	Kinetik aktiver Prm3-spezifischer Ribozyme	66
3.1.3.3	Nachweis der Substratspezifität (HPrm3)	69
3.1.3.4	Aktivitätstests in Gesamt-RNA	70
3.2	Ribozyme gegen Prm1-mRNA der Maus	71
3.3	Transgene Mauslinien für einen Tetracyclin-abhängigen Transaktivator	72
3.3.1	Klonierung eines spezifisch exprimierenden Tet-Transaktivators	72
3.3.2	Tet-Transaktivator Stamm (PGK2Tet-On)	72
3.4	Tet-Responder, Klonierung verschiedener Effektorgene zur Reduzierung der Transkriptmenge von Prm3	74
3.4.1	Klonierung eines Prm3 „Antisense“-Konstruktes	74
3.4.2	Klonierung von Prm3-spezifischen Ribozymen	75
3.4.3	Klonierung von Konstrukten zur „RNA-Interferenz“	77
3.4.4	Tet-Responder Mauslinien	79
3.4.5	Versuch des Nachweises der regulierbaren Expression der Responderkonstrukte in doppelt transgenen Mäusen	83
3.5	Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen Prm3	85

3.6	Zellkultursystem zur Prm3-Expression	88
3.7	Spezielle Aktivitätstests mit Ribozymen/ <i>In vitro</i> -Aktivitätstests mit transkribierter 3'-UTR	91
3.8	Versuch des Nachweises von Ribozymaktivität <i>in vivo</i>	94
3.8.1	Versuch des Nachweises einer Prm3-spezifischen Ribozymaktivität in transgenen Mäusen	94
3.8.2	Transiente Transfektionen Prm3-exprimierender Zellen mit Ribozymkonstrukten	95
3.8.3	Ribozymexpression in stabilen Zelllinien	97
3.9	Modifikationen des Tet-Systems durch Veränderung des Transaktivators	100
3.9.1	Herstellung eines Transaktivatorproteins (rtTA) mit minimalen Aktivierungsdomänen	100
3.9.2	Charakterisierung der L-Fusionskonstrukte	102
3.9.3	Aktivierungspotential von rTetR, fusioniert mit minimalen Aktivierungsdomänen	104
3.9.3.1	Überprüfung des Aktivierungspotentials der L-Fusionskonstrukte in doppelt transienten Transfektionen	104
3.9.3.2	Überprüfung des Aktivierungspotentials der L-Fusionskonstrukte in stabil transfektierten Responderlinien	107
3.9.4	DOX-Abhängigkeit der DNA-Bindungsaktivität der rTetR Fusionsproteine	108
3.9.5	Aktivierungseigenschaften verschiedener Tet-Transaktivatoren Kombination mit pflanzlichen Promotorkonstrukten	109
3.9.6	Dox-Sensitivität der Tet-Transaktivatoren	111
3.9.7	Erzeugung transgener Mäuse mit dem 17L-Transaktivator	112
4	Diskussion	114
4.1	Ribozymaktivität	116
4.1.1	Einflüsse der Ziel-RNA	116

4.1.2	Nachweis der Spezifität der eingesetzten Ribozyme	118
4.2	Etablierung eines Zellkultursystems	119
4.2.1	Prm3-Expression in der Zellkultur	119
4.2.2	Transiente Expression von Ribozymen in der Zellkultur	121
4.3	Ribozymexpression in transgenen Mäusen	123
4.4	Spezielle Aktivitätstests mit Ribozymen/ <i>In vitro</i> -Aktivitätstests mit transkribierter 3'-UTR	123
4.5	Stabile Ribozymexpression in Prm3-exprimierenden Zelllinien	124
4.6	Tetracyclin/Doxycyclin induzierbare Genexpression	126
4.6.1	Tet-On oder Tet-Off	126
4.6.2	Basalaktivität, Hintergrundaktivität, Aktivierungspotential von Transaktivatoren	128
4.6.3	Negative Effekte von Transkriptionsaktivatoren auf Zellen	130
4.6.4	Stabilität der Transaktivatorproteine	131
4.6.5	Transgene/ keimzellspezifische Expression des Transaktivators	132
4.7	Modifikationen der Tet-Komponenten	134
4.8	Transaktivatormäuse mit 17L-Minimaldomänen	137
5	Zusammenfassung	139
6	Literaturverzeichnis	14

Abkürzungen

A	Ampère
A	Purinbase Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Pyrimidinbase Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteres
Fa.	Firma
g	Gramm
x g	x Erdbeschleunigung
G	Purinbase Guanin
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
k	kilo- (1×10^3)
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	milli- (1×10^{-3})
M	mega- (1×10^6)

M	Molarität
MCS	„multiple cloning site“
μ	mikro- (1×10^{-6})
min	Minute(n)
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
n	nano- (1×10^{-9})
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
Nr.	Nummer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p	pico- (1×10^{-12})
PAA	Polyacrylamid
p.A.	per analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Svedberg
T	Pyrimidinbase Thymin
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris- (hydroxymethyl) aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U	Pyrimidinbase Uridin
ü.N.	über Nacht
UTR	nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt

1 Einleitung

1.1 Untersuchung der Genfunktionen mit Hilfe von „Knockout“-Mutanten

Die spezifische Ausschaltung von Genen („Knockout“) ist eine wichtige Methode zur Untersuchung der Genfunktion. Die klassische und am häufigsten benutzte Methode basiert auf dem Mechanismus der homologen Rekombination und führt über die Rekombination von Teilen eines sog. „Knockout“-Konstruktes mit homologen Bereichen des Zielgens zu dessen Unterbrechung (Capecchi, 1989). Diese Methode führt zwar oft zu eindeutigen Phänotypen, hat aber auch Nachteile. Hierzu gehören z.B. mangelnde Gewebsspezifität und Irreversibilität des „Knockouts“, embryonale Letalität oder mögliche Beeinträchtigung von lokalen Regulationsmechanismen im modifizierten Genlocus. Ein Teil dieser Probleme kann durch die Verwendung eines spezifischen Rekombinationssystems, wie des **Cre-*loxP*-Systems** umgangen werden. Hier werden zunächst über homologe Rekombination *loxP*-Sequenzen in den Ziellocus eingeführt. Nach Verpaarung mit transgenen Tieren, die die Cre-Rekombinase („causes recombination“) exprimieren, wird eine Deletion des Bereiches zwischen zwei *loxP*-Sequenzen gleicher Orientierung katalysiert. Durch entsprechende transgene Expression der Cre-Rekombinase kann ein gewebsspezifischer oder stadienspezifischer „Knockout“ erreicht werden (Gu et al., 1993).

Trotzdem bleibt es für viele Anwendungen vorteilhaft, den genomischen Locus nicht irreversibel zu verändern. Daher werden zunehmend alternative Strategien entwickelt. Prinzipiell sind Eingriffe auf allen Ebenen des genetischen Informationsflusses denkbar. Einige Ansätze zur spezifischen Beeinflussung von Genexpression sind in Abb. 1.1 veranschaulicht. Allgemein lassen sich drei Typen von Strategien unterscheiden: Anti-Gen-, Anti-RNA- und Anti-Protein-Strategien (Jen und Gewirtz, 2000). Die verschiedenen Methoden sollen im Folgenden näher erläutert werden.

1.2 „Knockout“-Strategien

Anti-Gen-Strategien:

Anti-Gen Strategien sind attraktiv, weil sie einen „stöchiometrischen Vorteil“ bieten, d.h. es müssen nur zwei Moleküle (nämlich die beiden Allele an einem Genlocus) manipuliert

werden, um einen Effekt sicherzustellen. Die klassische homologe Rekombination und Cre-*loxP*-Strategie als bekannteste Formen der Anti-Gen-Strategien inklusive deren Nachteile wurden oben bereits beschrieben. Weitere Strategien sind synthetische Oligonukleotide, die mit spezifischen DNA-Sequenzen hybridisieren und meist durch eine Bindung in der großen Furche eine „**Triple**“-**Helix-Struktur** ausbilden (Wang et al., 1995; Gunther et al., 1996; Raha et al., 1996). Tripple-Helix-Bildungen zerstören Gene nicht, sie verhindern aber die Transkription entweder durch das Behindern der Entwindung der DNA-Duplexstruktur oder der Anbindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor des Gens.

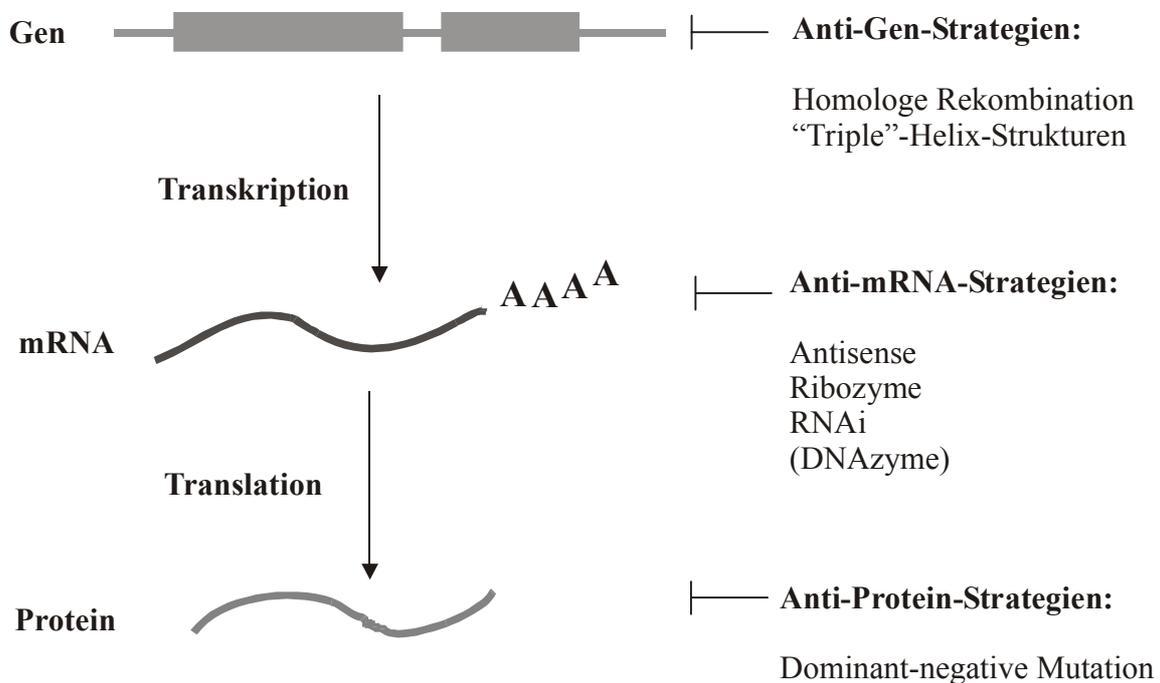


Abb. 1.1: Schematische Darstellung verschiedener Strategien zum Erhalt eines Gen-„Knockouts“.

Anti-mRNA-Strategien:

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Inhibierung der Genexpression ist die Destabilisierung der entsprechenden mRNA. Effektormoleküle verschiedener Art sollen spezifisch auf die mRNA von Zielgenen wirken, diese zerstören oder deren Abbau veranlassen und so einen signifikanten „Knockout“-Effekt hervorrufen.

Die Verwendung von „**Antisense**“-RNA ist eine seit langem bekannte Methode zur spezifischen Reduktion der Expression eines Zielgens. Die komplementäre Basenpaarung an

die Ziel-RNA führt zu dsRNA. Diese soll dann nicht gespleißt, transportiert oder translatiert werden können, was die Stabilität der RNA herabsetzt. Der exakte Mechanismus der „Antisense“-Wirkung ist jedoch noch nicht geklärt. Eine Übersicht über experimentelle und mögliche klinische Anwendungen von „Antisense“-RNA geben z. B. Agrawal und Zhao, 1998; Galderisi et al., 1999.

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die sequenzspezifisch eine Phosphodiesterbindung zu spalten vermögen. Entdeckt wurde die katalytische Fähigkeit von RNA in selbstspaltenden mRNA-Vorläufermolekülen der Gruppe I des Einzellers *Tetrahymena thermophila* (Cech, 1990a). Solche sog. „Gruppe I Introns“ wurden später in Vorläufer rRNAs, tRNAs und mRNAs vieler Organismen gefunden, konnten aber bisher nicht in einem Wirbeltiergenom nachgewiesen werden. Die ebenfalls selbstspaltende Aktivität besitzenden Gruppe II Introns findet man hauptsächlich in mitochondrialen und Chloroplasten-RNAs von Pflanzen und Pilzen.

Diese RNAs sind strenggenommen keine Enzyme (bzw. Ribozyme), weil sie nicht unverändert aus der Reaktion hervorgehen. Echte, natürlich vorkommende Ribozyme stellen z.B. der RNA-Anteil von RNaseP (Prozessierung von Vorläufer tRNAs, kommt in allen Organismen vor) und eine weiterprozessierte Form des Introns der 26S-rRNA aus *Tetrahymena* dar. Eine weitere Gruppe von katalytischen RNAs findet sich in RNA-Genomen einiger Viren und Viroide, wo sie eine Rolle in der Prozessierung von Zwischenprodukten der „rolling circle“-Replikation spielen. In diese Gruppe der intramolekular (*in cis*) spaltenden „Ribozyme“ gehören die Hammerhead-, Hairpin-, Hepatitis- δ -Virus- und *Neurospora crassa* VS-RNAs (Bruening, 1989; Sheldon und Symons, 1993; Symons 1992; Saville und Collins, 1990). Durch die Aufteilung von katalytischer Region und Substratregion auf getrennte RNA-Moleküle können auch diese eine echte katalytische Aktivität erhalten. Durch diese Aufteilung ist ein „multiple turnover“ von intermolekularen *in trans*-Spaltungen möglich.

Die sog. Hammerkopf-Ribozyme („hammerhead ribozymes“) gehören zu den kleinsten katalytischen RNAs, sie leiten sich aus selbstspaltenden Strukturen in Pflanzenviroiden ab (erstmalig beim Avocado-Sonnenflecken-Viroid beschrieben). Die Spaltung von RNA erfolgt 3' eines NUH Triplets (N = beliebiges Nukleotid; H = A, C oder U), ist jedoch am effizientesten 3' von GUC (Haseloff und Gerlach, 1988; Ruffner et al., 1990; Perriman et al., 1992; Nakamaye und Eckstein, 1994). Da der zur Substratsequenz komplementäre Bereich der Hammerkopf-Ribozyme nur für den Bereich der Spaltstelle invariante Nukleotide besitzt, kann er spezifisch für verschiedene Zielstellen gestaltet werden. Die Abb. 1.2 zeigt die zum Selbstschneiden minimal notwendige Sequenz der RNA des Virusoids des „lucerne transient

streak virus“ (vLTSV) (Forster und Symons, 1987) und das daraus abgeleitete zweidimensionale Modell des I/III *in trans* aktiven Hammerhead-Ribozymes (Haseloff und Gerlach, 1988). Ribozyme verschiedener Typen wurden bereits erfolgreich zur Geninhibierung vor allem in Zellkulturen aber auch in transgenen Mäuse eingesetzt (z.B. Dawson und Marini, 2000; L’Huillier, 1996).

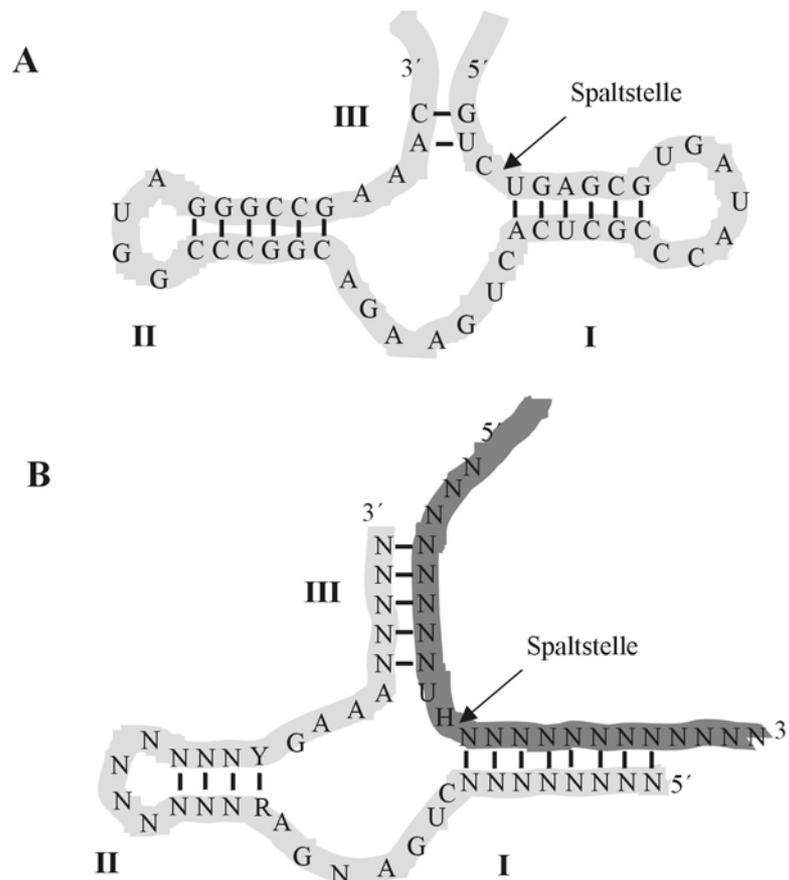


Abb. 1.2: Model des „Hammerhead“-Ribozymes. **A)** Zweidimensionale Darstellung der selbstschneidenden RNA des Pflanzenviroids LTSV (Foster und Symons, 1987). **B:** Model der I/III *in trans* aktiven „Hammerhead“-Ribozyme. Nichtkonservierte Positionen sind mit „N“ gekennzeichnet, „H“ bezeichnet alle Nucleotide mit Ausnahme von „G“, „R“ und „Y“ bezeichnen Purine und Pyrimidine. I, II und III bezeichnen die Stammes Schleifen der „Hammerhead-consensus-sequence“.

Ähnlich wie Ribozyme gibt es DNA-Moleküle mit katalytischer Aktivität (**DNAzyme**, **Desoxyribozyme**), die spezifisch RNA schneiden. Das sog. „general-purpose“ RNA-cleaving DNA-Enzym Typ 10-23 besteht aus einer katalytischen Domäne von 15 Desoxynucleotiden und kann über bindende Arme spezifisch an die mögliche RNA-Schnittstelle GC gebunden werden (Santoro und Joyce, 1997). Über diese „10-23“-RNase hinaus wurden weitere

katalytisch aktive DNA-Sekundärstrukturen gefunden. Der Vorteil von Desoxyribozymen gegenüber Ribozymen liegt in der vielfach höheren Stabilität und im Fall der 10-23-RNase in der höchsten katalytischen Aktivität unter allen bisher gefundenen DNA- und RNA-Enzymen (Breaker, 1999). Die Aktivität von 10-23-RNase in Zellkultursystemen wurde bereits gezeigt (Cairns et al., 1999). Eine endogene Expression von DNAzymen ist bisher nur im Zellkultursystem gezeigt worden, indem ein Vektorsystem benutzt wurde, das neben dem DNAzym auch eine Reverse Transkriptase codierte (Chen et al., 2000).

Das Phänomen der spezifischen Degradierung von mRNA nach der Injektion von doppelsträngiger RNA wurde erstmals 1995 beobachtet (Guo und Kemphues, 1995) und wird als „**RNA-Interference**“ (RNAi) bezeichnet. Der spezifische Abbau von homologer mRNA erfolgt in *C. elegans* nach der Injektion von intramolekular hybridisierter dsRNA, Gemischen von „Sense-“ und einer „Antisense“-RNAs oder schnell aufeinanderfolgenden Injektionen einer „Sense“- und „Antisense“-RNA. Dieser Effekt benötigt (im Gegensatz zu den durch reine „Antisense“-RNA hervorgerufenen Effekte) keine zur mRNA äquimolaren Mengen des Effektmoleküls (Fire et al., 1989). Der RNAi-Effekt kann durch die *in vivo*-Transkription eines dsRNA-Konstruktes über ein stabil vererbbares Plasmid hervorgerufen und über entsprechende Promotoren lokal oder induziert kontrolliert werden (Tavernarakis et al., 2000). RNAi wurde bisher in Fruchtfliegen (Kenerdell und Carthew, 2000), Trypanosomen (Ngo et al., 1998), Planarien (Sánchez Alvarado und Newmark, 1999) und vor allem bei Pflanzen beschrieben, die in einer Art Überreaktion vermeintliche dsRNA-Viren bekämpfen (Waterhouse et al., 1998). Es gibt Hinweise, daß RNAi für die Anwendung in Säugerzellen adaptiert werden kann (Wianny und Zernicka-Götz, 2000).

Anti-Protein-Strategien

Neben der direkten Interaktion mit der codierenden DNA ist eine Inhibierung über Protein-Interaktionen denkbar. Diese kann z.B. über den Einsatz von DNA-Effektmolekülen als „**Köder**“ für genspezifische Transkriptionsfaktoren erfolgen (Morishita et al., 1995).

Effektmoleküle auf Proteinbasis werden bei den „**dominant negativen Mutationen**“ eingesetzt. Hierbei wird ein z. B. rekombinantes Protein zur Expression gebracht, das wie sein natürliches Gegenstück die Bindung eines Proteins an einen Rezeptor unterstützt, aber wegen fehlender katalytischer Aktivität keine Einleitung einer nachfolgenden Kaskade induziert (z. B. Mukherjee et al., 2001).

1.3 Reversibler „Knockout“ durch induzierbare Expression von Anti-RNA-Effektormolekülen

Die für einen reversiblen „Knockout“ notwendigen Effektormoleküle können prinzipiell über exogene oder endogene Applikation in Zellen gebracht werden. Die exogene Applikation (z.B. über Injektionen oder Transfektionen) wird überwiegend bei kultivierten Zellen angewendet. Die Grundlage der endogenen Applikation ist ein vektorvermittelter Gentransfer. Die als Effektormolekül wirksame RNA wird in diesem Fall erst in der Zelle synthetisiert. Durch die Wahl eines Promotors und der 3'-UTR kann die Expression und die Lokalisation der Effektormoleküle bestimmt werden. Da in *in vivo*-Systemen eine gleichmäßige und kontinuierliche Expression gefordert ist, ist der endogene Weg, eine Expression der Effektormoleküle als Gene in transgenen Tieren, vorzuziehen. Idealerweise wäre die Expression der Effektormoleküle regulierbar, um die Vorteile eines reversiblen „Knockout“-Effekts nutzen zu können.

Ein Vektorsystem, das diesem Anspruch genügt und dessen, von außen applizierbarer Induktor keine Nebeneffekte auf Tiere zeigt, ist das von Bujard und Kollegen für Säuger vorgestellte Tetracyclin-abhängige Genexpressionssystem (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1993; Furth et al., 1994). Die Regulation eines Gens, das z.B. ein Effektormolekül codiert, erfolgt in Tieren über die Applikation des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin (Dox) mit dem Trinkwasser. Das System besteht jeweils aus dem Vektor zur Expression eines synthetischen Transaktivatorproteins und dem Vektor zur Expression eines Effektormoleküls, dessen Regulation vom Transaktivator bestimmt wird. Das Transaktivatorprotein (tTA) ist ein Fusionsprotein aus dem Tet-Repressor (TetR) des Tet-Operons von *E. coli* und eines Teils der VP16-(Transkriptions)-Aktivator-domäne (Triezenberg et al., 1988) des Herpes simplex Virus (TetR + VP16 → tTA). Das System nutzt die über Dox induzierbare Bindung des TetR-Anteils von tTA an *tet*-Operatorsequenzen (*tetO*) des Responderkonstruktes. Hier wird über den VP16-Anteil des tTA die Transkription eines stromabwärts der *tetO*-Sequenzen liegenden, ansonsten nicht aktiven Minimalpromotors (ein um seine Enhancersequenzen verkürzter Cytomegalovirus immediate early Promotor, P_{tetCMVmin}) ermöglicht. Durch die Zugabe von geringsten, noch nicht antibiotisch wirkenden Mengen an Dox (Hillen und Berens, 1994), wird durch die Konformationsänderung des TetR-Anteils die Bindung des Transaktivatorproteins aufgehoben und damit die Transkription vom abhängigen Minimalpromotor gestoppt (Tet-Off-System).

Es wurden bereits verschiedene Modifikationen des Tet-Systems entwickelt (siehe Übersichtsartikel von Shockett und Schatz, 1996). Vorteilhaft für den Einsatz in transgenen Tieren ist die von Gossen et al. (1995) beschriebene Modifikation. Durch Mutagenese wurde ein Transaktivator erhalten, der durch den Austausch von vier Aminosäuren im Tet-Repressor-Anteil eine umgekehrte DNA-Bindungseigenschaft aufweist. Dieser reverse Tet-Repressor (rTetR) bindet *tetO* und aktiviert die Transkription in Anwesenheit von Dox. Der reverse Tet-Repressor ist Grundlage des positiv regulierbaren Tet-Systems (Tet-On-System, siehe Abb. 1.3). Die positive Regulation zeigt mehrere Vorteile gegenüber dem Tet-Off-System. Sie ermöglicht die schnellere Aktivierung der Transkription der abhängigen Promotoren, unabhängig von der Halbwertszeit des noch im Körper vorhandenen Doxycyclin.

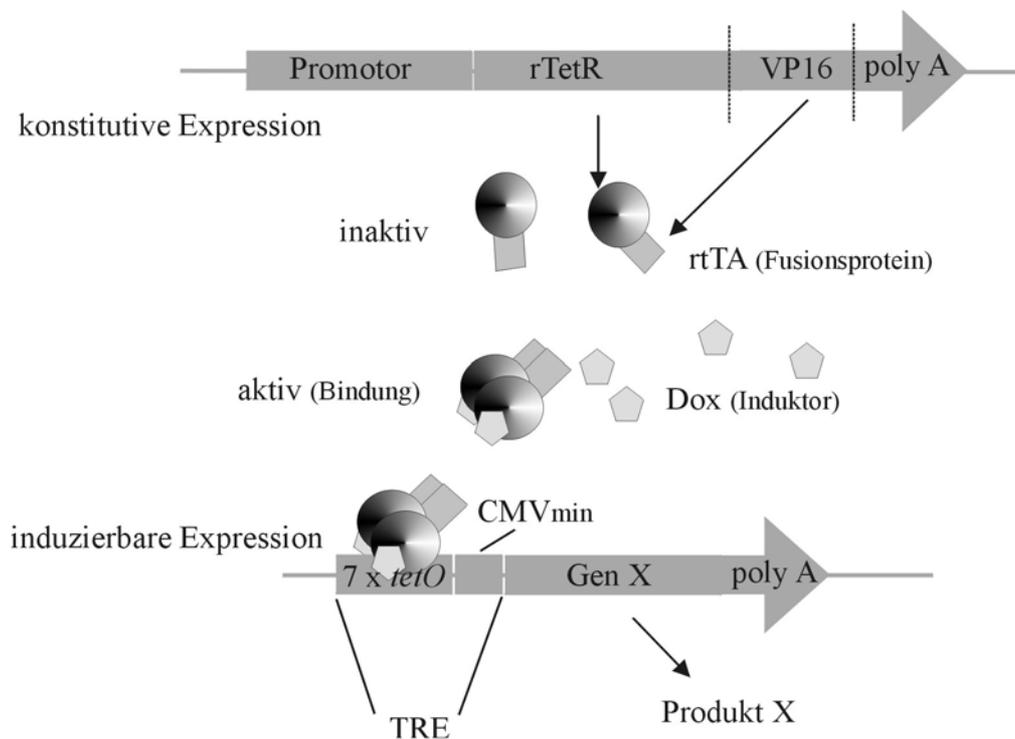


Abb. 1.3: Das Doxycyclin-aktivierbare Expressionssystem Tet-On (Gossen et al., 1995). Das aus rTetR und der VP16-Aktivierungsdomäne bestehende Transaktivator-Fusionsprotein wird konstitutiv exprimiert. Nach der durch Dox induzierten Konformationsänderung bindet der Transaktivator über den rTetR-Anteil an die *tetO*-Sequenzen des synthetischen Promotors TRE („tetracycline responsive element“). Dadurch kann über die VP16-Aktivierungsdomäne die Bildung eines Transkriptions-Initiationskomplexes eingeleitet und die Transkription eines nachgeschalteten Gens gestartet werden.

Die Nomenklatur der verschiedenen Komponenten und seine Verwendung in dieser Arbeit ist unter 2.8.2 nochmals zusammengefaßt.

1.4 Anwendung eines induzierbaren, reversiblen „Knockout“-Systems in der Spermatogenese

Das oben beschriebene Konzept soll zum konditionalen Knockout von haploid exprimierten Genen, die eine Rolle im Rahmen der männlichen Keimzellentwicklung spielen, realisiert werden. Im folgenden wird zunächst die Spermatogenese erläutert und im weiteren die besonderen Vorteile der geplanten Strategie in diesem Kontext.

1.4.1 Spermatogenese

Die Entwicklung der männlichen Keimzellen beim Säuger ist ein komplexer Differenzierungsprozess, in dessen nach mitotischer und meiotischer Teilung dritter Phase, der Spermiogenese, die Spermatiden zu reifen Spermien differenzieren. Neben einer Änderung in der Zellmorphologie, die sich u.a. in der Ausbildung eines Flagellums und des Akrosoms zeigt, kommt es zu einer Umstrukturierung des Chromatins (Clermont, 1992). Somatische Histone werden zunächst durch testisspezifische Histonvarianten, diese wiederum durch sog. „Transitionsproteine“ ersetzt. Schließlich werden die Transitionsproteine durch Protamine abgelöst, die (je nach Spezies) 80-100 % der Kernproteine des reifen Spermiums ausmachen (Balhorn, 1989; Hecht, 1992). Dieser Austausch der Chromatinstrukturproteine führt zu einer drastischen Kondensierung des Chromatins, die mit der morphologischen Differenzierung des Spermienkopfes einhergeht. Verschiedene Befunde legen nahe, daß Protamine und Transitionsproteine eine wichtige Rolle in der Spermienmorphogenese spielen. So lassen sich Spermienköpfe infertiler Männer mit einem hohen Prozentsatz makrozephaler Spermien mit Anilinblau färben, ein Zeichen des nicht erfolgten Austausches der anfärbbaren Histone durch nicht färbbare Protamine (Dadoune et al., 1988).

Vier der bisher gefundenen Transitionsproteine und Protamine sind in einem, in allen höheren Wirbeltieren hochkonservierten Gencluster lokalisiert (Schlüter et al., 1996). Die hier codierten Protamine Prm1, Prm2 und Prm3 sowie das Transitionsprotein Tnp2 wurden auf cDNA-Ebene untersucht. Die zeitlich festgelegte Translation der verschiedenen mRNAs lässt eine koordinierte Regulation der Gene des Clusters vermuten. Diese Idee wird unterstützt durch Berichte über veränderte Prm1/Prm2-Raten infertiler Männer (Ballhorn et al., 1988; Belokopytova et al., 1993; Yebra et al., 1993). Unter den haploid exprimierten Genen gibt es

bisher klassische „Knockout“-Mäuse für die Transitionsproteine Tnp1 (Yu et al., 2000) und Tnp2 (Adham et al., 2001). Diese zeigen eine abnormale Spermatogenese.

„Knockoutmutanten“, denen Protamine oder Kombinationen der beschriebenen Gene fehlen, könnten Hinweise auf die Beteiligung der einzelnen Proteine bei der Differenzierung reifer Spermien geben, da die Kompaktierung des Spermienchromatins eine wichtige Voraussetzung für die morphologische Differenzierung der männlichen Keimzelle darstellt.

1.4.2 Tetracyclin-regulierbares „Knockout“-System zur Untersuchung des Protamin-Genclusters der Maus

Der nach der klassischen Methode der homologen Rekombination hergestellte irreversible „Knockout“ ist im Kontext der Untersuchung von Genen des Protamin-Clusters nicht zweckmäßig. Das Ziel von „Knockout“-Untersuchungen wäre ein infertiler Phänotyp, der sich nicht ohne weiteres züchten ließe. Da einzelne Gendefekte innerhalb des Clusters möglicherweise nicht zu einem signifikanten (infertilen) Phänotyp führen, müssten mehrere Gene in verschiedenen Kombinationen ausgeschaltet werden. Auch Einflüsse der verschiedenen Genprodukte auf die möglicherweise streng geregelte Reihenfolge der Translation der in den Keimzellen vorliegenden mRNAs kann durch Kombination von „Knockouts“ untersucht werden. Durch die kurzen intergenen Abstände innerhalb des Protamin-Genclusters ist das Kreuzen von „single-Knockouts“ nicht möglich. Untersuchungen von verschiedenen kombinierten „Genknockouts“ innerhalb des Clusters bedürften also jeweils spezieller Konstrukte zur homologen Rekombination, einer sehr arbeitsintensiven Technik. Aus diesem Grund ist auch das Cre-*loxP*-System in diesem Zusammenhang keine Alternative zum klassischen „Knockout“.

Im vorliegenden Projekt sollte versucht werden, mit Hilfe des Tet-On-Systems verschiedene Effektormoleküle endogen in Keimzellen zur Expression zu bringen, um eine Anti-mRNA-Strategie aufzubauen. Die Expression von spezifischer Antisense-RNA, Ribozymen oder dsRNA erfolgt dabei in verschiedenen transgenen Mauslinien, die die entsprechenden Responderkonstrukte nach Mikroinjektion in befruchtete Oocyten stabil integriert haben. Die Expression verschiedener Effektormoleküle kann durch Verpaarung der einzelnen Linien kombiniert werden. Die Regulation der Expression wird durch ein einzukreuzendes Transaktivatorkonstrukt ermöglicht.

Ziele der Arbeit

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Idee war ein konditionaler Eingriff in die Genexpression der Maus. Durch die Kombination verschiedener „Antisense“-Techniken mit dem induzierbaren Genexpressionssystem (Tet-On) sollten mRNA-Effektormoleküle (Antisense, Ribozyme o.ä.) unter der Kontrolle eines aktivierbaren Transkriptionsfaktors exprimiert werden. Die Expression der Effektormoleküle, die gegen die mRNA verschiedener Gene des evolutionär konservierten Genclusters der Protamine gerichtet sein sollten, sollte durch das gewählte Expressionsfenster des sensitiven Transaktivators und die festgelegte Aktivierung über Doxycyclin bestimmt werden können. Als Zielgene wurden Prm1 und Prm3 ausgewählt, die in haploiden Stadien der Spermatogenese exprimiert werden (Balhorn et al., 1989; Schlüter und Engel, 1995).

Folgende Punkte können als Zwischenschritte zu diesem Ziel definiert werden:

- Suche nach Prm3- und Prm1-spezifischen Ribozymen, Synthese und Test dieser Ribozyme in *in vitro*-Spaltungsreaktionen
- Etablierung eines Zellkultursystems zur Expression der Protamingene (Prm3)
- Test der nach den *in vitro*-Tests aktivsten Ribozyme in der Prm3-exprimierenden Zelllinie
- Generierung einer transgenen Mauslinie, die den regulierbaren Transaktivator unter der Kontrolle eines keimzellspezifischen Promotors exprimiert
- Generierung transgener Mauslinien, die verschiedene Effektorkonstrukte (Ribozymgene, „Antisensegene“, RNAi-Gene) tragen (Responderlinien)
- Herstellung eines Prm3-spezifischen Antiserums
- Analyse doppelt transgener Linien (Transaktivator- und Responderkonstrukt) in bezug auf induzierbare Effekte auf das Zielgen (Prm3)

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien und Lösungsmittel, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) in p.A. Qualität bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid (40 %; 29:1)	Amresco, Cleveland, USA
Agar	Fluka, Deisenhofen
Agarose	Peq-Lab, Erlangen
Ampicillin	Fluka
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Fluka
BSA	Biomol, Hamburg
Coomassie-Brilliant Blau R250	Fluka
Dextransulfat	Amresco
Diethylpyrocarbonat	Sigma
Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Roth
Dithiothreitol	Biomol
DNase I (RNase-frei)	Epicentre, Wisconsin, USA)
dNTPs	GIBCO BRL, Karlsruhe
EDTA	ICN, Aurora, USA
EGTA	Sigma
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Fluka
FKS	PAN, Aidenbach
Formaldehyd	Roth
Formamid	Merck
G480	Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, USA
D(+)-Galactose	Fluka
Glasperlen (0,25-0,5 mm)	Roth
Glucose (Dextrose)	Becton Dickinson, Cockeysville, USA

Glutamin (200 mM in H ₂ O)	PAN, Aidenbach
Glutaraldehyd	Roth
Glutathion (reduziert)	Fluka
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Glycerin	ICN
Glycylglycin Puffersubstanz	Biomol
Harnstoff	ICN
HCG (Choriongonadotropin, human)	Organon, Oberschleißheim
HEPES	Sigma, Roth
Hefe Stickstoffbasis ohne Aminosäuren	Difco, Detroit
Hygromycin B	Calbiochem-Novabiochem
Kanamycin	Sigma
Ketavet [®]	Parke-Davis, Berlin
Klenow-DNA-Fragment	MBI, St. Leon-Rot
Lachs-Spermien-DNA	Sigma
LeukaseN-Puder	SmithKline Beecham, München
Leupeptin	Sigma
D-Luciferin (freie Säure, synth.)	PJK, Kleinblittersdorf
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
MES Puffersubstanz	Roth
Mineralöl	Sigma
MOPS Puffersubstanz	Roth
myo-Inositol	BBL
Orange G	Sigma
PBS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	PAN
Penicillin, Streptomycin (10000U, 10 mg/ml)	PAN
Pepstatin	Sigma
Phenol	Biomol
PMS (Intergonan)	Vemie, Kempen
PMSF	Sigma
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Poly (dI*dC)	ICN
Ponceau	Fluka

Protease Inhibitor Cocktail (Mammaliagewebe)	Sigma
Proteinase K	Roth
Radioaktiv markierte Reagenzien:	
[α ^{32p}] dCTP, [β ^{32p}] UTP	Amersham Pharmacia Biotech
Restriktionsenzyme	Eurogentec, Gibco, MBI
RNase Inhibitor	MBI
Rompun [®] 2%	Bayer, Leverkusen
SDS	ICN
Suprarenin [®] (Epinephrinhydrochlorid)	Hoechst, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	MBI
T7-RNA-Polymerase	Promega
Taq-DNA-Polymerase	Biometra (Göttingen), Gibco BRL, Roche
TEMED	Serva
Trypsin/EDTA (0,05/0,02 %ig in PBS)	PAN
Tween 20	Merck
Yeast Nitrogen Base w/o aa	Difco, Detroit, USA
Zellkulturmedien	PAN

2.2 Gebrauchswaren

Blottingpapier GB 003	Schleicher & Schüll, Dassel
Dialyseschläuche	Serva
Einmalfilter Minisart NMI	Sartorius, Göttingen
Hybond C Membran	Amersham Pharmacia Biotech
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech

Sonstige Plastik-Einwegartikel wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickhausen), Nunc (Wiesbaden) oder Sarstedt (Sarstedt) bezogen.

2.3 Sterilisation

Die Sterilisation erfolgte für 20 min bei 120 °C und 10⁵ Pascal im Dampfdruckautoklaven (Webeco, Bad Schwartau) oder durch Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm). Gebrauchswaren wurden autoklaviert oder für 5-10 h bei 200 °C hitzesterilisiert.

2.4 Puffer und Stammlösungen

Puffer und Lösungen wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt. Die Chemikalien wurden den Erfordernissen entsprechend in bidestilliertem oder deionisiertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert. Für die Arbeiten mit RNA wurden die Puffer, sofern sie kein Tris enthielten, über Nacht mit 0,1 % DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert. Tris-Puffer wurden in RNase-freien Gefäßen mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt. Puffer von Enzymen und gebrauchsfertigen „Kits“ wurden, wie vom Hersteller in den Beipackzetteln angegeben, benutzt. Ihre Zusammensetzung ist hier nicht mehr aufgeführt.

AP-Puffer	100 mM Tris/Cl (pH 9,5) 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Betäubungsmittel (100 µl pro 10 g Körpergewicht)	I. KETAVET 100 ng/ml II. Rompun 2% I. (1 ml) und II. (1 ml) ad 10 ml mit H ₂ O
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml in Dimethylformamid
10 x Bindungspuffer (GelRetardation Assay)	100 mM HEPES (pH 8,0) 1 mM EDTA 17 % Glycerol (40-50 mM) MgCl ₂ (0,1-1 M) KCl 20 mM DTT (vor Gebrauch zugeben)

Coomassie-Lösung	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau R250
Denhardt´s Lsg.	1 % (w/v) Ficoll 400 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 1 % (w/v) BSA
Elutionspuffer (Fusionsproteinisolierung)	10 mM reduziertes Glutathion 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Coomassie-Entfärber	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
E-Puffer (10 x)	300 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0) 50 mM EDTA
Extraktionspuffer (Gesamtprotein)	100 mM Kaliumphosphat (pH 7,8) 1 mM DTT (direkt vor Gebrauch zugeben) 0,2 % (v/v) Triton X-100 (Lysis von Zellkulturen) 1 % (v/v) Triton X-100 (Lysis von Geweben)
Formamid-Stopmix	95 % (v/v) Formamid 50 mM EDTA 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylenyanol
GET-Lösung	10 mM EDTA 50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl (pH 8,0)

Gewebe-Lysis-Puffer (Isolierung genomischer DNA)	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 0,5 % (w/v) SDS 0,5 mg/ml Proteinase K
Glycylglycinpuffer (pH 7,8)	25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO ₄ 4 mM EGTA
Hybridisierungslösung	10 % (w/v) Dextransulfat 5 x Denhardt's 5 x SSC 0,5 % SDS
Lachs-Spermien-DNA	100 µg/ml
Luciferase-Reaktionspuffer	165 µl Glycylglycinpuffer (25 mM, pH 7,8) 35 µl Kaliumphosphat (100 mM, pH 7,8) 2,5 µl DTT (100 mM) 2,5 µl ATP (200 mM)
Luciferin (Stocklösung)	10 mg D-Luciferin (freie Säure) 55 mg DTT 37,5 ml Glycylglycin-Puffer (25 mM, pH 7,8) (Aliquots bei -70°C, lichtgeschützt lagern)
Luciferin-Injektionslösung	1 ml Luciferin Stocklösung 4 ml Glycylglycinpuffer (25 mM, pH 7,8) 80 µl DTT (0,5 M)

Kernproteinpuffer A (Gewebe)	0,6% (v/v) Nonidet P40 10 mM HEPES (pH 7,9) 150 mM NaCl 2 mM EDTA
Kernproteinpuffer B (Gewebe)	25 % (v/v) Glycerol 20 mM HEPES (pH 7,9) 1,2 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA
Kernproteinpuffer NE (Zellen)	10 mM HEPES (pH 7,9) 10 mM KCl 0,2 mM EDTA 0,2 mM EGTA
Kernproteinpuffer NESG (Zellen)	25 % (v/v) Glycerol 20 mM HEPES (pH 7,9) 0,2 mM EDTA 0,2 mM EGTA
Zu den Kernproteinpuffern wurde vor Gebrauch zugefügt:	1 mM DTT 1 mM PMSF 2 mM Benzamidin 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 5 µg/ml Pepstatin
NBT-Stammlösung	75 mg/ml in 70 % (v/v) Dimethylformamid
PBS (pH 7,2)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄

Ponceau-Lösung	0,1 % (w/v) in 5% (v/v) Essigsäure
Protease-Inhibitor (Hefe, 1:200)	100 mM TLCK 100 mM TPCK 100 mM p-Aminobenzamidin-HCl 100 mM o-Phenantrolin 100 mM PMSF
SDS-PAGE Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 7 % SDS 30 % Glycerol 0,3 % Bromphenolblau 15 % β -Mercaptoethanol (frisch zusetzen)
SDS-PAGE Sammelgelpuffer (2 x)	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,2 % SDS
SDS PAGE Trenngelpuffer (4 x)	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,4 % SDS
SDS PAGE Laufpuffer (10 x)	250 mM Tris/HCl 2,5 M Glycin 1 % SDS
Semi-dry Transferpuffer	25 mM Tris/HCl (pH 8,3) 150 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
20 x SSC (pH 7,0)	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat
20 x SSPE (pH 7,0)	0,02 M EDTA 0,2 M NaH_2PO_4 3,6 M NaCl

TBS	100 mM Tris/HCl 0,9 % (w/v) NaCl
TFB1 (pH 5,0)	15 % (v/v) Glycerol 30 mM KAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂
TFB2 (pH 7)	10 mM NaMOPS 10 mM RbCl ₂ 75 mM CaCl ₂
Towbin Protein-Transferpuffer (Towbin et al., 1979)	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 20 % (w/w) Methanol 0,1 % (w/v) SDS

2.5 Medien und Zusätze

2.5.1 Medien für Bakterien

LB (Luria-Bertani)-Medium (pH 7,5)	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
Zusätze zur Selektion:	Ampicillin (0,1 mg/ml) Kanamycin(0,05 mg/ml)

Agarplatten enthielten 1,5 % (w/v) Agar

2.5.2 Medien für Hefen

YEPD-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton 1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Glucose
SC-Medium	0,15 % (w/v) Hefe Stickstoffbasis 0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat 0,1 % (v/v) myo-Inositol 2 % (w/v) Glucose

Agarplatten enthielten 1,5 % (w/v) Agar

2.5.3 Medien für die Zellkultur

Medien und Zusätze zur Anzucht eukaryotischer Zellen wurden als sterile Lösungen bezogen (PAN, Aidenbach; Sigma, Deisenhofen).

Zur Kultivierung primärer Fibroblasten sowie verschiedener Tumorzelllinien wurden folgende Medien benutzt:

- DMEM (Dulbecco's „modified Eagle medium“): 4,5 g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃
- RPMI 1640: mit 3,7 g/l NaHCO₃

Medienzusätze zur Kultivierung: 10 % (v/v) FKS, L-Glutamin (2-4 mM), Penicillin (200 U/ml, Streptomycin (0,2 mg/ml)

Medienzusätze zur Lagerung in N₂: 20 % (v/v) FKS, 10 % (v/v) DMSO

Während der Präparation von befruchteten Oocyten und zur Kultivierung unter 5 % CO₂ wurden folgende, von der Fa. Sigma bezogene Medien verwendet:

- M2-Medium
 - 5 ml 10 x Hanks
 - 1,25 ml 40 x HEPES
 - 165 µl 300 x Na-Pyruvat
 - 0,25 ml 1 M NaOH
 - 0,5 ml Penicillin (6 mg/ml)
 - Streptomycin (5 mg/ml)
 - 43 ml Ampuwa
 - 0,2 g BSA

- M16-Medium
 - 1 ml 10 x EARLE
 - 270 µl 37,5 x NaHCO₃
 - 33 µl 300 x Na-Pyruvat
 - 100 µl Penicillin (6 mg/ml)
 - Streptomycin (5 mg/ml)
 - 8,6 ml Ampuwa
 - 40 mg BSA

2.6 Verwendete Bakterien-, Hefestämme, eukaryotische Zelllinien

2.6.1 Bakterienstämme

Escherichia coli HB101 (Bolivar und Beckmann, 1979)
JM109 (Messing, 1983)
DH5α (Hanahan et al., 1983)

2.6.2 Hefestämme

Sacharomyces cerevisiae

Stamm H301 (Background S288c, Heinemeyer et al., 1991) Genotyp: MATα pra1, prb1, prc 1, cps1, ura3Δ5, leu2, his3

Stamm RH2191 Genotyp: MATα pra1, prb1, prc 1, cps1, ura3Δ5

2.6.3 Eukaryotische Zelllinien

- NIH/3T3 Embryofibroblasten; „NIH Swiss Mouse“, kontaktinhibiert
(Kulturbedingungen: DMEM, 37°C, 5 % CO₂)
- CHO-K1 „Chinese hamster Ovary“ (Puck et al., 1958)
(Kulturbedingungen: DMEM, 37°C, 5 % CO₂)
- CHO AA8 Kontrollzelllinie zur regulierbaren Luciferaseexpression über das Tet-Off-System (Fa. Clontech)
(Kulturbedingungen: DMEM, 37°C, 5 % CO₂)
(Selektionsbedingungen: 100 µg/ml Hygromycin B, 100 µg/ml G418)

2.7 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma. NAPS (Göttingen) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Verschiedene, standardmäßig eingesetzte Oligonukleotide, die komplementär zu Phagenpromotorsequenzen wie T3 oder T7 sind, sind nicht aufgeführt.

FFwM12	5'-TAT ACG CGT TGC CGG CCG ACG-3'
FRvBs2	5'-AAT GCG CGC CCA GCA TGT CC-3'
MP1Z3f/T7	5'-CTC ACT ATA GTC CGT CGT CCT GAT GAG TC-3'
MP1Z3r	5'-GGC GAA GAT GTT TCG TCC TCA C-3'
MP1Z4f/T7	5'-CTC ACT ATA GAG CGG CGG CCT GAT GAG TC-3'
MP1Z4r	5'-GAT GCT GCC GTT TCG TCC TCA C-3'
MT/EPfw	5'-GAG CAA CCG CCT GCT GGG TGC-3'
MT/EPrv	5'-CGT CAT CAC CGA AAC GCG CG-3'
P3Rz2fw	5'-CTC ACT ATA GCT TCA TGG AGC TGA TGA GTC-3'
P3TAGfw	5'-CTT TTC CCT GTC ATC AGA GGG CTA GG-3'
P3TAGrv	5'-CTC CTC TTC CTA GCC CTC TGA TG-3'
P3allz4f	5'-CCT CTT CCT CGC CCT CTG ATG-3'
P3allz4r	5'-TCA AGA CAA CTT TTC CCT GTT ATC-3'
P3-z1-f	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CAC GGT TGT CTG ATG AGT C-3'
P3-z1-r	5'-AGA ACA CTG GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT CAG AC-3'
P3-z4-f	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CCC TCT GAT CTG ATG AGT C-3'

P3-z4-r	5'-CTT TTC CCT GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT CAG ATC-3'
P3zATC1rv	5'-TTC CCT GTC ATT TCG TCC TCA C-3'
P3zATC1f/T7	5'-CTC ACT ATA GCT CGC CCT CTC TGA TGA GTC-3'
P3ATC2rv	5'-GAG GAG CAA ATT TCG TCC TCA C-3'
P3ATC2f/T7	5'-CTC ACT ATA GCC TTC ACC GGC TGA TGA GTC-3'
P3Rz2rv	5'-GTG GCC ACG AGT TTC GTC CTC AC-3'
P3Rz3fw	5'-CTC ATC ATA GAA GTT GTC TTC TGA TGA GTC-3'
P3Rz3rv	5'-CCT GTG TGA GTT TCG TCC TCA C-3'
P3woABa	5'-TCA GGA TCC GGT TCC CGC TGT TC-3'
P3intrvBg	5'-TCA AGA TCT ACC CTC TGA TGA CAG-3'
REALFfw	5'-TAT ACG CGT TGC ATG CCG ACG CG-3'
REALFrv	5'-ATG CGC GCC CAA CAT GTC CAG A-3'
Ribcor1	5'-CTG ATG AGT CCG TGA-3'
Ribcor2	5'-TCG TCC TCA CGG ACT C-3'
RTTAF2	5'-GAA TTG ATC ATA TGC GG-3'
TetOrv	5'-GGG GAC TTT CAC TTT TCT CTA TCA CTG ATA GGG AGT GGT AAA CTC G-3'
TetOfw	5'-GGG CGA GTT TAC CAC TCC CTA TCA GTG ATA GAG AAA AGT GAA AGT C-3'
T7NHE	5'-ACG GCT AGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3'
TstopfMlu	5'-TTA TAC GCG TAG GGG GCG CGA GGA TCC-3'
TstoprvPvu	5'-GCC GAT TCA TTA ATG CAG CTG-3'

2.8 Verwendete Vektoren, Gensonden und Antikörper

2.8.1 Vektoren für Standardklonierungen

Bluescript SK II	Stratagene, La Jolla, USA
pUC 18, 19	Norander et al., 1983
pGEM-T	Promega, Wisconsin, USA
pGL3-basic	Promega, Wisconsin, USA

2.8.2 Expressionsvektoren/ Expressionssysteme

pCDNA3: fand vor allem Anwendung bei der Expression von cDNAs in Zellkulturen (Fa. Invitrogen, De Schelp, Niederlande)

pCMV- β -Gal: pUC18-Derivat; Expression der β -Galactosidase unter der Kontrolle des Cytomegalievirus „immediate early enhancer/promoter“ (CMV-Promotor); Anwendung als Kontrolle der Transfektionseffizienz durch Kotransfektion

pMT/EP: enthält die Maus Methallothionin-I Sequenz (Glanville et al., 1981) Der Vektor kann episomal repliziert werden. Bei der Anwendung in Zellkulturen erfolgt die Induktion der Transkription durch die Zugabe von 50 μ M Zn^{2+} in das Zellkulturmedium (Burfeind et al., 1996).

pYGEX-2T: (abgeleitet von pGEX, Fa. Stratagene); der Vektor diente der induzierbaren Überexpression eines GST-Fusionsproteins in Hefe. Dazu wurde der ursprüngliche Vektor pGEX um einen Replikationsstartpunkt für Hefe (2 μ) und einen Selektionsmarker (URA3) ergänzt, sowie der Promotor durch einen Galactose-induzierbaren Hefepromotor ersetzt.

pTK-Hyg: (Fa. Clontech); vermittelt Hygromycinresistenz. Der Vektor wurde für Kotransfektionen mit Expressionsvektoren ohne eigenes Resistenzgen eingesetzt, um die Selektion einzelner Klone zu ermöglichen.

Tet-On/Off: induzierbares Expressionssystem (Fa. Clontech), bestehend aus Aktivator (**A**)- und von (**A**)-abhängigen „Responder“-Konstrukten (**B**)

A) Vektor zur Expression des Transaktivatorproteins:

pTet-On: Vektor zur konstitutiven (CMV-kontrollierten) Expression des reversen Tet-Transaktivators (rtTA), ursprünglich beschrieben als pUHD17-1neo (Gossen et al., 1995); Das Protein rtTA bindet an Promotorsequenzen und aktiviert die Transkription der Responderkonstrukte bei Anwesenheit von Dox.

B) Vektoren zur regulierten Expression von Respondergenen:

pTRE-Luc: Tet-Responder-Plasmid mit dem Reporter-gen Luciferase (*Photinus pyralis*), dessen Expression von einem von der Aktivatorbindung abhängigen Promotor (TRE) kontrolliert wird, ursprünglich beschrieben als pUHC-13-3 (Gossen et al., 1992)

pBI: Tet-Responder-Plasmid, dessen aktivierbarer (abhängiger) Minimalpromotor (TRE) bidirektional exprimiert, es können cDNAs in zwei MCS kloniert und im Verhältnis 1:1 transkribiert werden. Der Vektor wurde ursprünglich als pBI-4 beschrieben (Baron et al., 1995).

2.8.3 Gensonden

Sonde	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
Bi (TRE)	„Tet responsive element“ (CMV Promotor und tet-Operator Sequenzen): Nachweis auf Dot- und RNA-Blots	EcoRI aus pBI-4 (Baron et al., 1995)
hEF 2	Kontrollhybridisierung von RNA-Blots	BamHI/BglII (1,6 kb-Fragment aus pHEF2 (Rapp et al., 1987)
Luc	Luciferase cDNA; Nachweis auf Dot- und RNA-Blots	XhoI/XbaI aus pGL3
Prm3	Prm3 cDNA, Nachweis der Transkripte auf RNA-Blots	BamHI/NotI aus pBSC (Schlüter, Diss. 1996)
rtTA	cDNA des reversen Tet-Transaktivators; Nachweis auf Dot- und RNA-Blots	EcoRI/BamHI aus pTet-On
28S	Kontrollhybridisierung von RNA-Blots	400 bp EcoRI-Fragment aus pBSC

2.8.4 Antikörper

Antikörper	Verwendung	Bezugsquelle
anti α -Tubulin (monoklonal, aufgereinigt)	Kontrollantikörper zum Abgleich der Proteinmengen	Fa. Sigma
anti GST (IgG, aufgereinigt aus polyklonalem Serum, Kaninchen)	Nachweis der Glutathion S-Transferase	Fa. Santa Cruz, Santa Cruz, Delaware, USA
anti-Luciferase (IgG)	Nachweis der Luciferase (<i>Photinus pyralis</i>)	Fa. Rockland, Gilbertsville, USA
anti Tet-Repressor (TET02, monoklonaler IgG1 Mix)	Nachweis der Tet-Transaktivatoren	Fa. MoBiTec, Göttingen

2.9 Mausstämme

Die verwendeten Mäuse der Stämme FVB und NMRI stammten aus institutseigenen Beständen, dem Max-Planck Institut für experimentelle Medizin (Göttingen) oder wurden von der Firma Charles River (Hannover) bezogen. Die Haltungsbedingungen bestanden aus einem zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22°C und 55 \pm 5 % relativer Luftfeuchtigkeit. Tierfutter wurde von der Firma ssniff-Spezialdiäten (Soest) bezogen.

2.10 Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren

2.10.1 Isolierung von genomischer DNA aus Geweben

(Laird et al., 1991)

Frisches oder tiefgefrorenes Gewebe (0,1–1 g) wurde zerkleinert und über Nacht in 10 Vol Gewebe-Lysis Puffer bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Die Proteine wurden einmal mit 1 Vol Phenol und einmal mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1 : 1) extrahiert, und die DNA mit 1 Vol Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert, das DNA Pellet einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in Wasser (0,3 bis 3 ml) über Nacht bei 56°C gelöst.

2.10.2 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmide wurden in Bakterien unter Selektionsbedingungen vermehrt. Die „Minipräparation“ aus kleinen Kulturvolumina zur Testung einzelner Klone erfolgte nach Sambrock et al., (1989). Die Plasmidpräparationen erfolgten nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Phenol/Chloroform Extraktion. Einzelne Bakterienklone wurden in 8 ml LB-Medium über Nacht kultiviert. 1,5 ml dieser Kulturen wurden abzentrifugiert und die Bakterien in 100 µl GET-Lösung resuspendiert. Nach der alkalischen Lyse durch Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH/ 1 % SDS wurde der Zelldebris und das SDS mit 150 µl KAc Puffer präzipitiert. Der nach dem anschließenden Zentrifugieren (20 min, 15000 x g, 4°C) erhaltene Überstand wurde mit 700 µl Phenol/Chloroform extrahiert, die DNA aus der abgenommenen wässrigen Phase mit 1 ml Ethanol ausgefällt. Nach dem Waschen mit 800 µl 70 %igem Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 40 µl H₂O/1 µg RNase A gelöst. 16 µl der DNA Lösung genügten für den anschließenden Testverdau des Plasmids.

Plasmid-DNA im Größenmaßstab 50–200 µg wurde mit Hilfe von DNA-Affinitätsäulen (Qiagen Plasmid Midi-Kit) erhalten. Mit 50 µl aus einer Vorkultur wurden 100 ml selektives LB Medium angeimpft und ü.N. kultiviert. 50 ml Kultur wurden abzentrifugiert und gemäß den Angaben des Herstellers lysiert, ohne KDS Präzipitat und Zelldebris auf die äquilibrierten Säulen gegeben, gewaschen und eluiert. Die DNA wurde mit Isopropanol ausgefällt, einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser (50-200 µl) gelöst.

2.10.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

(Vogelstein und Gillispie, 1979)

Die Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgte mit Hilfe von Glasmilch. Entsprechende Kits wurden von Genomed (Bad Oeynhausen) oder Bio 101 (vertrieben über Dianova, Hamburg) bezogen. Diese Methode beruht auf der reversiblen Bindung von Nukleinsäuren an Glaspartikel, abhängig von der Ionenstärke der Lösungsmittel. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht (354 nm) aus dem Agarosegel (TAE-Puffer) geschnitten und in 3 Vol 6 M NaI bei 55°C gelöst. Je nach DNA Menge wurden 5-25 µl einer 1:1 Glasmilch/H₂O Suspension zugegeben und 20 min bei 4°C inkubiert. Die Glaspartikel mit den gebundenen DNA-Fragmenten wurden abzentrifugiert (50 s, 5000 x g), einmal mit 800 µl 6 M NaI und zweimal mit „New-Wash“ (enthält 70 % Ethanol, die genaue Zusammensetzung

ist nicht veröffentlicht) gewaschen. Nach kurzem Abdampfen des restlichen Ethanol an der Luft wurde die DNA zweimal mit 15-50 µl H₂O von der Glasmilch eluiert und 5-10 % des Eluats auf einem Testgel kontrolliert.

2.10.4 Isolierung von Gesamt-RNA

(modifiziert nach Chomczynski und Sacchi, 1987)

RNA wurde mit Hilfe des Tri-Reagent (Sigma, Deisenhofen) Protokolls isoliert. Zum schnellen Zellaufschluß wird hierbei eine Mischung aus Phenol und Guanidinthiocyanat benutzt. Frische oder bei -70°C gelagerte Gewebe wurden in einem Glas/Glas-Potter in 5-10 Vol Tri-Reagent bei Raumtemperatur aufgeschlossen, mit 0,1 Vol 1-Brom-3-chlorpropan gemischt (15 s Vortex) und nach einer Inkubationszeit von 10 min zentrifugiert (15 min, 5000 x g, 4°C). Ab diesem Schritt wurde mit sicher RNase-freien Materialien und Lösungen gearbeitet. Die RNA wurde aus der wäßrigen Phase mit 0,5 Vol (bezogen auf das Tri-Reagent Volumen) Isopropanol gefällt, zentrifugiert (15–30 min, 5000 x g, 4°C), zweimal mit 800 µl 75 %igem Ethanol gewaschen und in H₂O gelöst.

2.10.5 Isolierung von Poly A(+)-RNA

Die Anreicherung von „messenger“-RNA (mRNA) erfolgte mit Hilfe des Oligotex-mRNA-Kits (Fa. Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Gesamt-RNA wurde 1:1 mit 2 x Bindungspuffer gemischt. Diese RNA-Lösung wurde mit 6 µl Oligotexsuspension je 100 µg eingesetzter Gesamt-RNA 3 min bei 65°C und weiter 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Oligotexpartikel wurden abzentrifugiert und zweimal mit einer gelieferten Waschlösung gewaschen. Die Elution der mRNA von den Oligotexpartikeln erfolgte zweimal mit auf 70°C vorgewärmter Elutionslösung.

2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die nach Gelextraktionen erhaltenen Mengen an DNA wurden im Vergleich mit Proben bekannter Konzentration auf Agarosegelen abgeschätzt. Dazu wurden verschiedene Volumina

aus den Elutionslösungen neben einem DNA Standard aufgetragen, der definierte Mengen an DNA/Bande enthielt (Smart-Ladder, Eurogentec, Seraing, Belgien). Die der Größe nach entsprechende Bande wurde mit Hilfe der Ethidiumbromidfärbung mit den eluierten DNAs verglichen. Die DNA Konzentrationen von Midi-Präparationen und von isolierter Gesamt RNA wurde im Spektralphotometer bestimmt (Biophotometer, Eppendorf). Unter Annahme einer OD₂₆₀ von 1 einer dsDNA Lösung von 50 ng/μl (bzw. 40 ng/μl für RNA) wurden die Konzentrationen nach Abzug des Hintergrundes des Lösungsmittels (H₂O) berechnet. Die zusätzlich angegebenen Quotienten OD_{260/280} und OD_{260/230} spiegeln die Protein- bzw. Salzkontamination wieder und sollten > 1,8 bzw. > 2,0 sein.

2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1985)

Die Möglichkeit der *in vitro*-Amplifikation definierter DNA-Fragmente wurde in dieser Arbeit zur Einführung von Schnittstellen in DNA-Fragmente, zur Vervielfältigung von zu klonierenden oder zu transkribierenden DNA-Fragmenten und zur DNA-Sequenzierung eingesetzt. Die Reaktionen wurden in „Thermocyclern“ der Firmen Perkin-Elmer, Überlingen (Thermal Cycler Typ 480) oder MWG-Biotech, München (Typ Primus) durchgeführt. Die Zyklusprofile und besonderen Zusammensetzungen der verschiedenen Anwendungen sind in den jeweiligen Abschnitten des Ergebnisteils angegeben. Soweit nicht anders vermerkt, bestand die Zusammensetzung einer PCR aus 1 x Reaktionspuffer (vom Hersteller der jeweils verwendeten Taq-Polymerase), 10 pmol jeden Primers, 0,2 mM dNTP und ca. 1 pg Plasmid oder 0,5-1 μg genomische DNA als Template. Die Reaktionsansätze, die in 0,5 ml Cups im Perkin-Elmer „Thermocycler“ durchgeführt wurden, mußten mit Mineralöl als Verdunstungsbarriere überschichtet werden, da dieser Gerätetyp nicht über einen beheizten Deckel verfügt. Es wurden Taq-DNA-Polymerasen verschiedener Hersteller eingesetzt. Die Reaktionen wurden immer erst nach Ablauf des ersten Denaturierungsschrittes durch Zugabe der Polymerase gestartet („Hot-Start“). Die besonders hergestellten „Hot-Start“-Polymerasen mancher Hersteller enthalten Modifikationen, die eine Aktivierung des Enzyms erst durch den ersten Denaturierungsschritt verursachen (z.B. Abfall eines aktivitätshemmenden Antikörpers durch Erhitzen, wie bei „Platinum Taq-Polymerase“, Fa. Gibco). Für PCRs, deren Amplifikate nachfolgend kloniert werden sollten, wurden Pwo- (Roche Diagnostics,

Mannheim) oder Pfu-Polymerase (Stratagene, La Jolla) benutzt, deren Fehlerraten aufgrund ihrer „proof-reading“-Aktivität erheblich reduziert ist.

2.13 Enzymatische Modifikation von DNA

2.13.1 Restriktionsspaltungen

Doppelsträngige DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen (RE) verschiedener Hersteller gespalten. In der Regel wurde 2-10 U (1 U spaltet 1 µg λ-DNA in einer Stunde) RE pro µg DNA eingesetzt. Wegen des zur Enzymlösung zugesetzten Glycerols sollte das Volumen an eingesetztem Enzym nicht 1/10 des Reaktionsvolumens überschreiten. Für den simultanen Verdau mit zwei verschiedenen REs wurde ein für beide Enzyme kompatibler Puffer eingesetzt. Die Inkubation erfolgte je nach Herkunft der REs bei den vom Hersteller angegebenen Temperaturen. Falls eine Inaktivierung erforderlich war, wurden hitzesensitive Enzyme für 10 min bei 70°C inaktiviert.

2.13.2 Auffüllreaktion

Durch die Behandlung mit Klenow-Fragment oder Taq-Polymerase mit „proof-reading“-Aktivität wurden 5'-überhängende Enden von DNA-Fragmenten zu stumpfen („blunt ends“) aufgefüllt. Die Reaktionen wurden in Volumina von 20 µl durchgeführt, wobei jeweils ca. 1 µg DNA modifiziert werden konnte. Die genaue Zusammensetzung und die Bedingungen der Reaktion richteten sich nach den Angaben des Herstellers des verwendeten Enzyms. Wegen der hohen Stabilität des Enzyms mußte die so behandelte DNA mit einer Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanolfällung oder über Agarosegelelektrophorese mit anschließender Glasmilchelution aufgereinigt werden.

2.13.3 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Wenn Vektor-DNA nach Restriktionsverdau kompatibel Enden enthielt, wurde die DNA vor der Ligation mit einem Fragment mit alkalischer Phosphatase behandelt, um die 5'-

Phosphatgruppen zu entfernen und eine Religation des Vektors ohne Einbau des gewünschten Fragments zu verhindern. Zur Dephosphorylierung wurde 1 U alkalische Phosphatase aus Kälberdarm pro 10 µg DNA zum abgeschlossenen, letzten Restriktionsverdau gegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der Enzyme wurde die DNA über ein Agarosegel mit anschließender Glasmilchelution aufgereinigt.

2.13.4 Ligation

Die Ligation von Vektor-DNA (geschnitten und dephosphoryliert) mit DNA-Fragmenten wurde in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem der T4-Ligase in 10 µl Ansätzen durchgeführt. In der Regel wurden 0,1-1 µg Vektor-DNA mit einem molaren Überschuß an DNA-Fragmenten ligiert. Die Ligation erfolgte unter Verwendung von 1 U T4-Ligase über Nacht bei 16°C.

2.13.5 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

2.13.5.1 „Random prime“-Markierung

(Feinberg und Vogelstein, 1983)

Für die radioaktive Markierung von Sonden zur Hybridisierung von Dot- und Northern-Blots wurden doppelsträngige DNA-Fragmente (50-150 ng in 46 µl H₂O) für 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zu diesen einzelsträngigen Templates wurden 40 µCi (4 µl) [α^{32} P] dCTP (Amersham) gegeben. Mit diesem Ansatz wurden die an eine Glasmatrix gebundenen Komponenten des „Ready-to-go-DNA-labeling-System“ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) gelöst. Der getrocknete „Ready-to-go“ Reaktionsansatz enthält Oligo(dN)₉-Primer, Reaktionspuffer, Klenow-DNA Polymerase und nichtmarkierte Nukleotide (dATP, dGTP und dTTP). Der 50 µl Ansatz wurde 45 min bei 37°C inkubiert und danach mit Ethanol gefällt. Das die markierten Sonden enthaltende Pellet wurde an der Luft getrocknet, in 200 µl Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.13.5.2 Radioaktive Endmarkierung von „Bandshift“-Fragmenten

Für die „Gel Retardation Assays“ wurden Oligonukleotide in „Sense“- und „Antisense“-Orientierung hergestellt (Fa. Roth, Karlsruhe). Nach der Anlagerung der einzelsträngigen Oligonukleotide erhält man doppelsträngige Fragmente mit überhängenden Enden (Guanin). Für das Anlagern wurden 5 nmol der komplementären Oligonukleotide zusammengegeben und 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Der Ansatz wurde langsam bis auf RT abgekühlt. Das Markieren erfolgte mit Klenow-Polymerase unter Verwendung von [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP. Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um ungebundene Nukleotide zu entfernen. Das Pellet wurde in 100 μl H_2O gelöst. Die Aktivität in 1-5 μl der gelösten Sonde wurde im Szintillationszähler (Canberra/Packard, Dreieich) gemessen. Das ca. 10^5 Zerfallsereignisse/min entsprechende Volumen wurde in einem Polyacrylamidgel auf seine Integrität geprüft, indem eine einzelne Bande auf einem geschwärzten Röntgenfilm nachgewiesen wurde.

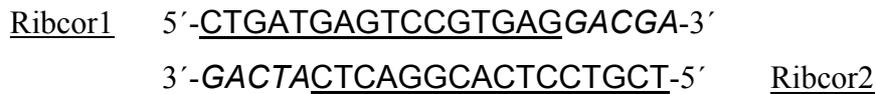
2.14 Ribozyme

Ribozyme sind katalytisch aktive Ribonukleinsäuren. Die wegen ihrer Sekundärstruktur „Hammerhead“ Ribozyme genannten Ribozyme gehören zu den kleinsten Ribozymtypen. Ihr aktives Zentrum besteht aus etwa 22 Basen, die von sog. bindenden Armen flankiert werden, mit deren Hilfe das Ribozym über komplementäre Basenpaarung spezifisch an eine mögliche Schnittstelle der Ziel-RNA gebunden wird.

2.14.1 Herstellung spezifischer „Hammerhead“-DNA-Templates

Das enzymatisch aktive Zentrum („core“) aller verwendeten Ribozymtypen war identisch. Das „core“-Template wurde einmal über die Methode der „Primeramplifikation“ hergestellt. Für alle PCRs zur Herstellung von Ribozymtemplates zur *in vitro*-Transkription bzw. für die Klonierung in Expressionsvektoren wurden Taq-Polymerasen mit „proof-reading“-Aktivität eingesetzt.

Schema der Primeramplifikation (Auffüllreaktion nach Bindung zweier Oligonukleotide):



Die verwendeten Primer sind unterstrichen, amplifizierte Nukleotide kursiv sind dargestellt. Die PCRs zur Primeramplifikation wurden mit 25 Zyklen durchgeführt, der Reaktionsansatz enthielt jeweils 100 pmol der beiden Oligonukleotide:

92°C 1 min	Denaturierung
40°C 5 min	Annealing
60°C 1 min	Elongation

Das Produkt dieser PCR (verdünnt 1;1000, 1 µl eingesetzt) diente dann zur Herstellung der sequenzspezifischen Ribozymtemplates. Die cDNAs von Protamin1 und Protamin3 der Maus wurden mit Hilfe von Programmen zur Sekundärstrukturberechnung von RNA (M-fold, Zuker, et al., 1991) analysiert. Es wurden Primer zur Herstellung von spezifischen Ribozymen entworfen, die Sequenzen 5' und 3' von sterisch nicht behinderten möglichen GUC und AUC Schnittstellen enthalten und gleichzeitig mit dem Ribozym-„Coretemplate“ überlappen (3.1.1). Diese PCRs wurden mit je 10 pmol pro eingesetztem Primer unter folgenden Bedingungen für 35 Zyklen durchgeführt.

95°C 30 s	Denaturierung
45°C 30 s	Annealing
68°C 10 s	Elongation

Die Produkte wurde im 15 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Bandengrößen mit den PCR Produkten des vorhergehenden Schrittes verglichen (Ribozymcore: 21 bp, „Core“ mit bindenden Armen (abhängig von der Position der Schnittstelle): 54-56 bp).

In einem dritten PCR-Schritt wurde den Ribozymtemplates am 5'-Ende eine T7 RNA-Polymerase-Promotorsequenz angehängt. Dieser, für jedes Ribozym bestellte vorwärts gerichtete Primer fügte zudem eine NheI-Schnittstelle in das Konstrukt ein, was die gerichtete Klonierung ermöglichte. Der neu bestellte Primer wurde zusammen mit dem schon vorher benutzten rückwärts gerichteten Primer des jeweiligen Ribozyms eingesetzt. Als PCR-

Template diente 1 µl einer 1:100 Verdünnung der vorhergegangenen PCR-Stufe, die Bedingungen wurden beibehalten, das Produkt wieder in einem Polyacrylamidgel kontrolliert (+ 15 bp).

2.14.2 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription erfolgte von nach PCR generierten Ribozymkonstrukten mit Hilfe des RNA „MEGAscript“ Kits (Fa. Ambion, Austin, USA) gemäß den Anwendungsprotokollen des Herstellers. Es wurden jedoch meist 10 µl Ansätze anstelle der angegebenen 20 µl Reaktionsvolumina verwendet. Die *in vitro*-Transkription der Ribozyme erfolgte meist unter Verwendung des PCR-Templates (2.14.1) über die T7 RNA-Polymerase-Promotorsequenz. Um die Ribozymtranskripte z.B. um eine 3'-UTR zu verlängern, wurden sie in Plasmide eingebracht. Die *in vitro*-Transkription klonierter Ribozyme erfolgte z. T. ebenfalls unter Verwendung des mitklonierten T7-RNA-Polymerase-Promotors aus dem PCR generierten Ribozymtemplate. Die ebenfalls *in vitro*-transkribierten cDNAs von Prm1 und Prm3 wurden in pBluescript (T3 und T7-) oder pCDNA3 (T7- und SP6-RNA-Polymerase-Promotor) kloniert und die *in vitro*-Transkription erfolgte von den vom Vektor vorgegebenen RNA-Polymerase-Promotoren aus. Die Konstrukte wurden je nach Orientierung 5' oder 3' vom Insert geschnitten und gefällt. Bei der Linearisierung müssen Enzyme, die 3'überhängende Enden produzieren, vermieden werden, da diese einen illegitimen Startpunkt für RNA Polymerase darstellen. Die Transkriptionsreaktion wurde mit 1 µg DNA in 25 oder 50 µl Ansätzen durchgeführt. Nicht radioaktive Reaktionen enthielten ATP, CTP, GTP und UTP in gleichen Teilen (je 1 µl 10 mM Lösung). Für die radioaktive Markierung wurde der Anteil des nichtmarkierten UTP auf 1/10 reduziert und 2 µl [³²P]-UTP (800 µCi/mMol; 20 µCi) zugefügt.

Reaktionsansatz: x µl linearisiertes Plasmid oder PCR-Produkt
 5 µl 5 x Transkriptionspuffer
 1 µl RNasin (10 U)
 je 1 µl je NTP (10 mM) oder UTP 1/10
 (2 µl [³²P]-UTP)
 1 µl RNA Polymerase
 H₂O ad 25 µl

Die Transkription erfolgte bei 37°C für 2 h. Anschließend wurde das DNA Template durch Zugabe von RNase freier DNase verdaut (37°C, 20 min) Das *in vitro*-Transkript wurde gefällt und zur Entfernung überschüssiger Nukleotide zweimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen. Die Konzentration nichtradioaktiver Transkripte wurde photometrisch ermittelt und die Aktivität der ³²P-markierten Transkripte im Szintillationszähler (Canberra-Packard, Dreieich) bestimmt. Die entstehende Bande im denaturierenden Polyacrylamidgel wurde entweder durch Anfärben mit Ethidiumbromid oder Auflegen eines Röntgenfilms überprüft.

2.14.3 *In vitro*-Aktivitätstests

Zur Feststellung der Aktivität verschiedener Ribozymkonstrukte *in vitro*, wurden diese mit ihren Ziel-RNAs inkubiert. Spaltprodukte wurden nach dem Auftrennen der Ansätze im Polyacrylamidgel (5 %, 7 M H₂N-CO-NH₂) entweder mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht oder im Falle von radioaktiv markierten Ziel-RNAs mit Hilfe von Röntgenfilmen oder einem Phosphor-Imager System (Molecular Imager® FX, Fa. BIO-RAD, München) ausgewertet. Die *in vitro*-Aktivitätstests wurden mit einem 5-10fachen molaren Überschuß von Ribozym gegenüber der Ziel-RNA durchgeführt und wie folgt pipettiert:

0,2 µg Ziel RNA (markiert ein Volumen von 50-100000 „Counts“)
2 µl 10 x Reaktionspuffer (0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA)
0,1-0,2 µg Ribozym
H₂O ad 17 µl

Die Reaktionsansätze wurden zur Auflösung von Sekundärstrukturen 1 min bei 95°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Die Reaktion konnte dann durch die Zugabe von Magnesium im Überschuß (3 µl MgCl₂, 10 mM) definiert gestartet werden. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 20 µl Formamid-Stopmix. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Ansätze erneut 1 min erhitzt (95°C) und auf Eis abgeschreckt.

2.15 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.15.1 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Testgele zur Kontrolle von Restriktionsverdau, Gele für Restriktionskartierungen oder für Insertisolierungen wurden in „Horizon 11.14“ Gelkammern (Fa. GIBCO BRL) gegossen. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurde 0,5 bis 3 % (w/v) Agarose zugesetzt. Je nach Anwendung wurde 0,5 x TBE- oder 1 x TAE- (für Insertisolierungen) Puffer eingesetzt. Nach dem Lösen der Agarose durch mehrmaliges, kurzes Aufkochen des Ansatzes wurde die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt. Kurz vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte über den Vergleich mit EcoRI/HindIII geschnittener λ DNA als Längenstandards. Die Proben wurden vor dem Einfüllen in die Taschen des Gels mit ca. 20 % Stopmix beschwert.

2.15.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

(nach Sambrock et al., 1989)

Für die Auftrennung von Gesamt-RNA wurden 1%ige Gele verwendet, die in Vertikalkammern (Glasgerätebau Ochs, Lenglern) gegossen wurden. Da RNA einzelsträngig ist und Sekundärstrukturen ausbilden kann, die das Verhalten der RNA in der Elektrophorese beeinflussen, wurde die Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, die durch Zugabe von Formaldehyd eingestellt wurden. Nach dem Gießen eines Gelsockels, der 2 % (w/v) Agarose in 1 x E-Puffer enthielt, wurde das eigentliche RNA-Gel vorbereitet:

RNA-Gele:	1,25 g	Agarose
	87,5 ml	H ₂ O
	12,5 ml	10 x E-Puffer

Nach dem vollständigen Lösen der Agarose durch mehrmaliges kurzes Aufkochen der Agarose wurden unter dem Abzug 25 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung zugegeben und das Gel auf den bereits festen Sockel gegossen.

Die RNA Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit je

3 μ l 10 x E-Puffer

4 μ l Formaldehyd (37 %)

30 μ l Formamid

versetzt, 10 min bei 75°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden mit 0,2 Vol Stopmix (enthielt 200 ng Ethidiumbromid) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 4°C und 50 bis 90 V durchgeführt. Während des Gellaufs (ca. 3-4 h) wurden die Puffer der inneren (Kathode) und äußeren Kammer (Anode) vermischt, um den Aufbau von pH- und Salzgradienten zu verhindern und einen gleichmäßigen Spannungsabfall über die Gelstrecke zu gewährleisten.

2.15.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde zur Auftrennung und Identifikation kleiner DNA-Fragmente und PCR-Produkte (< 500 Bp) sowie zur Darstellung von *in vitro*-Transkripten und zur Analyse von Protein/DNA-Komplexen verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren bzw. Komplexe wurden 4–10 %ige Gele, ausgehend von einer 40 %igen Polyacrylamid Stammlösung (38 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid) mit 1 x TBE als Laufpuffer hergestellt. Zur Auftrennung von RNA wurde die Gellösung auf 7 M Harnstoff gebracht, die Gele zur Analyse von Protein/DNA-Komplexen enthielten 5 % Glycerol. Die Komponenten der entsprechenden Gele wurden gemischt (Harnstoff enthaltende Gele wurden vor der Polymerisierung filtriert). Zum Start der Polymerisation wurden 10 %iges APS (0,1 % des Endvolumens) und TEMED (0,1 % des Endvolumens) zugegeben und die Lösung durch Schwenken gemischt. Das Gel wurde sofort zwischen zwei Glasplatten einer vorbereiteten Gelapparatur (Fa. PHASE, Lübeck) gegossen.

2.16 Transfertechniken von Nukleinsäuren

2.16.1 Dot-Blotting

2.16.1.1 Dot-Blot zum Nachweis eines Transgens

Zur Analyse transgener Tiere wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze isoliert und punktförmig auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde eine mit 2 x SSC angefeuchtete Nitrozellulosemembran in eine Vakuum-Kammer (Minifold, Schleicher & Schüll, Dassel) eingesetzt und zur Äquilibration 100 µl 20 x SSC über das angelegte Vakuum durch die einzelnen Öffnungen gesogen. 2-10 µg der zu analysierenden DNA wurden mit H₂O auf ein Volumen von 30 µl gebracht, 10 min bei 95°C denaturiert und durch Zugabe von 150 µl eiskaltem 20 x SSC schockgekühlt. Die DNA-Lösungen wurden in die Öffnungen der Vakuum-Kammer pipettiert und durch die Membran gesogen, auf der die DNA haften blieb. Nach dem Nachspülen der Kammer mit weiteren 100 µl 20 x SSC wurde der Blot entnommen, in 2 x SSC gespült und die DNA durch „Crosslinking“ der feuchten Membran (Stratalinker™ 1800 mit 120 mJ, Fa. Stratagene) oder Backen der luftgetrockneten Membran (2 h, 80°C) fixiert. Beide Methoden sollen eine irreversible Bindung der Nukleinsäuren an die Nitrocellulose-Membran gewährleisten.

2.16.1.2 Dot-Blot zur Abschätzung der Anzahl inserierter Kopien

Die Abschätzung der Anzahl der in das Mausgenom inserierten Fragmente erfolgte über den Vergleich von Signalstärken von DNA transgener Tiere zu den Signalen aufgetragener Plasmid-DNA der Injektionsfragmente. Dazu wurde die Plasmid-DNA unter Zugabe von 10 µg Wildtyp-Träger-DNA in unterschiedlichen Mengen, etwa einer aufsteigenden Reihe von 10-400 pg über den Dot-Blot auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht und das nach der Hybridisierung resultierende Signal mit geblotteter DNA von transgenen Mäusen verglichen. Für ein beispielhaft angenommenes, in das Mausgenom (3000 Mb) inseriertes 3 kb-Fragment entsprach ein Signal aus 10 µg DNA eines transgenen Tieres bei einer integrierten Kopie also dem Signal von 10 pg Plasmid.

2.16.2 Northern-Blotting

Nach der Auftrennung von RNA wurden die denaturierenden Agarosegele unter UV-Licht photographiert (Videodokumentation, Fa. Intas, Göttingen) und anschließend sofort einem Kapillarblot zur Übertragung der RNA auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C, Amersham) unterzogen. Das Gel wurde mit Plastikfolie umgrenzt auf ein Filterpapier (Typ GB003, Schleicher & Schüll, Dassel) gelegt, dessen Enden in 20 x SSC eintauchten. Ein Flüssigkeitstransfer war so nur durch das Gel möglich. Eine der Gelgröße entsprechende Nitrocellulosemembran wurde mit 2 x SSC angefeuchtet und luftblasenfrei auf dem Gel ausgebreitet. Darüber wurden zwei Stück Filterpapier und mehrere Lagen Handtuchpapier zur Flüssigkeitsaufnahme ausgebreitet. Zur Verstärkung des Flüssigkeitstransfers wurde der Aufbau beschwert. Während der Transferzeit von 10-20 h wird die DNA durch die diffundierende konzentrierte Salzlösung aus dem Gel auf die Unterseite der Membran übertragen. Nach dem Transfer wurden die Membranen zum Entfernen möglicher Gel- und Salzreste kurz in zweimal SSC gewaschen und feucht unter UV-Licht (120 mJ, UV Stratalinker™ 1800, Fa. Stratagene) oder nach dem Trocknen für 2 h bei 80°C durch „Backen“ fixiert.

2.17 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die Nitrocellulosefilter wurden in 2 x SSC äquilibriert und mit der nicht beladenen Fläche luftblasenfrei an die Wandung des mit 2 x SSC gefüllten Hybridisierungsröhrchens gedrückt. Der Puffer wurde durch 15 ml Hybridisierungslösung (Yang et al., 1993) ersetzt, die 150 µl denaturierte Lachspemien-DNA (10 mg/ml, 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt und auf Eis abgekühlt) enthielt. Die Prähybridisierung erfolgte zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 1-4 h bei 65°C im Rollofen (Bachhofer, Reutlingen). Zur spezifischen Hybridisierung wurde dann die Sonde mit weiteren 150 µl Lachsspermien-DNA wie oben beschrieben denaturiert und nach dem schnellen Abkühlen direkt in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. unter denselben Bedingungen wie die Prähybridisierung.

Zur weiteren Behandlung der Membranen wurde die Hybridisierungslösung mit Sonde abgegossen (gegebenenfalls zur erneuten Verwendung verwahrt) und die Filter je nach gewünschter Stringenz in den Hybridisierungsröhrchen mehrfach mit jeweils 100 ml

Waschlösung (0,2 x SSC mit 0,1 % SDS) unter den Bedingungen der Hybridisierung im Rollerofen solange gewaschen, bis keine deutlich Abnahme der Radioaktivität mehr zu messen war. Die getrockneten Membranen wurden in Folie eingeschweißt und zur Auswertung mit einem Röntgenfilm bei -70°C (Autoradiographiekassette mit Verstärkermembran) oder mit einer Phospho-Imagermembran (Kodak, Rochester, NY) bei RT exponiert.

2.18 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und zur Expression von cDNAs wurden diese in verschiedene Plasmidvektoren eingebaut und in kompetente Bakterien oder in Hefen transformiert.

2.18.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

(Dagert und Ehrlich, 1979)

Einzelkolonien der verschiedenen *E. coli* Stämme wurden in 50 ml LB-Medium über Nacht zu einer Vorkultur angezogen. Mit 5 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 kultiviert, dann bei 4°C 10 min mit 1500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet in 4 ml eiskaltem TFB-2-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden in 150 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.18.2 Transformation kompetenter Bakterien

(Hanahan, 1983)

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien wurden diese langsam auf Eis aufgetaut. Der Ligationsansatz oder 50 ng Plasmid-DNA wurden mit 15 µl kompetenten Zellen 20 bis 60 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 60-90 s auf 42°C erwärmt und wieder auf Eis abgekühlt, in 800 µl LB-Medium aufgespült und bei 37°C inkubiert. Nach

1 h wurden 50-200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die der Resistenz des transformierten Plasmids entsprechende selektive Agenzien enthielten. Einzelkolonien zeigten sich nach einer Bebrütung ü.N. bei 37°C.

2.19 Sequenzanalyse

(modifiziert nach Sanger et al., 1977)

Die nichtradioaktiv durchgeführten Sequenzreaktionen wurden nach einem modifizierten Kettenabbruchverfahren durchgeführt. Die Sequenzabbruchreaktion wurde als nicht-radioaktive PCR („Dye Terminator“ Technik) mit Systemen von ABI oder Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Dabei wird die doppelsträngige DNA denaturiert und ein Einzelstrang nach Anlagerung eines sequenzspezifischen Primers aufgefüllt, wobei die limitierte Zugabe von ddNTPs zu Synthesestops führt. Über die verschiedenfarbige Markierung der vier Didesoxynukleotide können diese nach Anregung mit einem Argonlaser an ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz erkannt und über die Lauflänge im Sequenzgel ihrer Position in der zu sequenzierenden DNA-Probe zugeordnet werden. Neben den markierten ddNTPs enthält der „Dye Terminator“ Mix dNTPs, Reaktionspuffer sowie Ampli-Taq-DNA-Polymerase. Vor der Sequenz-PCR wurden 10 pmol Primer und doppelsträngige Plasmid-DNA oder ein über PCR amplifiziertes DNA-Fragment zugegeben und der Reaktionsansatz auf 11 µl aufgefüllt. Einer Faustregel folgend wurde die Menge zu sequenzierender DNA in ng eingesetzt, die man nach der Division der Anzahl der bp der DNA durch 5 erhält, also z.B. 400 ng eines 2 kB Fragmentes. In einer Reaktion von 11 µl wurden 3-4 µl Dye-Terminator-Mix eingesetzt. Die PCR durchlief standardmäßig 25 Zyklen mit 98°C/30s Denaturierung, 50°C/15s „Annealing“ und 60°C/4 min „Elongation“. Nach der PCR wurde der Ansatz auf ein Vol von 100 µl gebracht und die DNA mit 15 µl 2 M NH₄Ac (pH 4,5) und 450 µl Ethanol gefällt. Der Gellauf zur Auswertung der Sequenzierung erfolgte in automatischen Sequenzern des Typs ABI PRISM 377 DNA-Sequencer (Perkin Elmer). Die Sequenzgele enthielten 6,8 % Polyacrylamid und wurden mit Puffern (TBE) und Lösungen speziell für die Fluoreszenz-Sequenzelektrophorese (Fa. Roth, Karlsruhe) angesetzt. Die DNA Pellets der Sequenzreaktion wurden in 4 µl Formamid/EDTA (0,5 M EDTA, pH 8,0, 1:5 in Formamid) aufgenommen, aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf Eis auf das Gel aufgetragen, welches schon ohne Proben 1h bei 1400 V im Vorlauf war. Nach dem Auftrag der Proben dauerte der Gellauf 14 h

bei 1400 V. Die Auswertung der durch die Anregung erhaltenen Signale erfolgte weitgehend automatisch.

2.20 Isolierung von Proteinen

2.20.1 Gesamtproteinisolierung aus Zellkulturen und Geweben

Gesamtprotein aus Zellkulturen und Geweben wurde zum immunologischen Nachweis nach SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Transfer der Proteine auf Nitrocellulose und zur Verwendung in Reporter-Gen-Assays isoliert. Der Nachweis der Aktivität des Reporterenzym Luciferase bestimmte die Methode der Isolierung und wurde für alle vergleichbaren Gesamtproteinisolierungen beibehalten. Die verschiedenen, zu Transfektionsexperimenten verwendeten adhären Zellen wurden 24-48 h nach der Transfektion einmal mit Ca/Mg-freiem PBS gewaschen, das PBS sorgfältig entfernt und die Zellen je nach Größe der Kulturschale und der zu erwartenden Reporter-Genaktivität mit Extraktionspuffer überschichtet. Für die so durchgeführte Lyse der Zellen in den Kulturschalen wurden z.B. 75-150 µl je Schale einer 12-Well Platte (Costar®, Fa. Corning, New York) oder bis zu 1 ml für eine 100 mm Kulturschale verwendet. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Zellextrakte in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, Zelltrümmer durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 12000 x g, 4°C) und ein Aliquot des Überstandes im entsprechenden Test auf Luciferase- oder β-Galactosidaseaktivität gemessen.

Zur Ermittlung der Luciferaseaktivität in Geweben transgener Mäuse wurden die einzelnen Gewebe bzw. Gewebeteile nach der Entnahme einmal in PBS gewaschen und in einem Glas/Glas-Potter in 1 ml Extraktionspuffer homogenisiert. Nach der Überführung der Extrakte in 1,5 ml Reaktionsgefäße wurde der Aufschluß durch drei Einfrier/Auftau-Zyklen (1 min N_{2(l)}, 5 min 37°C) vervollständigt. Aliquots der Extrakte wurden nach der Zentrifugation (12000 x g, 20 min, 4°C) dem Überstand entnommen und die Luciferaseaktivität im Luminometer bestimmt. Die Proteinbestimmung der Überstände erfolgte nach der Methode von Bradford. Zellextrakte konnten zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert werden.

2.20.2 Extraktion von Kernproteinen aus Geweben.

(Deryckere und Gannon, 1994, modifiziert)

Frisch präparierte Organe (0,1–0,2 g) wurde auf Eis in PBS gewaschen, in 2 ml Kernproteinpuffer A aufgenommen und mit einem Glas/Glas-Potter homogenisiert. Nach der Überführung in 10 ml Zentrifugationsröhrchen wurden größere Zellbestandteile durch vorsichtige Zentrifugation (50 s, 800 x g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde 10 min (4000 x g, 4°C) zentrifugiert und die pelletierten Zellkerne in 100 - 300 µl Kernproteinpuffer B resuspendiert. Die osmotische Lyse der Kerne erfolgte während einer 20 minütigen Inkubation auf Eis (mehrmaliges Aufschütteln). Die Ansätze wurden in 1,2 ml Reaktionsgefäße überführt und hochmolekulare Bestandteile (inkl. DNA) durch kurzzeitige Zentrifugation (5 min, 7000 x g) sedimentiert. Der die Kernproteine enthaltende Überstand wurde bei -70°C gelagert oder bis zur Verwendung innerhalb einiger Tage auf Eis aufbewahrt.

2.20.3 Isolierung von Kernproteinen aus kultivierten Zellen

Die zur Isolierung von Kernproteinen verwendeten, adhären wachsenden NIH/3T3-Zellen wurden vor der Proteinextraktion trypsinisiert und in NE-Puffer aufgenommen oder nach zweimaligem Waschen mit PBS noch in der Kulturschale mit NE-Puffer (1 ml NE-Puffer /100 mm Kulturschale) überschichtet, mit einem Schaber abgekratzt und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zum Aufbrechen der Zellwände 10 x durch eine 25 gauge Kanüle aufgezogen. Die Kerne wurden anschließend in einem kurzen Zentrifugationsschritt (30 s, 10000 x g, 4°C) von den Zellresten getrennt, die pelletierten Kerne in 100 µl NESG-Puffer resuspendiert. Der Aufschluß der Kerne erfolgte dann während einer 30 minütigen Inkubation auf Eis, wobei die Proben häufig aufgeschüttelt wurden. Die Kernproteine blieben nach der folgenden Zentrifugation (20 min, 20000 x g, 4°C) im Überstand und wurden bei -70°C gelagert oder bis zur Verwendung innerhalb einiger Tage auf Eis aufbewahrt.

2.21 Proteinanalysen

2.21.1 SDS-PAGE

Proteine werden in Anwesenheit von reduzierenden Agenzien (DTT und β -Mercaptoethanol) und SDS aufgekocht, wobei die natürlichen Ladungen der Probe durch die negativen Ladungen des SDS maskiert werden und so eine Auftrennung der nun gleich geladenen Proteine nach ihrer Größe gewährleistet wird. Die große Trennleistung der Diskelektrophorese wird über Diskontinuitäten im pH-Wert und in der Porengröße erreicht, die aus der Kombination eines großporigen Sammelgels (3 % Polyacrylamid) zur Konzentrierung der Probe auf eine schmale Startzone und eines feinporigen Trenngels (10-12 % Polyacrylamid) resultieren. Es wurden diskontinuierliche Gele in PHASE-Minigelkammern mit Trennlängen von ca. 70 mm gegossen oder vorgefertigte Gele des NuPAGE™ Elektrophorese Systems (Fa. NOVEX, San Diego) benutzt. In der Regel wurden Trenngele mit 10 % Polyacrylamid (29:1) gegossen (1x Trenngelpuffer, 0,1 % APS und 0,1 % TEMED zur Polymerisierung). Um bei selbst gegossenen Gelen eine glatte Oberfläche des Trenngels zu erhalten, wurde diese direkt nach dem Gießen mit Butanol überschichtet. Das Butanol wurde nach dem vollständigen Polymerisieren des Trenngels mit Wasser abgespült, danach das 4 %ige Sammelgel gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit 0,5-1 Vol Probenpuffer versetzt, 10 min bei 75°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 – 100 V und zwar solange bis der mitlaufende gefärbte Proteinstandard (SeeBlue™Plus2, NOVEX) eine genügende Auftrennung der Proben wahrscheinlich machte.

2.21.2 Coomassie-Färbung

(Weber und Osborn, 1969, modifiziert)

SDS-PAGE Gele wurden zwecks Proteinfärbung 1-3 h in Coomassie Brilliant Blau Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurden die Gele bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung geschwenkt. Dabei wurde der Entfärber mehrfach gewechselt. Benutzter Entfärber wurde über Aktivkohle regeneriert. Die zur An- und Entfärbung benötigte Zeit konnte, wenn nötig durch Erwärmen auf 45°C auf die Hälfte

reduziert werden. Zur Lagerung wurden die gefärbten Gele in Folie eingeschweißt, bei 4°C oder auf einem Filterpapier getrocknet bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.21.3 Acetonfällung von Proteinen

Proteinproben konnten, wenn nötig, über Acetonfällung aufkonzentriert werden. Hierzu wurden 4 Vol Aceton (vorgekühlt auf -20°C) zugegeben. Nach 1 h bei -20°C wurden die ausgefallenen Proteine 30 min bei 10.000 x g zentrifugiert, die erhaltenen Pellets einmal mit 80 %igem Aceton (enthält 20 % H₂O) gewaschen.

2.21.4 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyseschläuche (Fa. Serva) wurden vor dem Gebrauch in folgenden Lösungen ausgekocht:

Na₂CO₃ (2 %, w/v)

H₂O dest.

EDTA (2 mM)

H₂O dest.

Anschließend wurden die Schläuche autoklaviert und bei 4°C in H₂O aufbewahrt. Die Dialyse erfolgte unter Rühren bei 4°C gegen ein 1000faches Puffervolumen für ca. 12 h.

2.21.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

(Bradford, 1976)

Coomassie Brilliant Blau G250 wird durch Bindung an Protein vom kationischen in den anionischen Zustand überführt und absorbiert in diesem Zustand Licht mit einer Wellenlänge von 595 nm (der kationische Zustand absorbiert bei 470 nm). Coomassie Brilliant Blau G250 bindet hauptsächlich an basische Aminosäuren (Chial und Splittgerber, 1993), die Absorptionmessungen wurden immer auf eine Eichgerade mit BSA (BSA gelöst in H₂O: 0; 10; 20; –; 100 µg/ml) bezogen. Das vorgefertigte Bradford-Reagenz (Roti[®]-Quant, Fa. Roth)

enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 unter Zusatz von Ethanol und H_3PO_4 gelöst in H_2O . Für die Verwendung in Mikrotiterplatten wurden wie vom Hersteller angegeben 2 Vol des Reagenz mit 5,5 Vol H_2O verdünnt. Pro Messung wurden dann 200 μ l verdünntes Reagenz zu 50 μ l der vorgelegten Standards und verdünnten Proben gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die OD_{595} in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Microplate Reader 450, Biorad Laboratories, München) gemessen. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Auswertung wurde die OD_{595} für jede Probe gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen. Bei der Messung von Proben, die mit Hilfe von Glycerin, Triton X 100 oder SDS enthaltenden Lysispuffern erhalten wurden, mußte beachtet werden, das diese Reagenzien ab einer bestimmten Konzentration das Anfärbeverhalten von Coomassie Blau beeinflussen (siehe Produktprotokoll).

2.22 Expression von rekombinantem Protein in *S. cerevisiae*

Als Expressionsvektor wurde YGEX benutzt, ein Vektor, der das Glutathion S-Transferase (GST) Fusionssystem zur Expression und Aufreinigung eines Fusionsproteins in *E.coli* (pGEX, Fa. Stratagene) auf Hefe überträgt. Dem ursprünglichen Vektor wurden ein Hefe-Replikationsstartpunkt zur Überexpression, ein Galactose induzierbarer Hefepromotor und ein Selektionsmarker (URA3) hinzugefügt. Die Defizienzen des verwendeten Hefestamms S228 wurden bis auf den Selektionsmarker des Expressionsvektors aufgefüllt, zudem wurde eine Galactose-Permease (GAL2) in den Hefestamm gebracht, der nach diesen Veränderungen mit RH2191 bezeichnet wird.

2.22.1 Klonierung eines Hefe Expressionskonstruktes

Die zu exprimierende cDNA wurde unter Verwendung einer Polymerase mit „proof reading „ Aktivität mittels PCR so amplifiziert, daß anstelle des ATGs eine BamHI-Schnittstelle eingeführt wurde, und sich das Fragment unter Beibehaltung des Vektorleserahmens in die BamHI-Schnittstelle 3' des GST ORF von pYGEX einklonieren ließ. Das Konstrukt wurde zunächst in *E. coli* kloniert, zur Kontrolle sequenziert und anschließend im Hefestamm RH2191 zur Expression gebracht.

2.22.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

(Ito et al., 1983 modifiziert)

Einzelkolonien der verschiedenen Hefestämme wurden in einer 10 ml YEPD-Kultur über Nacht bei 30°C zu einer Vorkultur angezogen. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden 10 ml frisches, auf 30°C vorgewärmtes YEPD-Medium angeimpft und 5-6 h inkubiert. Die Zellen wurden für 2 min bei 1000 x g abzentrifugiert und zweimal in 10 ml LiAc x TE gewaschen (Resuspension des Pellets und Zentrifugation mit 1000 x g für 2 min). Danach wurde das Pellet in 400 µl LiAc x TE aufgenommen und die Zellen transformiert.

2.22.3 Transformation von Hefen

(Ito et al., 1983 modifiziert)

Zur Transformation wurde 10 µg Konstrukt (zur Integration ins Genom - etwa bei der Auffüllung von Defizienzen - linearisierte DNA-Fragmente) und dieselbe Menge Lachs-Spermien-DNA als Träger in einem Vol von 20 µl 10 min bei 65°C inkubiert und zu 200 µl der kompetenten Hefezellen (2.22.2) gegeben. Danach wurden 800 µl einer Lösung aus 50 % (w/v) PEG 4000 in LiAc x TE zugegeben und der Ansatz kurz gemischt (Vortex, 5 s). Der Transformationsansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Durchführen eines Hitzeschocks (20 min bei 42°C) wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 1000 x g), das Pellet in 100-300 µl YEPD-Medium aufgenommen und 30-60 min bei 30°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde später auf Selektionsagarplatten ausplattiert, Kolonien transformierter Zellen wurden nach 2-3 Tagen sichtbar.

2.22.4 Induktion der Proteinexpression und Aufschluß der Hefezellen

Der den Expressionsvektor enthaltende Hefestamm wurde zunächst aus dem Glycerolstock heraus auf eine selektive Agarplatte (Minimalmedium: SC) ausgestrichen. Nach dem Anwachsen der Hefen (2-3 d) wurde Zellmaterial zum Animpfen einer Vorkultur (200 ml) abgenommen und diese ü.N. kultiviert. Die Hauptkulturen (2 l) zur präparativen Isolierung des Fusionsproteins wurden mit 10 % ihres Volumens aus der Vorkultur angeimpft und ebenfalls ü.N. kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Hefen abzentrifugiert (1000 x g,

1 min) und die Zellpellets mit PBS gewaschen, um Glucosereste des verwendeten SC-Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und wieder in derselben Menge SC-Medium aufgenommen, die jetzt 2 % (w/v) Galactose als einzige C-Quelle enthielt. Die Induktion durch Galactose erfolgte mindestens 8h, konnte aber auch ü.N. durchgeführt werden.

Nach der Induktion der Expression des Fusionsproteins wurden die Kulturen abzentrifugiert (1000 x g, 15 min, 4°C) und einmal in PBS gewaschen. Die Pellets wurden in 20 ml PBS (enthielt 10 % (v/v) Glycerol, 100 µl Hefe-Protease Inhibitor) sowie 10 ml Glasperlen (Ø 0,5 mm) aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Schütteln für 15 min bei 4°C. Danach konnte eine Verbesserung der Lyse durch die Zugabe von 1,5 % Sarkosyl und 2 % Triton X-100 und erneutem kurzem Schütteln (2 min) erreicht werden. Die Zugabe der Tenside zu Anfang des Aufschlusses ist nicht von Vorteil, da durch die entstehende Schaumbildung das Zerschlagen der Zellen durch die Glasperlen behindert wird. Die Glasperlen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (2000 x g, 15 min, 4°C) von den freigesetzten Proteinen getrennt.

2.22.5 Aufreinigung von rekombinantem Protein

Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgte über die Bindung des GST-Anteils an Sepharose gekoppeltes Glutathion, das Substrat der Glutathion S-Transferase. Die verwendete Glutathion Sepharose 4B wurde zur Konservierung in 20 % Ethanol geliefert und mußte vor der Verwendung mit PBS äquilibriert werden. Nach den Angaben des Herstellers bindet 1 ml eines 50 %igen Gemisches der äquilibrierten Sepharose 5 mg GST. Um 1 ml des Gemisches zu erhalten wurden, 1,33 ml der Ethanol enthaltenden Sepharose vorsichtig abzentrifugiert (500 x g, 5 min), der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in 10 ml kaltem PBS (4°C) resuspendiert, die Sepharose erneut abzentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Die äquilibrierte Glutathion Sepharose (1 ml, 50 % (w/v) Sepharose) wurde zu dem aus 2 l Hefekultur erhaltenen Proteinaufschluß gegeben. Die Bindung des GST-Anteils des Fusionsproteins an die Glutathionreste der Agarose erfolgte innerhalb von 30-45 min wobei die Lösung in langsamer Bewegung gehalten wurde. Nach der Bindungsreaktion wurde die Sepharose abzentrifugiert (500 x g, 5 min, 4°C) und der Überstand abgetrennt. Zur Entfernung nichtgebundener Proteine aus dem Sepharosepellet wurde dieses 5-10 x mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 1 ml

Elutionspuffer vorsichtig aufgeschwemmt und 10 min bei RT inkubiert. Zur Sedimentation der Sepharosematrix wurde erneut zentrifugiert (500 x g, 5 min, RT). Die Elution der Matrix erfolgte dreimal in 1 ml Lösung reduziertem Glutathion. Die Elutionsfraktionen wurden jeweils mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt getestet.

2.22.6 Herstellung polyklonaler Antiseren

Zur Herstellung polyklonaler Antiseren durch die Fa. Eurogentec (Seraing, Belgien) wurden zwei unter keimreduzierten Bedingungen gehaltene Kaninchen verwendet. Vor der Erstimmunisierung wurde den Tieren 2 ml Präimmunserum abgenommen. Zur Erstimmunisierung wurden jeweils 0,5 ml der das Fusionsprotein mit ca. 0,25 mg/ml enthaltenen Lösungen mit dem gleichen Volumen „Freund's Adjuvans Complete“ emulgiert und den Kaninchen an verschiedenen Stellen unter die Haut gespritzt. Weitere Injektionen von 0,5 ml, versetzt mit 0,5 ml „Freund's Adjuvans Incomplete“, erfolgten nach 14, 28 und 56 Tagen. Zur Gewinnung von Serum wurde den Tieren während und nach den Immunisierungen standardmäßig zweimal (nach 38 Tagen 2 ml und nach 66 Tagen 22 ml) Blut entnommen. Das durch Gerinnung (1 h bei RT und ü.N. bei 4°C) und Zentrifugation (10 min, 23000 x g) vom Blutkuchen abgetrennte Serum wurde mit dem Western-Blot Verfahren auf das Vorhandensein der gesuchten Antikörper getestet. Das schwächer reagierende Tier wurde standardmäßig nach 80 Tagen narkotisiert ausgeblutet. Das stärker reagierende Tier wurde noch ein weiteres Mal „geboostert“ und nach insgesamt 100 Tagen ausgeblutet.

2.23 Immunoblots

2.23.1 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose

Nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine ebenfalls über ein elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond C) transferiert. Für diesen sog. „Western-Blot“ wurde entweder die Methode des „Tank-“ (Bio-Rad, München) oder des „Semi-Dry-Blots“ (Fast Blot, Fa. Biometra, Göttingen) verwendet. Für beide Transferarten wurde ein sog. „Immunoblot-Sandwich“ vorbereitet, dessen Größe von der Gelgröße abhing

und in dem das PA-Gel luftblasenfrei Kontakt zur Nitrozellulose hatte. Im Falle des Tank-Blots wurden zwei in Towbien-Puffer getränkte Filterpapiere (GB 003, Fa. Schleicher & Schüll, Dassel), im Falle des Semi-Dry-Blot je drei Filterpapiere in Semi-Dry-Puffer getränkt und auf beide Seiten des Sandwichs gelegt. Das fertige Sandwich wurde dann entweder in die Tank-Transfer-Kassette eingebaut und in die mit Towbien-Puffer gefüllte Tank-Blot Apparatur eingehängt oder zwischen die Elektroden des Semi-Dry Blotters gelegt. Bedingt durch die gebundenen negativen Ladungen des SDS werden die Proteine in Richtung der Anode transferiert. Der Transfer im Tank-System erfolgte meist ü.N. bei 4°C und eingestellten 10-15 V. Der Semi-Dry-Transfer erfolgte bei RT für ca. 1 h. mit voreingestellten 5 mA/cm², wobei auch bei Ansteigen der Spannung während des Transfers die Leistungsaufnahme des Gerätes nicht über 10 W steigen durfte.

2.23.2 Transferkontrolle mit Ponceau Rot

Die reversible Anfärbung von Proteinen mit Ponceau-Rot erlaubt eine qualitative Abschätzung der Transfereffizienz ohne eine Beeinflussung später erfolgreicher Immunodetektion. Ponceau S bildet ein komplettes Profil der transferierten Proteine mit einem Detektionslimit von 1-2 µg ab. Der wenige Minuten gefärbte Blot wurde in Wasser bis zur Sichtbarwerdung der Proteinbanden entfärbt, das Bandenmuster ggfs. dokumentiert. In den folgenden Inkubationsschritten mit PBS oder TBS wurde die Färbung der Membran vollständig entfernt.

2.23.3 Immunodetektion

Unspezifische Bindungsstellen von Antikörpern an die Membran wurden durch Inkubation der Filter (ü.N. bei 4°C oder 1 h bei RT) in Block-Puffer (TBS oder PBS mit 10 % FKS (v/v)) abgesättigt. Danach wurden die Filter einmal im verwendeten Puffersystem (TBS oder PBS) gewaschen und mit dem primären Antikörper inkubiert (ü.N. bei 4°C oder 1-2 h bei RT). Der Antikörperansatz enthielt 5 % (w/v) FKS, die Verdünnung des Antikörpers oder Antiserums richtete sich nach seiner Konzentration und der Konzentration des zu detektierenden Proteins. Ungebundene Antikörper wurden nach der Inkubation durch Waschen (3 x 10 min mit 0,05 % (v/v) Tween-20, einmal nur mit Puffer) entfernt. Die Membran wurde nun für 1 h mit

dem entsprechenden mit Alkalischer Phosphatase konjugierten sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus oder Ziege-anti-Kaninchen; 1:15000 verdünnt) inkubiert. Nach erneutem Abwaschen ungebundener Antikörper wurde die Membran 5 min im Reaktionspuffer der Alkalischen Phosphatase (AP-Puffer) äquilibriert. Die Färbereaktion, bei der an Stellen gebundener Alkalischer Phosphatase wasserunlösliche violette Kristalle ausfallen, wurde durch AP-Puffer gestartet, der 66 µl NBT und 33 µl BCIP in 5 ml Vol enthielt. Die Färbereaktion wurde abgedunkelt gehalten, fortwährend kontrolliert und konnte durch Waschen der Filter in Wasser abgestoppt werden.

2.24 Quantitativer Nachweis von Reporter Enzymen

Der quantitative Nachweis der Aktivität der Reporterenzyme Luciferase und β -Galactosidase erfolgte über die Messung von Lichtemissionsreaktionen in RLUs („relative light units“) in einem Luminometer (Typ LB 953, Fa. Berthold, Bad Wildbad). Das rekombinante Gen des Enzyms Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (de Wet et al., 1987) wird als Reportergen verwendet (Halbwertszeit in transfektierten Zellen ca. 3 h, Thompson et al., 1993), da die auf die Oxidation des Käfer-Luciferins zurückzuführende Biolumineszenzreaktion gut nachgewiesen werden kann. Nach der automatischen Injektion des Substrats durch das Luminometer startet die lichtemittierende Reaktion in <1 s und ist bei einer Zugabe des Substrats im Überschuß über einen bestimmten Zeitraum proportional zur Luciferaseaktivität der Probe, was eine indirekte Bestimmung der Transkription des Reportergens erlaubt. In der ATP- und Mg^{2+} -abhängigen Reaktion wird zunächst eine Acyl-AMP Zwischenstufe gebildet, die in Gegenwart von Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert wird. Angeregtes Oxyluciferin fällt nachfolgend in den Grundzustand zurück, wobei ein Photon emittiert wird. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde ein β -Galaktosidase exprimierender Vektor im Verhältnis 1:10 bis 1:20 zu dem zu testenden Konstrukt kotransfiziert. Durch die Verwendung von Chemilumineszenzsubstraten ist die Aktivitätsmessung im Luminometer möglich, was den linearen Bereich der Detektion erhöht und die Sensitivität gegenüber dem calorimetrischem Ansatz um den Faktor 5×10^5 steigert (Bronstein et al., 1994).

2.24.1 Luciferase-„Assay“

(Ausubel et al., 1992)

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 200 µl des Luciferase-Reaktionspuffers in Meßröhrchen (Fa. Sarstedt, Nürnbrecht) vorgelegt und 25-50 µl Zell- bzw. Gewebeextrakt zugegeben. Zum Starten der Lichtreaktion wurden 100 µl der Luciferin-Injektionslösung durch einen Injektor des Luminometers eingespritzt und die nachfolgende Lichtemission nach Verstreichen einer Vorlaufzeit von 20 s über weitere 20 s integriert.

2.24.2 β -Galactosidase- „Assay“

(Jain und Magrath, 1991)

Die Chemilumineszenzmessung der β -Galactosidaseaktivität erfolgte unter Verwendung desselben Zellextrakts wie zur Luciferasebestimmung (Fulton und Van Ness, 1993) mit dem „Galacto-Light™-Kit“ (Fa. Tropix, Bedford, USA). Das als Stocklösung vorliegende chemilumineszente Substrat Galacton wurde 1:100 mit dem gelieferten Reaktionspuffer verdünnt und 70 µl in die Messröhrchen des Luminometers vorgelegt. In einem Abstand von 30 s wurden 5 – 10 µl der Proben zum Substrat gegeben. Der Abstand von 30 s entsprach der Dauer einer Messung im Luminometer, zusammengesetzt aus 20 s Vorlaufzeit nach Injektion von 100 µl des „Light Emission Accelerators“ und 10 s Messintervall. Die Inkubationszeit mit Reaktionspuffer sollte für jede Probe identisch sein, da die Signalintensität mit der Inkubationszeit variiert. Nach dem Pipettieren der ersten Probe begann die Inkubationszeit von 30 - 60 min bei RT nach der die Messungen gestartet wurden. Der durch das Luminometer injizierte „Light Emission Accelerator“ enthält modifizierten „Emerald Lumineszenz-Verstärker“, der gleichzeitig nichtenzymatischen Hintergrund reduzieren soll.

2.25 Gel „Retardation Assay“

(Johnson et al., 1991)

Der Gel Retardation „Assay“ diente zum Nachweis einer Protein/DNA-Interaktion. Das als Sonde dienende DNA-Fragment wird über das „Annealing“ zweier komplementärer Oligonukleotide erhalten. Nach der „Annealingreaktion“ bleiben 5´ und 3´ überhängende,

einzelsträngige Guanin-Reste, an denen das Fragment mit Hilfe der Klenow-Polymerase Reaktion mit radioaktiven dCTPs markiert kann. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsmöglichkeiten wurden verschiedene Kernproteinisolierungen (20-50 µg Protein) und Poly(dI*dC) in Bindungspuffer 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des markierten DNA-Fragments erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Nach dieser Bindungsreaktion wurde der Ansatz ohne die Zugabe von Stopmix auf ein 5%iges Polyacrylamidgel (enthält 5 % (v/v) Glycerol) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C mit 7 V/cm in 1 x TBE-Puffer. Nach der Auftrennung über ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel können Protein/DNA-Komplexe wegen ihrer verzögerten Laufgeschwindigkeit auf einem Röntgenfilm von freier DNA unterschieden werden.

2.26 Zelllinien und Gewebekultur

2.26.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten, ausschließlich adhären in beschichteten Gewebekulturschalen wachsenden Zellen wurden im entsprechenden Medium bei 37°C und zur Einstellung eines günstigen pH-Wertes (alle Medien enthielten NaHCO₃) mit einer Begasung von 5 % CO₂ kultiviert. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen geteilt, bevor eine 100%ige Konfluenz erreicht wurde. Dies ist notwendig, um nicht die stärkste Wachstumsphase der Zellen zu unterbrechen und somit verschiedene Zellparameter zu ändern. Zum Aufteilen wurden die Zellen nach Abnahme des Kulturmediums zweimal mit Ca/Mg-freier PBS-Lösung gewaschen und in Trypsin/EDTA-Lösung solange inkubiert, bis sich alle Zellen vom Boden der Kulturschale gelöst hatten. Zum Abstoppen der Trypsin-Wirkung wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen. 10 % dieser Zellsuspension wurden zur Weiterkultur in der benutzten oder einer neuen Kulturschale gleicher Größe verwendet.

2.26.2 Isolierung und Kultivierung primärer Fibroblasten

Zum Test der Expression von transgenen Reporterkonstrukten in Mäusen wurden narkotisierten Tieren der entsprechenden Linien kleine Gewebestücke an der Ohrmuschel entnommen. Die Gewebe wurden kurz in 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in

einer Kulturschale (\varnothing 30 mm) in RPMI-Medium unter Zusatz von Collagenase Typ IV (10 mg/ml) 2 h unter CO₂ inkubiert. Danach wurde das Gewebestück mit zwei sterilen Pinzetten in möglichst kleine Stückchen zerzupft. Nach weiterer Inkubation in der Collagenase über Nacht wurden die Gewebestücke mehrmals durch eine Pipette aufgezogen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (10 min, 1000 x g, RT). Das Zellpellet wurde in RPMI-Kulturmedium resuspendiert und in neue Kulturschalen überführt. Die Zellen wurden so lange kultiviert und geteilt, bis eine Zellzahl erreicht war, in der das Reporterenzym nachgewiesen werden konnte.

2.26.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte zum qualitativen Nachweis oder zur quantitativen Bestimmung von Reporter-genaktivität. Für die Transfektion der verschiedenen Zelltypen wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien verwendet. Zum Teil wurde das Reagenz auch gewechselt, wenn aufgrund der geringeren Sensitivität des folgenden Versuchs größere Mengen an DNA transfektiert werden mußten, um mehr RNA oder Protein zu erhalten. Transfektionsreagenzien komplexieren DNA, sie schirmen die negativen Ladungen ab und ermöglichen dem positiv geladenen DNA/Reagenz-Komplex auf unterschiedliche, z. T. nicht genau aufgeklärte Weise den Eintritt in die Zelle und weiter in den Kern. Monokationische Lipide wie z.B. DOTAP (Roche Diagnostics, Mannheim) oder polykationische Lipide wie Roti-Fect (Carl Roth, Karlsruhe) ermöglichen eine Fusion des Komplexes mit der Zellmembran während DNA-Komplexe mit Substanzen wie Superfect (Qiagen, Hilden) aktiv von den Zellen aufgenommen werden. Bei der Transfektion besitzt jede Kombination von Zelllinie und Plasmid einen Satz von optimalen Parametern in Hinblick auf die Transfektionseffizienz. Es muß für jede Zelllinie das beste Verhältnis von Transfektionsreagenz und DNA ermittelt werden. Zu beachten ist aber, das Transfektionsreagenzien unterschiedlich toxisch auf verschiedene Zellen wirken, was auch bei ansonsten sehr guter Transfektionseffizienz die Menge der DNA im Transfektionsansatz limitiert. Grundsätzlich wurden zu Transfektionsexperimenten nur Zellen benutzt, die sich in einer permanenten Wachstumsphase befanden. Zellen, die zu lange konfluent waren, lassen sich schwerer transfektieren als schnell wachsende (häufig und rechtzeitig passagierte) Zellen. Die Anzahl der Passagen lag zwischen 5 und 25. Die Anzahl der Passagen wurde ab Ankunft der Zellen gezählt. Früheste erhältliche Passagen von NIH/3T3 Zellen sind laut ATCC-

Katalog (American Type Culture Collection) erst ab einer Passagenzahl von ca. 120 (ab Primärkultur) erhältlich. Zu oft passagierte Zellen können ihre Morphologie und damit ihre Transfektionsbereitschaft verändern. Zur Transfektion wurden die Zellen einen Tag vor der DNA-Aufnahme in die entsprechende Kulturschalen passagiert, so daß am folgenden Tag eine Konfluenz von 50-70 % erreicht wurde. Die Transfektion erfolgte weitgehend nach den Herstellerangaben, veränderliche Parameter der am häufigsten eingesetzten Transfektionsreagenzien sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Zelltyp	Kulturgröße (µg DNA/Schale)	Nachweis/ Verwendung	Reagenz (µl/µg DNA)
NIH/3T3	12 Well (0,25-0,5 µg) 24 Well (0,25-0,5 µg)	Luciferase-Assay	Roti-Fect (3 µl/µg)
NIH/3T3	6 cm (4-8 µg DNA) 10 cm (10 µg DNA)	Northern- Western- Blot, Gel-Retardation	Superfect (5 µl/µg)
CHO	12 Well (0,25-0,5 µg) 24 Well (0,25-0,5 µg)	Luciferase-Assay	Roti-Fect (3 µl/µg)
primäre Fibroblasten	12 Well (0,25-0,5 µg)	Luciferase-Assay	Roti-Fect (3-6 µl/µg)

Die Dauer der Inkubation mit den DNA-Komplexen betrug 2-4 h. Die Ernte der Proteine bzw. der RNA erfolgte 20-40 h nach dem Abstoppen der Transfektion durch Ersetzen des Ansatzes mit frischem Kulturmedium.

2.26.4 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Herstellung stabil transformierter Zellen wurden die Zelllinien CHO oder NIH/3T3 am Tage vor der Transfektion so in 10 cm Schalen ausplattiert, daß am folgenden Tage eine Konfluenz von 30-50 % erreicht wurde. Um die Rate von stabiler genomischer Integration zu erhöhen, wurden die transfektierten Konstrukte im Vektorrückgrad linearisiert. Die Transfektion erfolgte nach den Herstellerangaben. Expressionsvektoren, die keinen Selektionsmarker enthalten, wurden im Gemisch 1:1 mit einem Resistenz vermittelnden Plasmid transfektiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und auf

verschiedene Kulturschalen verteilt, so daß eine Konfluenz von ca. 10 % erreicht wurde. Nach weiteren 24 h, nachdem die Zellen vollständig angewachsen waren, wurde das selektive Reagenz zugegeben (bei Verwendung von Hygromycin B oder G418 bei Beginn der Selektion 300-500 µg/ml, zur Kultivierung stabiler Klone 100 µg/ml). Das Selektionsmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen und die Selektion aufrechtzuerhalten. Resistente Zellen wachsen nach ein bis zwei Wochen zu Klonen aus, die einzeln mit einer ausgezogenen und angeschmolzenen Pasteurpipette unter dem Mikroskop abgelöst und mit einer automatischen Pipette in ein Schälchen einer 12-Well Platte überführt wurden. Nach dem Anwachsen wurden die Klone in immer größere Kulturschalen überführt, bis ein Teil zum Test der Expression abgenommen werden konnte.

2.26.5 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Nicht-transformierte und stabil exprimierende Zelllinien wurden zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden während der stärksten Wachstumsphase zweimal mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die losgelösten Zellen wurden zur Inaktivierung des Trypsins in Medium mit FKS aufgenommen und abzentrifugiert (3 min, 900 x g, 4°C), der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Aus einer 10 ml Kulturflasche mit einer Konfluenz von etwa 80 % lassen sich vier Kryoröhrchen mit einem Volumen von 1,8 ml befüllen. Für die Lebensfähigkeit der Zellen ist langsames Einfrieren erforderlich. Die Zellen wurden deshalb zunächst bei -20°C für 2 h gefroren, dann über Nacht bei -70°C gehalten (Lagerung bei -70°C ist abhängig vom Zelltyp für mehrere Monate möglich) und später in flüssigen Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Röhrchen schnell aus dem Stickstoff in ein 37°C Wasserbad überführt. Nach dem Schmelzen wurde der Inhalt des Röhrchens in eine kleine Kulturflasche mit 6 ml vorgewärmtem Kulturmedium gegeben. Nach dem Anwachsen der Zellen (über Nacht) wurde das noch DMSO enthaltende Medium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Eine Transfektion frisch aufgetauter Zellen war nach drei bis vier Passagen möglich.

2.27 Erzeugung transgener Mäuse

Die Erzeugung transgener Mäuse, also Keimbahn inserierte Fremd-DNA tragende Mäuse, erfolgte z.T. im Institut für Humangenetik und z.T. (ab 1999) über den „Transgenen Service“ des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin in Göttingen. Die Methoden zur Erzeugung transgener Mäuse wurden prinzipiell nach Hogan et al. (1986) durchgeführt.

2.27.1 Vorbereiten der DNA zur Mikroinjektion

Alle zur Mikroinjektion vorgesehenen Konstrukte wurden zur Kontrolle sequenziert (siehe 2.19), und wenn möglich durch transiente Transfektion eukaryotischer Zellen (NIH/3T3) auf ihre Funktionalität getestet. Laut Literatur (Brinster et al., 1985) integriert DNA in linearisierter Form am besten, die Beschaffenheit der Enden spielt dagegen für die Integrationseffizienz keine Rolle. Das das Konstrukt enthaltende DNA-Fragment wurde über einen Verdau des Vektorrückgrats mit entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Plasmid freigesetzt und über ein Agarosegel (ohne EtBr) vom Vektorrückgrat getrennt. Da DNA-Mengen von 25 µg verdaut wurden, wurden mehrere Taschen eines Gels beladen. Die äußeren Taschen erhielten dabei nur etwa 1/10 der DNA/Dye-Lösung. Nach dem Gellauf wurden diese Taschen und der DNA-Längenstandard ausgeschnitten und die Gelstücke im EtBr-Bad angefärbt. Nach dem Anfärben wurde das Gel zusammengesetzt und auf dem UV-Tisch die gesuchte Bande zwischen den angefärbten Bereichen ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte mit Glasmilch (siehe 2.10.3). Um nach der Gelelution jegliche verbliebenen Partikel zu entfernen, wurde das Eluat über kleine Mikrofilter (Fa. Millipore, Typ HY, 0,45 µm) filtriert. Die Konzentration der DNA wurde über eine Anfärbung mit Etbr nach der Agarosegelelektrophore bestimmt. Dazu wurden verdünnte Aliquots der DNA-Lösung aufgetragen und die Anfärbung mit der auf gleicher Höhe laufenden Bande eines Markers verglichen, die definierte DNA-Mengen enthielt. Zur Mikroinjektion wurde die Konzentration auf etwa 5 ng/µl mit 1 x Mikroinjektionspuffer verdünnt.

2.27.2 Superovulation

Bei dem im Tierstall vorgegebenem Hell-Dunkel-Rhythmus (7-18, 18-7 Uhr) ovulieren die Weibchen alle 4-5 Tage 3-5 Stunden nach Einsetzen der Dunkelperiode. Um die Ausbeute an befruchteten Eizellen zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erhöhen, wurden die Tiere hormonell behandelt. Der Tag der Oocytenisolierung wird als Tag 0 bezeichnet. Am Tag -3 wurde den Tieren um 15 Uhr je 10 IU PMS (follikelstimulierendes Hormon aus dem Serum schwangerer Stuten) intraperitoneal injiziert. Nach 48 h (Tag -1) wurden 10 U HCG auf die gleiche Weise injiziert. HCG entspricht dem Luteinisierungshormon und wird für die Ovulation benötigt. Direkt nach der HCG- Injektion wurde je ein Weibchen mit einem im Einzelkäfig gehaltenen Männchen zusammengesetzt. Die Befruchtung erfolgte 1-2 h nach der Ovulation, meist etwa in der Mitte der Dunkelperiode. Die erfolgte Kopulation wurde am nächsten Morgen (Tag 0) am Vorhandensein des Vaginalpfropfs (VP) festgestellt, VP-positive Tiere wurden zur Oocytenentnahme verwendet. Je nach Stamm erhielt man 20-40 befruchtete Oocyten pro Tier.

2.27.3 Gewinnung befruchteter Oocyten

Die Bearbeitung und Kultivierung der Oocyten am Tag 0 erfolgte in 35 mm Kulturschalen, von denen zur Vorbereitung einige mit M2- bzw. M16-Medium befüllt und im Wärmeschrank bei 37°C (M2) bzw. im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ (M16) inkubiert wurden. In eine weitere Kulturschale wurden drei einzelne Tropfen M16-Medium gegeben und mit Mineralöl überschichtet (Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂). Den zur Oocytenentnahme getöteten Tieren wurde die Bauchdecke geöffnet, die Eileiter von den Uterushörnern abgetrennt und in M2-Medium (auf 37°C vorgewärmt) gegeben. Die weitere Arbeit erfolgte unter einem Stereomikroskop (Stemi SV 11, Fa. Zeiss) unter Durchlicht auf einer mit 37°C beheizten Arbeitsplatte. Mit Hilfe von spitz ausgeschmiedeten Pinzetten wurde die geschwollene Ampulle angerissen, worauf die von Cumulusmasse umgebenen Oocyten wegen des vorliegenden Überdrucks herausgepresst wurden. Restliche Zellen wurden mit den Pinzetten aus den Ampullen herausgestrichen, die leeren Reste der Ampullen entfernt. Zum Ablösen der Cumuluszellen wurden 20 µl Hyaluronidase (10 mg/ml) zugegeben. Nach 5minütiger Inkubation wurden die Oocyten mit einem Mundschlauch in eine über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Pasteurpipette eingesaugt und mit möglichst wenig Cumuluszellen oder

Geweberesten in frisches M2-Medium gegeben. Auf dieselbe Weise wurden die Oocyten solange weitergewaschen, bis alle Cumuluszellen, Gewebereste oder zerstörten Oocyten abgetrennt waren. Danach wurden die Oocyten zum Mediumwechsel einmal kurz in M16-Medium gewaschen, bevor sie in die zur Kultivierung vorbereiteten M16-Tropfen unter Mineralöl gegeben und bis zur Mikroinjektion bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert wurden.

2.27.4 Mikroinjektion

Die im Institut für Humangenetik verwendete Mikroinjektionsanlage (Fa. Eppendorf, Hamburg) besteht aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 10, Fa. Zeiss), zwei Mikromanipulatoren (Typ 5171, Fa. Eppendorf), einem Mikroinjektor (Typ 5242, Fa. Eppendorf) und einer Mikrometerspritze zur Kontrolle der Haltepipette (CellTram Air, Fa. Eppendorf). Vor der Mikroinjektion wurde eine Haltepipette (Vacu Tips, Fa. Eppendorf) mit M2-Medium befüllt, mit der Mikrometerspritze verbunden und in einen Mikromanipulator (hier linker Hand) eingesetzt. Die Injektionskanüle (Femtotips II, Innendurchmesser 0,5 µm, Außendurchmesser 0,7 µm, Fa. Eppendorf) wurde rückseitig über eine lang ausgezogene „Mikroladder“ Pipettenspitze (Fa. Eppendorf) befüllt, mit dem Mikroinjektor über eine Verschraubung verbunden und in den zweiten, rechter Hand liegenden Mikromanipulator eingespannt.

Jeweils ca. 10-20 Oocyten wurden aus den M16-Tropfen entnommen, einmal in M2-Medium äquilibriert und auf einen Hohlschliffobjektträger in einen 20 µl Tropfen M2-Medium unter Mineralöl gegeben. Der Objektträger wurde auf dem Mikroskopisch fixiert, die Ebene der Oocyten fokussiert und die Haltepipette an eine Oocyte herangeführt. Die Oocyte wurde dann über einen angelegten Unterdruck an der Haltepipette fixiert. Ansaugen und Abstoßen der Oocyten erfolgte solange, bis sie so fixiert waren, das die Vorkerne leicht zu erkennen und der männliche (größere) Vorkern der Seite der Injektionskapillare zugewandt war. Je nach Durchlässigkeit der Injektionskapillare wurde der Injektionsdruck (Mikroinjektor Typ 5242 baut einen Dauerdruck auf) zwischen 30-300 hPa eingestellt. Zur Mikroinjektion stach man vorsichtig bis in den männlichen Vorkern hinein. Ein leichtes Anschwellen des Kerns zeigte die Aufnahme von Flüssigkeit (1-2 pl) an. Waren alle vorgelegten Oocyten auf diese Weise injiziert, wurden die noch intakten Eizellen einmal in M16-Medium gewaschen und in einem frischen M16-Tropfen unter Mineralöl bis zum Retransfer bei 37°C und 5 CO₂ inkubiert.

2.27.5 Retransfer mikroinjizierter Oocyten

Die am Tag 1 zum Zweizeller entwickelten Embryonen wurden in die Eileiter eines Tag 1 scheinsschwangeren Weibchens (NMRI) retransferiert. Dazu wurden am Vorabend des Retransfers mehrere Weibchen im Alter zwischen 2-3 Monaten mit vasktomierten Männchen verpaart. Nach positiver VP-Kontrolle wurde je eine Maus mit Rompun/KETAVET (0,01 ml/1 g Körpergewicht) narkotisiert. Die Rückengegend der bäuchlings auf einer Wärmeplatte liegenden Maus wurde desinfiziert und das Fell im Bereich der Leiste durch einen ca. 10 mm langen Schnitt aufgetrennt. Über dem durchscheinenden Ovar wurde die Unterhaut aufgeschnitten und das Ovar am anliegenden Fettgewebes herausgezogen. Das Ovar wurde mit einer Gefäßklemme (angebracht am Fettgewebe) so orientiert festgelegt, daß Ovidukt und Uterus gut zu erkennen waren. Mit zwei Pinzetten wurde danach die Bursa angerissen und die Ampulle freigelegt. Ein Tropfen Adrenalinlösung verhinderte das Einbluten. Das Infundibulum wurde mit einer Pinzette hervorgehoben und mit der anderen Pinzette vorsichtig aufgeweitet. In die sog. Retransferkapillare, einer besonders schmal ausgezogenen Pasteurpipette, waren vorher M2-Medium, eine Luftblase und 10-20 Zweizeller perlschnurartig aufgesogen worden. Mit einer Pinzette hielt man das Infundibulum des Ovidukts fest, die Spitze der Retransferkapillare wurde in das Infundibulum eingeführt und die Zellen hineingeblasen. Das unter dem Binokular gut sichtbare Erscheinen der Luftblase im Eileiter zeigte den erfolgreichen Retransfer an. Nach erfolgtem Retransfer wurden die Organe in die richtige Lage zurückgebracht, die Wundränder aneinandergelegt und geklammert und die Wunde zur Desinfektion mit Leukase-Puder behandelt. Die Maus wurde dann bis zum Aufwachen aus der Narkose eingewickelt in ein Zellstofftuch auf eine Wärmeplatte gelegt, wobei die Augen durch aufgelegte Wassertropfen vor der Austrocknung geschützt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Ribozyme gegen Prm3-mRNA der Maus

Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle. Ribozyme aus Pflanzenviren und Viroiden ermöglichen z.B. das intramolekulare (*in cis*) Prozessieren festgelegter RNA-Einheiten aus Concatemeren, die aus der „rolling circle“-Replikation hervorgehen. Die meisten Ribozyme können auch *in trans* aktiv sein, d.h. auch andere RNA-Moleküle schneiden. Von den verschiedenen Ribozymtypen ist das sog. „Hammerhead“-Ribozym eines der kleinsten. Dieser Typ sollte in intermolekularer Reaktion (*in trans*) zum Abbau der Prm3-mRNA eingesetzt werden.

3.1.1 Feststellung möglicher Ribozym-Schnittstellen der Prm3-mRNA der Maus

Hammerhead-Ribozyme schneiden die Ziel-RNA 3' der aus einem bestimmten Basentriplet bestehenden Zielstelle. Das in der Natur am häufigsten durch Hammerhead-Ribozyme gespaltene Motiv ist die Basenabfolge GUC (Birikh et al., 1997). Andere Untersuchungen geben AUC als am effizientesten gespaltenes Triplet unter den NUC Motiven an (Zoumadakis und Tabler, 1995). Die Prm3-cDNA der Maus (vgl. GenBank „Accession“ Nr. Z47352) wurde der Literatur folgend zunächst nach GTC- und ATC-Triplets durchsucht (Abb. 3.1).

```

GTCCAGAGAGACAGGAGTGGGCGATGGGTTCCCGCTGTTCCAAGCTCAGC      50
ACTGGCCATGAACAGCCAGCCCAGAACACTGGGTCACAGCCGTGGCCACGA      100
                                     G1↑
GTCCTCCATGAAGAAGCTCGTGGCCTGTGTGAGTCAAGACAACTTTTCCC      150
  G2↑                                     G3↑
TGTCATCAGAGGGCGAGGAAGAGGAGGAGGACGAGGAAGAGGAGGAGGAG      200
  G4↑A1↑
GAAGAAGAAGAAGAGGAAGAGGAGCAAATCCCCGGTGAAGGGCAAGCTGCT      250
                                     A2↑
GCTGCTGGAGCCCGAAAAGCAAGAGAGCGCCGAGGATGGGGAGGCCACAGC      300
CAAGCCCCGAGCCAAGCAGACACACTCCTGAGCCACAAGGCCTGCCTGG      350
CAATGGGTGCCCATTGCCACGCCAGAGGACATTCAGAAAAGAATAAAGAG      400

```

Abb. 3.1: Sequenz der Maus Prm3-cDNA. Die möglichen Ribozymschnittstellen GTC (G1-G4) und ATC (A1,A2) sind durch Fettdruck hervorgehoben und durch Pfeile (↑) markiert. Die Translationsstart- und -stopcodons sind ebenfalls durch Fettdruck hervorgehoben.

Es wurden sechs mögliche Schnittstellen für Hammerhead-Ribozyme gefunden. Die Abb. 3.1 zeigt die Positionen der vier GTC (1-4) und zwei ATC (1+2) Triplets in der cDNA von Prm3. Da die Bindungsfähigkeit der Ribozyme an ihre Zielstellen immer auch von der Sekundärstruktur der zu spaltenden RNA abhängt, wurden mögliche Sekundärstrukturen der Prm3-mRNA mit Hilfe des Computerprogramms M-fold (Zucker und Stiegler, 1981; Zucker et al., 1991) ermittelt. Diesen Berechnungen zufolge lagen alle ausgesuchten Triplets in oder an nicht vollständig basengepaarten Bereichen, was die Auftrennung der mRNA durch Ribozyme an dieser Stelle erleichtern sollte. Es wurden deshalb für alle sechs möglichen Ribozyme DNA-Templates synthetisiert. Die Abb. 3.2 zeigt die Sekundärstruktur mit der kleinsten berechneten freien Energie.

3.1.2 Synthese spezifischer Ribozyme

Ribozyme für *in vitro*-Spaltungen wurden durch *in vitro*-Transkription von entsprechenden DNA-Konstrukten synthetisiert. Die Konstruktion von DNA-Templates der spezifischen Ribozyme erfolgte über mehrere Amplifikationen mittels PCR (siehe 2.14.1). Der stufenweise Aufbau der DNA-Templates, dargestellt in Abb. 3.3 wird hier am Beispiel des Ribozyms für die Schnittstelle GUC 3 dargestellt.

Das aktive Zentrum („core“) wurde mit der Methode der Primeramplifikation hergestellt. Die das aktive Zentrum des Ribozyms codierenden Oligonukleotide „Ribcor1“ und „Ribcor2“ wurden aneinander gelagert und fehlende Basen aufgefüllt (siehe 2.14.1), so daß ein 21 bp langes DNA-Fragment entstand (Abb. 3.3A). Im zweiten PCR-Schritt wurde das so geschaffene „core“-Fragment um die flankierenden Bindungsarme und die T7-RNA-Polymerase-Promotorsequenz, die eine *in vitro*-Transkription auf der Basis des PCR-Produkts ermöglicht, ergänzt (Abb. 3.3B). Um die Klonierung der Konstrukte für die spätere endogene Expression zu erleichtern, wurde ein Teil der Ribozymkonstrukte mit einer NheI-Schnittstelle (5'-Ende) über eine PCR unter Verwendung des Oligonukleotids T7NHE erweitert (nicht abgebildet).

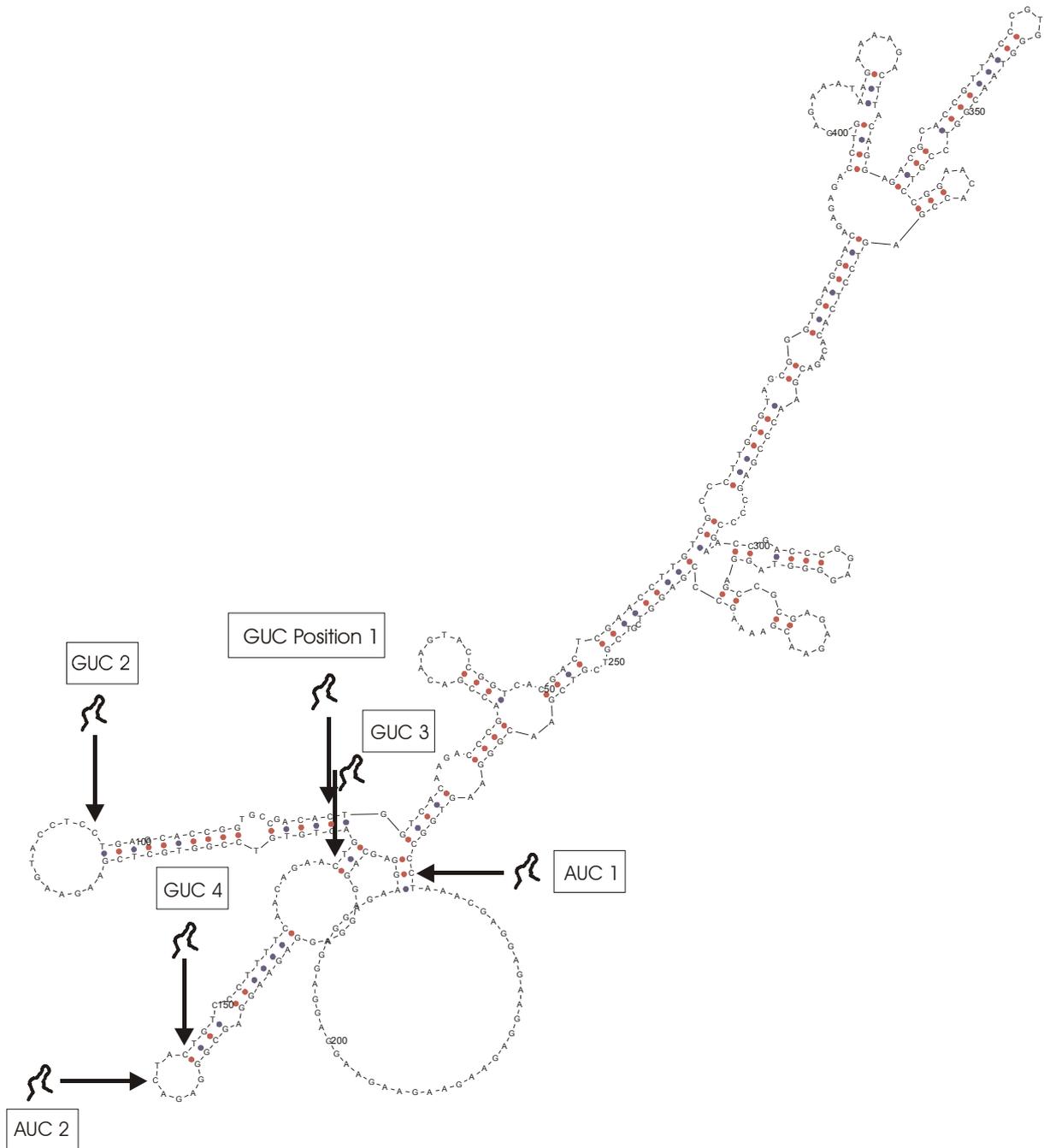
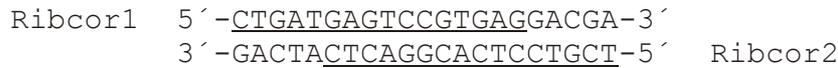
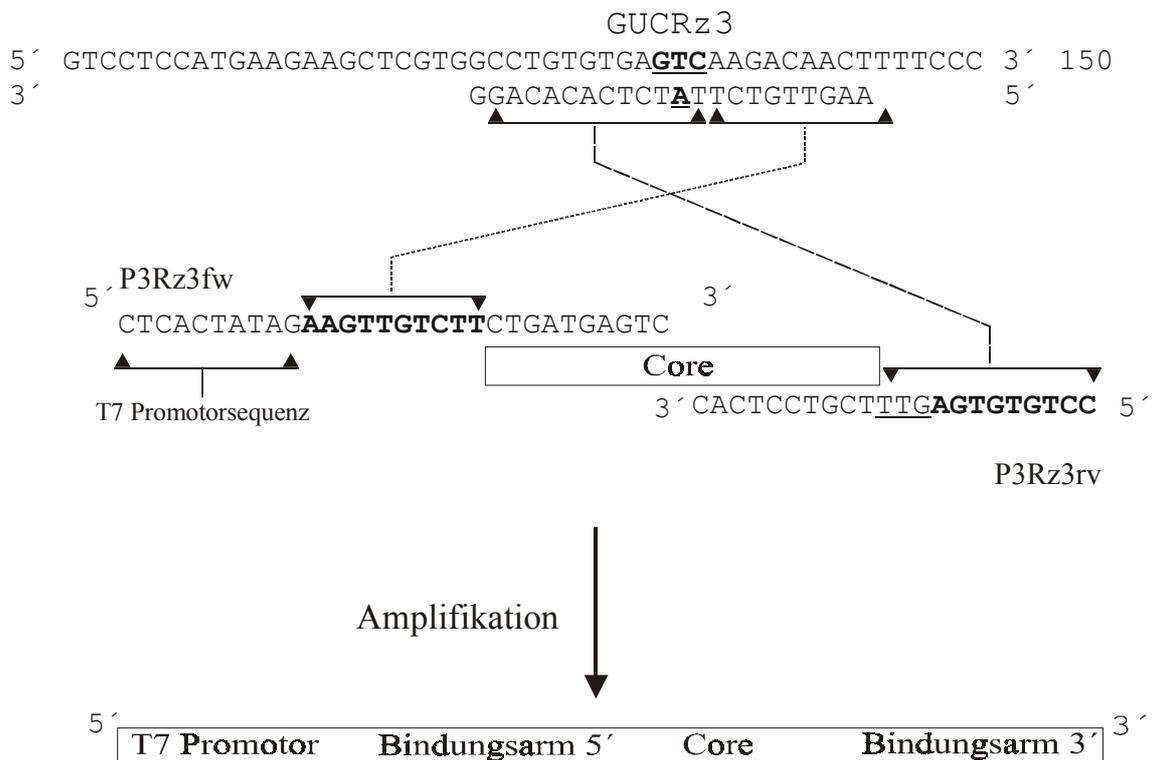


Abb. 3.2: Mögliche Sekundärstruktur der Prm3-mRNA, berechnet mit M-fold. Für die abgebildete Sekundärstruktur wurde unter verschiedenen berechneten Faltungsmustern die geringste freie Energie ermittelt. Die Positionen der möglichen Ribozymschnittstellen GUC und AUC sind markiert.

Abb. 3.3: **A (folgende Seite):** Schema der Primeramplifikation zur Herstellung des Templates für das „Ribozymcore“. Die Basen der „core“-Oligonukleotide sind unterstrichen. **B:** Amplifikation eines Ribozym-DNA-Templates nach dem Auswählen der Basen zur spezifischen Bindung an die Schnittstelle GUC 3 von Prm3. Die markierte Fehlpaarung ergänzt ein nicht in den „core“-Primern enthaltenes konserviertes Nukleotid A und induziert die Ausbildung der Sekundärstruktur des aktiven Zentrums. Die die bindenden Arme codierenden Oligonukleotide überlappen mit Basen des „Ribozymcore“ und vervollständigen das Ribozym. Die P3Rzfw-Primer enthalten jeweils eine T7-Promotorsequenz zur *in vitro*-Transkription der Ribozyme.

A: Primeramplifikation**B: Festlegen der bindenden Arme und Amplifikation eines spezifischen Ribozyms**

Im vollständigen Konstrukt liegt das aktive Zentrum dem zu schneidenden Triplet (hier GUC) benachbart. Der 3′-bindende Arm führt an die „G“-Position des GUC eine Fehlpaarung (G→T) ein. Dies ist zum Erhalt der richtigen Sekundärstruktur des Ribozyms notwendig.

Nach der *in vitro*-Transkription der hergestellten DNA-Templates wurden auf diese Weise sechs Ribozyme erhalten, die gegen die Prm3-mRNA gerichtet sind. Abb. 3.4 zeigt beispielhaft die Basenpaarung von RzGUC3 bei angenommener ungehinderter Bindung an das Substrat.

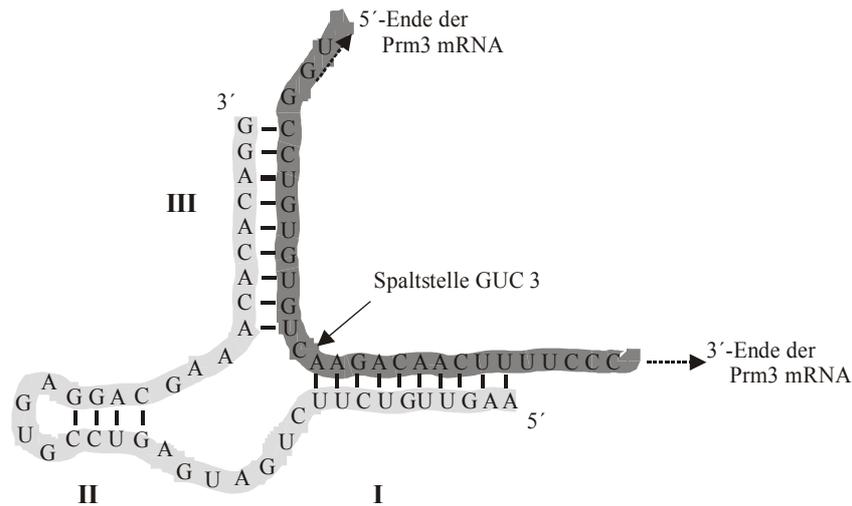


Abb. 3.4: 2-dimensionale schematische Darstellung der Sequenz des gegen die Prm3-mRNA gerichteten Ribozyms Rzguc3 (vgl. Abb. 3.1 und Abb. 1.2), gebunden an das Substrat.

3.1.3 *In vitro*-Spaltungen unter „single turnover“-Bedingungen

3.1.3.1 Feststellung der Aktivität einzelner Ribozyme

Da Sekundärstrukturberechnungen nur einen Hinweis auf die tatsächliche Zugänglichkeit eines bestimmten Triplets in einem gefalteten RNA-Strang geben, wurde in *in vitro*-Ansätzen versucht, die Aktivität der verschiedenen Ribozyme zu bestimmen. Die Transkription der Substrat-mRNA (unter Einbau von ^{32}P -UTP oder nicht radioaktiv markiert) erfolgte wie unter 2.14.2 beschrieben. Um kinetische Parameter unter *in vitro*-Bedingungen bestimmen zu können, wurden die Reaktionen unter „single turnover“-Bedingungen durchgeführt (Heidenreich und Eckstein, 1992). Substrat-RNA wurde mit einem 5-10fachen molaren Überschuss an Ribozym-RNA gemischt und nach einer festgelegten Reaktionszeit wurden die Spaltprodukte in der Polyacrylamidgelelektrophorese (5 % PAA, denaturierende Bedingungen) analysiert. Nach einer Anfärbung durch Ethidiumbromid zeigten sich 0,1-0,2 μg RNA unter UV-Licht gut sichtbar. Diese Menge wurde dann jeweils als Ziel-RNA in den Ansätzen vorgelegt. Von den ebenfalls durch *in vitro*-Transkription hergestellten Ribozymen wurden 0,1-0,2 μg eingesetzt, was aufgrund der Molmasse bei gegen Prm3 gerichteten Ribozymen (Rz mit ca. 50 nt, Prm3-Transkript je nach Klonierung und Linearisierung des Konstruktes mit bis zu 450 nt) einen etwa 10fachen molaren Überschuss bedeutet.

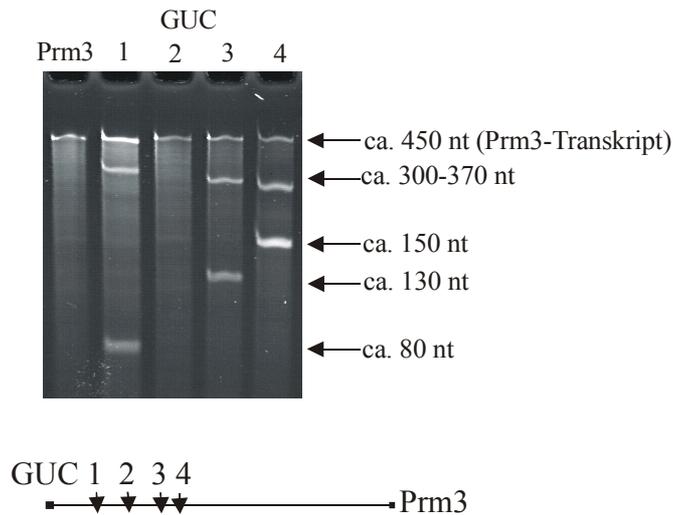


Abb. 3.5: Mit Ethidiumbromid angefärbte Prm3-Fragmente nach *in vitro* Spaltungsreaktionen mit Ribozymen gegen die Spaltstellen GUC 1, 2, 3 und 4. „Prm 3“ bezeichnet die Kontrollspur mit Prm3-RNA, die ohne den Zusatz von Ribozymen über den Reaktionszeitraum inkubiert wurde. Die schematische Darstellung der Spaltpositionen unter dem Gelfoto verdeutlicht die Größen der resultierenden Banden.

Zunächst wurden alle synthetisierten Ribozyme wie in Abb. 3.5 gezeigt auf ihre Aktivität getestet (2.14.3). Nach einer Inkubation mit Ribozymen bei 37°C zeigten sich nach dem Abstoppen der Reaktion (1,5-2 h Inkubation) Spaltungsfragmente des Prm3-Transkriptes. Es stellte sich heraus, dass einige Ribozyme keine Spaltung der Substrat-RNA katalysierten. Dazu gehörte das Ribozym gegen die Prm3-GUC-Spaltstelle Nr. 2 und die beiden Ribozyme gegen die Prm3-AUC-Spaltstellen (nicht abgebildet). Die *in vitro* aktiven Ribozyme gegen die Prm3-GUC Triplets Nr. 1, 3 und 4 werden deshalb nur noch mit Rz1, Rz3 und Rz4 bezeichnet.

3.1.3.2 Kinetik aktiver Prm3-spezifischer Ribozyme

Die durch EtBr angefärbten Gele ließen eine grobe qualitative Abschätzung der Aktivitäten der unterschiedlichen Ribozyme zu. Zur genauen Analyse der Unterschiede der Spaltungsaktivitäten von Rz1, Rz3 und Rz4 wurde ein radioaktiv markiertes Prm3 Transkript hergestellt (siehe 2.14.2). Etwa 100000 Zerfallsereignisse (cpm), gemessen mit einem Szintillationszähler wurden als Ziel-RNA eingesetzt, was einer Transkriptmenge von 0,1-0,15 µg entspricht. Die RNA-Konzentration wurde über die photometrische Messung einer parallel durchgeführten nicht radioaktiven *in vitro*-Transkription bestimmt. Die Abb. 3.6 zeigt

die durch die Ribozyme Rz1, Rz3 und Rz4 katalysierten Spaltungen des radioaktiv markierten Prm 3-Transkriptes. Um eine Kinetik ermitteln zu können, wurden die Spaltungsreaktionen definiert mit der Zugabe von $MgCl_2$ gestartet, bei $37^\circ C$ inkubiert und später zu bestimmten Zeitpunkten durch Vermischen mit Formamid-Stopmix abgestoppt. Nach Auftrennung der Reaktionen im Polyacrylamidgel erfolgte eine Auswertung entweder durch Exposition auf Röntgenfilmen oder durch Quantifizierung der Signale im Phospho-Imager. Im Röntgenfilm zeigte sich bei allen drei eingesetzten Ribozymen mit dem Fortschreiten der Reaktionsdauer eine Abnahme der Menge an vollständigem Prm3-Transkript und eine Zunahme der Menge der Spaltprodukte (Abb. 3.6).

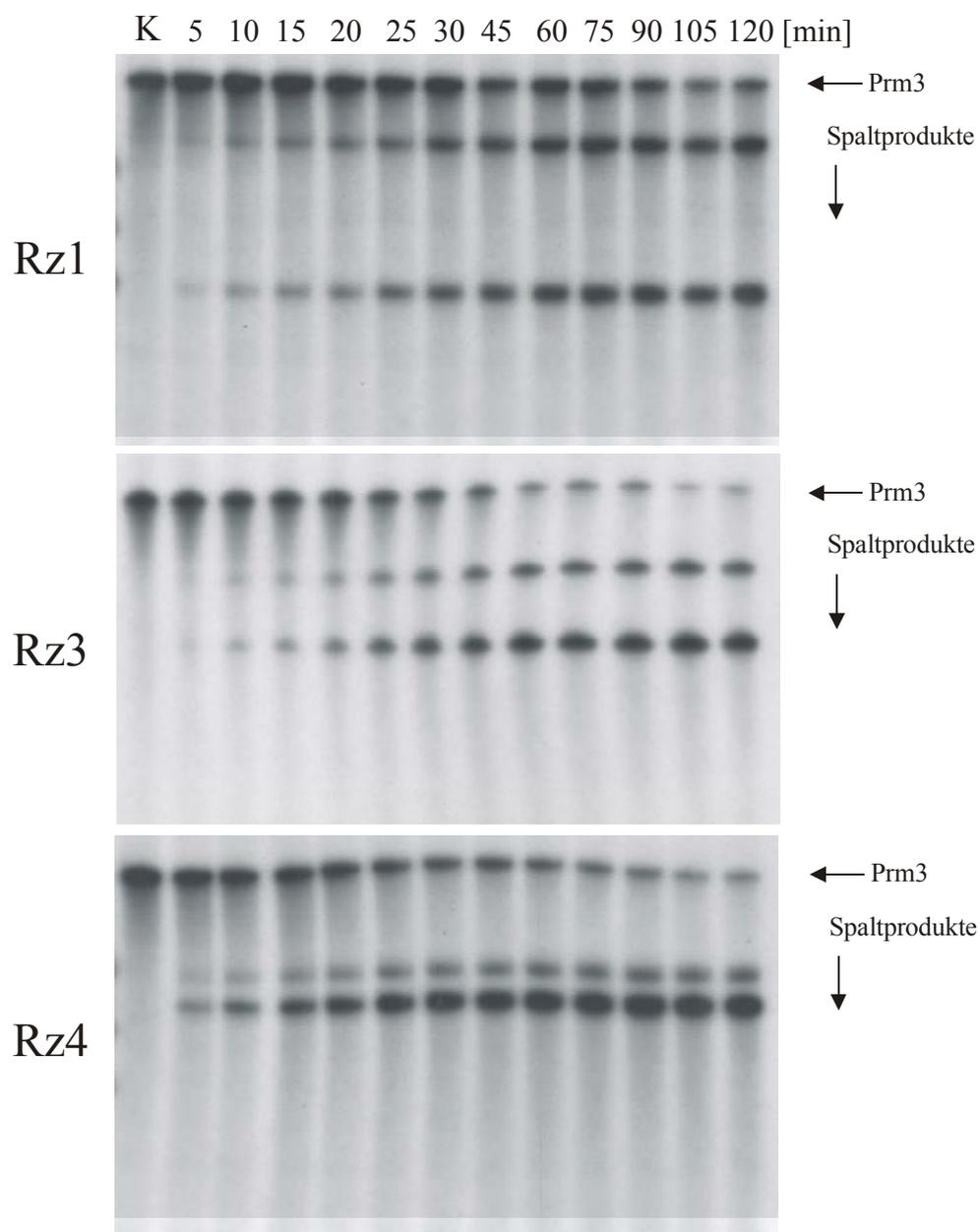


Abb. 3.6: Legende nächste Seite

Vorherige Seite:

Abb. 3.6: Spaltung von radioaktiv markiertem Prm3-Transkript mit den Ribozymen Rz1, Rz3, und Rz4. Die Spur „K“ enthielt zur Kontrolle jeweils Prm 3-Transkript, das ohne Zusatz von Ribozymen über die gesamte Inkubationszeit (120 min) im Reaktionspuffer bei 37°C inkubiert worden war. Die über den Spuren angegebenen Minuten beschreiben die Reaktionsdauer.

Die Abb. 3.7 zeigt das Ergebnis der Phospho-Imager-Auswertung der für Abb. 3.6 verwendeten Gele. Da jede Spur einen eigenen Reaktionsansatz darstellte, wurde jeweils auch für jede Spur das Verhältnis zwischen Spaltprodukten und vollständigem Transkript ermittelt. Dazu wurde nach Abzug eines Hintergrundwertes die Schwärzung der einzelnen Banden quantifiziert. Um die Abnahme darstellen zu können, wurden die Werte der zwei Spaltprodukte addiert und durch die Summe der Schwärzungen aller Banden dividiert. Die Multiplikation mit 100 ergab dann eine Abnahme der Schwärzung in [%] bezogen auf die Gesamtschwärzung der Spur, die ohne Spaltungsreaktion zu 100 % vom intakten Prm3-Transkript stammt. Die aus diesen berechneten Werten resultierende Auftragung gegen die Inkubationszeit (Abb. 3.7) zeigt die unterschiedlichen Reaktionskinetiken der drei Ribozyme bei *in vitro*-Spaltungen.

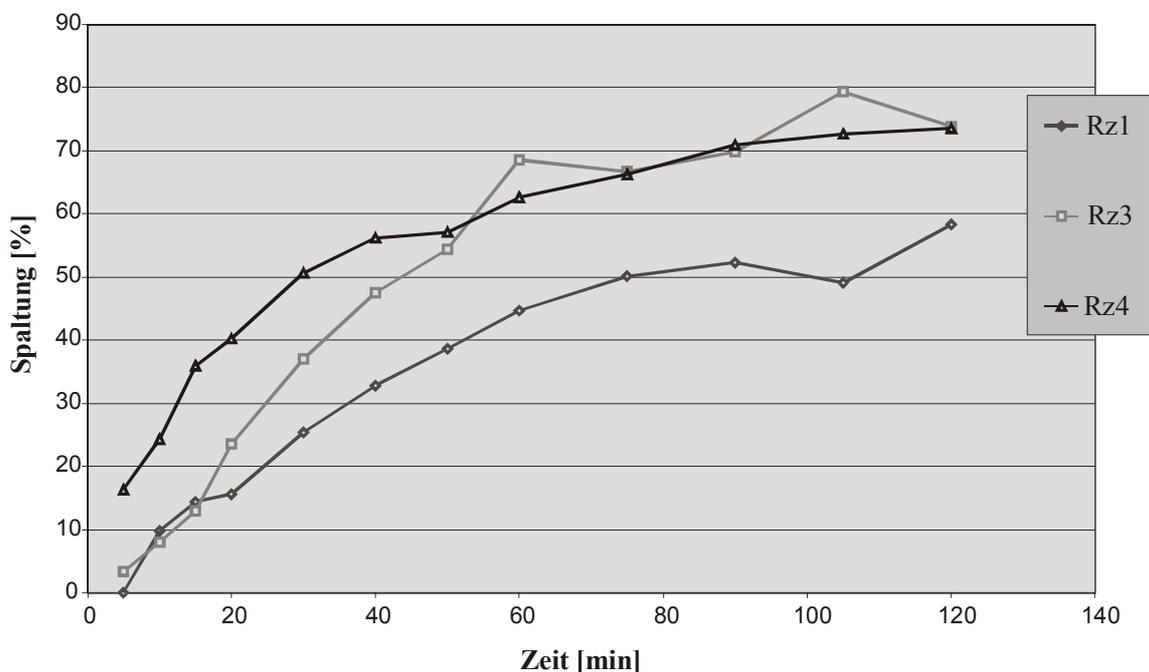


Abb. 3.7: Auftragung des berechneten Verhältnisses von Spaltprodukten zu vollständigem Prm 3-Transkript [%] gegen die Inkubationszeit. Die zugrundeliegenden, mit einem Phospho-Imager ermittelten Werte (nicht abgebildet), stammen von den für die Abb. 3.6 verwendeten Gele.

Aufgrund der *in vitro*-Spaltungsreaktionen konnte folgende Reihenfolge der Prm3-spaltenden Ribozyme mit abnehmender Spaltungsaktivität festgelegt werden: Rz4 \geq Rz3 > Rz1 (GUC 4 \geq GUC 3 > GUC 1). Wegen der höheren Sensitivität bei der Detektion von radioaktiven Spaltprodukten gegenüber der Anfärbung mit EtBr wurden die Ribozyme gegen GUC 2, AUC 1 und AUC 2 erneut auf Spaltungsaktivität getestet. Es konnten jedoch auch mit dieser Methode keine Spaltprodukte nachgewiesen werden (nicht abgebildet). Für die weitere Anwendung als Effektormoleküle zur Generierung eines konditionale „Knockout“-Systems wurden aufgrund der *in vitro*-Versuche die gegen GUC-Schnittstellen der Prm3-mRNA gerichteten Ribozyme Rz1, Rz3 und Rz4 ausgesucht.

3.1.3.3 Nachweis der Substratspezifität (HPrm3)

Um die Substratspezifität der konstruierten Ribozyme darstellen zu können, wurde *in vitro* versucht, ein Transkript des humanen Prm3 (HPrm3) mit den Maus-Prm3 spezifischen Ribozymen zu spalten.

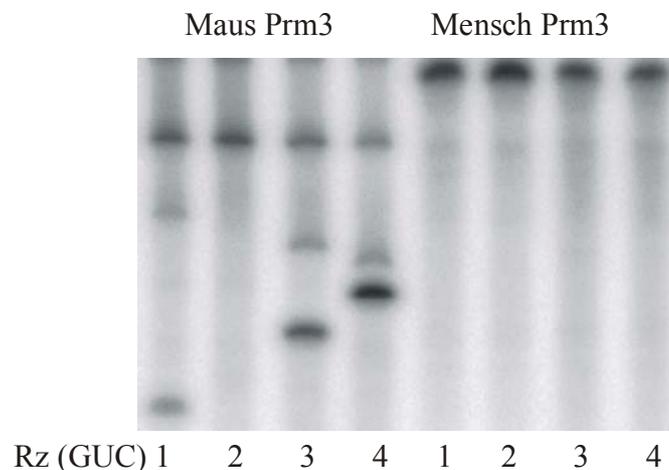


Abb. 3.8: Keine Spaltung eines markierten humanen Prm3- *in vitro*-Transkripts (cDNA kloniert in pBluescript, Schlüter, 1996) durch die Maus Prm3-spezifischen Ribozyme. Die Versuche wurden wie unter 3.1.3.2 beschrieben durchgeführt. Das Maus Prm3- *in vitro*-Transkript wurde zur Kontrolle des Versuchsansatzes erneut mit *in vitro* transkribierten Ribozymen verdaut.

Die HPrm3 Sequenz ist über weite Strecken identisch mit der Maus Prm3-Sequenz. Die GUC Triplets, die als Spaltsequenzen in der Mausequenz benutzt wurden, sind hier aber mutiert. Die Ansätze wurden wie für die „single turnover“-Tests mit dem Maus-Prm3-Transkript

(siehe 3.1.3) beschrieben durchgeführt. Nach den Ribozymverdau von 2 h bei 37°C traten weder im EtBr angefärbten Gel Spaltprodukte auf (nicht abgebildet), noch konnte ein Verdau oder Abbau von radioaktiv markiertem Transkript festgestellt werden (Abb. 3.8). Die Substratspezifität sollte also hoch genug für die Anwendung in transgenen Mäusen sein.

3.1.3.4 Aktivitätstests in Gesamt-RNA

So wie die Substratspezifität in *in vitro*-Tests bestätigt worden war, sollte eine mögliche Inhibierung der Ribozymaktivität durch die *in vivo* vorhandene Gesamt-RNA in *in vitro*-Tests ausgeschlossen werden. Dazu wurden die unter 3.1.3.2 beschriebenen Tests mit radioaktiv markiertem Prm3-Transkript erneut durchgeführt (Abb. 3.9), wobei 7,5 µg Gesamt-RNA aus NIH/3T3-Zellen in den Reaktionsansatz gegeben wurden. Nach diesen Versuchen hat der Zusatz von RNA keinen Einfluß auf die Aktivität spezifischer Ribozyme.

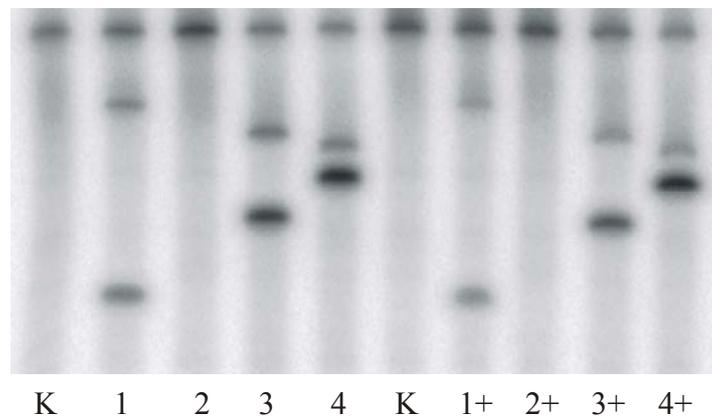


Abb. 3.9: Testverdau von radioaktiv markiertem Maus Prm3-*in vitro*-Transkript mit den gegen die GUC-Spaltstellen gerichteten Ribozyme Rz 1-4. Die Verdau wurden wie unter 3.1.3 beschrieben durchgeführt. Die mit „+“ gekennzeichneten Spuren enthielten 7,5 µg Gesamt-RNA aus NIH/3T3-Zellen (Maus, Embryofibroblasten). Die Kontrollspur (K) enthielt aufgetragenes Transkript, das über den Inkubationszeitraum (1,5 h) mit Gesamt-RNA aus NIH/3T3-Zellen versetzt war.

3.2 Ribozyme gegen Prm1-mRNA der Maus

Prinzipiell war auch eine Reduktion der Prm1-Expression der Maus geplant (Prm1: GenBank „Accession“ Nr. Z47352). Es wurden auf dieselbe Weise wie unter 3.1.1 für Prm3 beschrieben, mögliche Schnittstellen für Ribozyme in der cDNA von Prm1 gesucht, die Sekundärstruktur der mRNA berechnet (nicht abgebildet) und DNA-Templates zweier Ribozyme hergestellt. Diese Ribozyme waren gegen die GUC-Schnittstellen Nr. drei und vier gerichtet, die nach der berechneten Faltung der Prm1-mRNA am besten zugänglich erschienen.

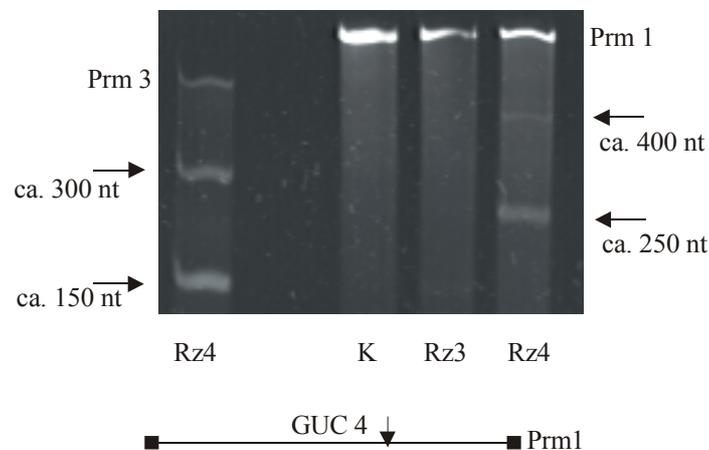


Abb. 3.10: Darstellung erster *in vitro*-Verdau des Prm1-Transkriptes (Transkription nach Klonierung in pcDNA3, Auftrennung in 5 % Polyacrylamid). Zum Vergleich der RNA-Längen wurde Prm3-Transkript (ca. 450 nt unverdaut) nach dem Verdau mit RZ4 aufgetragen. Die Spaltprodukte sind jeweils mit Pfeilen markiert. Die schematische Darstellung der Spaltposition GUC 4 unter dem Gelfoto verdeutlicht die Größen der resultierenden Banden.

Für Prm1 wurden lediglich einzelne Pilotexperimente zur Findung aktiver Ribozyme durchgeführt. (Abb. 3.10). Es zeigten sich ebenso wie für Prm3 Unterschiede in der Spaltungsaktivität. Während das Ribozym gegen die GUC-Schnittstelle Nr. 3 keine Spaltungsaktivität zeigte, war das Ribozym gegen GUC 4 aktiv.

3.3 Transgene Mauslinien für einen Tetracyclin-abhängigen Transaktivator

Voraussetzung für die steuerbare Regulation eines gewünschten Gens im Tet-System ist die Expression des Tet-Transaktivators (rtTA).

3.3.1 Klonierung eines spezifisch exprimierenden Tet-Transaktivators

Um die Protaminexpression gezielt in männlichen Keimzellen zu beeinflussen, wurde versucht die transgene Expression des positiv regulierbaren Tet-Transaktivators spezifisch in diesen Zellen zu induzieren. Dazu wurde der Phosphoglycerat-Kinase2 (PGK2) Promoter des Menschen ausgewählt, der uns von R. P. Erickson (Tucson, Arizona) zur Verfügung gestellt wurde. Das Gen für die Phosphoglycerat-Kinase2 wird prä- und postmeiotisch in den Keimzellen exprimiert und gewährleistet so eine Abdeckung des Expressionsfensters der Protamine. Der humane PGK2-Promotor war bereits erfolgreich von Dr. K. Nayernia in transgenen Mäusen zur keimzellspezifischen Expression des SV40-Large-T-Antigens benutzt worden (Nayernia et al. 1992). Die rtTA-Sequenz (entsprechend der Nomenklatur der Fa. Clontech „Tet-On“) wurde hinter den PGK2-Promotor kloniert, das gesamte Konstrukt aus dem Vektor geschnitten und zur Mikroinjektion (2.27.4) aufgereinigt.

3.3.2 Tet-Transaktivator Stamm (PGK2Tet-On)

Nach der Mikroinjektion der linearisierten DNA in den paternalen Vorkern befruchteter Oocyten und Retransfer in scheinsschwangere Mäuse (NMRI) wurde ein positives Junges erhalten. Dieses enthielt das Aktivator-konstrukt in mittlerer Kopienzahl (25-30), ermittelt über Dot-Blot Vergleiche mit aufgetragener Plasmid-DNA (siehe 2.16.1.2 und 3.4.4), und transmittierte es gemäß der Mendel'schen Regeln. Die Northern-Blot Analyse (Abb. 3.11) zeigt eine starke, testisspezifische Transkription.

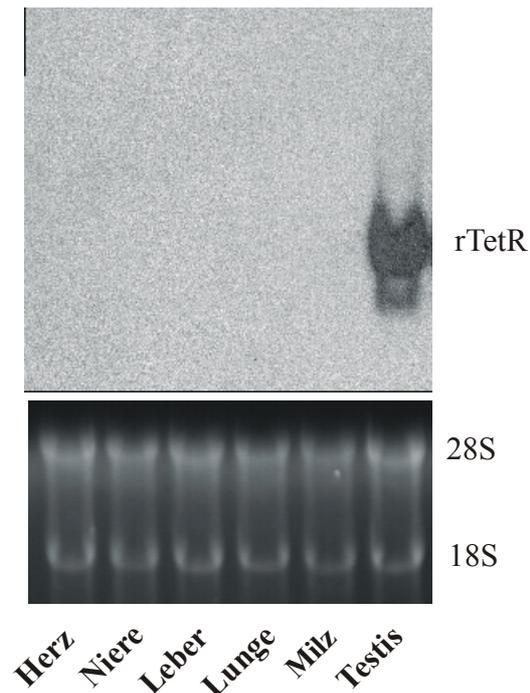


Abb. 3.11: Nachweis der testisspezifischen Expression des Tet-Transaktivators mit Hilfe des Gewebe-Northern-Blots. Es wurden je 20 µg Gesamt-RNA aufgetragen und mit der für den Tet-Transaktivator spezifischen Sonde rTetR hybridisiert. Zur Kontrolle der RNA-Proben wurde das Gel mit EtBr angefärbt, um die 28S- und 18S-rRNAs sichtbar zu machen.

Zum Nachweis des Tet-Transaktivatorproteins in Testesextrakten wurden Western-Blots durchgeführt. Es gelang trotz des Auftrennens von bis zu 100 µg Testiskernproteinen nicht, die entsprechende Proteinbande darzustellen. Es wurde ebenfalls versucht, primäre Testiszellkulturen mit einem Luciferase enthaltenden Responder-Konstrukt (TRE-Luc) zu transfektieren, um eine durch Dox regulierbare Wirkung des Transaktivators zu zeigen. Hier bestand das besondere Problem, daß eine Transfektion des TRE-Luc-Plasmids in prä- und postmeiotische Keimzellen erzielt werden mußte. Diese Zellen sind bekanntermaßen außerordentlich schwer zu transfizieren (Keime, 1993). Es wurden eine Reihe verschiedener Transfektionsreagenzien und Systeme getestet, u.a. das „Ballisto Magnetische Vektor System“. Hierbei wurden im „Centrum Somatische Gentherapie“ an der Freien Universität Berlin die Responderkonstrukte an Goldpartikel gebunden und unter Hochdruck durch die isolierten Zellen geschossen. Mit dieser Methode gelingt häufig die Transfektion von sonst nicht zu transfizierenden Zelltypen. Es gelang jedoch mit keinem der verwendeten Systeme eine Transfektion von Responderkonstrukten und der Nachweis von Luciferaseaktivität. Neben dem positiven Northern-Blot blieb also nur die Sequenzkontrolle der integrierten DNA als Nachweis der Integrität des inserierten Konstruktes. Dazu wurde genomische DNA

positiver Mäuse isoliert, der entsprechende DNA-Abschnitt des Vektors über PCR amplifiziert und das Produkt mit verschiedenen zur Verfügung stehenden Primern sequenziert. Der gesamte rtTA-codierende Bereich konnte gelesen werden und zeigte keine Fehler. Da für die Aktivierung der Responderkonstrukte nur wenige Transaktivatormoleküle pro Zelle benötigt werden, entschieden wir uns trotz des fehlenden Beweises der Existenz eines funktionsfähigen Proteins für die Verwendung der Mauslinie für weitere Züchtungen.

3.4 Tet-Responder, Klonierung verschiedener Effektorgene zur Reduzierung der Transkriptmenge von Prm3

Neben dem unter 3.4 beschriebenen Transaktivator mußte als zweite Komponente des transgenen Tet-Systems Responder-Linien erzeugt werden. Die transgenen Responder-Linien sollten Effektor-Moleküle exprimieren, die über verschiedene Mechanismen eine reversible Reduzierung der Genexpression von Prm3 (Prm1) erreichen. Die Effektormoleküle, ebenfalls mRNAs, sollten zu einer Reduktion der Transkriptmenge des Zielgens und somit zu einer verringerten Proteinexpression führen. Verschiedene DNA-Konstrukte wurden in das bidirektional exprimierende „response“-Plasmid pBI kloniert. Der Promotor bi-1 stellt eine Variante des TRE-Promotors dar (Baron et al., 1995). Er erlaubt eine gleichzeitige äquimolare Expression zweier Gene mit Hilfe eines Tetracyclin- oder Doxycyclin-abhängigen Aktivators. Dadurch ist es möglich neben der Effektor-RNA auch das Reporter-gen Luciferase zu exprimieren, um über eine direkte Kontrolle der Expressionsstärke zu verfügen.

3.4.1 Klonierung eines Prm3 „Antisense“-Konstruktes

Als eine Möglichkeit zur Repression der Prm3-Expression sollte die Wirkung der Expression von „Antisense“-Transkripten untersucht werden. Hierzu wurde die Prm3-cDNA (NotI → BamHI in pBSC SKII) in den Vektor pBI gebracht. Zur Transkription einer „Antisense“-Prm3-mRNA mußte die cDNA aus pBSC mit ATG zum 3'-Ende in MCS I von pBI kloniert werden, der hier noch den β -Globin 3'-UTR (vgl. 3.4.2) enthält. Zur Kontrolle der Prm3 „Antisense“- Expression (vgl. 3.4.2) wurde Luciferase XbaI/XhoI aus pGL3 ausgeschnitten und XbaI/ Sall in die MCS II von pBI gebracht. Nach dem Test der regulierbaren

Luciferaseaktivität nach Kotransfektionen von NIH/3T3-Zellen wurde die DNA des pLucBiAS-Konstruktes für die Mikroinjektion vorbereitet.

3.4.2 Klonierung von Prm3-spezifischen Ribozymen

Aufgrund der *in vitro*-Spaltungen wurden die gegen Prm3 gerichteten Ribozyme Rz1, Rz3 und Rz4 (3.1.3.1) für die weiteren Versuche in Expressionsvektoren bzw. in das Tetracyclin/Doxycyclin induzierbare Expressionssystem kloniert. Die Ribozymkonstrukte erhalten bei der endogenen Transkription 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche, sie stellen deshalb „Minigene“ dar.

Die Expression der Ribozyme über das Tet-System sollte unter Verwendung des Vektors pBI erfolgen. Das Reportergen Luciferase wurde mit XbaI/XhoI aus dem Plasmid pGL3-basic (Fa. Promega) ausgeschnitten und XbaI/ Sall in die MCS II von pBI gebracht. An die DNA-Templates der Ribozyme wurde per PCR an das 3'-Ende eine NheI-Schnittstelle angefügt, die PCR-Produkte wurden dann NheI/ „blunt-end“ in MCS I von pBI kloniert. Der ursprünglich in MCS I von pBI vorkommende β -Globin 3'-UTR-Bereich wurde durch den „Bovine Growth Hormone“ (BGH) 3'-UTR ersetzt. Der BGH 3'-UTR ist erheblich kürzer als der des β -Globin-Gens, außerdem wurde der BGH 3'-UTR bereits erfolgreich für transgene Expression in Keimzellen benutzt (Nayernia, 1992). Der BGH 3'-UTR wurde XbaI (aufgefüllt)/XhoI aus dem Vektor pIRES (Fa. Clontech) ausgeschnitten und HincII (aufgefüllt)/XhoI in die MCS I von pBluescript SKII gebracht. Von dort aus wurde das Fragment EcoRV/ApaI in den Vektor pBI kloniert, wodurch der β -Globin 3'-UTR ersetzt wurde. Die Ribozymkonstrukte konnten nun über die angehängte NheI-Schnittstelle NheI/ „blunt-end“ in richtiger Orientierung in die durch Reste der pBluescript MCS z. T. veränderte MCS I von pBI eingebaut werden. Die Abb. 3.12 verdeutlicht das Konstrukt, das die Ribozyme als Minigen enthält.

Die vollständigen Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Die Funktionalität des Luciferasegens in MCS II im Kontext der regulierbaren Expression wurde in Zellkulturexperimenten getestet. NIH/3T3-Fibroblasten wurden mit dem Aktivatorplasmid pTet-On und den Luciferase enthaltenen Respondern (LucBiRz1, 3 und 4) transfektiert.

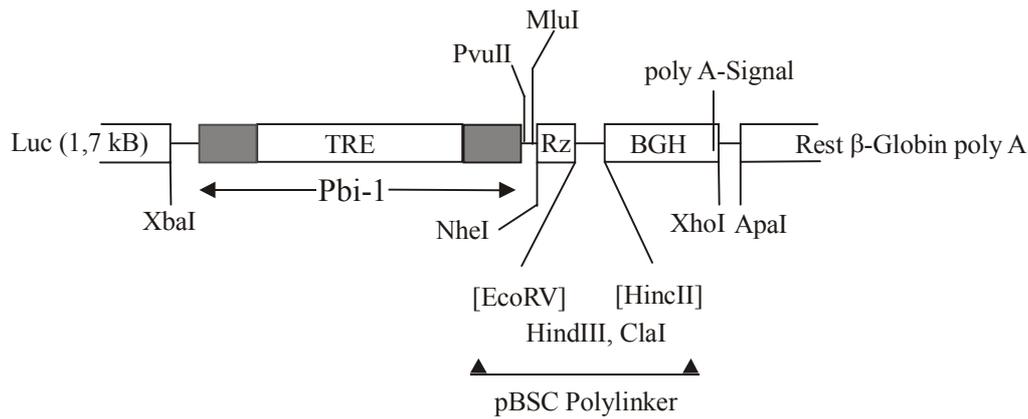


Abb. 3.12: Darstellung des Klonierungsschemas zur simultanen Expression des Reportergens Luciferase (Luc) und zur Transkription der Ribozyme Rz1, Rz3 und Rz4 (Rz) über den Tet-Vektor pBI (LucBiRz). Die vom CMV-Promotor stammenden Bereiche des abhängigen bidirektionalen Promotors bi-1 sind grau unterlegt. Inaktive Restriktionsschnittstellen sind in Klammern gesetzt.

Da der ursprüngliche humane β -Globin 3'-UTR in den pBI-Konstrukten durch den BGH 3'-UTR ersetzt worden war (s.o.), mußte die 3'-liegende Expressionskassette erneut überprüft werden. Dazu wurde neben dem oben beschriebenen (Abb. 3.12) für das Konstrukt pBiRz3 ein weiteres Konstrukt kloniert, in dem die Luciferase cDNA zwischen Pbi-1 und Ribozym kloniert wurde (Abb. 3.13: BiLucRz3).

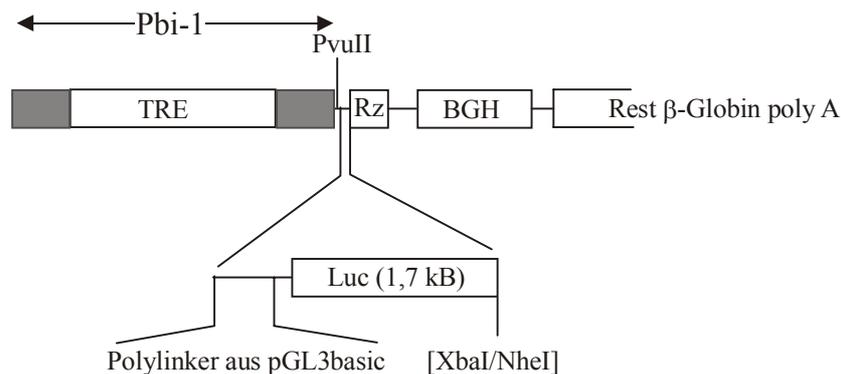


Abb. 3.13: Expressionskonstrukt zur Kontrolle der 3'-Aktivität (MCS I) des bidirektionalen Promotors und der Funktionalität des einklonierten BGH 3'-UTR (BiLucRz3).

Zur Berechnung des Aktivierungsfaktors wurde mit pCMV- β -Gal kotransfiziert, um die Luciferasewerte über die Transfektionseffizienz normalisieren zu können. Tab. 3.1 zeigt die

Induzierbarkeit von Luciferase in beiden MCS des bidirektional exprimierenden Vektors; einmal für die Konstrukte mit Luciferase zwischen Pbi-1 und Ribozym (pBiLucRz3) zur Überprüfung der modifizierten Expressionskassette sowie für die eigentlich zur Mikroinjektion vorgesehenen Ribozym-Konstrukte mit Luciferase und Ribozym an je einer Seite des Pbi-1 (LucBiRz3).

Tab. 3.1: Luciferaseaktivität in Proteinextrakten von NIH/3T3-Zellen nach doppelt transienter Transfektion eines Transaktivatorkonstruktes (pTet-On) und eines bidirektionalen Responderkonstruktes:

Responder	Luciferaseaktivität/ μ g Protein nach 20 h Dox [RLU]	Luc-/ β -Gal-Aktivität [RLU] \emptyset Dox; +Dox	resultierender Aktivierungsfaktor
pBiLucRz3	ca. 500.000	0,8 ; 13	16,3
pLucBiRz3	ca. 500.000	0,5 : 8,7	17,2

Da die Induktion der Luciferaseexpression und somit auch der Rz-Minigene durch Dox gegeben war, konnten die Konstrukte LucBiRz für die Mikroinjektion in befruchtete Oocyten zur Herstellung transgener Responder-Mäuse vorbereitet werden. Dazu wurde das nicht benötigte Vektorrückgrat mit den Restriktionsenzymen ApaI, BstEII und ApaLI verdaut und die Konstrukte zur Mikroinjektion aufgereinigt.

3.4.3 Klonierung von Konstrukten zur „RNA-Interference“

Eine weitere Möglichkeit zum gezielten Abbau von mRNA besteht in der sog. RNA-Interference (RNAi) (siehe Einleitung). Zur endogenen Synthese von dsRNA wurden zwei verschiedene Expressions-Konstrukte kloniert:

- 1.) SBiAS („Sense“ Bi „Antisense“)
- 2.) SASBiLuc

Beim SBiAS-Konstrukt wird die dsRNA über eine *intermolekulare* Hybridisierung gebildet. Hier ist keine Kontrolle über parallel exprimierte Luciferase möglich. Beim SASBiLuc-Konstrukt wird über eine *intramolekulare* Hybridisierung eine „hairpin“-Struktur mit dsRNA-Abschnitt gebildet. Hier kann die freie MCS I zur Luciferaseexpression genutzt werden. Die

Abb. 3.14 verdeutlicht den Ablauf der Bildung des Effektormoleküls nach der Induktion der Transkription.

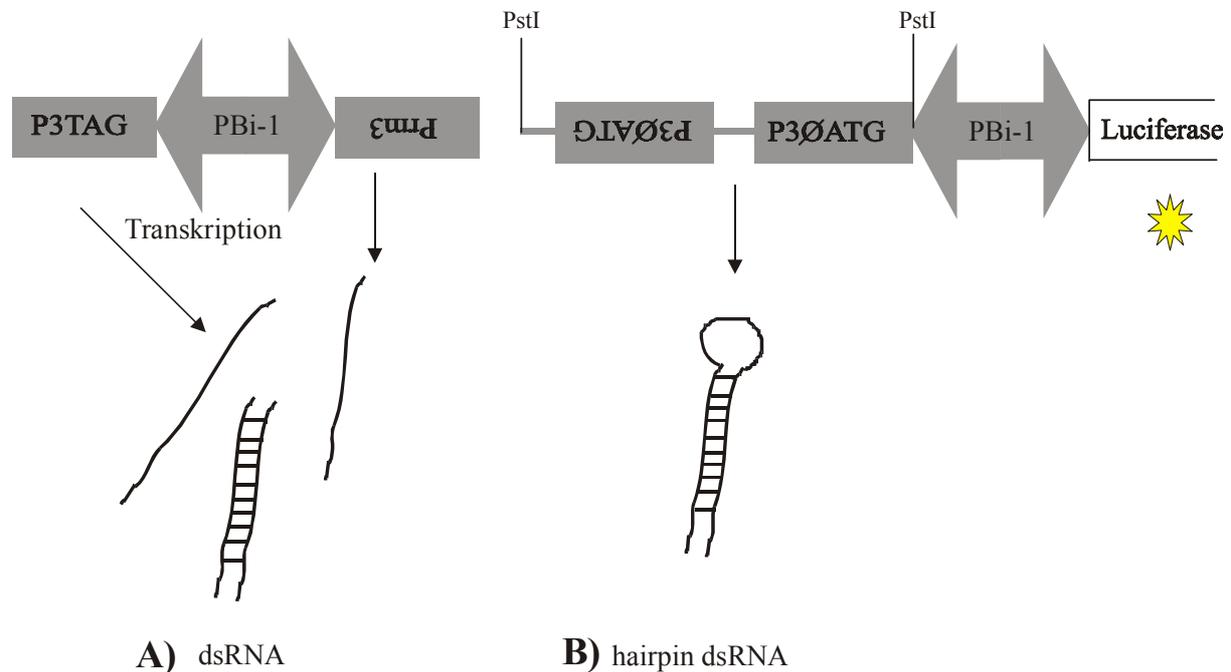


Abb. 3.14: Möglichkeiten der Transkription von RNAi-Effektormolekülen. **A:** Hybridisierung zu dsRNA nach Transkription einer „Sense“ und einer „Antisense“-RNA. **B:** Intramolekulare Hybridisierung unter Ausbildung einer Haarnadelschleife.

Grundlage zur Klonierung des Konstruktes SBiAS war das „Antisense“-Prm3 (AS) exprimierende Konstrukt pLucBiAS (3.4.1). Die in MCS II klonierte Luciferase cDNA wurde durch Prm3 ersetzt, dessen cDNA etwa 200 bp nach ATG ein Stopcodon enthielt (P3TAG), um eine Translation der „sense“-RNA (S) auszuschließen (Generierung des Stopcodons siehe 3.6).

Die Herstellung des zweiten RNAi-Konstruktes erfolgte unter Verwendung des Konstruktes P3ØATG (Prm3-cDNA ohne Translationsstartpunkt, siehe 3.5) In pGEMT lag P3ØATG durch die erfolgte AT-Klonierung in zwei Orientierungen vor. Die cDNA 5'→3' wurde SstI/SstII aus dem Vektor pGEMT ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen eines pBSC kloniert, der bereits P3ØATG (BamHI → NotI) enthielt. Dadurch ergab sich eine „Sense-Antisense“-Orientierung. Die Ausbildung der Haarnadelschleife kann über die mitklonierten MCS-Teile des Vektors pGEMT erfolgen. Durch die über die MCS von pGEMT stromaufwärts eingeführte zweite PstI-Schnittstelle war eine Klonierung des SAS-Konstrukts über PstI in die MCS II des Vektors pBI möglich.

3.4.4 Tet Responder Mauslinien

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Tet-Responder-Konstrukte in befruchtete Oocyten mikroinjiziert:

- LucBiRz1 konditionale Expression eines Ribozyms gegen das GUC-Triplet Nr. 1
- LucBiRz3 konditionale Expression eines Ribozyms gegen das GUC-Triplet Nr. 3
- LucBiRz4 konditionale Expression eines Ribozyms gegen das GUC-Triplet Nr. 4
- LucBiAS konditionale Expression einer Prm3 „Antisense“-RNA
- SBiAS konditionale Expression eines „Sense/Antisense“-RNAi-Konstruktes

Die Nachkommen aus retransferierten Oocyten wurden über den Dot-Blot genomischer DNA (siehe 2.16.1.1) unter Verwendung der Sonden Luc oder TRE (siehe 2.8.3) auf die Integration der verschiedenen Konstrukte getestet. Die erhaltenen Dot-Blot positiven F₀-Tiere aller Konstrukte sind in Tab. 3.2 zusammengefaßt.

Für die weitere Arbeit mußten von allen Linien jeden Konstruktes diejenigen ausgesucht werden, die die höchste induzierbare Expression (Luciferase und Ribozym) erzielen lassen. Hierzu wurden für die meisten Linien primäre Fibroblastenkulturen angelegt und der Tet-Transaktivator transient transfektiert. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, ob das Responder-Konstrukt in einer Weise integriert ist, die eine Dox-induzierbare Expression ohne Hintergrund zuläßt, ohne daß die Zucht doppelt transgener Linien abgewartet werden muß. Lediglich F₀-Tiere von Konstrukten, für die nur ein einziges F₀-Tier erhalten wurde (LucBiAS, LucBiRz4) oder die kein Luciferase-Reportergen enthielten (SBiAS) wurden ohne weitere Tests verpaart.

Die Isolierung und Kultivierung primärer Fibroblasten wurde wie unter 2.26.2 beschrieben durchgeführt. Nachdem genug Zellen in Kultur gewachsen waren (mind. vier Schälchen einer 12Well Platte), wurden sie mit CMVTet-On transfektiert. Der CMV-Promotor ist in primären Fibroblasten aktiv (Kistner et al., 1996). Die Luciferaseaktivität wurde 48 h nach der Transfektion gemessen, wobei zwei der vier Schälchen mit Dox inkubiert worden waren. Wenn Luciferaseaktivität nach Transfektionen nachzuweisen war, erfolgte der Vergleich verschiedener Mauslinien über die Messung der β -Galactosidaseaktivität als Normalisierung der Transfektionseffizienz. Tiere, deren Luciferaseexpression über Dox regulierbar war, zeigten in keinem Fall eine Hintergrundaktivität ohne die Zugabe von Dox.

Tab. 3.2: Zusammenfassung der bisher mikroinjizierten Responderkonstrukte und der getesteten transgenen Tiere.

Konstrukt	NKO (F ₀)	transgen	Expression	weitergeführte Linien (Nr.)	ungefähre Kopienzahl	Besonderheit
LucBiRz1	103	18	9	40	13	
				92	15	
				99	18	Expression konstitutiv
LucBiRz3	87	7	4	9	7	
				34	20	Y-chromosomal integriert
				62	8	
LucBiRz4	115	1	1	1	20	
LucBiAS	97	1	1	1	16	
SBiAS	105	5	XXXXX	20	10	
				51	8	

Mikroinjizierte Responderkonstrukte (**Konstrukt**); erhaltene Nachkommen nach Retransfers (**NKO F₀**); Anzahl der transgenen F₀-Nachkommen (**transgen**); Luciferaseexpression in Ohrfibroblastenkultur (**Expression**) und Nr. der **weitergeführten Linien** mit abgeschätzter **Kopienzahl** des Transgens

Bei neun der 18 auf Luciferaseexpression getesteten Dot-Blot positiven F₀-Tiere des Konstruktes LucBiRz1 konnte Luciferaseaktivität nachgewiesen werden. Zwei der auf Expression getesteten Tiere des Konstruktes LucBiRz1 zeigten eine konstitutive Luciferaseexpression, unabhängig von der Transfektion eines Aktivorkonstruktes und der Induktion mit Dox. Von diesen wurde die stärker exprimierende Linie (LucBiRz1/99) als Positivkontrolle weitergezüchtet. Zwei weitere Linien (Nr. 40 und 92), die nach der Induktion mit Dox die höchsten Luciferasewerte in der Fibroblastenkultur aufwiesen, wurden weiterverpaart; die Linie mit der höchsten ermittelten Expression (LucBiRz1/92) mit der Transaktivatorlinie PGK2Tet-On, das Tier LucBiRz1/40 zum Erhalt der Linie mit NMRI Wildtyp.

Bei den positiven F₀-Tieren des Konstruktes LucBiRz3 wiesen vier (Nr. 15, 28, 34 und 62) eine in der Zellkultur nach der Transfektion mit dem Transaktivorkonstrukt nachweisbare Luciferaseaktivität auf. Zwei dieser Linien enthielten aber nur wenige Kopien des Responderkonstruktes (< 10), positive Tiere waren deshalb im Dot-Blot schlecht zu bestimmen. Insgesamt wurden drei Linien weitergeführt (15, 34 und 62). Eine der weiter verwendeten Linien (LucBiRz3/34) vererbt das Responderkonstrukt Y-chromosomal, was nach der ersten meiotischen Teilung die Expression des Konstruktes allenfalls in der Hälfte

der Spermatozyten ermöglicht. Wegen des möglichen Austausches vor allem von mRNA zwischen den Keimzellen („transcript sharing“; z.B. Caldwell und Handel, 1991) wurde die Linie trotzdem weitergeführt, da sich eine Expression der Ribozyme durchaus auf alle Keimzellen auswirken könnte.

Die Nachkommen der zwei zunächst verpaarten „Founder“ der Konstrukte LucBiRz4 und LucBiAS zeigten nach der Transfektion mit dem Transaktivator-konstrukt Luciferaseaktivität. Beide Linien wurden weitergezüchtet und mit der vorhandenen Transaktivatorlinie (PGK2Tet-On) verpaart.

Von den fünf nach der Oocyteninjektion mit dem Konstrukt SBiAS erhaltenen positiven Tiere konnten vier verpaart werden. Da ein schnelles Nachweissystem der Expression fehlte, wurden nur zwei der Linien (die positiven Tiere der Linien 20 und 51 waren wegen der höheren Kopienzahl besser zu detektieren) weitergeführt.

Die Abschätzung der Kopienzahl (Zusammenstellung in Tab. 3.3) der integrierten Fragmente erfolgte durch den Vergleich der Signalstärken in Dot-Blots (genomische DNA positiver Tiere verglichen mit einer Plasmid-DNA-Eichreihe, siehe 2.16.1.2). Die Bestimmung der Kopienzahl des integrierten Konstruktes wird hier am Beispiel der positiven Linien LucBiRz1/99 und LucBiRz3/15 dargestellt. Die Abb. 3.15 zeigt den Vergleich der Signalstärken mittels eines Phospho-Imagers. Die Signale wurden über gleich große Quadrate integriert und die Meßwerte gegen eine Eichkurve aus definierten Dots einer Plasmidreihe aufgetragen. Die Abschätzung der Kopienzahl erfolgte, indem die Größe des mikroinjizierten Fragments zur Genomgröße der Maus in Beziehung gebracht wurde (siehe 2.16.1.2). Die Abb. 3.15A, B und die Tab. 3.3 veranschaulichen das Vorgehen an einem Beispiel. Die Auftragung der Kontrollplasmide mußte für jeden Test erneut mitgeführt werden, sie erlaubt nur für den jeweiligen Blot Aussagen über Kopienzahlen. Um Signalstärken innerhalb des linearen Bereichs der Eichkurve zu erreichen, wurde die DNA mancher Linien verdünnt (hier LucBiRz1/99 1:2). Um Pipettier- und Meßfehler zu minimieren, wurden Durchschnittswerte mehrerer Tiere einer Linie zur Messung der Kopienzahl verwendet.

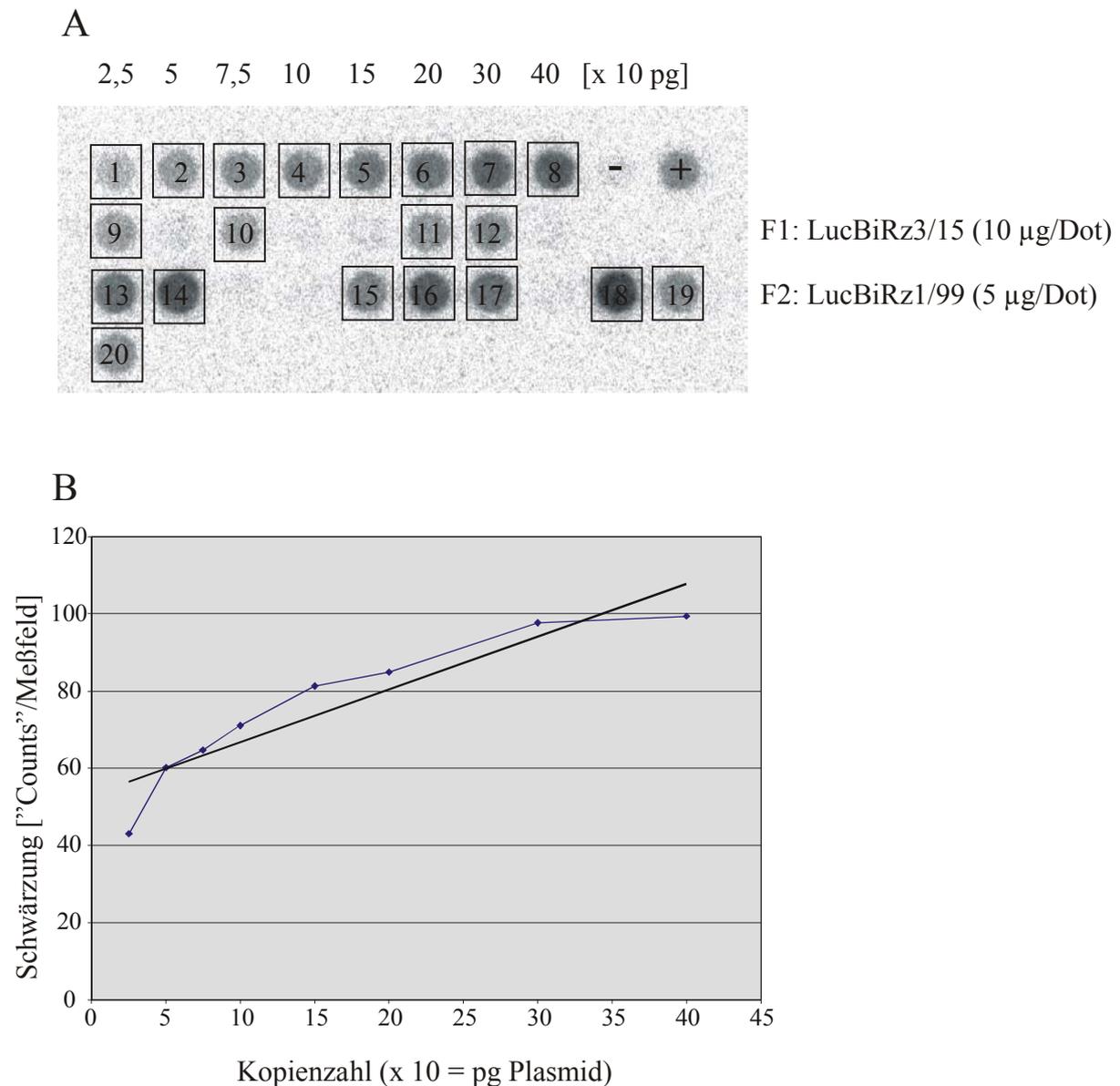


Abb. 3.15: **A:** Dot-Blot mit genomischer- und Plasmid-DNA. Festlegung der Meßfenster zur Schwärzungsmessung. Die oberste Reihe enthält die Plasmidreihe (25-400 pg) sowie eine Negativ (-)- und eine Positivkontrolle (+) aus genomischer DNA. Die unteren Reihen enthalten DNA von Nachkommen verschiedener transgener Linien. **B:** Auftragung der im Phospho-Imager gezählten „geschwärzten“ Pixel gegen die der Kopienzahl entsprechende Plasmid-DNA. Bei der Integration eines 3 kb DNA-Fragments in das Genom der Maus (3000 Mb) entspricht das durch 10 pg Plasmid hervorgerufene Signal dem Signal einer in das Genom integrierten Kopie.

Tab. 3.3 faßt die Werte eines Blots zur Kopienzahlbestimmung zusammen. Für die Linie LucBiRz3/15 wurde eine Kopienzahl von sieben, für die Linie LucBiRz1/99 eine Kopienzahl von 18 ermittelt.

Tab. 3.3A: Densitometrische Bestimmung der Strahlungsintensität der Plasmidreihe des Dot-Blots (Abb. 3.15A) und Festlegung der entsprechenden Kopienzahl bei einem 3 kb-Fragment

Feldname	detektierte Pixel (x Mio)	µg Plasmid	entspr. Kopienzahl
1	43	25	2,5
2	60,2	50	5
3	64,7	7,5	7,5
4	71,1	100	10
5	81,3	150	15
6	84,9	200	20
7	97,7	300	30
8	99,4	400	40

Tab. 3.3B: Auswertung der Messungen der Signale verschiedener transgener Tiere entsprechend der im Dot-Blot mitgeführten Plasmidreihe (Abkürzung der Konstrukte LucBiRz: Rz)

Feldname	Schwärzung	[µg] genom. DNA	Kopienzahl
9	55,5	10; Rz3/15 Tier Nr. 1	6,4 → 7
10	54,7	10; Rz3/15 Tier Nr. 3	6,3 → 7
11	65,8	10; Rz3/15 Tier Nr 6	7,6 → 7
12	69,5	10; Rz3/15 Tier Nr 7	8 → 7
13	88,3	5; Rz1/99 Tier Nr 1	20,4 → 18
14	111,6	5; Rz1/99 Tier Nr 2	-*
15	77,2	5; Rz1/99 Tier Nr 5	17,8 → 18
16	105,1	5; Rz1/99 Tier Nr 6	-*
17	92,3	5; Rz1/99 Tier Nr 7	21,3 → 18
18	125	5; Rz1/99 Tier Nr 9	-*
19	73	5; Rz1/99 Tier Nr 10	16,8 → 18
20	65,9	5; Rz1/99 Tier Nr 11	15,2 → 18

*Signale dieser Stärke zeigen Homozygotie für das transgene Konstrukt LucBiRz1 an. Diese Annahme wurde durch die ebenfalls verdoppelte Luciferaseaktivität in Geweben und durch Rückkreuzungsexperimente bestätigt.

3.4.5 Versuch des Nachweises der regulierbaren Expression der Responderkonstrukte in doppelt transgenen Mäusen

Es wurden verschiedene Responderlinien mit der keimzellspezifisch exprimierenden Transaktivatorlinie (PGK2Tet-On, siehe 3.3.2) verpaart. Getestet wurden doppelt transgene männliche Mäuse der Linien LucBiz1/92/Tet-On, LucBiz4/Tet-On und LucBiAS/Tet-On. Es wurden in der Regel heterozygote, in einigen Fällen auch doppelt homozygot transgene Tiere bezüglich beider Transgene verwendet. In Vorversuchen sollte zunächst die Dox-abhängige

Luciferaseexpression gezeigt werden. Dazu wurde den Tieren sieben bis zehn Tage Dox in einer Konzentration von 2 mg/ml in das Trinkwasser gegeben (um die Lösung schmackhaft zu machen wurden 4 % (w/v) Saccharose zugesetzt). Die Dox-Lösung wurde alle drei Tage erneuert. Laut Literaturangaben (Kistner et al., 1996) wird die volle Expression des Reportergens auf diese Weise nach 24 h in den meisten Organen induziert. Nach mindestens sieben Tagen Induktion wurden die Tiere abgetötet und die Luciferaseaktivität in den Gewebeproteinextrakten gemessen. Als Positivkontrolle wurde die Luciferaseaktivität von Geweben der konstitutiv exprimierenden Linie LucBiRz1/99 mitgeführt. Hier war die Expression in der Ohrfibroblastenkultur unabhängig von einem Aktivator (unveränderte Werte nach Transfektion eines Transaktivatoronstruktes und anschließender Induktion mit Dox). In den Luciferase-Messungen in Extrakten aus verschiedenen Geweben der Linie LucBiRz1/99 variierten die Meßwerte sehr stark. Während in Extrakten von Leber, Milz und Niere nur etwa 15-20 RLU/ μ g Protein gemessen wurden, konnten in Testesextrakten im heterozygoten Tier 2000-2500 RLU/ μ g Protein nachgewiesen werden. Die Luciferaseaktivität verdoppelte sich hier erwartungsgemäß in homozygoten Tieren.

Die erwartete Induktion der Luciferaseaktivität in den doppelt transgenen Tieren konnte nicht reproduzierbar gezeigt werden. Luciferaseaktivität konnte in der Linie LucBiAS/Tet-On trotz der vorher gut nachweisbaren Luciferaseexpression in der Zellkultur und trotz des Einsatzes von doppelt homozygoten Tieren nicht nachgewiesen werden (es wurden 8 Männchen getestet). Für die Linie LucBiRz1/92/Tet-On konnte nur bei einer von zehn getesteten induzierten Mäusen eine testisspezifische Luciferaseaktivität gezeigt werden. Eine meßbare unspezifische Hintergrundaktivität ohne die Induktion mit Dox trat nicht auf. Von der Linie LucBiRz4/Tet-On wurden insgesamt 12 männliche Tiere getestet. Nur sechs der Tiere zeigten nach Induktion über verschiedene Zeiträume (7–21 Tage) eine Luciferaseexpression. Bei dieser Linie wurde einmal eine Luciferaseaktivität in Testisextrakten festgestellt, ohne daß eine vorherige Induktion durch Dox stattgefunden hatte. Während in Testesextrakten der konstitutiv exprimierenden Linie (s.o.) ca. 4000 RLU/ μ g Protein (homozygote Tiere) erreicht wurden, zeigten die induzierten und positiv getesteten Tieren der Linie LucBiRz4/On nur 10-20 RLU/ μ g Protein. Um die Möglichkeit einer unzureichenden Dox-Aufnahme aus dem Trinkwasser auszuschließen, wurde Dox außerdem durch Injektion intraperitoneal und in den Testis verabreicht (0,1 ml; 1 mg/ml). Auch nach dieser Behandlung konnte 48 h nach Induktion keine Aktivierung nachgewiesen werden. Der Nachweis ausreichender Dox-Konzentration im Testisgewebe gelang unter Verwendung von Testisgewebeextrakten von Dox-induzierten Mäusen (6 Tage; 2 mg/ml) in Zellkulturexperimenten. Die vollständige

Repression der Tet-Off-regulierten (vgl. 1.3) Luciferaseexpression der CHO-Zelllinie AA8 (Fa. Clontech) konnte unter Zugabe von 1 µg Testisextrakt (1:2 verdünnt in PBS) zu 1 ml Medium erreicht werden (Messung 48 h nach der Zugabe von Dox). Die maximale Aktivierung des Tet-On-Systems (transiente Transfektion des Aktivatorbausteinbaues Tet-On in die stabil TRE-Luc enthaltende Responderlinie Nr. 30, vgl. 3.9.3.2) trat nach der Zugabe von 5 µl des Extraktes ein. Da die für die vollständige Repression bzw. Aktivierung notwendige Dox-Konzentration aus Zellkulturexperimenten bekannt ist (z.B. Urlinger et al., 2000), konnte die im Testisextrakt enthaltene Dox-Konzentration abgeschätzt werden. Sie muß demnach 1-1,5 mg/ml enthalten haben und liegt damit 1000fach höher als zur Aktivierung des Tet-On-Systems notwendig ist. Die Transaktivatorlinie PGK2Tet-On ist demnach inaktiv. Die Mikroinjektion eines Transaktivatorbausteinbaues mußte also wiederholt werden (siehe 3.9.7).

3.5 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen Prm3

Ziel der Versuche war es, ein polyklonales Antiserum zu erzeugen, um damit ein Reagenz für immunologische Nachweismethoden, wie etwa für die Abnahme der Prm3-Menge nach Ribozymbehandlung oder die exakte Lokalisierung von Prm3 in Zellen zu haben.

Mehrere Versuche zur Herstellung eines Antiserums gegen Prm3 der Ratte (Schlüter, 1996) führten zu keinem Serum, mit dem sich Prm3 gesichert nachweisen ließ. Es war versucht worden, Prm3 der Ratte zur Immunisierung als His-Tag-Protein in *E. coli* zu exprimieren und aufzureinigen (pQE-Vektor, Fa. Qiagen). Weiter wurde erfolglos eine DNA-Vakzinierung versucht (Tang et al., 1992; Barry et al., 1994). Auch die Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Peptid aus Prm3 führte nicht zum Erfolg. Für die vorliegende Arbeit wurde ebenfalls zunächst versucht, Prm3 (Maus) in *E. coli* zu exprimieren. Nachdem jedoch die Induktion der Proteinexpression mit IPTG zu keiner zusätzlichen Bande in der SDS-PAGE führte (nicht abgebildet), wurde auf ein eukaryotisches Expressionssystem umgestellt und versucht, ein GST/Prm3 Fusionsprotein in *Saccharomyces cerevisiae* herzustellen. Dazu wurde der zur Expression in Hefen umgewandelte Vektor pYGEX verwendet, der aus dem Vektor pGEX (Fa. Stratagene) hervorgeht, aber einen Lactose-induzierbaren Hefepromotor, einen Hefe-Replikationsstartpunkt und einen entsprechenden Selektionsmarker besitzt. Zur Klonierung wurde die in pBSC enthaltene codierende Sequenz von Prm3 mit den Primern M13 Reverse und P3woABa amplifiziert und ein PCR-Produkt erzeugt, in dem das Prm3-ATG entfernt und an dessen Stelle eine BamHI-Schnittstelle eingefügt war. Das Fragment

wurde über AT-Klonierung in den Vektor pGEMT gebracht. Dessen MCS enthält keine BamHI-Schnittstelle. Ein richtig orientiertes Prm3-Fragment konnte deshalb von hier über die neue Schnittstelle BamHI und SalI ohne Veränderung des Prm3-Leserahmens in den Vektor pYGEX umkloniert werden. Das Protokoll zur Induktion der Expression und der Aufreinigung des Fusionsproteins wurde im Kapitel 2.22 ausführlich beschrieben. Die Abb. 3.16A zeigt in einer SDS-PAGE aufgetrennte Aliquots einzelner Waschfraktionen. Die Abnahme der Ausbeute an Fusionsprotein begann mit der vierten Elution der GST-Sepharose. Die Aufreinigung des GST-Prm3-Fusionsproteins über Glutathion-Sepharose führte zu einem Eluat, das ausschließlich Fusionsprotein und in geringem Maße Degradationsprodukte enthielt. Die Ausbeute an rekombinantem Protein war jedoch sehr gering. Im Durchschnitt wurden etwa 2-4 mg Fusionsprotein aus 4 l Hefekultur erhalten. Mit dem erhaltenen Eluat konnten nach Dialyse (z.T. erst nach Aufkonzentrierung durch Acetonfällung) zwei Kaninchen (Nr. 300 und 301) immunisiert werden (siehe 2.22.6). Die Seren beider Tiere wurden zunächst über den Vergleich der Erkennung von isoliertem Fusionsprotein gegenüber dem jeweiligen Präimmuns serum getestet (nicht abgebildet). Die Größe (etwa 54 kD) der nur von den Immuns eren erkannten Bande wurde parallel durch eine Immunodetektion mit GST-spezifischem Antikörper verifiziert (Abb. 3.16B).

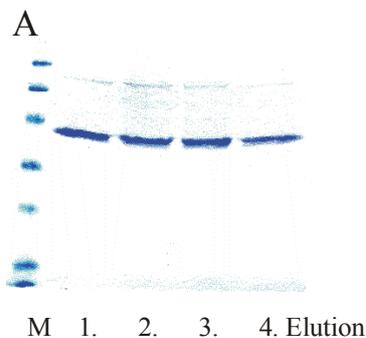


Abb. 3.16 A: Aufreinigung des rekombinanten Maus- Prm3 über Glutathion-Sepharose und Test des erhaltenen Immuns erums (GP300). **A:** Darstellung des Fusionsproteins GST-Prm3 im SDS-PAGE, Anfärbung durch Coomassie-Blau: Aufgetragen sind je 20 μ l aus 1 ml Eluat. In der Regel nahm die Proteinausbeute nach der vierten

Mit den vorhandenen Seren ließ sich ebenfalls Prm3 nachweisen. In der Abb. 3.16C ist die Detektion in der Prm3-exprimierenden Zelllinie P3/5 (siehe 3.6) und -wenn auch sehr schwach- in Gesamtproteinextrakten aus Testis (Maus, Stamm NMRI) gezeigt.

Die spezifische Expression von Prm3 im Testis, die durch Northern-Blots bereits gezeigt worden war (Schlüter, 1996), konnte im Western-Blot bestätigt werden (Abb. 3.17).

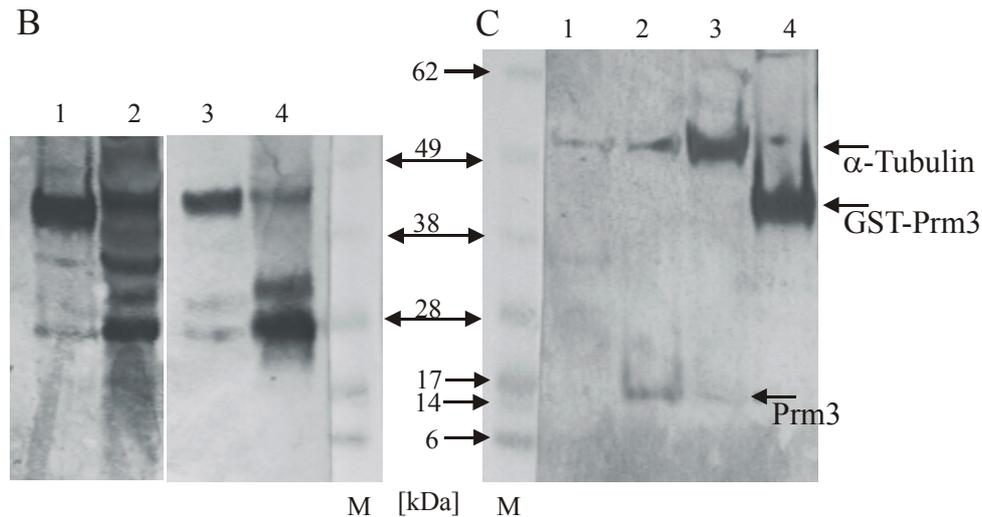


Abb. 3.16: B: Spuren 1 und 3: Detektion des GST-Prm3-Fusionsproteins durch das Immunsereum GP300 (1:100 verdünnt) und (Spuren 3 und 4) durch einen GST-spezifischen Antikörper (1:1000) im Western Blot. Die Spuren 1 und 3 des SDS-PAGE enthielten 5 μ l der GST-Prm3-Elution, die Spuren 2 und 4 enthielten 50 μ g Hefe-Gesamtprotein (nach der Aufreinigung des Fusionsproteins aus dem Gesamtextrakt). **C:** Detektion von Prm3 durch das Immunsereum. Spur 1: (Negativkontrolle) enthält 25 μ g Gesamtprotein aus NIH/3T3-Fibroblasten; Spur 2: 10 μ g Gesamtprotein einer Prm3 exprimierenden Zelllinie P3/5 (siehe 3.6.2); Spur 3: 50 μ g Testisprotein; Spur 4: (Positivkontrolle) aufgetragenes GST-Prm3-Fusionsprotein.

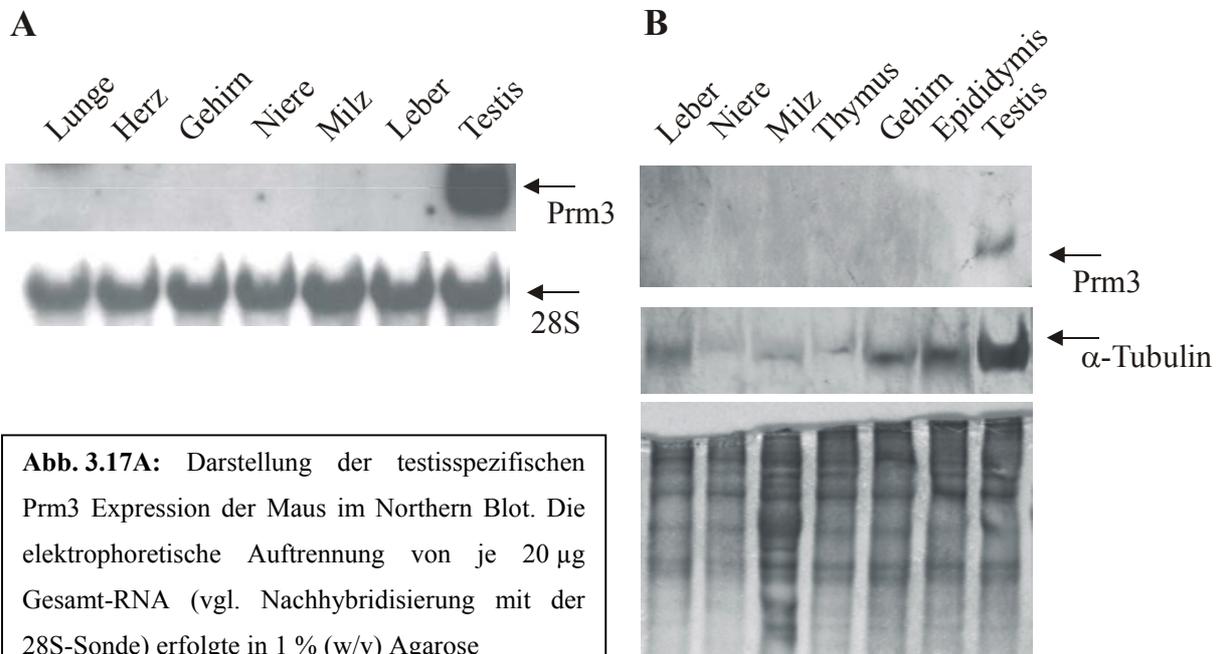


Abb. 3.17A: Darstellung der testisspezifischen Prm3 Expression der Maus im Northern Blot. Die elektrophoretische Auftrennung von je 20 μ g Gesamt-RNA (vgl. Nachhybridisierung mit der 28S-Sonde) erfolgte in 1 % (w/v) Agarose

Abb. 3.17B: Darstellung der testisspezifischen Prm3-Expression der Maus im Western Blot (Auftrennung von je 100 μ g Protein in 12 % Polyacrylamid). Die ungleichmäßige Kontrolldetektion mit α -Tubulin resultiert aus der großen Menge von Tubulin in den Spermien. Ein Vergleich der Proteinmengen ist nur über die Anfärbung des Gels mit Coomassie-Brilliant Blau (unteres Bild) möglich.

Die Seren der immunisierten Kaninchen detektierten Prm3 nicht mit gleicher Qualität. Da sich ein deutlich stärkerer Hintergrund bei Verwendung des Präimmunserums (nicht abgebildet) und des Immunsersums des Kaninchens 301 zeigte, wurde nur noch das Antiserum des Tieres 300 verwendet (vgl. 2.22.6). Die Abb. 3.18 zeigt den erheblichen Unterschied in der unspezifischen Markierung von Proteinen und in der spezifischen Markierung von Prm3 durch die Immunsereen der beiden Tiere.

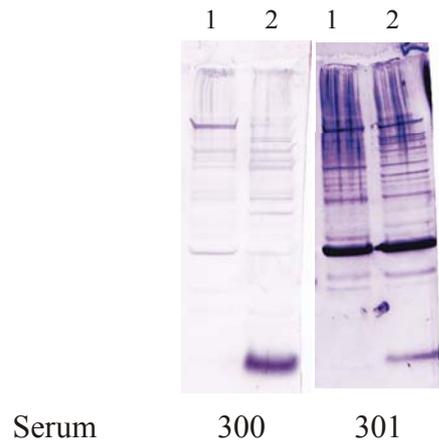


Abb. 3.18: Vergleich der Detektion von Prm3 durch die Seren der beiden immunisierten Kaninchen 300 und 301. Beide Blots enthalten 20 µg Protein/Spur (Spur 1: Gesamtprotein aus NIH/3T3-Zellen, Spur 2: Gesamtprotein der Prm3-exprimierenden Zelllinie P3/5, siehe 3.6.2).

Da das Serum des Kaninchens 301 sehr viel stärker unspezifischer bindet, waren lange Entwicklungszeiten einer Detektion mit NBT/BCIP (siehe 2.23.3) nach Verwendung dieses Serums nicht möglich. Der trotz des starken Signals der Testis-RNA im Northern-Blot niedrige Prm3-Proteingehalt von Testisextrakten (siehe Abb. 3.16C) wäre mit dem Serum 301 nicht gut zu detektieren.

3.6 Zellkultursystem zur Prm3-Expression

Parallel zu den Experimenten in transgenen Tieren sollte ein Zellkultursystem zur Expression von Prm3 etabliert werden. In dieser Zellkultur sollte versucht werden, die Wirkung der Ribozyme nach der Transfektion entsprechender Expressionskonstrukte nachzuweisen. Zunächst wurde versucht, die Prm3-cDNA (siehe 3.1.1) unter der Kontrolle des Cytomegalievirus-RNA-Polymerase-Promotors (CMV) stabil in NIH/3T3-Zellen zur Expression zu bringen (Vektor pCDNA3, Fa. Invitrogen, Prm3 cDNA BamHI/NotI). Nach der Selektion mit G418 wurden jedoch nur falsch positive Klone (etwa 50 wurden getestet) erhalten (G418 Resistenz, aber keine Expression von Prm3 im Northern-Blot sichtbar).

Des Weiteren wurde ebenfalls erfolglos versucht, ein Prm3-Konstrukt stabil zur Expression zu bringen (Vektor pcDNA3), das ein Stopcodon innerhalb der cDNA enthält (P3TAG). Hierzu wurde die Prm3-cDNA in zwei Hälften über PCR amplifiziert, wobei die internen Primer jeweils eine BfaI-Schnittstelle (GATC) einführen. Nach der Ligation der Fragmente entstand innerhalb des Leserahmens das Stopcodon GAT. Beide pCDNA-Konstrukte (Prm3 und Prm3TAG in pCDNA3) wurden später noch für transiente Transfektionen eingesetzt.

Um eine negative Wirkung der Prm3-Expression weiterzuvermindern, wurde für die weiteren Versuche ein Vektor mit schwächerem und zudem regulierbarem Promotor eingesetzt. Der Zink-induzierbare Metallothionin-Promotor (Glanville et al., 1981) des Plasmids pMT/EP (Burfeind et al., 1996) ermöglicht eine Selektion von stabilen Klonen mit einer weitaus schwächeren Expression. Die Prm3-cDNA wurde HindIII/NotI aus pBSC in den Expressionsvektor pMT/EP umklontiert, das Plasmid linearisiert und für die stabile Transfektion eingesetzt. Nach der Selektion mit Hygromycin B wurden die erhaltenen Klone zunächst wieder im Northern-Blot auf die Expression von Prm3 untersucht. Es wurden etwa 40 Klone auf ihre Expression und Induzierbarkeit getestet. Von diesen Klonen zeigten 15 eine Expression von Prm3, die jedoch in ihrer Stärke sehr unterschiedlich war, wie der Vergleich der Linien P3/5, P3/8, P3/11 und P3/14 (Abb. 3.19A) zeigt. Die Induzierbarkeit bzw. eine Verstärkung der Expression nach der Zugabe von ZnSO₄ zum Kulturmedium war nicht immer gegeben (siehe Abb. 3.19A, Klon P3/11). Die Prm3-Expression einiger Linien wurde näher untersucht. Zwei der untersuchten Linien P3/5 (Abb. 3.19A) und P3/8 zeigten eine starke und gut induzierbare Prm3-Expression im Northern-Blot. Diese Linien wurden deshalb auch auf Proteinebene untersucht. Die Induzierbarkeit läßt sich im Western-Blot (Abb. 3.19B) ebenfalls belegen.

Die auf diese Weise gewonnenen, stabil Prm3-exprimierenden Zellen bildeten als Ersatz zu Keimzellen die Grundlage für das Zellkultursystem zum Test der Ribozyme. Insgesamt zeigten auf RNA-Ebene fast alle getesteten positiven Zellklone ein schwächeres Northern-Blot-Signal für Prm3 als die immer zur Kontrolle in gleicher Menge aufgetragene Testis-Gesamt-RNA (es wurden 10-20 µg RNA aufgetragen). Im Western-Blot änderte sich dieses Bild. Während mit dem Serum des Kaninchens 300 Prm3 der stabilen Zelllinien bei einer Auftragung von 10 µg (vgl. Abb. 3.19) Gesamtprotein zu detektieren war, benötigte man 80-100 µg Testis-Gesamtprotein zum sicheren Nachweis von Prm3 (siehe Abb. 3.17).

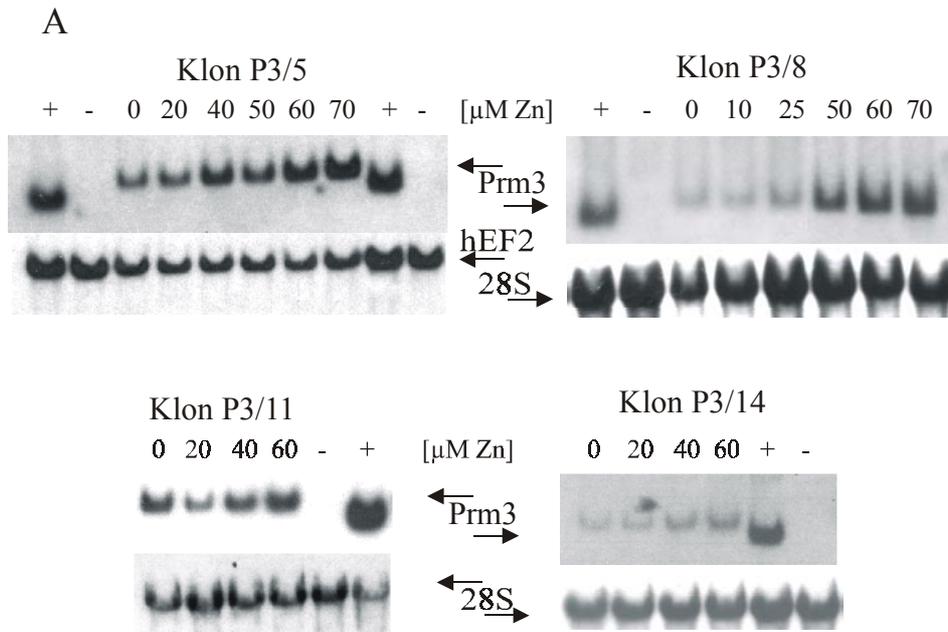


Abb. 3.19A: Nachweis der Prm3-Expression auf RNA-Ebene in stabilen Linien. Auftrennung von jeweils 20 µg Gesamt-RNA und Nachweis mit einer Prm3-Sonde. Als Negativkontrolle (Spur -) sind 20 µg Gesamt-RNA aus NIH/3T3-Zellen aufgetragen, die Positivkontrolle (Spur +) enthält 20 µg Testis-RNA. Das Prm3-Transkript aus den NIH/3T3-Linien ist klonierungsbedingt größer als das aus Testis.

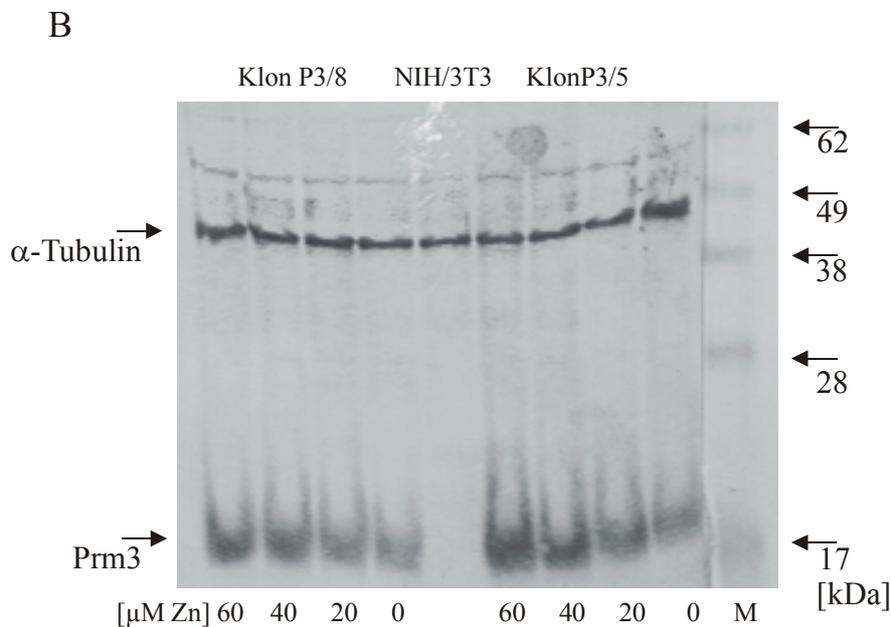


Abb. 3.19B: Nachweis der Prm3-Expression stabiler Linien auf Proteinebene. Nachweis der Prm3-Expression der Klone P3/8 und P3/5 nach Induktion durch verschiedene Zn-Konzentrationen für 24 h. Es wurden 15 µg Gesamtprotein im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, Antigen mit dem Serum GP300 (1:100) bzw. Anti-α-Tubulin (1:2000) gebunden und mit AP-gebundenem sekundärem Antikörper detektiert.

3.7 Spezielle Aktivitätstests mit Ribozymen/ In vitro-Aktivitätstests mit transkribierter 3'-UTR

In den unter 3.1.2 beschriebenen Ribozymkonstrukten stellen die Ribozyme „Minigene“ dar, d.h. die Konstrukte enthalten zusätzlich einen 3'-UTR und ein Poly A-Signal. Dazu erfolgte die *in vitro*-Transkription der Ribozyme von in den Vektor pBI klonierten Konstrukten, die NheI/XhoI ausgeschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt wurden. Die zum Abbruch der *in vitro*-Transkription führende Linearisierung erfolgte so direkt hinter dem klonierten Poly A-Signal. Die *in vitro*-Transkription dieser Fragmente war durch den im Ribozym-PCR-Produkt enthaltenen T7-RNA-Polymerase-Promotor möglich, der 3' auf die NheI-Schnittstelle folgt (siehe 3.1.2). Die Abb. 3.20 zeigt die DNA-Templates und *in vitro*-Transkripte verschiedener Ribozymkonstrukte. Die Ribozyme (ca. 50 nt) sind um einen 3'-UTR-Bereich (entsprechend BGH bzw. SV40 Poly A) verlängert. Folgende Ribozym-3'-UTR-Kombinationen wurden unter „single turnover“-Bedingungen *in vitro* getestet: Rz1/BGH, Rz3/BGH und Rz3/SV40.

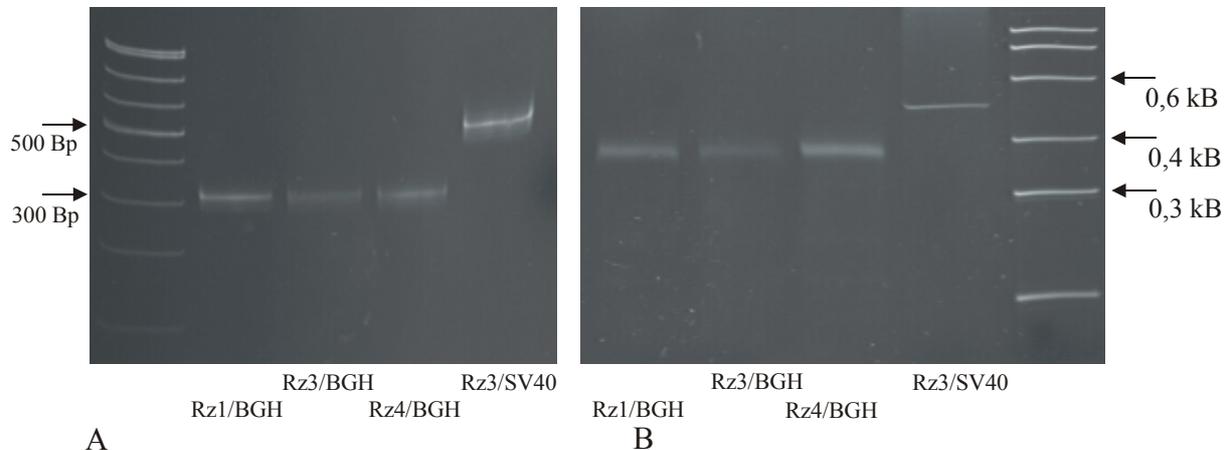


Abb. 3.20: **A:** Auftrennung der isolierten Ribozym-DNA-Templates im 5 %igen Polyacrylamidgel. Die Ribozym-DNAs enthalten 3'-UTRs aus dem Vektor pBI. Rz1, 3 und 4 (50 bp) mit „bovine growth hormone“ Poly A-DNA (+ ca. 285 bp), Rz3 zusätzlich mit „simian virus“ SV40 Poly A-DNA (+ ca 450 bp). **B:** 5 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel zur Kontrolle der von den DNA-Templates (Gel A) erhaltenen *in vitro*-Transkripte.

Wie in Abb. 3.21 zu sehen, wurde die Aktivität der beiden getesteten Ribozyme durch die 3'-UTRs in unterschiedlicher Weise verändert. Die Ribozyme Rz1 und Rz3 (ohne angehängte 3'-UTRs) zeigten in diesen Versuchsreihen die unter 3.1.3 beschriebene, als Vergleich erneut

gezeigte Spaltungseffizienz unter „single turnover“-Bedingungen. Trotz erhöhter Ribozymmenge (von 0,2 auf 0,3 µg) blieb die Spaltungsrate nahezu gleich, die Ribozyme lagen also wie für „single turnover“-Bedingungen gefordert im Überschuß vor. Um die Spaltungsraten der Ribozyme mit verschiedenen angehängten 3'-UTRs mit den Ribozymen ohne 3'-UTRs vergleichen zu können, mußten zunächst die unterschiedlichen Größen (als relatives Maß der Molmassen) der Transkripte berücksichtigt werden. So enthalten 0,1 µg Ribozym-RNA (ca. 50 nt) etwa 6,5 x mehr Moleküle als 0,1 µg Rz/BGH (ca. 335 nt) und etwa 10 x mehr Moleküle als 0,1 µg Rz/SV40 (ca. 500 nt). Aufgrund dieser ersten Ergebnisse von *in vitro*-Tests mit Ribozymen, die 3'-UTRs enthielten, kann man für die verwendeten Ribozyme feststellen, daß die dem BGH Poly A-Signal entsprechende 3'-UTR die Aktivität von Rz1 deutlich vermindert, während die Aktivität von Rz3 verstärkt wird. Die Abnahme der Rz1-Aktivität wird bei einem Vergleich der Spaltungsraten von M1 (ohne BGH) zu M0,9 (mit BGH) deutlich, auch wenn hier die Anzahl der Ribozyme nicht exakt übereinstimmt (Verhältnis 1:0,9). Rz3 mit BGH spaltet das Prm3-Transkript bei diesem Vergleich dagegen deutlich stärker als ohne 3'-UTR. Das etwas längere, dem SV40 PolyA-Signal entsprechende 3'-UTR reduziert eher die Aktivität des Ribozyms (zumindest im Vergleich mit der BGH 3'-UTR). Exakte vergleichende *in vitro*-Tests unter „single turnover“-Bedingungen mit einer „Sättigung“ an Ribozymen sollten Klarheit über den Einfluss von 3'-UTRs bringen. Der Versuch demonstriert, daß zusätzliche Sequenzen, die an Ribozyme angehängt werden, deren Aktivität entscheidend beeinflussen können. Zumindest für das Rz3 konnte gezeigt werden, daß die Addition von BGH 3'-UTRs seine Aktivität nicht behindert.

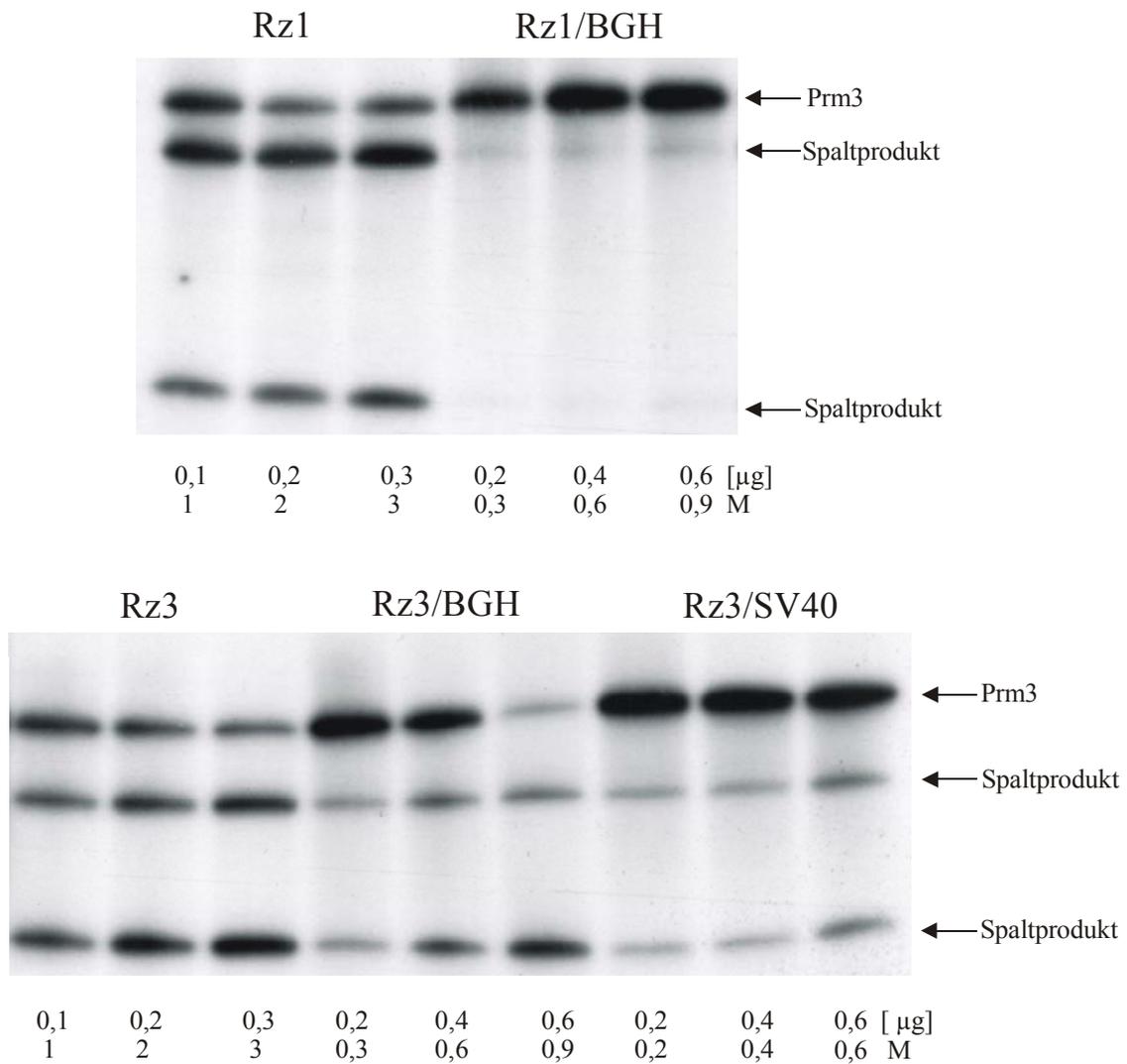


Abb. 3.21: Ribozym-Verdau von Prm3 unter „single turnover“-Bedingungen. Die Inkubation des radioaktiv markierten Prm3-Transkriptes erfolgte 2 h bei 37°C. Es wurden jeweils 0,1, 0,2 und 0,3 bzw. 0,2, 0,4 und 0,6 µg der Ribozymkonstrukte mit der gleichen Menge Prm3-RNA (ca. 100000 cpm) inkubiert. „M“ bezeichnet die aus den unterschiedlichen Transkriptlängen der Ribozymkonstrukte (mit und ohne 3'-UTR) resultierenden molekularen Verhältnisse. Bei den Ribozymen mit 3'-UTR wird eine „Sättigung“ der Reaktion mit Ribozymen (vgl. 3.1.3) nicht erreicht.

3.8 Versuch des Nachweises von Ribozymaktivität *in vivo*

3.8.1 Versuch des Nachweises einer Prm3-spezifischen Ribozymaktivität in transgenen Mäusen

Obwohl aufgrund der fehlenden Induktion der Luciferaseexpression in doppelt transgenen Mäusen nicht zu erwarten war, daß eine signifikante Ribozymexpression erzielt werden kann, wurde doch versucht, einen Ribozymeffekt nachzuweisen. Hierzu wurde die konstitutiv exprimierende Linie LucBiRz1/99 benutzt. Die Bestimmung von Prm3 im RNA-Blot zeigte keine Unterschiede in der Transkriptmenge zwischen Wildtypmäusen (NMRI) und den getesteten heterozygoten und homozygoten Tieren der konstitutiv Rz1-exprimierenden Linie LucBiRz1/99 (Abb. 3.22A). Es wurde außerdem versucht, eine Ribozymaktivität in Testis-Gesamt-RNA dieser Tiere nachzuweisen. Hierzu wurde radioaktiv markiertes Prm3-Transkript mit Testis-Gesamt-RNA inkubiert. Auch hier konnten keine (radioaktiven) Spaltprodukte detektiert werden (Abb. 3.22B).

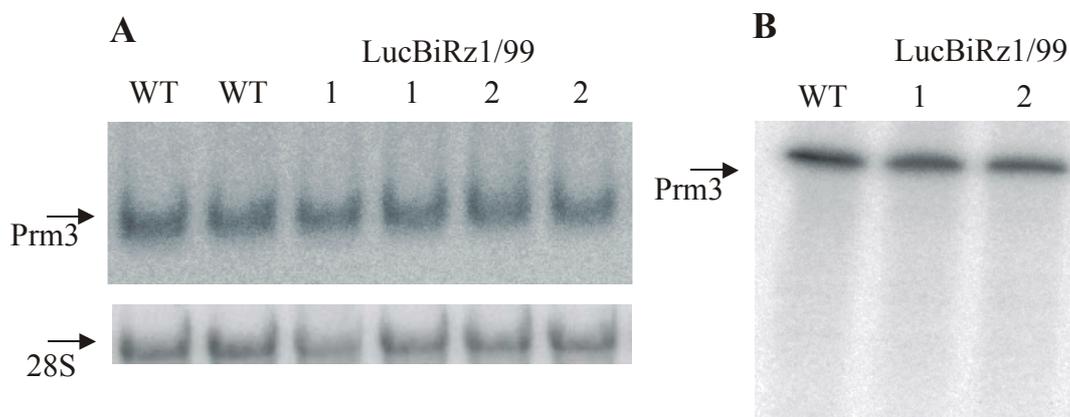


Abb. 3.22: **A:** Vergleich der Prm3-Expression von Wildtypmäusen (WT, Stamm NMRI) mit heterozygoten (Spuren 1) und homozygoten (Spuren 2) Tieren der konstitutiv exprimierenden Linie LucBiRz1 auf RNA-Ebene. Es wurden jeweils 10 µg RNA im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. **B:** Versuch der Detektion von Spaltfragmenten nach der Inkubation von radioaktiv markiertem Prm3-Transkript mit Testis-RNA (7,5 µg) eines heterozygoten (1) und eines homozygoten Tieres (2) der Linie LucBiRz1/99. Spur WT: Inkubation mit 7,5 µg Wildtyp-RNA (Stamm NMRI).

3.8.2 Transiente Transfektionen Prm3-exprimierender Zellen mit Ribozymkonstrukten

Zum Nachweis der Ribozymaktivität im Zellkultursystem wurden zunächst verschiedene Prm3-exprimierende Zelllinien (siehe 3.6) mit Ribozymkonstrukten transfektiert. Die DNA-Konstrukte enthielten zumeist die in den *in vitro*-Tests (siehe 3.1.3) aktivsten Ribozyme Rz3 und Rz4. Diese wurden entweder doppelt transient als Teil des Tet-Systems (Aktivator zusammen mit Tet-Responder) oder, um eine maximale Expression in den Zellkulturen zu erreichen, unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Vektor pCDNA3) transfiziert. Zur Kontrolle wurden jeweils Vektoren ohne klonierte Effektorstrukturen transfektiert. Die Abb. 3.23 zeigt beispielhaft den Effekt der Transfektion von Ribozymen, die unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurden. Zellen der Prm3-exprimierenden Linie P3/8 wurden mit leerem Vektor (pCDNA3) bzw. mit Vektoren transfektiert, die DNA der Ribozyme Rz3 bzw. Rz4 enthielten. 48 h nach der Transfektion zeigte sich auf RNA-Ebene eine leichte Abnahme von Prm3 (Abb. 3.23A), die jedoch auf Proteinebene nicht zu detektieren war.

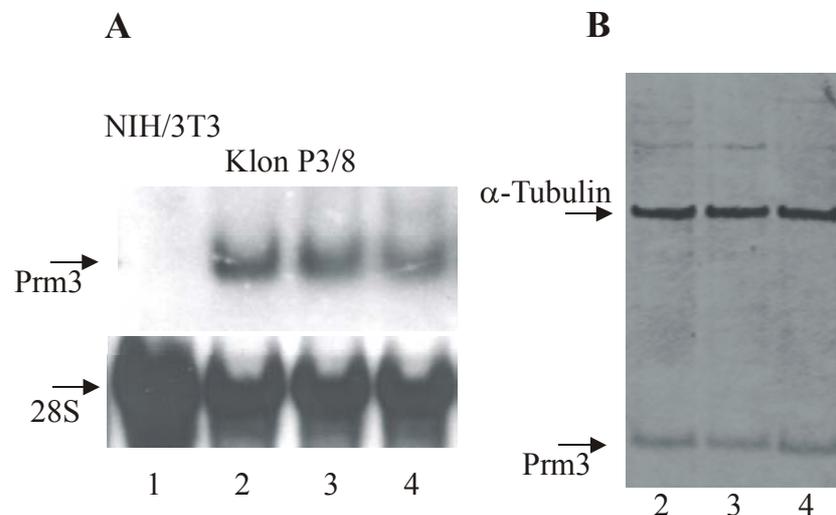


Abb. 3.23: Detektion von Prm3 nach der Transfektion von Ribozymkonstrukten in die Zelllinie P3/8. Spur 1: 20 µg RNA aus NIH/3T3-Zellen, Spur 2: 10 µg RNA aus der stabil Prm3-exprimierenden Zelllinie P3/8 (keine Induktion durch Zn), Spur 3: 10 µg RNA der Linie P3/8 nach der Transfektion von Rz3 in pCDNA3 (nach 48 h Kultur), Spur 4: 10 µg P3/8-RNA nach der Transfektion von pCDNA3Rz4 (ebenfalls 48 h Kultur ohne Zn).

Um das Vorhandensein aktiver Ribozyme in entsprechend transfektierten Zellen durch eine sensitive Methode nachzuweisen, wurde radioaktiv markiertes Prm3-Transkript mit Gesamt-RNA oder Poly A⁺-RNA dieser Zellen inkubiert. Zur Erhöhung der Ribozymaktivität (und damit der Empfindlichkeit des Versuchs) wurden die Ansätze bei 50°C anstatt 37°C inkubiert und während der Inkubation von 1,5 h mehrmals auf 95°C erhitzt und abgekühlt, um statt der einfachen Anlagerung der Ribozyme („single turnover“) ein mehrmaliges Binden und Spalten der Ziel-RNA zu erreichen. Die Abb. 3.24A,B,C verdeutlicht die erhöhte Spaltungsrate nach Inkubation der Ansätze bei 50°C. Die Zunahme der Spaltungsaktivität bei allen aktiven Ribozymen ist sehr ausgeprägt. Das während der bei 37°C durchgeführten *in vitro*-Tests kaum aktive Ribozym Rz1/BGH (siehe Abb. 3.21) verursacht durch die Inkubation bei 50°C eine nachweisbare Spaltung des Prm3-Transkriptes. Rz3/BGH erreicht bei 50°C (Abb. 3.24B) qualitativ die gleiche Spaltungsrate wie Rz3 (Abb. 3.24A). Die vollständige Spaltung der Ziel-RNA wird hier erreicht, obwohl gegenüber Rz3 (ohne 3'-UTR) etwa 3,5 x weniger Ribozymmoleküle eingesetzt wurden (0,4 µg Rz mit 50 nt; 0,8 µg RzBGH mit ca. 335 nt). Die Inkubation mit RNA aus den mit Ribozymkonstrukten transfektierten Zellen oder von Testis-RNA der konstitutiv exprimierenden Linie (LucBiRz1/99) zeigte keinen Effekt. Die Abb. 3.24D steht stellvertretend für verschiedene Versuche, die Ribozymaktivität auf diese Weise nachzuweisen. Die Inkubation der radioaktiv markierten Prm3-RNA erfolgte in diesem Fall unter Zusatz von je 7,5 µg Gesamt-RNA aus transfektierten NIH/3T3-Zellen bei 50°C. Die Zellen wurden 48 h vor der RNA-Isolierung in einer 10 cm-Schale mit 4 µg pTet-On und 6 µg pLucBiRz3 oder, um die Expression der Ribozyme zu erhöhen, mit einem CMV-Promotor regulierten Ribozymkonstrukt (10 µg pCDNA3/Rz) transfektiert. Die mittels des Tet-Systems exprimierten Konstrukte wurden über die gesamte Kultivierung mit Dox (4 µg/ml) induziert. Im Fall des hier beispielhaft dargestellten Versuchs nach der Transfektion von Aktivatorkonstrukt und pLucBiRz3 wurde die Aktivierung durch Dox über die Detektion der Luciferase-mRNA nachgewiesen (Abb.3.24D). Zur Kontrolle der Ribozymreaktion wurde jeweils Prm3-Transkript mit Ribozym-*in vitro*-Transkripten verdaut.

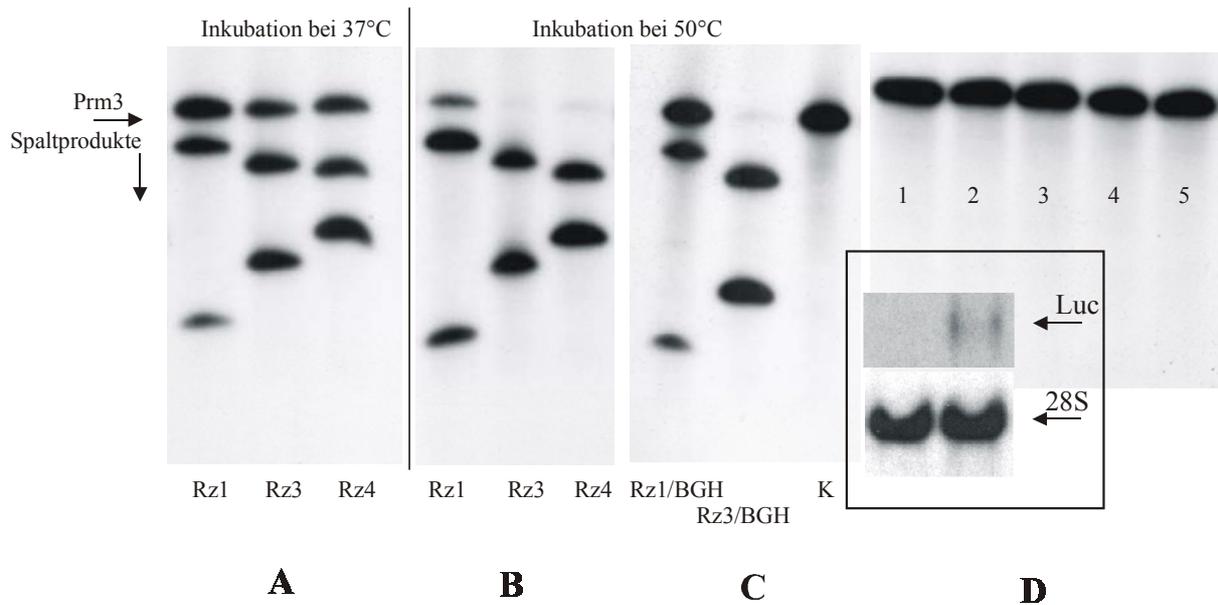


Abb. 3.24: Auftrennung von Ribozym *in vitro*-Spaltungsreaktionen im 5 % Polyacrylamidgel. **A/B/C:** Die eingesetzten Ribozym *in vitro*-Transkripte ohne 3'-UTR's (Rz1, Rz3 und Rz4) zeigen die bekannten Unterschiede in der Spaltungsaktivität (vgl. 3.1.3.2). Die Spaltungsrate ist nach der Inkubation bei 50°C (**B**) gegenüber der Inkubation bei 37°C (**A**) deutlich erhöht. Die Aktivität der eingesetzten Ribozyme mit transkribierter 3'-UTR (Rz/BGH) ist durch die Inkubation bei 50°C ebenfalls erhöht (**C**). Rz1/BGH erreicht hier nicht die Aktivität von Rz1. Rz3/BGH zeigt die gleiche Effektivität wie Rz3. Es wurden jedoch jeweils 0,4 µg Rz und 0,8 µg Rz/BGH eingesetzt, also etwa 3,5 x mehr Moleküle Rz als Rz/BGH. Die Spur K enthält Prm3-Transkript, das ohne Ribozym über 1,5 h inkubiert wurde.

D: Inkubation (50°C, 1,5 h) von radioaktiv markiertem Prm3-Transkript mit Gesamt-RNA aus transfektierten Zellen. Die Spuren 1 und 2 enthalten 7,5 µg RNA aus Zellen, die Rz3 über das transient transfektierte Tet-System exprimieren. Ohne Induktion (Spur 1) und auch nach der Induktion der Expression durch Dox (Spur 2) sind keine Spaltprodukte nachzuweisen. Die induzierte Expression des Responderkonstruktes konnte über die Detektion der Luciferase (vgl. 3.4.2) nachgewiesen werden (eingeschobener Kasten). Hierzu wurden 30 µg RNA im Gel aufgetrennt und geblottet, der Röntgenfilm ü.N. exponiert. Nach der Inkubation mit RNA (7,5 µg) aus pCDNA3/Rz1/Rz3/Rz3-transfiziertem Zellen (Spuren 3, 4 und 5) konnten ebenfalls keine Spaltprodukte nachgewiesen werden.

3.8.3 Ribozymexpression in stabilen Zelllinien

Um eine in allen Zellen einer Kultur gleichmäßige und dauerhafte (keine Verdünnung von transfektierten Plasmiden durch Zellteilungen) Expression von Ribozymen zu erreichen, wurden stabil transfektierte Zelllinien etabliert, die neben Prm3 auch Rz3 (über das Tet-System regulierbar) exprimierten. Dies führt zu dreifach stabilen Zelllinien. Als Ausgangslinie wurde die Zelllinie P3/5 (3.6) eingesetzt, die Prm3 unter der Kontrolle des Zn-regulierbaren

Metallothionin-Promotors der Maus exprimiert. Zum Erhalt der stabilen Expression von Prm3 durch den Vektor pMT/EP erfolgte die Kultur dieser Linie unter Hygromycin B (100 µg/ml). Zur regulierbaren Expression eines Ribozyms wurde LucBiRz3 zusammen mit einem Transaktivatorkonstrukt transfektiert. Die Selektion auf die Expression der neuen Konstrukte erfolgte über G418 (300 µg/ml). Die Resistenz wurde hierbei nur über eine Neomycin-Resistenzkassette des Transaktivatorkonstruktes vermittelt. Die Tab. 3.4 zeigt die Konstrukte der stabilen Transfektion (vgl. 2.26.4). Es wurden insgesamt 131 Klone auf die Expression des Reporters Luciferase getestet (2.24.1). Bei 54 dieser neuen Linien konnte eine Luciferaseexpression nachgewiesen werden, die bei 29 durch die Inkubation mit Dox verstärkt werden konnte. Durch die gleichzeitige Transfektion von Transaktivator- und Responderkonstrukten integrieren diese in denselben chromosomalen Bruchpunkt. Durch die räumliche Nähe des starken CMV-Promotors zu den Responderkonstrukten war eine Transkription dieser Responder auch ohne die Aktivierung durch Dox zu erwarten. Hieraus resultiert ein recht hoher Hintergrund und ein nur geringes Aktivierungspotential. In der Tab. 3.4 sind deshalb bereits die Klone als regulierbar angegeben, die nach der Induktion mit Dox (4 µg/ml) „nur“ eine Verdopplung der Luciferaseaktivität aufwiesen.

Tab. 3.4: Zusammen mit LucBiRz3 transfektierte Aktivatorkonstrukte zur Etablierung einer dreifach-stabilen Zelllinie

Transaktivator	Transaktivator-: Responder-DNA	Anzahl der getesteten Klone	Klone mit Luciferase- expression	Klone mit regulierbarer Expression
Tet On	1:2	10	2	0
Tet On	1:4	52	27	13
17L*	1:2	26	8	4
17L*	1:4	43	17	12

* Unter 3.9 beschriebenes Transaktivatorkonstrukt

Die erhaltenen Luciferasewerte und Aktivierungspotentiale der einzelnen Klone waren sehr weit gestreut. Die erreichten absoluten Luciferasewerte/ µg Protein lagen deutlich unter den Werten, die nach transienten Transfektionen (vgl. Tab. 3.1) erhalten wurden. Die am stärksten exprimierenden Klone erreichten 6000-8000 RLU/µg Protein.

Die bisher nicht wiederholten Experimente mit einer mit pTet-On/LucBiRz3 (1:4) transfektierten Linie (Nr. 4) auf veränderte Prm3-Expression sind in Abb. 3.25 gezeigt. Unmittelbar nach dem Ausplattieren des Klons Nr. 4 wurde die Transkription des

Responderkonstruktes in der Hälfte der Kulturschalen mit 4 µg/ml Dox induziert. In jeweils einer induzierten und einer nichtinduzierten Kultur wurde 24 h später durch die Zugabe von 50 µM Zn die Prm3-Expression erhöht (siehe 3.6.2). Die Versuche wurden jeweils doppelt angesetzt, um RNA und Protein der Zellen gewinnen zu können. Die Messung der Luciferasewerte aus Proteinextrakten ergab ca. 7000 RLU/µg Protein nach der Steigerung der Expression durch die Dox-Zugabe um den Faktor 2,5. Im Western-Blot der nicht Zink-induzierten Extrakte konnte keine Änderung im Prm3-Proteingehalt gezeigt werden (Abb. 3.25A). Die Veränderung des Gehalts an Prm3-RNA war, wenn auch nicht ohne weiteres, auf belichteten Röntgenfilmen sichtbar, über eine Auswertung im Phospho-Imager detektierbar. Die Stärke der Prm3-Bande wurde quantifiziert und die erhaltenen Werte über die Messung der jeweiligen Bande der Rehybridisierung (28S) abgeglichen. Für die Ansätze ohne Prm3-Induktion mit Zn ergibt sich danach eine Reduktion der Prm3-RNA um 24 %. Die um die 28S-Werte korrigierte Abnahme der Prm3-RNA des Ansatzes +Zn,+Dox gegenüber der nur durch Zn induzierten Kultur betrug in diesen ersten Versuchen 41 %. Aus dem ursprünglichen Bild (Abb. 3.25B) sind diese Veränderungen nicht ersichtlich, sie werden aber deutlich, sobald die Abbildung mit rechnerisch reduziertem Hintergrund dargestellt wird (Abb. 3.25C).

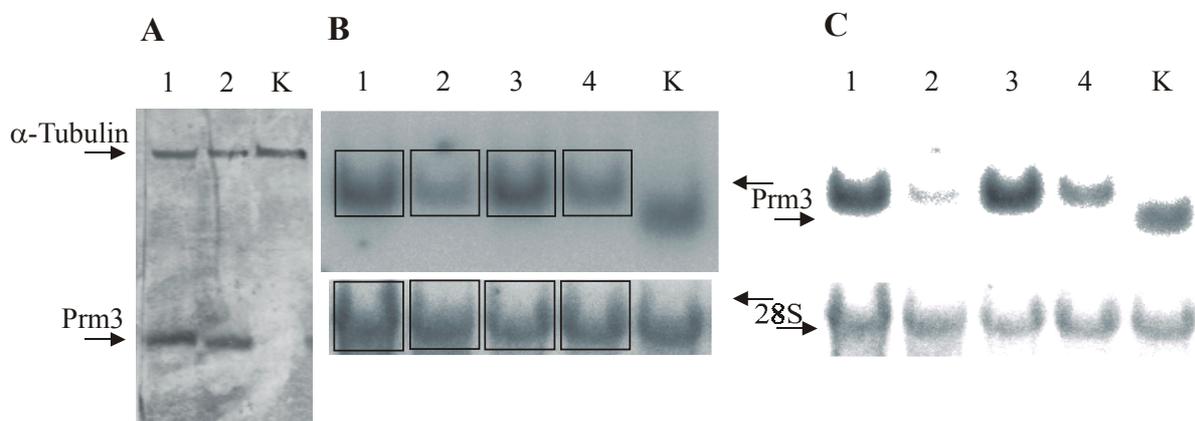


Abb. 3.25: Detektion von Prm3 der Linie Nr 4 im Western-Blot (A) und auf RNA-Ebene (B, C). Je Spur wurden 20 µg Protein bzw. 15 µg RNA des dreifach stabilen Klons Nr 4 eingesetzt. **A:** Färbung des Western-Blots nach Detektion mit Alkalische Phosphatase konjugiertem Sekundärantikörper, Spur 1: Gesamtprotein, Spur 2: Gesamtprotein nach 48 h Induktion mit Dox, Spur K: Negativkontrolle (Zellextrakt aus NIH/3T3-); **B:** Bild des nach der Hybridisierung eingelesenen Phospho-Imager-Screens, Spur 1: Kultivierung der Zellen mit Zn und Dox; Spur 2: Kultivierung mit Dox; Spur 3: Kultivierung mit Zn; Spur 5: Kultivierung ohne Induktion **C:** Darstellung der Abb. 27B mit reduziertem Hintergrund

3.9 Modifikationen des Tet-Systems durch Veränderung des Transaktivators

3.9.1 Herstellung eines Transaktivatorproteins (rtTA) mit minimalen Aktivierungsdomänen

Die Verbesserung des reversen Tet-Transaktivatorproteins (rtTA, „reverse tetracycline-controlled transactivator“) im Hinblick auf Hintergrundaktivität sollte durch die Multimerisierung einer minimalen Aktivierungsdomäne erfolgen. Das durch den Vektor pTet-On codierte originale rtTA-Protein besteht aus den Aminosäuren 1-207 des Tet-Repressors (*E.coli*), fusioniert mit 130 Aminosäuren des C-terminalen Teils der Herpes simplex Virus Aktivierungsdomäne VP16. Die minimale Aktivierungsdomäne umfaßt die Aminosäurepositionen 436-447 der VP16-Domäne und wurde zunächst unmodifiziert nach dem Ansatz von Baron et al. (1997) hergestellt und multimerisiert. In dieser Form, der 4-fach multimerisierten F-Domäne, war im Tet-Off-System eine Verbesserung der Aktivierungsstärke um den Faktor 2,3 erreicht worden (Baron et al., 1997). Die Herstellung der F-Domänen erfolgte über Amplifikation des entsprechenden Fragmentes von VP16 aus dem Plasmid pTet-On. Neben den F-Domänen entstand bei dieser PCR ein „unvollständiges“ PCR-Produkt mit einer 6 bp Deletion, welche die entstehende Domäne um die Aminosäuren an den Positionen 442 und 443 (Phenylalanin und Aspartat) verkürzt. Dieses Fragment bildete den zweiten Typ von minimalen Aktivierungsdomänen [L]. Die Oligonukleotide [F] und [L] wurden dem Leserahmen des *rtetR*-folgend an dessen 3'-Ende in den Vektor pTet-On kloniert. Unter Verwendung der „Primer“:

Ffw 5'-TAT ACG CGT TGC ATG CCG ACG CG-3'

Frv 5'-ATG CGC GCC CAA CAT GTC CAG A-3'

entstehen die F-Domänen [zunächst verwendete kürzere Oligonukleotide führten zu den L-Domänen]. Die Abb. 3.26 zeigt das Aufbauprinzip der veränderten Transaktivatoren (3.26A) und das Klonierungsschema der Multimerisierungen (3.26B). Die aus den PCRs resultierenden Produkte enthalten eine MluI-Schnittstelle am 3'-Ende und eine BssHII-Schnittstelle am 5'-Ende, was eine Klonierung in den BssHII-geschnittenen Vektor pTet-On möglich machte. Die Klonierung war durch die kompatiblen kohäsiven Enden der beiden Enzyme möglich. Nur die mit korrekter Orientierung integrierten Domänen konnten am 3'-Ende erneut mit BssHII geschnitten werden, so daß eine schrittweise Multimerisierung möglich war. Stopcodon und Poly A-Signal wurden ebenfalls über ein, auf Grundlage des

Vektors pTet-On generiertes, PCR-Produkt (Primerpaar: Tetstopfw, Tetstoprv) mittels der Schnittstellen MluI/PvuII in den Vektor zurückgeführt (Abb. 3.26B).

Jeder Multimerisierungsschritt sowie die darauf folgende Klonierung des Stopcodons und des Poly A-Signals wurden über Restriktionsverdau und Sequenzierungen überprüft. Es wurden auf diese Weise 2-8 F-Domänen und 2-20 L-Domänen mit rTetR fusioniert. Abb. 3.27 zeigt einen Testverdau einiger Vektoren mit multimerisierten L-Domänen.

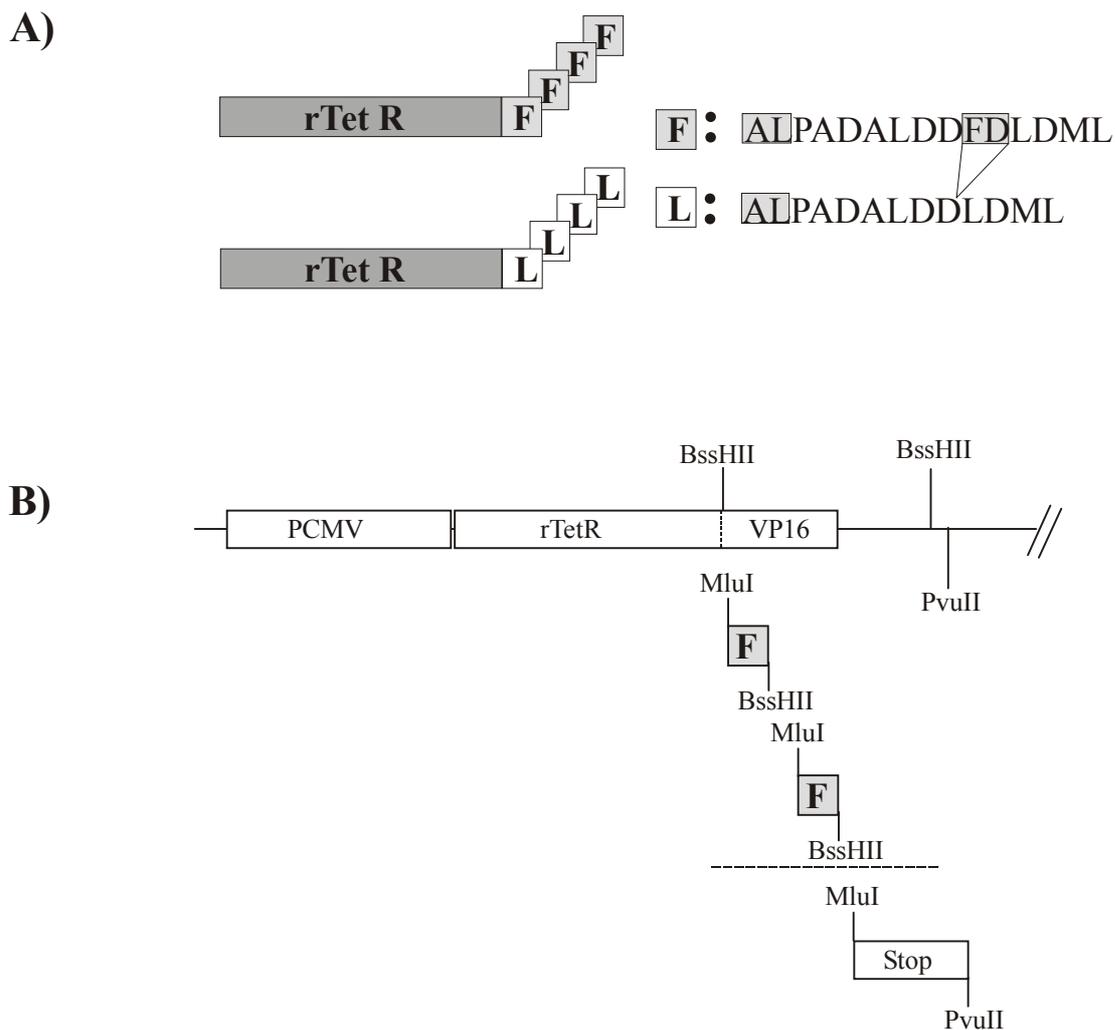


Abb. 3.26: Aufbau und Schema der Multimerisierungen der minimalen Aktivierungsdomänen. **A:** Aminosäuresequenzen der F-Domänen und der um „F“ und „D“ verkürzten L-Domänen. Die markierten AS „AL“ sind aufgrund der verwendeten Klonierungsstrategie zusätzlich eingefügt **B:** Klonierungsschema der Multimerisierungen. Nach dem Einfügen der Minimaldomänen wurde das Konstrukt durch den Einbau des Stopcodons und Poly A-Signals vervollständigt.

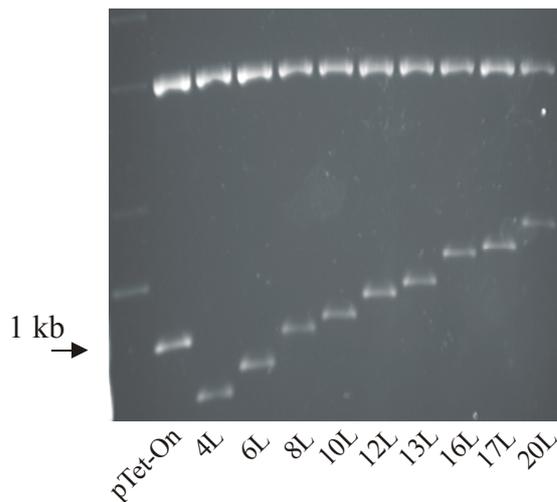


Abb. 3.27: Restriktionsanalyse (HindIII-Verdau) des Vektors pTet-On (VP16-Domäne) und von Vektoren mit unterschiedlicher Anzahl von multimerisierten L-Domänen.

3.9.2 Charakterisierung der L-Fusionskonstrukte

Um den Effekt der Multimerisierungen der L-Domänen auf Transkriptions- und Translationsebene nachzuweisen, wurden Northern- und Western-Blots von RNA-bzw. Kernproteinextrakten transient transfektierter NIH/3T3-Fibroblasten (2.26.3) durchgeführt. Die mit den beschriebenen Transaktivorkonstrukten (Tet-On und L-Multimere) transfektierten Zellen wurden 24 h nach der Transfektion aufgearbeitet. Der Northern-Blot der isolierten Gesamt-RNA zeigte die zunehmende Größe der Transaktivator-RNA und, da gleiche RNA-Mengen (unabhängig von der Transfektionseffizienz) aufgetragen wurden, die Vergleichbarkeit der RNA-Gehalte nach transients Transfektion (Abb. 3.28A) an.

Die Abb. 3.28B zeigt die Detektion der Transaktivatorproteine mit einem monoklonalen Antikörper gegen tTA (negativ regulierbarer Transaktivator des Tet-Off-Systems, siehe 2.8.4). Die Auftrennung von Kernproteinextrakten ergab ein Bild vergleichbar dem des in Abb. 3.27 gezeigten Restriktionsverdau. Jede Spur zeigt eine Bande, deren Größe mit steigender Anzahl an L-Domänen zuimmt.

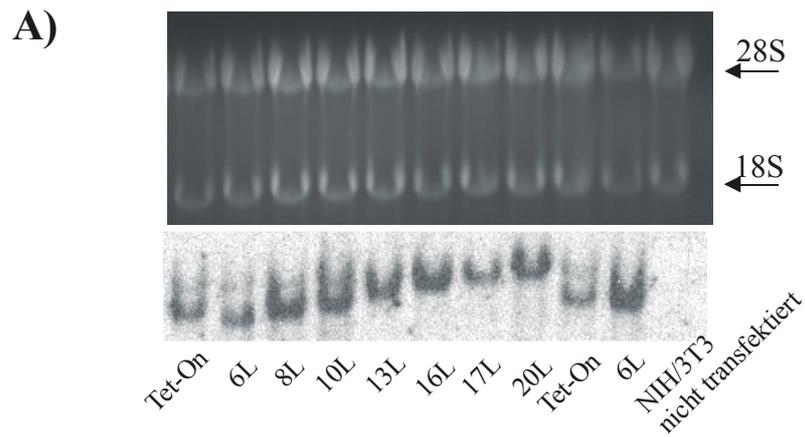


Abb. 3.28: Northern- und Western-Blot-Analyse verschiedener Aktivatorstrukture. NIH/3T3-Zellen wurden transient mit den Vektoren verschiedener rTetR-Fusionen transfektiert. **A:** Die Auftrennung der RNA zeigt die zunehmende Größe des Transkripts entsprechend der Zahl der L-Domänen.

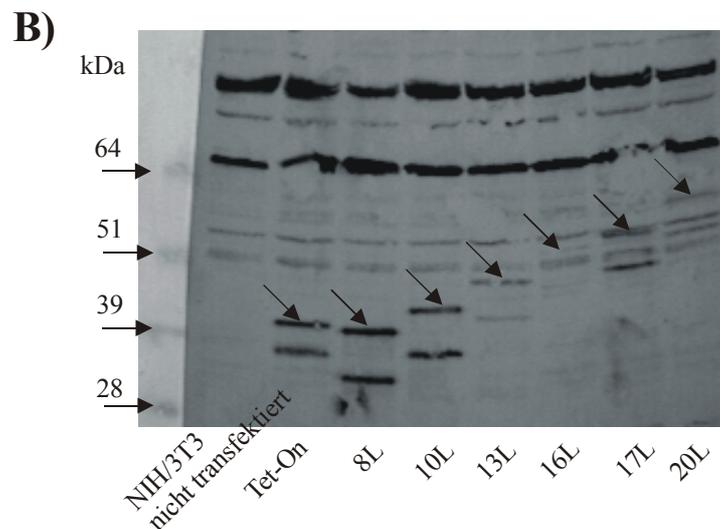


Abb. 3.28: Northern- und Western-Blot-Analyse verschiedener Aktivatorstrukture. NIH/3T3-Zellen wurden transient mit den Vektoren verschiedener rTetR-Fusionen transfektiert. **B:** Auftrennung isolierter Kernproteine in der SDS-PAGE (10 %). Die sichtbaren Banden in der Spur der untransfektierten Zellen resultieren aus unspezifischen Bindungen zu Proteinen der NIH/3T3-Zellen. Die nach der Transfektion mit Aktivatorstrukturen zusätzlich auftretenden Banden (Pfeilmarkierung) ergeben das treppenartige Muster des schrittweise vergrößerten Proteins. Es wurden gleiche Mengen an RNA (15 µg) bzw. Protein (50 µg) pro Spur aufgetragen (vgl. 18S- und 28S-RNA in 3.28A bzw. unspezifisch markierte Proteinbande bei 64 kDa), unterschiedlich starke Markierungen sind folglich durch Unterschiede in der Transfektionseffizienz bedingt.

3.9.3 Aktivierungspotential von rTetR, fusioniert mit minimalen Aktivierungsdomänen

3.9.3.1 Überprüfung des Aktivierungspotentials der L-Fusionskonstrukte in doppelt transienten Transfektionen

Zur Feststellung des Aktivierungspotentials der modifizierten rtTA Proteine wurden NIH/3T3-Zellen zugleich mit dem Luciferase-codierenden Plasmid pTRE-Luc und mit den Transaktivatoronstrukten transfektiert (siehe 2.26.3). Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und Zellen in zwei von vier transfektierten Kulturen ca. 24 h mit Dox (4 µg/ml) induziert. Die Normalisierung der Luciferaseexpression erfolgte über die β -Galactosidaseaktivität (β -Gal). Eine Normalisierung erfolgt üblicherweise, indem der zu interpretierende Luciferasewert durch den zugehörigen β -Gal-Wert, welcher auf konstanter Expression beruht, dividiert wird. Dieses Vorgehen war im Fall der Dox-regulierten Expression der Luciferase nicht möglich, da die β -Gal-Werte in den Dox-induzierten Ansätzen deutlich niedriger waren als in den nicht-induzierten Transfektionsansätzen, was zu einer Verfälschung der Aktivierungsfaktoren (Abb. 3.29) geführt hätte. Die Abnahme der β -Gal-Expression betrug z. T. 70-80 % gegenüber den in den nicht Dox-induzierten Zellen gemessenen Werten. Dieser Effekt war unabhängig von der Transfektionseffizienz, da die Induktion der Luciferaseexpression nach der Transfektion begonnen wurde. Zur Normalisierung (siehe Tab. 3.5) wurden also zunächst die Luciferasewerte der induzierten und der nichtinduzierten Zellen über die Unterschiede der zugehörigen β -Gal-Werte korrigiert, da diese auf leicht unterschiedliche Transfektionseffizienzen zurückzuführen waren. Das heißt, vor der Berechnung des Mittelwertes aus einer Doppelbestimmung wurde der zum niedrigeren β -Gal-Wert gehörende Luciferasewert mit einem Ausgleichsfaktor multipliziert. Dieser ergab sich aus der Division des höheren durch den niedrigeren β -Gal-Wert. Um später die absoluten Luciferasewerte unterschiedlicher Transfektionen vergleichen zu können, wurden dann die Werte der Zellen aller vier Kulturschalen über den jeweils höheren Wert der nichtinduzierten Transfektion normalisiert. Diese Art des Abgleichs der absoluten Luciferasewerte über einen β -Gal-Wert war wegen der im Mittel gleichen Transfektionseffizienz in den vier identisch transfektierten Ansätzen möglich. Dies zeigte sich in Versuchen, bei denen NIH/3T3-Zellen direkt nach der Trypsinisierung, also noch in Suspension, transfektiert und dann auf vier Schälchen verteilt wurden. Bei der Messung der β -Gal-Werte dieser Transfektionen mit zwangsläufig gleicher Effizienz traten dieselben

geringen Unterschiede auf wie nach der Transfektion von vier bereits bewachsenen Schälchen mit demselben Transfektionsansatz.

Tab. 3.5: Beispiel der Normalisierung der Luciferasewerte nach Dox-induzierter Expression über das Tet-System (Kotransfektion von pTet-On, pTRE-Luc und pCMV-β-Gal).

Dox	Luciferase [RLU]	β-Gal [RLU]	Ausgleich (β-Gal)	Luc- Mittelwert *	Luc-Wert (absolut)**	Aktivierungs- faktor
∅	4342247	11860792				
∅	4351683	11404273	1,04	4434065	0,37	
+	38813716	3915403				
+	36607856	3574464	1,1	39456649	3,33	8,9

* nach Multiplikation des niedrigeren Luc-Wertes mit dem Ausgleichswert, der sich aus den β-Gal-Werten ergab

** errechnet durch Division der Luc-Werte durch den höchsten β-Gal-Wert

Zum Vergleich der durch die verschiedenen Konstrukte hervorgerufenen Aktivierungen wurden die nach der Induktion gemessenen Werte der immer mitgeführten Transfektion des original beschriebenen Systems pTet-On/ pTRE-Luc (Gossen et al., 1995) als 100 % gesetzt. Alle anderen erhaltenen Werte wurden auf diese Aktivität bezogen. Die F-Domänen, die in der Kombination mit dem TetR-Fusionspartner (Tet-Off-System) zu einer Verbesserung der Aktivierung führten (Baron et al., 1997), zeigten im Tet-On-System im Vergleich zum originalen Fusionsprotein rtTA kein erhöhtes Aktivierungspotential. Mit der Addition weiterer F-Domänen steigt die Hintergrundaktivität (ohne Dox) stark an, was zu einer Abnahme des Aktivierungspotentials führt (Abb. 3.29B). Die doppelt transiente Transfektion mit Multimeren des L-Typs zeigte gegenüber der Transfektion mit pTet-On zunächst kein verstärktes Aktivierungspotential oder der absoluten Aktivität, wenn nur vier-, fünf- oder sechsfach L-Multimere eingesetzt wurden. Eine deutliche Erhöhung des Aktivierungspotentials zeigte sich erst nachdem mehr als acht L-Domänen mit rTetR fusioniert und transfektiert wurden. Bis zu einer Anzahl von 17 L-Domänen konnte eine Steigerung des Aktivierungspotentials beobachtet werden. Diese ergab sich aus einer reduzierten Hintergrund- und einer gesteigerten absoluten Aktivität (Abb. 3.29). Die Hintergrundaktivität, die durch die Fusionierung von L-Domänen bis zu einem 16mer abgenommen hat, stieg wieder an, wenn mehr als 16 L-Domänen mit rTetR fusioniert wurden. Dieser Effekt führte bei der Verwendung von 20 L-Domänen trotz der oft, verglichen

mit anderen Konstrukten, höchsten induzierten absoluten Aktivität zu einem Absinken des Aktivierungspotentials. Die gleichen Ergebnisse wurden nach doppelt transienten Transfektionen von CHO-Zellen erhalten (nicht abgebildet).

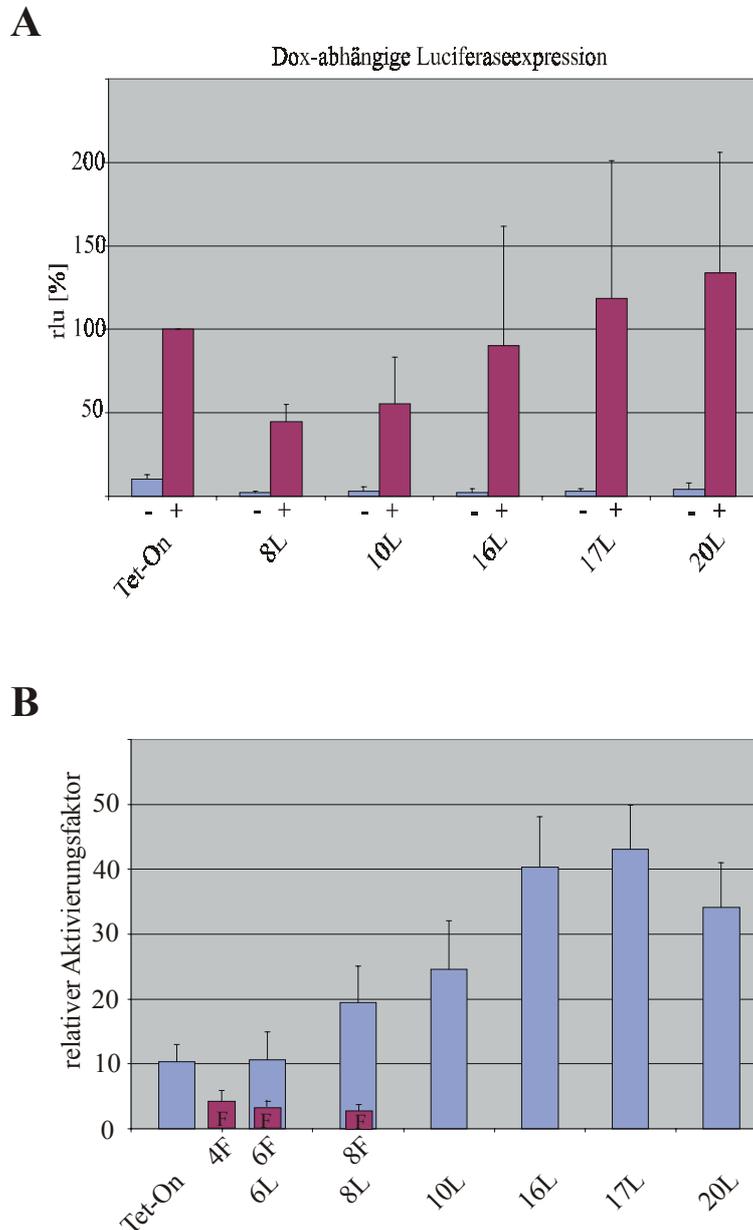


Abb. 3.29: Dox-abhängige Genaktivierung durch verschiedene rTetR-Fusionskonstrukte **A:** Luciferaseaktivität von NIH/3T3-Zellen nach doppelt transienter Transfektion von pTRE-Luc kombiniert mit pTet-On (VP16 oder multimerisierte L-Domänen enthaltend). **B:** Darstellung der über multimerisierte F-Domänen erreichten Aktivierungsfaktoren und der Aktivierungen, die sich aus den für Abb. 3.29A verwendeten Luciferaseaktivitäten ergeben. Die Zellkulturen wurden zur Induktion nach der Transfektion für 24 h mit und ohne Dox (4 µg/ml) inkubiert. Die gemessene Luciferaseaktivität wurde jeweils über β -Galactosidaseaktivität (Kotransfektion von pCMV β -Gal) normalisiert.

3.9.3.2 Überprüfung des Aktivierungspotentials der L-Fusionskonstrukte in stabil transfektierten Responderlinien

Um die durch die transiente Transfektion des Responderkonstruktes TRE-Luc (3.9.3.1) hervorgerufene hohe Basalaktivität zu reduzieren und um die Funktion der Aktivatoren unter definierten Responder-Verhältnissen zu zeigen, wurden stabile Linien (siehe 2.26.4) erzeugt, in denen das Responder-Konstrukt TRE-Luc chromosomal integriert ist. Das Plasmid pTRE-Luc wurde zusammen mit pTK-Hyg (zur Vermittlung einer Hygromycinresistenz) transfektiert und nach der Selektion wurden 40 Klone isoliert. Zum Test auf Regulierbarkeit der Luc-Aktivität wurde in diese Klone pTet-On transfektiert und die Luciferase mit und ohne Dox-Inkubation gemessen. Bei ca. 85 % der Klone konnte eine Luciferaseexpression nachgewiesen werden, eine deutliche Regulierbarkeit (Induktionsfaktor > 10) zeigte sich aber nur bei ca. 10 % der isolierten Klone. Bei allen erhaltenen Klonen konnte eine Basalaktivität auch ohne Transfektion oder nach der Transfektion von irrelevanten Kontrollplasmiden (pUC18) nachgewiesen werden. Die über das Tet-System regulierbaren Responder-Klone Nr. 21, 29 und 30 wurden mit den verschiedenen Aktivatoronstrukten transient transfektiert. Wie schon in den doppelt transienten Transfektionen zeigten die Konstrukte 16L und 17L generell höhere Aktivierungsraten als sie nach der Transfektion mit rTetR-VP16 (pTet-On) erreicht werden konnten. Der Anstieg der Aktivierung gegenüber der Transfektion mit pTet-On war wie zu erwarten in jedem der drei Klone unterschiedlich. Die Konstrukte 16L und 17L erreichten in den Klonen Nr. 21 und 30 eine gegenüber Tet-On 10fach verbesserte Aktivierung. Nach transienter Transfektion des Klons Nr. 29 steigerte sich der Aktivierungsfaktor jedoch nur um den Faktor 2,5. In diesem Fall erreichte die absolute Luciferaseaktivität 80 % des mit pTet-On erreichten Wertes, während die absoluten Luciferaseaktivitäten der Klone Nr. 21 und 30 nach der Transfektion mit 16L oder 17L 300-400 % der Tet-On-Vergleichstranfektion erreichten. Die Mittelwerte aus 5-10 unabhängigen Transfektionen sind in Tab. 3.6 zusammengefaßt.

Tab. 3.6: Aktivierung der Luciferaseexpression durch Dox nach transienter Transfektion verschiedener Transaktivatorkonstrukte in stabile Responderlinien

Aktivator rTetR-Fusion	Responder (TRE-Luc stabil)	Luciferase- aktivität* Ø Dox	Luciferase- aktivität* + Dox	Regulierungs- faktor**
rTetR-VP16	21	2,1 (± 0,8)	100	54,8 (± 19,6)
rTetR-16L	21	0,5 (± 0,4)	282,2 (± 77,3)	639,2 (287,6)
rTetR-VP16	29	2,1 (± 0,8)	100	42,4 (± 12,6)
rTetR-16L	29	0,8 (± 0,3)	80,0 (± 24,1)	106,0 (± 54,5)
rTetR-VP16	30	3,2 (± 0,9)	100	33,3 (± 7,5)
rTetR-10L	30	1,0 (± 0,5)	118,0 (± 22,1)	148,3 (± 94,0)
rTetR-16L	30	1,6 (± 0,8)	430,7 (± 215,4)	287,3 (± 63,6)
rTetR-17L	30	1,6 (± 1,0)	380,6 (± 151,7)	256,2 (± 60,3)

* nach Normalisierung durch β -Galactosidaseaktivität

** der angegebene Aktivierungsfaktor wurde direkt über die Einzelmessungen der Transfektionen berechnet und weicht deshalb von den aus der Tabelle berechenbaren Werten ab.

3.9.4 DOX-Abhängigkeit der DNA-Bindungsaktivität der rTetR-Fusionsproteine

Die Dox-abhängige Bindung der rTetR-Fusionsproteine an ihre Promotor-Elemente (*tetO*) wurde in Gel „Retardation Assays“ (2.25) untersucht. Die nach transienten Transfektionen (2.26.3) isolierten Kernproteinextrakte (2.20.3) wurden mit radioaktiver *tetO*-DNA (2.13.5.2) inkubiert und im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Bindung des reversen Tet-Transaktivatorproteins (rtTA) an *tet*-Operatorsequenzen erfolgt in Umkehrung des aus *E. coli* stammenden Systems in Anwesenheit von Dox. In der Abb. 3.30 wird allerdings eine Verringerung der elektrophoretischen Mobilität der Sonde mit und ohne die Zugabe von Dox in den Inkubationsansatz deutlich. Die Signale sind in Anwesenheit von Dox aber wesentlich stärker. Obwohl gleiche Mengen an DNA in jeder Bindungsreaktion eingesetzt wurden, variierte die Stärke des „shifts“ sehr stark. Dieser Effekt ist wiederum (vgl. Western-Blot Abb. 3.28) auf die mit unterschiedlicher Effizienz transfektierten codierenden Plasmide zurückzuführen. Der Gehalt an Transaktivatorprotein in den Spuren eines Konstruktes mit und ohne Dox ist durch Verwendung der Proteine derselben Transfektion identisch. Der Vergleich dieser Banden macht die gegenüber dem original rTetR reduzierte Bindung der multimerisierten L-Fusionskonstrukte im nicht Dox-induzierten Zustand deutlich. Diese Beobachtung bestätigt die aus den Luciferasemessungen (3.9.3.1 und 3.9.3.2) bekannten Ergebnisse der reduzierten Hintergrundaktivität im Falle der L-Domänen Transaktivatoren.

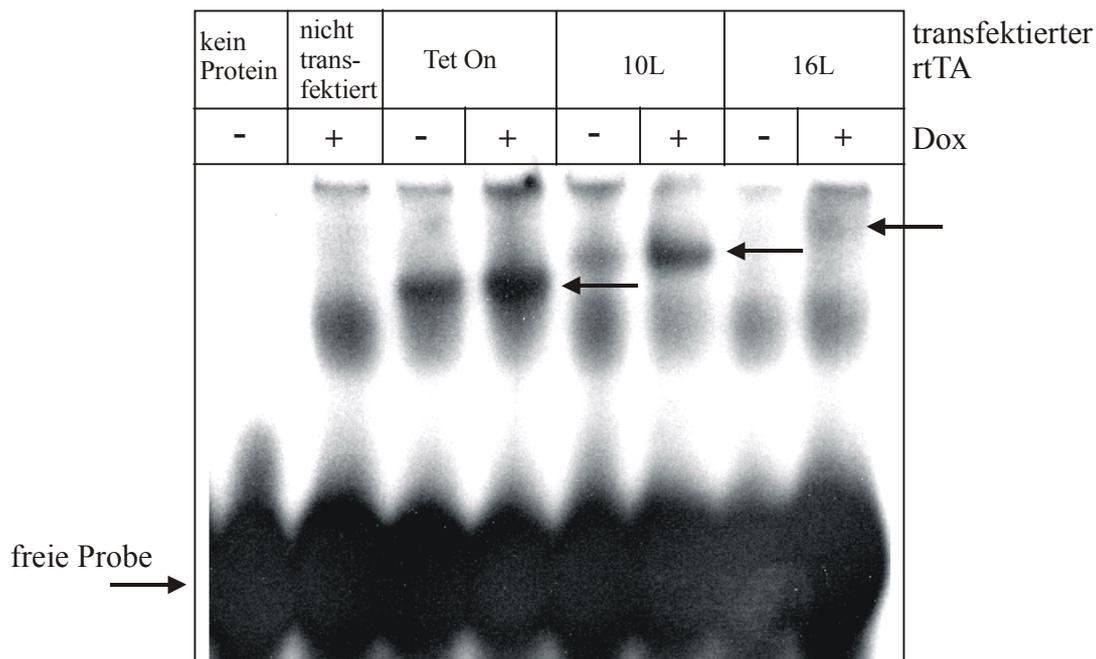


Abb. 3.30: Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften der rTetR-Fusionsproteine in „DNA retardation assays“. Kernproteine transient transfektierter NIH/3T3-Fibroblasten wurden mit radioaktiv markierter *tetO*-DNA in An- und Abwesenheit von Dox inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Laufverzögerung durch die Proteinbindung wurde über die Belichtung eines Röntgenfilms detektiert und ist mit Pfeilen markiert.

3.9.5 Aktivierungseigenschaften verschiedener Tet-Transaktivatoren in Kombination mit pflanzlichen Promotorkonstrukten

Schließlich wurde das Verhalten von L-Domänen-Transaktivatoren in Kombination mit neuartigen Respondern untersucht, deren Tet-abhängige Promotoren von Pflanzenviren stammen. Das Tet-Off-System wurde von Weinmann et al. (1994) in Tabak etabliert. Als Minimalpromotor diente hier ein Derivat des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus. Um eine erhöhte maximale Transkriptionsrate zu erreichen und um den auftretenden „Silencing“-Effekt, d.h. keine Möglichkeit der Aktivierung des Responders in Abwesenheit von Tetracyclin nach einiger Zeit der Reprimierung (Weinmann et al., 1994) zu verhindern, wurden verschiedene Modifikationen des pflanzlichen Responderkonstruktes entwickelt. Die optimierten Responderkonstrukte P_{Tax} (Böhner et al., 1999) und $P_{TopFree}$ (Böhner, 2000) zeigen in Pflanzen eine deutliche Verbesserung der Tet-regulierbaren Genexpression. Um die Basalaktivität (nicht von einem Transaktivator beeinflusst) der mit pflanzenspezifischen Promotoren ausgestatteten Responderkonstrukte P_{Tax} und $P_{TopFree}$ (das inklonierte

Reportergeren Luciferase führt zu den Konstruktnamen Tax-Luc und TopFree-Luc) in Säugerzellen zu testen, wurden sie zunächst ohne Aktivator-konstrukt in NIH/3T3-Zellen transfektiert und die Luciferaseexpression gemessen. Unter Verwendung von P_{Tax} und $P_{TopFree}$ sank die basale Aktivität der minimalen Responderpromotoren (gemessen über die Luciferaseaktivität) auf unter 10 % verglichen mit einer Transfektion des für Säugerzellen entwickelten Responders TRE-Luc (CMV-Minimalpromotor). Die Kombination von Tax-Luc und TopFree-Luc mit verschiedenen Transaktivator-konstrukten wurde in doppelt transienten Transfektionen als Kombination mit Tet-On sowie mit den L-Domänen-Transaktivatoren getestet (vgl. 3.9.3.1). Die erhaltenen Ergebnisse der Transfektionen sind in Tab. 3.7 zusammengefaßt.

Tab. 3.7: Aktivierung der Luciferaseexpression nach transientser Kotransfektion verschiedener Kombinationen von Transaktivator- und Responder-konstrukten. Die Dox-induzierte Luciferaseaktivität nach der Transfektion von pTet-On wurde als 100 % gesetzt, alle anderen Werte darauf bezogen.

Responderkonstrukt: TRE-Luc

Transaktivator	Luciferaseaktivität* [%] Ø Dox	Luciferaseaktivität* [%] + Dox	Regulierungsfaktor**
Tet On	10,23 (± 2,7)	100	10,4 (± 2,5)
16L	2,36 (± 2,4)	90,2 (± 71,5)	40,4 (± 7,8)
17L	2,78 (± 1,9)	118,7 (± 82,5)	43,1 (± 6,9)

Die aufgeführten Werte entsprechen der Abb. 3.29A

Responderkonstrukt: Tax-Luc

Transaktivator	Luciferaseaktivität* [%] Ø Dox	Luciferaseaktivität* [%] + Dox	Regulierungsfaktor**
Tet On	3,01 (± 2,1)	100	56,6 (± 31,3)
16L	0,17 (± 0,1)	84,8 (± 29,9)	401,9 (± 156,6)
17L	0,26 (± 0,1)	100,4 (± 63,1)	508,0 (± 385,3)

Responderkonstrukt: TopFree-Luc

Transaktivator	Luciferaseaktivität* [%] Ø Dox	Luciferaseaktivität* [%] + Dox	Regulierungsfaktor**
Tet On	2,66 (± 1,57)	100	54,55 (± 18,5)
16L	0,33 (± 0,15)	69,5 (± 7,1)	333,2 (± 72,6)
17L	0,27 (± 0,15)	67,8 (± 25,7)	338,2 (± 154,3)

* nach Normalisierung durch β -Galactosidaseaktivität

** der angegebene Aktivierungsfaktor wurde direkt über die Einzelmessungen der Transfektionen berechnet und weicht deshalb von den aus der Tabelle berechnbaren Werten ab.

Nach transienten Kotransfektionen mit dem originalen Transaktivator Tet-On reduzierten die Responder Tax-Luc und TopFree-Luc die Hintergrundaktivität des Tet-Systems auf 3 % der erreichbaren, nach Dox-Induktion erhaltenen absoluten Werte. Die Kombination Tet-On/TRE-Luc entwickelte dagegen in transienten Transfektionen bereits bis zu 10 % der maximalen Aktivität ohne die Zugabe von Dox (vgl. Abb. 3.29A). Die Verwendung der Konstrukte 16L oder 17L in den Transfektionen, die bereits im originalen System (TRE-Responder) eine Reduktion des Hintergrundwertes um den Faktor 4 zeigte (Abb. 3.29A), reduzierte den nichtinduzierten Hintergrund von Tax-Luc um den Faktor 15 und von TopFree-Luc um den Faktor 9 gegenüber der Kotransfektion dieser Konstrukte mit pTet-On.

3.9.6 Dox-Sensitivität der Tet-Transaktivatoren

Um das Induktionsverhalten des 17L-Transaktivators nach Dox-Zugabe mit dem des ursprünglichen Transaktivators (rtTA) vergleichen zu können, wurde Responderklon Nr. 30 (siehe Tab. 3.6) mit den entsprechenden Tet-Transaktivatoren transfektiert. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Dox-Konzentrationen.

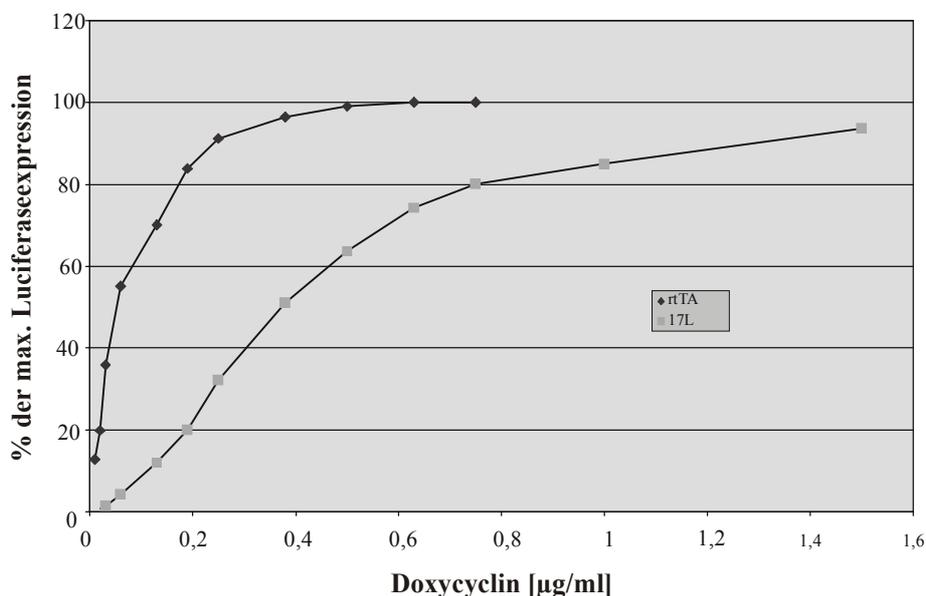


Abb. 3.31: Dox-Abhängigkeit der Aktivierung durch Transaktivatoren. Zellen des stabilen TRE-Luc Responderklons Nr. 30 (Tab. 3.6) wurden transient mit den rtTA oder 17L codierenden Expressionsvektoren transfektiert und mit unterschiedlichen Dox-Konzentrationen inkubiert. Die Luciferaseexpression wurde 24 h nach der Transfektion gemessen. Zur Berechnung der prozentualen Aktivierungswerte wurde eine jeweils mitgeführte Aktivierung nach der Zugabe von 5 µg Dox/ml Medium als 100 % aktiviert angenommen.

Die Dox-abhängigen Verlaufskurven der Aktivierung sind in Abb. 3.31 dargestellt. Die Aktivierung durch rtTA erfolgte innerhalb eines schmalen Konzentrationsbereiches, die maximale Luciferaseexpression war bereits bei einer Dox-Konzentration von 0,5 µg/ml erreicht. Die Dox-abhängige Steigerung der Aktivierung durch 17L verläuft innerhalb eines weiteren Konzentrationsbereiches. Die Luciferaseexpression wird nahezu linear innerhalb des Dox-Konzentrationsbereiches von 0,1-0,8 µg/ml aktiviert. Die Aktivitätssteigerung beträgt etwa 10-15 %/0,1 µg Dox. Bei einer Konzentration von 0,8 µg/ml erreicht die Aktivierung etwa 85 % des maximal möglichen Wertes. Die volle Expression des Responders wird jedoch erst durch die Zugabe von etwa 2 µg/ml erreicht.

3.9.7 Erzeugung transgener Mäuse mit dem 17L-Transaktivator

Aufgrund der dem rtTA überlegenen Aktivierungseigenschaften in Zellkulturexperimenten wurde das Konstrukt CMV-17L (3.9.1-3.9.6) zur Erzeugung transgener Mäuse in befruchtete Oocyten mikroinjiziert (2.27). Unter den ersten nach Retransfer erhaltenen Tieren (102) wurden nur 4 im Dot-Blot (2.16.1.1) als transgen identifiziert. Die Nachkommen von 3 positiven Tieren wurden im Northern-Blot (2.16.2) auf die Expression des Transaktivators getestet, es konnte jedoch kein 17L-Transkript nachgewiesen werden. Nach der transienten Transfektion primärer Ohrfibroblasten mit dem Responderkonstrukt pTRE-Luc zeigte eine der drei getesteten Linien trotz des negativen Tests auf RNA-Ebene eine verstärkte Luciferaseaktivität nach Zugabe von Dox. Da die erhaltenen Werte jedoch nur etwa das Doppelte der nichtinduzierten Luciferasewerte (Hintergrund nach transients Transfektion des Luc-Konstruktes) erreichten, wurde diese Linie wie auch die beiden anderen getesteten Linien nicht weitergeführt. Nach weiterer Mikroinjektion wurden nochmals 83 Tieren geboren. Von diesen erwiesen sich 11 als transgen. Von allen noch zu testenden positiven F₀-Tieren (12) wurden Ohrfibroblastenkulturen angelegt, um eine Expression des Transgens auf Proteinebene nachzuweisen. Nach der Transfektion der primären Fibroblasten mit dem Responderkonstrukt TRE-Luc war ohne Induktion mit Dox immer eine Luciferaseaktivität messbar. Die Induktion mit Dox führte meist nur zu einer Verdopplung der Luciferaseaktivität. Ein leichter Anstieg der Luciferasewerte nach der Induktion mit Dox war bei 8 der 12 getesteten Tiere nachzuweisen. Wegen der geringen Aktivierungsraten ist die gemessene Luciferaseaktivität ohne Induktion deshalb nicht auf hohe Aktivorkonzentrationen (Hintergrundaktivität), sondern auf die Basalaktivität des

Responders TRE-Luc zurückzuführen. Um diese zu reduzieren wurden die transgenen primären Fibroblasten mit den Responderkonstrukten Tax-Luc und TopFree-Luc transfektiert. Dadurch konnten bei einigen Linien 3fach oder 4fach erhöhte Luciferasewerte nach der Induktion mit Dox gemessen werden. Der Nachweis eines aktiven Transaktivatorproteins gelang auf diese Weise bei 5 der 12 zuletzt getesteten transgenen Mäuse. Diese werden zur Zeit mit Respondertieren (3.4.4) verpaart, um eine Regulierung *in vivo* zu testen.

4 Diskussion

Die der Arbeit zugrundeliegende Idee war die Kombination von „Antisense“-Techniken mit einem System zur willkürlichen Regulation von Genexpression zur Erzeugung eines „Knockout“-Phänotyps. Ein Schwerpunkt der Untersuchung sollte in der Anwendung von Ribozymen als enzymatisch aktive „Antisense“-Moleküle liegen. Die von außen regulierbare endogene Expression der verschiedenen Effektormoleküle sollte über das Tetracyclin-regulierbare Expressionssystem (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) geschaffen werden. Der vorgeschlagene Ansatz ist vor allem deswegen interessant, weil er als einziger einen reversiblen „Knockout“ ermöglicht.

Vor allem *in trans*-spaltende „Hammerhead“-Ribozyme wurden seit ihrer Erstbeschreibung (Haseloff und Gerlach, 1988) zunehmend als Werkzeuge zur Manipulation der Genexpression benutzt. Auch ihr erfolgreicher Einsatz als endogen exprimierte RNAs in Zellkulturen und transgenen Tieren wurde beschrieben (Crisell et al., 1993; Zhao und Pick, 1993; Lewin et al., 1998; Tang et al., 1998; Dawson und Marini, 2000). Die Aktivität eines Ribozyms wird maßgeblich von der räumlichen Struktur der zu spaltenden RNA beeinflusst (4.1.1). Um Hinweise auf den Einfluß von Sekundärstrukturen auf die Aktivität eines spezifischen Ribozyms zu erhalten, kann man mögliche Sekundärstrukturen der Ziel-RNA mit Hilfe von Computerprogrammen berechnen. Da diese nicht vollkommen der nativen Struktur entsprechen (es können z.B. keine Tertiärstrukturen berechnet werden), ist es notwendig, Ribozyme *in vitro* zu testen, bevor sie *in vivo* eingesetzt werden können.

Die durchgeführten Tests führten zu klaren Ergebnissen in Bezug auf die (*in vitro*-) Aktivität der Ribozyme und ermöglichten die Auswahl von Ribozymen für die weiteren Experimente.

Ein Punkt, der in der Literatur wenig diskutiert wird, sich aber in den hier dargestellten Experimenten als wichtig erwies, war der Einfluß von zusätzlichen Sequenzen, die in die exprimierte Ribozym-RNA eingefügt werden (z.B. 3'-UTR und Poly A-Signal). Es zeigten sich deutliche und uneinheitliche Effekte von 3'-UTRs auf die *in vitro*-Aktivität der Ribozyme. Dieser Punkt wurde leider erst spät aufgegriffen, so daß die Interpretation einiger Daten erschwert wird (s.u.). In zukünftigen Versuchen wäre daher eine systematische Testung der Ribozyme unter diesem Gesichtspunkt nötig (4.4).

Die *in vivo*-Aktivität der ausgesuchten Ribozyme sollte in zwei verschiedenen Systemen, nämlich in der Zellkultur und in transgenen Mäusen, getestet werden.

Da kein natürliches Zellkultur-System zur Expression von Prm3 existierte, mußte ein künstliches System benutzt werden (4.2). Bei einer transienten Expression von Ribozym-

Konstrukten in einer stabilen, Prm3-exprimierenden Zelllinie zeigte sich kein Effekt. Auch bei einer Kotransfektion von Prm3 und Ribozymen (d. h. transiente Expression beider Partner) zeigte sich keine Beeinflussung der Prm3-Expression. In beiden Experimenten ist nicht klar, ob methodische Fehler für den ausbleibenden Erfolg verantwortlich waren (4.2.2).

Die Untersuchung von dreifach-stabilen Zelllinien führte dagegen zu ersten Erfolgen. In diesen Linien wird die Expression von Prm3, sowie die regulierbare Expression von Ribozymen über das Tet-System (Transaktivator und Responderkonstrukt) von stabil integrierten Konstrukten kontrolliert. Der wesentliche Vorteil gegenüber einer Expression nach transienter Transfektion liegt hierbei in der Produktion von Effektormolekülen in 100 % der Zellen. Die Ergebnisse zeigen die grundsätzliche Möglichkeit der effektiven Expression von Ribozymen mit Hilfe des Tet-Systems (4.5).

Das *in vivo*-System sollte den Nachweis der regulierbaren „Knockouts“ in transgenen Tieren zeigen (4.3). Dieser Ansatz scheiterte im wesentlichen daran, daß eine Etablierung des Tet-Systems, so wie gewünscht, nicht gelang. Die Aktivität der Effektormoleküle in den meisten transgenen Mäusen konnte nicht untersucht werden, da die zur Regulation der Responder notwendige Transaktivatorlinie (PGK2Tet-On) inaktiv zu sein scheint (4.6.5). In einer konstitutiv exprimierenden Responderlinie konnte der Nachweis der Ribozym-vermittelten Reduktion der Prm3-Expression ebenfalls nicht erbracht werden. Die Ineffektivität ist hier vermutlich auf eine zu schwache Gesamtexpression des Effektormoleküls Rz1 und auf dessen schlechte Spaltungseffizienz zurückzuführen (4.4).

Die erfolgreiche Anwendung des Tet-Systems in transgenen Tieren unterliegt in hohem Masse den Einflüssen der chromosomalen Umgebung, d.h. des Integrationsortes des Transgens, und ist deshalb über die übliche Herstellungsmethode transgener Tiere nicht zu beeinflussen. Zur Zeit läßt sich dieses Problem wohl nur durch das Testen einer großen Zahl von „Foundertieren“ lösen, bis eine geeignete Linie gefunden ist.

Um die Eigenschaften des Systems insgesamt zu verbessern, wurden bereits die verschiedensten Modifikationen von Transaktivatoren publiziert. Im Rahmen dieser Arbeit werden ebenfalls veränderte reverse Transaktivatoren (Tet-On) beschrieben, die dem originalen System in verschiedener Hinsicht überlegen sind (4.7). Neue, diese Veränderungen bereits enthaltende Transaktivatormäuse werden in nächster Zeit getestet (4.8).

Die hier kurz resümierten Punkte werden im Folgenden ausführlich diskutiert.

4.1 Ribozymaktivität

4.1.1 Einflüsse der Ziel-RNA

Die Aktivität und Spezifität von Ribozymen gegen Protamin-mRNA wurde in *in vitro*-Ribozymaktivitätstests untersucht. Das sog. I/III *in trans* spaltende „Hammerhead“-Ribozym wurde als Ribozymmotiv ausgewählt (Haseloff und Gerlach, 1988). Das „Hammerhead“-I/III-Motiv ist das am intensivsten untersuchte und am häufigsten zur Inhibierung einer Genexpression angewendete Ribozym (Birikh et al., 1997; Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998). Die Aktivität eines spezifischen Ribozyms ist bezogen auf die Ziel-RNA vom Ziel-Triplet und der lokalen Faltung der Ziel-RNA im Bereich des zu schneidenden Triplets abhängig.

Die natürlicherweise vorkommende Selbstspaltung (*in cis*) der „Hammerhead“-RNA-Strukturen erfolgt am häufigsten 3' eines GUC-Triplets (Symons et al., 1987). Dieses Triplet ist auch nach separater Synthese von Ribozym- und Substratstrang ein optimales Substrat für *in trans* Spaltungen (Haseloff und Gerlach, 1988). Die durchschnittlichen Spaltungsraten werden für „Hammerhead“-Ribozyme allgemein mit $< 5 \text{ min}^{-1}$ angegeben (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998). Mutagenesestudien ergaben, daß alle Triplets des Typs NUH (N = jedes Nukleotid; H = A, U oder C) durch „Hammerhead“-Ribozyme gespalten werden, wenn auch mit stark unterschiedlicher Effektivität (Perriman et al, 1992; Zoumadakis und Tabler, 1995). Je nach zugrundegelegtem kinetischen Modell waren GUC und AUC die am besten schneidbaren Triplets einer Ziel-RNA (Perriman et al., 1992; Zoumadakis und Tabler, 1995; Shimayama et al., 1995). Prinzipielles Problem der Messung von Ribozymaktivitäten ist, daß die Spaltungsreaktion *in vitro* ab einer bestimmten Länge der hybridisierenden „Antisense“-Arme des Ribozyms und wegen der Sekundärstrukturen der Ziel-RNA nicht mehr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Dies liegt daran, daß sich möglicherweise kein schnelles Gleichgewicht der Edukte mit dem Ribozym-Substrat-Komplex einstellt (Fedor und Uhlenbeck, 1992; Hertel et al., 1994) und die Produkte nach der Reaktion gar nicht oder nur verlangsamt dissoziieren (Fedor und Uhlenbeck, 1992). Eine Substratumsetzung unter solchen Bedingungen kann nicht durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden. *In vitro*-Aktivitätstests wurden daher unter sog. „single turnover“-Bedingungen durchgeführt, in denen das spezifische Ribozym in mindestens 10fachem molarem Überschuß eingesetzt werden muß (eine weitere Erhöhung der Ribozymmenge darf keinen Einfluß mehr auf die Kinetik haben).

Als Folge der Sekundärstruktur der Ziel-RNA zeigten bei *in vitro*-Spaltungsreaktionen spezifische Ribozyme gegen verschiedene Spaltstellen (gleiches Triplet) eines Substrats bis zu 400fache Unterschiede in der Spaltungseffizienz, wobei wegen der Länge der Substrat-RNA und der gebildeten Sekundärstruktur die Assoziation des Ribozyms als geschwindigkeitsbestimmend angesehen wird (Campbell et al., 1997). Die Vorhersage möglicher Sekundärstrukturen der Ziel-RNA mit Hilfe von RNA-Faltungsprogrammen (siehe 3.1.1) wird allgemein als wichtiger Schritt für die Anwendung von Ribozymen angesehen. In Untersuchungen von „Antisense“-RNA wurde eine positive Korrelation zwischen einer geringen lokalen Faltung einer Ziel-RNA (hohe freie Energie) und der inhibitorischen Effekte von „Antisense“-RNA gegen diese Bereiche festgestellt (Sczakiel et al., 1993). Auf Ribozyme übertragen bedeutet dies, die 5'- und 3'-Erkennungssequenzen der Ziel-RNA müssen für das Ribozym zugänglich und dürfen nicht an der Ausbildung von Sekundärstrukturen beteiligt sein, die das einschließende Spaltungstriplet unzugänglich für die Bindung des Ribozyms machen (Marshall et al., 1994) oder die Ausbildung der aktiven Sekundärstruktur des gebundenen Ribozyms behindern. Sakamoto et al. fanden 1996, daß die zwei Ribozyme, für deren Zielsequenz ein Einzelstrang vorhergesagt wurde, *in vitro* und im Zellkultursystem vielfach aktiver waren als zwei andere Ribozyme, die an Doppelstrangbereiche der Ziel-RNA hybridisierten. Andererseits zeigten sich Ribozyme gegen ausschließlich einzelsträngige Ziel-RNA-Bereiche ineffizient (Szymanski et al., 1997). Im günstigsten Fall soll die Bindung des Ribozyms die freie Energie des RNA-Komplexes nicht verändern und damit seine Stabilität nicht beeinflussen. Eine Erklärung der oben beschriebenen widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, daß die optimalen Bindestellen eines Ribozyms an teilweise basengepaarten Bereichen liegen. Da RNA-Sequenzen aber verschiedene Sekundärstrukturen annehmen können, die dieselbe Stabilität wie die natürliche Sekundärstruktur aufweisen (Herschlag, 1995; Uhlenbeck, 1995), sind *in vitro*-Tests zur Vorhersage der Aktivität verschiedener spezifischer Ribozyme notwendig. Mit Hilfe von Computerprogrammen berechnete Faltungsmuster lassen wegen fehlender Eindeutigkeit die sichere Vorhersage einer Ribozymaktivität nicht zu. Neben der reinen Berechnung von lokalen Faltungen und Doppelstrangbereichen gibt es einen experimentellen Ansatz zur Detektion von RNA-Bereichen, die für Ribozyme zugänglich sind. Die radioaktiv markierte Ziel-RNA wird mit verschiedenen Desoxyoligonukleotiden inkubiert, die ebenso wie später Ribozyme nur an bestimmte Bereiche der gefalteten Ziel-RNA binden können. Der RNA-Anteil von DNA-RNA-Hybriden wird dann durch RNaseH-Verdau abgebaut. Aus der Größe

der verbleibenden radioaktiven RNA-Fragmente können dann Rückschlüsse auf zugängliche Bereiche der Ziel-RNA gezogen werden (Birikh et al., 1997).

Da die Prm3-cDNA nur ca. 450 bp lang ist, konnten mit relativ wenig Aufwand alle möglichen (GTC und ATC-) Triplets untersucht werden. Für die GUC-Schnittstellen der Prm3-RNA wurden bei *in vitro*-Aktivitätstests erhebliche Unterschiede in der Spaltungseffizienz festgestellt (vgl. 3.1.3). Vor allem der völlige Ausfall des gegen GUC gerichteten Rz2 ist nicht zu erklären, da die Schnittstelle GUC2, wie die anderen GUC-Schnittstellen auch, am Übergang eines doppelsträngigen zu einem einzelsträngigen Abschnitt liegt, also der Theorie nach gut von den Ribozymen zu erreichen ist. Möglicherweise ist die tatsächliche Sekundärstruktur an dieser Stelle nicht identisch mit der berechneten. Die AUC-Triplets ließen sich in unseren *in vitro*-Versuchen ebenfalls nicht schneiden. Dies kann zumindest für AUC2 nicht mit einer abweichenden Sekundärstruktur erklärt werden. AUC2 liegt direkt 3' neben GUC4, dem am besten schneidbaren und deshalb wohl am besten zugänglichen GUC-Triplet. Man kann also nur vermuten, daß die AUC-Triplets zumindest in *in vitro*-Tests durch die Ribozyme nicht schneidbar waren.

Computerprogramme wie M-fold schlagen verschiedene Sekundärstrukturen vor, die sich in ihrer freien Energie kaum unterscheiden (Zuker, 1989). Die ausgesuchten Schnittstellen lagen auch unter Berücksichtigung dieser Strukturen (nicht abgebildet) jeweils am 5' oder 3'-Ende nicht vollständig basengepaarter Bereiche. Es ist also wahrscheinlich, daß die native Sekundärstruktur der Prm3-mRNA an diesen Stellen ebenfalls keine vollständige Basenpaarung aufweist. Trotz dieser für die Ribozymaktivität optimalen Positionen treten bereits bei *in vitro*-Tests starke Unterschiede in der Spaltungsaktivität an potentiell spaltbaren Zieltriplets (GUC) auf. Dies liegt möglicherweise an der Tatsache, daß knäuelartige räumliche Strukturen (Tertiärstrukturen) eines Substrats nicht vorhergesagt werden können. Eine unter solchen „single turnover“-Bedingungen gemessene Spaltungsrate kann durch diese Faktoren um ca. zwei bis drei Größenordnungen verlangsamt werden (Heidereich und Eckstein, 1992, Heidenreich et al., 1994).

4.1.2 Nachweis der Spezifität der eingesetzten Ribozyme

Um die Spezifität der Ribozyme in Bezug auf die ausschließliche Spaltung der Prm3-mRNA zu überprüfen, wurde die humane Prm3-mRNA (HPrm3) *in vitro* transkribiert und den *in vitro*-Aktivitätstests unterzogen (siehe 3.1.3.3). Die HPrm3-Sequenz ist über weite

Strecken identisch mit der Maus Prm3-Sequenz. Die GUC-Triplets, die als Spaltsequenzen in der Maussequenz benutzt wurden, sind hier aber mutiert. Es sollte festgestellt werden, ob eine Spaltung durch Ribozyme erfolgen kann, wenn die „Antisense“-Arme des Ribozyms an eine RNA ähnlicher Sequenz binden, die jedoch kein spaltbares Triplet enthält. Da nach der Inkubation mit Ribozymen keine Spaltprodukte der HPrm3-RNA auftraten, war klar, daß eine Spaltung nur 3' der beschriebenen (mausspezifischen) Triplets erfolgen kann.

Das Auftreten unspezifischer Bindungsmöglichkeiten könnte theoretisch nicht nur zu unerwünschter Spaltung von RNA, sondern auch zu einer Verminderung der Spaltungsrate der Ziel-RNA führen. Unspezifische Bindungsmöglichkeiten können durch die Zugabe unspezifischer RNA in den Reaktionsansatz simuliert werden. Unter „single-turnover“-Bedingungen der *in vitro*-Aktivitätstests ist kein Ablösen der Ribozyme vom Substrat möglich. Bei den Spaltungsreaktionen, die unter Zusatz von Gesamt-RNA durchgeführt wurden, wurde kein 10facher Überschuß von Ribozym (bezogen auf das Substrat Prm3) eingesetzt. Es wurden in diesen Versuchen deshalb keine Kinetiken dargestellt. Wegen der fehlenden Ablösung von der gebundenen RNA und der limitierenden Zugabe von Ribozym hätte eine unspezifische Bindung zu einer Abnahme der Spaltungseffizienz im Vergleich zum Kontrollverdau ohne Zusatz unspezifischer RNA führen müssen. Dies war nicht der Fall (siehe 3.1.3.4). Die Bindung durch die 9-10nt-langen „Antisense“-Arme der Ribozyme an die Ziel-RNA ist demnach spezifisch.

4.2 Etablierung eines Zellkultursystems

4.2.1 Prm3-Expression in der Zellkultur

Um die Ribozymaktivität angenähert *in vivo* testen zu können, wurde ein Zellkultursystem zur Expression von Prm3 entwickelt. Dies ist notwendig, da die *in vitro*-Aktivität von Ribozymen nicht vollständig auf ein *in vivo*-System übertragbar ist. Neben möglicher Degradation der Ribozyme durch zelluläre RNasen beeinflussen hier RNA-bindende Proteine die Aktivität. Proteine beeinflussen die Faltung von RNA sowie das Bilden und Trennen von RNA-Duplex-Verbindungen (Herschlag, 1995). Da ein Zellkultursystem zur Expression von Prm3 nicht existierte wurde versucht, eine einfach zu kultivierende Zelllinie (NIH/3T3) mit einem Prm3-exprimierenden Vektor zu transfektieren (3.6). Zunächst sollte Prm3 unter der Kontrolle des Cytomegalovirus „immediate early gene 1“-Promotors (CMV) zur Expression gebracht

werden (Vektor pCDNA3, Fa. Invitrogen). Der Vektor wurde linearisiert transfiziert und nach der Selektion mit G418 sollten stabil exprimierende Klone isoliert werden. Nach der Kultivierung von Klonen konnte jedoch in keinem Fall eine Prm3-Expression nachgewiesen werden. Dieser Umstand deutete auf einen möglicherweise toxischen Effekt des Prm3-Proteins in somatischen Zellen hin. Eine negative Wirkung der Prm3-(Über)-Expression war zuvor schon in *E. coli* und *S. cerevisiae* beobachtet worden (siehe 3.5). Nach der Induktion der Expression eines Prm3-codierenden Vektors (pQE30, Fa. Qiagen) war in *E. coli* fast kein weiteres Zellwachstum (Zunahme der optischen Dichte) mehr zu beobachten. Mit einem Prm3-GST-Fusionsprotein codierenden Vektor transfizierte Hefezellen zeigten nach der Induktion ebenfalls einen deutlichen Rückgang in der Wachstumsgeschwindigkeit. Trotz einer induzierten Überexpression konnte nur wenig Fusionsprotein erhalten werden (vgl. 3.5). Um eine mögliche toxische Wirkung des Prm3-Proteins zu verringern, wurde also zunächst versucht, ein durch ein zusätzliches Stopcodon verkürztes Protein auf dieselbe Weise zur Expression zu bringen. Auch hier wurde keine „Prm3“-Expression in stabilen Klonen erreicht. Nach transients Transfektion beider Konstrukte konnte Prm3 jedoch im Northern-Blot und im Fall der unveränderten Prm3-cDNA auch im Western-Blot nachgewiesen werden. Toxizität konnte also nicht der hauptsächliche Grund für das Fehlen von stabiler Expression in NIH/3T3-Zellen sein. Die nächsten Versuche zur stabilen Expression von Prm3 wurden unter Verwendung des Vektors pMT/EP unternommen. Nach der Selektion mit Hygromycin B wurden Klone erhalten, die Prm3 exprimierten (Abb. 3.19). Die Prm3-Expression wird in diesem Fall vom Zink-induzierbaren Metallothion-Promotor (MT-Promotor) kontrolliert. Im Vergleich zum CMV-Promotor zeigten transiente Transfektionen des MT-Prm3-Konstruktes auch im induzierten Zustand eine deutlich schwächere Expression. Die Expression der erhaltenen stabilen Klone ist sehr unterschiedlich (siehe 3.6). Auch wenn der Vektor zunächst episomal repliziert wird, liegt er nach mehreren Zellteilungen chromosomal integriert vor. Die unterschiedlich starke Expression und die Unterschiede in der Induzierbarkeit der über mehrere Wochen kultivierten Klone ist deshalb auf Einflüsse des umgebenden Chromatins zurückzuführen. Auf der Ebene der Transkription erreichen einige der Prm3-exprimierenden Klone das Niveau des Testis (vgl. Abb. 3.19A). Der Gehalt an Prm3-Protein ist in Proteinextrakten der stabilen Linien jedoch um ein Vielfaches höher als in Testisextrakten. Um eine vergleichbare Prm3-Bande im Western-Blot zu erhalten, müßte etwa 20 x mehr Testisextrakt aufgetragen werden (siehe Abb. 3.16BC). Dies spiegelt die bekannte Tatsache wider, daß fast alle haploid exprimierten Gene im Testis einer translationalen Repression unterliegen und nur ca. 10-20 % der mRNA aktiv translatiert wird (Cataldo et al.,

1999). Der entsprechende Effekt wurde mittlerweile auch für Prm3 gefunden (Schlüter, unpubliziert).

4.2.2 Transiente Expression von Ribozymen in der Zellkultur

Einige der stabil Prm3-exprimierenden Zelllinien sollten nun mit Expressionsvektoren transfektiert werden, die die Ribozyme als „Minigene“ enthalten. Die Ribozymaktivität *in vivo* wird laut Literatur durch die Anwesenheit von RNA-bindenden Proteinen gefördert, die die Ausbildung von RNA-Doppelsträngen und die Dissoziation der gebundenen Spaltprodukte fördern. Es wurden in diesem Zusammenhang sowohl zytoplasmatische Proteine (Tsuchihashi et al., 1993) als auch Nukleoproteine beschrieben (Heidenreich et al., 1995). Zusätzlich sollen diese Faktoren ein „multiple turnover“ und damit eine echte enzymatische Aktivität ermöglichen. Dies sollte die Effektivität von Ribozymen im Vergleich zu „Antisense“-Konstrukten ausmachen.

Zunächst erfolgte die transiente Expression von Ribozymen in stabil Prm3-produzierenden Zelllinien unter Verwendung des Tet-Systems (stabil/transient). Die Kombination von Transaktivator und Ribozym-codierendem Responder sollte ja auch in transgenen Mäusen zur Anwendung kommen. Außerdem war hier wegen der Verwendung des bidirektional aktiven Vektors (LucBiRz) über die Messung der Luciferaseaktivität ein Nachweis der Expression möglich (siehe 3.4.2). Eine Abnahme der Prm3-Expression der stabilen Linien konnte nach transienter Transfektion des Vektorpaares pTet On/pLucBiRz (vgl. 3.4.2) in keinem Fall gezeigt werden, obwohl die Expression über die Messung von Luciferasewerten bestätigt werden konnte (3.8.2, Abb. 3.24). Im Vergleich zu Prm3 war jedoch die Menge an Luciferase-mRNA und wegen der äquimolaren bidirektionalen Expression folglich auch die Menge an Ribozym-RNA sehr gering. Die Effektormoleküle verteilten sich zudem auf die wenigen transfektierten Zellen (1-2 %). Möglicherweise war nach der Isolierung von Gesamt-RNA der Ribozymeffekt deshalb nicht mehr nachweisbar. Die transfektierbare Menge von DNA zu einer gegebenen Anzahl von Zellen wird u.a. durch die auftretende Toxizität des eingesetzten Komplexes aus DNA und Transfektionsreagenz bestimmt. Um die Transfektion der Ribozymkonstrukte zu erhöhen, wurden sie unter der Kontrolle des CMV-Promotors transfektiert, der als ein starker ubiquitärer Promotor gilt. Da hier gegenüber der Verwendung des Tet-Systems nur ein Konstrukt transfektiert werden mußte, konnte verhältnismäßig mehr Ribozym-codierende DNA transfektiert werden. Die Expression des Konstruktes konnte

allerdings nicht gezeigt werden, da durch die Verwendung des Vektors pcDNA3 keine Möglichkeit bestand, gleichzeitig ein Reportergen zu exprimieren, und der direkte Nachweis der Transkription über eine Detektion der 3'-UTR (SV40) im Northern-Blot nicht gelang. Nach der Transfektion stabil Prm3-exprimierender Zelllinien mit pcDNA3/Rz-Konstrukten konnte ebenfalls weder im Northern- noch im Western-Blot eine signifikante Abnahme der Prm3-Expression gezeigt werden. Neben der effektiven transienten Transfektion nur weniger Zellen einer Prm3-exprimierenden Zellpopulation bestand ein weiteres Problem in der möglichen Inhibierung der Ribozyme durch die Antibiotika-Zusätze zur selektiven Kultivierung der stabil Prm3-exprimierenden Zellen. Der Einfluß von Aminoglykosid-Antibiotika auf die Aktivität von „Hammerhead“-Ribozymen wird in Kapitel 4.5 diskutiert. Die spezifische Reduktion der Expression eines Zielgens infolge von Ribozymaktivität nach Transfektion von Zellen und folgender endogener Expression der Ribozyme ist vielfach gezeigt worden (Sarver et al., 1990; Scanlon et al., 1991; L'Huillier et al., 1992; Snyder et al., 1993; Perriman et al., 1995; Zhou et al., 1996; González et al., 1998; Dawson und Marini, 2000). Einige Untersuchungen beschreiben die Abnahme der Zielgen-Expression nach transienter Transfektion des Zielgen- und des Ribozymkonstruktes (transient/transient). González et al. benutzten hierzu ebenfalls den Vektor pcDNA3 zur transienten Expression eines „Hammerhead“-Ribozymes und konnten eine Reduktion des Zielgenproduktes nachweisen (González et al., 1998). In diesen Experimenten wurde das Zielgen ebenfalls transient transfektiert. Über die Kotransfektion erreichten die Expressionsvektoren des Zielgens und des Ribozyms oder zur Kontrolle eines leeren Vektors immer dieselben Zellen. Das oben beschriebene Problem der Ribozymexpression in wenigen transfektierten Zellen bestand hier nicht. Der Vorgang der Kotransfektion von mehreren transfektierten Vektoren ist Grundlage der Normalisierung von Transfektionseffizienzen (2.26.3) und sollte zur Aufnahme beider Konstrukte (zur Prm3- und zur Ribozymexpression) durch dieselbe Zelle führen. Eigene Versuche dieser Art zeigten allerdings ebenfalls keinen Effekt. Gegenüber dem von González et al. beschriebenen Ansatz wurde das Rz-Konstrukt hier jedoch in geringerem molaren Überschuß gegenüber dem Ziel-RNA codierenden Konstrukt transfektiert (maximal 1:5 anstelle von 1:20).

Eine Aktivität der gegen Prm3 gerichteten Ribozyme konnte in transienten Transfektionsexperimenten nicht bewiesen werden, sie kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Ribozymexpression in transgenen Mäusen

Da eine Induktion der Expression der Effektmoleküle aufgrund des Fehlens einer Transaktivatormauslinie nicht gelang, konnte nur die Prm3-Expression der konstitutiv exprimierenden Line LucBiRz1/99 untersucht werden (siehe 3.8.1). Dazu wurde zunächst die Prm3-Expression auf RNA- und Proteinebene mit der von Wildtypmäusen verglichen. Als bei diesen Untersuchungen keine Unterschiede festgestellt werden konnten (siehe Abb. 3.22A), wurde, wie bei den Zellkulturexperimenten auch, RNA des Rz1-exprimierenden Tieres mit radioaktiv markiertem Prm3-Transkript inkubiert, um wenigstens eine Ribozymaktivität nachweisen zu können (Abb. 3.22B). Der Nachweis der Aktivität gelang auch in diesem Falle nicht. Die fehlende Reduktion der Prm3-Expression und der fehlende Nachweis der Spaltung des Prm3-*in vitro*-Transkripts kann natürlich am einfachsten durch die zu geringe Expression der Ribozyme erklärt werden. Aber selbst wenn die Expression im Testis für ein sehr aktives Ribozym hoch genug für einen nachweisbaren Effekt gewesen wäre, muß hier noch die schlechte *in vitro*-Aktivität des Rz1 berücksichtigt werden (3.1.3). Man könnte einwenden, daß in der Literatur oftmals Fälle beschrieben sind, bei denen Ribozyme mit schlechter oder gar keiner *in vitro*-Aktivität *in vivo* aktiv waren (L'Huillier et al., 1992; Domi et al., 1996). Da aber die Aktivitätstests mit transkribierter 3'-UTR für das Rz1 noch schlechter ausfielen, als die „normalen“ *in vitro*-Aktivitätstests (vgl. 3.7; 4.4), konnte mit einem drastischen Anstieg der Aktivität *in vivo* in diesem Fall nicht gerechnet werden.

4.4 Spezielle Aktivitätstests mit Ribozymen/ *In vitro*-Aktivitätstests mit transkribierter 3'-UTR

Da selbst nach der Inkubation von radioaktiv markiertem Prm3-Transkript mit RNA aus transfektierten Zellen keine Spaltprodukte nachzuweisen waren (vgl. 3.8.2), kam der Verdacht auf, daß die über Expressionsvektoren produzierten Ribozyme ihre Aktivität verloren haben. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte unterschieden sich jedoch nicht von den bereits vielfach in der Literatur beschriebenen Konstrukten zur endogenen Expression. Die Ribozyme werden als sog. „Minigene“ kloniert und enthalten nach der Transkription 5'-UTRs, 3'-UTRs und Poly A-Schwänze. Das Flankieren der Ribozyme mit 5'- und 3'-UTRs kann in manchen Fällen die Faltung des aktiven Zentrums von Ribozymen beeinflussen und sich negativ auf die Interaktion mit dem Substrat auswirken. Ein Umstand, der z.B. durch das „Abkapseln“ dieser

Bereiche in separate Sekundärstrukturen behoben wurde (Thompson et al., 1995). Es gibt jedoch Beispiele für Expressionskassetten, die für RNAs von 500 oder 1000 Basen Länge codieren, in die ein Ribozym eingebettet ist, welches trotzdem in der Zellkultur die erwünschte Aktivität zeigt (Dawson und Marini, 2000). Um die Einflüsse von UTRs angenähert bestimmen zu können, wurden die *in vitro* aktiven Ribozyme Rz1 und Rz3 (3.1.3.2) *in vitro* einschließlich der klonierten 3'-UTRs transkribiert (siehe 3.7) und *in vitro*-Aktivitätstests unterzogen. Bei der Durchführung dieser Tests ist kein 10facher Überschuss an Ribozymmolekülen gegenüber dem Substrat eingesetzt worden. Die Ribozyme stellen möglicherweise einen limitierenden Faktor dar, d.h. durch eine weiter erhöhte Zugabe könnte sich der Anteil der Spaltprodukte erhöhen. Die Versuche stellen also keine Kinetiken unter den geforderten Bedingungen der „single turnover“-Reaktionen dar. Der Einfluß von 3'-UTRs wird dennoch sehr deutlich. Während das „Bovine Growth Hormone“ (BGH) 3'-UTR einen negativen Einfluß auf die Aktivität von Rz1 hat, wird die Aktivität von Rz3 gegenüber dem Effektormolekül ohne 3'-UTR eher verstärkt. Das angehängte 3'-UTR des „Simian Virus 40“ (SV40) schränkt dessen *in vitro*-Aktivität anscheinend ein. Es hat den Anschein, daß die lokalen Faltungen der Ziel-RNA je nach Struktur eine bestimmte „Ribozymgröße“ tolerieren, ab der dann einer Verringerung der Aktivität auftritt. Da die Spaltungsaktivität von Rz3 mit angehängter SV40 3'-UTR gegenüber angehängter BGH 3'-UTR abnimmt, muß der Einfluß eines weiter vergrößerten Transkriptes untersucht werden. Dies soll mit einem *in vitro*-Aktivitätstest geschehen, dessen Ribozymtranskript 5' die Luciferase-mRNA und 3' das BGH 3'-UTR enthält.

4.5 Stabile Ribozymexpression in Prm3-exprimierenden Zelllinien

Die Erzeugung einer stabilen Zelllinie, die neben Prm3 auch Ribozymmoleküle exprimiert, sollte das Vorhandensein von Effektormolekülen in jeder Zelle garantieren. Das Ribozym Rz3 wurde wegen seiner Aktivität mit angehängtem 3'-UTR ausgewählt. Um einen Ribozymeffekt in stabilen Zellen zeigen zu können, mußte die Expression induzierbar erfolgen, da die zufällige Integration eines Konstruktes immer die Expression der Ausgangszelllinie beeinflussen kann. Die induzierbare Expression sollte über das Tet-System erfolgen, wie es auch für die transgenen Mäuse geplant war (3.8.3). Dazu wurden Aktivator- und Responder-Konstrukt zusammen mit einem Resistenz-vermittelnden Konstrukt in die stabil Prm3-exprimierende Linie P3/5 (siehe Abb. 3.19A) transfektiert. Die Expression aller Konstrukte ist

hierbei wiederum von chromosomalen Einflüssen des Integrationsortes abhängig, der inhibierend oder verstärkend wirken kann. Es war zunächst nicht klar, inwieweit eine Regulierbarkeit unter diesen Umständen gegeben ist. Wenn der Integrationsort in das Chromosom eine Aktivität der Konstrukte zuließe, bestünde die Möglichkeit, daß der CMV-Promotor des Aktivatoronstruktes (vor allem bei gleicher Orientierung der verschiedenen Konstrukte) das Responderkonstrukt unkontrollierbar aktiviert. Nach der Untersuchung der erhaltenen stabilen Klone stellte sich heraus, daß die meisten Luciferase-exprimierenden Klone tatsächlich nicht durch die Zugabe von Dox aktivierbar waren. Einige der durch Dox aktivierbaren Linien wiesen aber sehr hohe Induktionsraten auf, d. h. es konnte kein nicht-induzierter Hintergrund des Systems, wohl aber eine Luciferaseexpression nach Induktion mit Dox nachgewiesen werden. Ähnlich große Unterschiede in den Induktionsraten werden von Chiba et al., (2000) angegeben. Die Erzeugung einer stabilen Linie zur Tet-regulierbaren Expression erfolgte hier auf dieselbe Weise. In unserem Fall wiesen die gut regulierbaren Klone generell eine schlechte absolute Aktivität der Luciferase auf. Zum Test der Induzierbarkeit der Prm3-Abnahme wurden Klone ausgewählt, die eine Aktivierung durch Dox zeigten und eine möglichst hohe absolute Aktivität aufwiesen. Bisher wurde in einem Klon (siehe Abb. 3.25) eine Abnahme der Prm3-Expression nach der Induktion der Ribozymexpression gezeigt. Diese Versuche müssen wiederholt werden. Vor allem muß bei der Rehybridisierung die Expression weiterer Gene untersucht werden, deren Transkriptanteil an der Gesamt-RNA nicht so stark ist wie der der 28S-rRNA und damit genauer zu quantifizieren ist. Eine Schwierigkeit bei der Untersuchung der erhaltenen Klone war, daß mehrere der wiederholt getesteten Klone die Luciferaseexpression verloren oder die Prm3-Expression ohne nachweisbare Ribozymexpression auf ein nicht mehr zu detektierendes Niveau zurückging. Deshalb wurden die Zelllinien mit eingeführten chromosomal inserierten Konstrukten dauerhaft unter Zugabe des jeweiligen Selektionsgiftes kultiviert. In diesem Fall erfolgte der Selektionsdruck zum Erhalt aller integrierten Konstrukte durch die Zugabe von Hygromycin B und G418 (ein Gentamycin-Derivat). Über unerwünschte Begleiteffekte dieser Zellgifte ist nichts bekannt. Es gibt allerdings Untersuchungen, die eine Inhibition der Ribozymaktivität der „Hammerhead“-Aktivität durch Aminoglycosid-Antibiotika belegen (Stage et al., 1995). Zu diesen gehören auch Hygromycin B und G418. Die stärkste Inhibition erfolgt durch das Aminoglycosid-Antibiotikum Neomycin B. Die Interaktionen zwischen Aminoglycosid-Antibiotika und Ribozymen beruhen vermutlich auf ionischen Bindungen der positiv geladenen Aminogruppen des Antibiotikums mit RNA (Clouet-d'Orval et al., 1995). Bereits geringe Mengen inhibieren die Ribozymaktivität. Die Inhibition steigt mit der

Konzentration an Neomycin B an und stoppt die Spaltungsaktivität eines der getesteten Ribozyme bei einer Konzentration von 50 μM bereits nahezu vollständig (Stage et al., 1995). Die mögliche Inhibierung in stabil exprimierenden Zellkultursystemen muß bei weiteren Versuchen berücksichtigt werden, da die Zellen bisher dauerhaft unter Zusatz von 100 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B (190 μM) und 300 μg G418 (430 μM) gehalten werden.

4.6 Tetracyclin/Doxycyclin induzierbare Genexpression

Das Tetracyclin/Doxycyclin-induzierbare Expressionssystem wurde wegen verschiedener Vorteile gegenüber anderen regulierbaren Expressionssystemen ausgewählt. Diese basieren z.B. auf durch Hitzeschock oder Schwermetalle induzierbare Promotoren (Jones et al., 1986; Glanville et al., 1981) oder auf Modifikation des Steroid-Rezeptor-Systems (No et al., 1996). Alle diese Systeme bringen entweder unerwünschte Einflüsse mit sich (insbesondere die Spermatogenese ist empfindlich gegenüber Temperaturschwankungen oder Schwermetallen), zeigen hohe Basalaktivitäten oder besitzen nur eine geringe Aktivierbarkeit. Ein besonderer Vorteil des Tet-Systems ist seine Herkunft aus einem phylogenetisch weit entfernten Organismus (*E. coli*) bzw. die Verwendung von gut bekannten und relativ ungiftigen Substanzen (Tetracyclin, Doxycyclin). Schließlich existieren für das Tet-System mittlerweile etliche hundert Publikationen, jedoch kaum für das konkurrierende Ectysom-System.

4.6.1 Tet-On oder Tet-Off

Für die Verwendung des Tet-On-System in transgenen Mäuse spricht die Tatsache, das hier die Expression der Effektormoleküle ohne die ständige Gabe von Dox reprimiert ist. Im alternativ zu verwendenden Tet-Off-System muß durch fortwährende Dox-Gabe das System im inaktiven Zustand gehalten werden. Auch wenn in der Literatur (Baron und Bujard, 2000) über keine negativen Effekte bei einer dauerhaften Dox-Gabe (0,2-2 mg/ml) berichtet wird, zeigten eigene Beobachtungen eine stark erhöhte Sterblichkeit von Embryonen, wenn die Muttertiere unter Dox (2 mg/ml) gehalten wurden. Bis zu 50 % der Nachkommen wurden tot geboren oder starben in den ersten Tagen postnatal.

Ein Nachteil des Tet-On-Systems ist die im Vergleich zum Tet-Off-System erhöhte Dox-Konzentration, die zur Regulation benötigt wird. Der Transaktivator rtTA (Tet-On) benötigt

zur maximalen Aktivierung der Transkription des Responders laut Literatur 1 µg/ml Dox während das Ablösen des tTA (Tet-Off) schon ab der Zugabe von 10-20 ng/ml Medium (Urlinger et al., 2000; Baron und Bujard, 2000) vollständig erfolgt. Nach eigenen Zellkulturexperimenten zur Dox-Abhängigkeit von Transaktivatoren erreichte rtTA allerdings schon bei 0,5 µg/ml Medium die maximal mögliche Aktivierung (3.9.6). Die Verfügbarkeit von Dox in verschiedenen Geweben ist Gegenstand von Untersuchungen. Dazu wurden jeweils doppelt transgene Mäuse untersucht, die das Reporter-gen Luciferase über das Tet-Off- oder das Tet-On-System exprimierten. Die Verfügbarkeit des Induktors (Dox) ist in nahezu allen Geweben ausreichend (Eine Ausnahme bildet das Gehirn). Die vollständige Aktivierung über das Tet-On-System ist aber in den anderen getesteten Organen einer doppelt transgenen Maus nach 24 h erreicht, wenn 0,2-1 mg/ml Dox über das Trinkwasser gegeben werden (Baron und Bujard, 2000). Die regulierbare Genexpression im Testis wurde für das Tet-Off-System gezeigt, hier wurde den Tieren allerdings 0,7 mg Tetracyclin pro Tag über implantierte Tetracyclin-Pellets verabreicht (Furth et al., 1994). Nach eigenen Versuchen ist die Verfügbarkeit von Dox im Testis ausreichend, wenn es über das Trinkwasser gegeben wird. In den Versuchen wurde Testisextrakt von Mäusen, die Dox sechs Tage über das Trinkwasser erhielten (2 mg/ml), zur Induktion des Tet-Systems in Zellkulturexperimenten eingesetzt. Die 100 %ige Repression der Luciferaseaktivität der Tet-Off-enthaltenden CHO-Zelllinie AA8 (Fa. Clontech) konnte durch erheblich weniger Testisextrakt erreicht werden, als zur 100 %igen Aktivierung eines transfektierten Tet-On-Systems benötigt wurde. Die Unterschiede in der Dox-Sensitivität von tTA und rtTA sind bekannt (s.o.). Über die erhaltenen Luciferasewerte konnte auf die mutmaßliche Konzentration von Dox im Testisgewebe zurückgerechnet werden. das Gewebe muß demnach 1-1,5 mg/g enthalten haben (bei benötigten 0,5 µg/ml als Berechnungsgrundlage). Die Halbwertszeit von Dox wird in der Literatur mit 12-24 h angegeben (Riond und Riviere, 1988). Möglicherweise werden deshalb im Gewebe Konzentrationen erreicht, die in der Größenordnung der gegebenen Lösung liegt. Mit 2 mg/ml Trinkwasser ist Dox damit höher dosiert als notwendig. Auch zur Induktion der Expression in Testisgewebe sollte demnach die für Tet-On standardmäßig eingesetzte Konzentration von 0,2 mg/ml ausreichen (Baron und Bujard, 2000).

4.6.2 Basalaktivität, Hintergrundaktivität, Aktivierungspotential von Transaktivatoren

Wie alle Expressionssysteme zeigt auch das Tet-System eine unspezifische Aktivität. Diese kann in Basalaktivität und Hintergrundaktivität unterschieden werden. Die Basalaktivität beschreibt die Restaktivität des Minimalpromotors des Responderkonstruktes (siehe 1.3). Die Hintergrundaktivität beschreibt die Expression des Responders bei Vorhandensein von Aktivator und Responder im nicht-induzierten Zustand (Tet-On) bzw. im reprimierten Zustand (Tet-Off).

Besonders nach transienter Transfektion kommt es durch die große Menge an DNA in einer Zelle zu einer hohen Basalaktivität und führt so zu einer rechnerisch niedrigen Aktivierungsrate. Um die Aktivierung des verwendeten Reporterenzym zu erhöhen, wird vorgeschlagen, die Transaktivatorkonstrukte (bzw. reversen Transaktivatorkonstrukte) gegenüber dem Responderplasmid im Verhältnis 10:1 bis 100:1 zu transfektieren, insgesamt aber möglichst wenig DNA einzusetzen, um die Basalaktivität des Responders zu überdecken und die volle Promotoraktivierung des Responder-Plasmids und Aktivierungsraten bis zu einem Faktor 1000 zu erreichen (Baron und Bujard, 2000).

Allerdings zeigt vor allem der reverse Transaktivator des Tet-On-Systems (rtTA) in Abwesenheit von Dox eine Restaffinität zu *tetO*, was den Hintergrund des Tet-On-Systems ausmacht (Urlinger et al., 2000; Baron und Bujard, 2000). In diesem Fall kann der Vorschlag der Transfektion des Transaktivatorkonstruktes im Überschuss keine Lösung sein. Unter Berücksichtigung der Restaffinität von rtTA sollte nur eine Verschiebung des Transfektionsverhältnisses in die andere Richtung zu einer Erhöhung des Aktivierungsfaktors führen. Einzelne doppelt transiente Transfektionen von pTet-On und pTRE-Luc im Verhältnis 1:5 und 1:10 zeigten tatsächlich die bei einer 1:1 Transfektion maximal erreichbare Luciferaseaktivität nach Induktion mit Dox bei reduziertem Hintergrund (nicht beschrieben). Eine deutliche Verbesserung der Aktivierungseigenschaft nach transienter Transfektion des Tet-On-Systems (pTet-On und pTRE-(Luc)) kann durch Variation der Plasmid-Verhältnisse also nicht erreicht werden, da entweder die Basalaktivität oder die Hintergrundaktivität verstärkt wird. Die erreichbaren Aktivierungsraten nach transienter Transfektion des Tet-Off wie des Tet-On-Systems sollen um den Faktor 1000 liegen (Baron und Bujard, 2000). Diese Werte können mit dem Tet-Off-System erreicht werden (z.B. Rang und Will, 2000). In unseren Versuchen mit dem Tet-On-System gelang mit transienten Transfektionen der

unmodifizierten Konstrukte im Verhältnis 1:1 eine Dox-induzierte Aktivierung lediglich um den Faktor 10.

Die Integration des Responderkonstruktes ins Chromatin etwa in einer stabilen Zelllinie, aber auch in einer transgenen Maus führt allgemein zu einer drastischen Reduzierung der Basalaktivität. Günstig ist ein Integrationsort, der einerseits nicht in einem transkriptionell inaktiven Bereich liegt, andererseits nicht von nahen *cis*-aktiven Enhancern beeinflusst wird. Diese Integrationsorte werden als *s/a* Loci („silent but activatable“) bezeichnet (Baron und Bujard, 2000). In diesem Übersichtsartikel wird beschrieben, daß 5-15 % von erhaltenen stabilen Responderklonen (HeLa-Zellen) diesen Bedingungen entsprechen. Diese Werte entsprechen in etwa unseren Beobachtungen nach stabilen Transfektionsexperimenten mit pTRE-Luc in NIH/3T3-Zellen (3.9.3.2) und CHO-Zellen (nicht beschrieben). Aber auch wenn ca. 10 % der Klone, die pTRE-Luc in *s/a*-Loci enthalten als regulierbar beschrieben werden, sind die möglichen Aktivierungsfaktoren nach transienter Transfektion von Aktivorkonstrukten sehr unterschiedlich (3.9.3.2) und schwanken zwischen 2 (diese Klone wurden nicht verwendet) und 600.

Die Integration eines Responderkonstruktes als Transgen in Mäusen unterliegt den gleichen Einschränkungen (3.4.4). Wie auch in stabilen Zelllinien wurde (bei transgenen Tieren nach Transfektion von Transaktivorkonstrukten in Ohrfibroblastenkulturen) nicht aktivierbare, aktivierbare und konstitutive Expression des Reportergens festgestellt. Die Aktivität aller Luciferase-enthaltenden Responderkonstrukte in transgenen Mäusen wurde deshalb vor der Verpaarung der Tiere in Zellkulturexperimenten getestet (3.4.4). Das Testen der Expression von Responderkonstrukten durch Kultivierung und Transfektion von primären Fibroblasten in Zellkulturexperimenten ist ein durchaus übliches Verfahren zur Abschätzung des Aktivierungspotentials eines Transgens (Kistner et al., 1996; Schultze et al., 1996). Die Möglichkeit der Aktivierung der Luciferaseexpression ließ sich in unseren Versuchen gut bestimmen. Die festgestellten Unterschiede in der Möglichkeit der Aktivierung der Expression in den Ohrfibroblasten konnten im Fall der konstitutiv exprimierenden Linien auf die Gewebe übertragen werden. Für die transgene Linie Rz1/99 wurde eine konstitutive Luciferase-Expression in verschiedenen Geweben festgestellt, die aber in der absoluten Höhe stark gewebeabhängig war. In ähnlicher Weise ist auch die Basalaktivität bei Tieren, die ansonsten regulierbare Expression zeigen, gewebeabhängig (Kistner et al., 1996). Hieraus ergibt sich, daß die maximal erreichbare Aktivierungsrate ebenfalls von Gewebe zu Gewebe variiert. Bei der Expression von Effektormolekülen ist jedoch neben einer guten Regulierbarkeit auch die absolute Aktivität ein wichtiger Faktor. In verschiedenen Zelllinien

wurde gezeigt, daß zumindest der über tTA maximal aktivierte Minimalpromotor der Responder stärker sein kann als bei dem vollständigen CMV-Promotor (Baron und Bujard, 2000, hierin zitiert). Unsere Beobachtungen zeigen, daß die absolute Aktivität des Tet-Systems mit der stabilen Integration der Komponenten insgesamt sinkt. Dies umso mehr, je niedriger die Basalaktivität des inserierten Responders oder die Hintergrundaktivität des Systems ist. Um eine optimal regulierbare und trotzdem stark exprimierende doppelt stabile Zelllinie oder doppelt transgene Mauslinie zu erhalten, bleibt letztlich nur die Möglichkeit viele Klone und F₀-Tiere zu testen.

4.6.3 Negative Effekte von Transkriptionsaktivatoren auf Zellen

Die maximale Aktivierbarkeit hängt neben dem Integrationsort des Responderkonstruktes von der ausreichenden Synthese des Transaktivators ab. Andererseits führt eine zu starke Expression des Transaktivators (rtTA wie tTA) zur Beeinträchtigung des Zellwachstums. Die Überexpression von Transkriptionsfaktoren und besonders der VP16-Domäne ist toxisch. Diese Toxizität soll aus der unspezifischen Bindung von Transkriptionsfaktoren an die VP16-Domäne resultieren und zu einer Verarmung der Zelle an solchen Faktoren führen, ein Phänomen, das als „Squelching“ beschrieben wurde (Gill und Ptashne, 1988; Berger et al., 1990). Dieser Umstand bedeutet (theoretisch) für die Generierung stabiler Linien, daß nur diejenigen Klone oder mikroinjizierten Oocyten überleben, in denen der Transaktivator aufgrund chromosomaler Einflüsse nur „moderat“ exprimiert wird. Es bestünde also keine direkte Korrelation zwischen der Expression des Transaktivators und der Stärke des ihn kontrollierenden Promotors (Freundlieb et al., 1997).

Die Untersuchungen zum Squelching-Effekt wurden zumeist mit GAL4-VP16 Fusionsproteinen durchgeführt und zeigten, daß eine Überexpression von Zellen nicht toleriert wird (Berger et al., 1990; Kelleher et al., 1990). Die Verbindung des Squelching zum Stop des Zellwachstums gab Hinweise darauf, daß der Effekt ein quantitatives Problem ist (Gilbert et al., 1993). Die sog. GTF's („general transcription factors“) stellen danach den limitierenden Faktor dar (Ptashne und Gann, 1990; Guarente, 1995). Die in Zellkulturen (HeLa-Zellen) verkraftbare kritische Menge von Tet-Transaktivatoren wird mit ca. 10000 Molekülen/Zelle angegeben (Baron und Bujard, 2000). Andere Untersuchungen des Effektes verglichen die durch Squelching verursachte Reduzierung der Aktivität von chromosomal integrierten und episomal vorliegenden Reporter genen nach der starken Expression des chimären

Transaktivators GAL4/VP16. Die bisher als Squelching beschriebene Reduktion der allgemeinen Genexpression war nur für das episomale Reportergen nachweisbar. In das Chromosom integrierte Gene sind hiernach vielleicht wegen unterschiedlichen GTFs nicht betroffen (Natesan et al., 1997).

Bei den zu dieser Dissertation durchgeführten Transfektionsexperimenten wurde unabhängig vom transfektierten Aktivatorbaustein nach der Induktion des Tet-Systems mit Dox eine deutliche Abnahme der Aktivität des zur Normalisierung benutzten Reporterenzym β -Galactosidase festgestellt (siehe 3.9.3.1; Tab. 3.5). Wahrscheinlich werden nach der Dox-vermittelten Bindung an *tetO* weitere Transkriptionsinitiationsfaktoren rekrutiert, die VP16 alleine nicht bindet. Durch die vielen in den transfektierten Zellen vorhandenen Plasmide werden etliche tausend aktive Transkriptionskomplexe geschaffen, die vor der Bindung des Tet-Repressors nicht da waren, was zur deutlichen Reduktion der Expression der kotransfektierten β -Galactosidase führte. Ein Einfluß auf chromosomal exprimierte Gene wurde nicht näher untersucht. Bei den üblichen, zur Rehybridisierung von Northern-Blots eingesetzten Sonden (vgl. Abb. 3.24) konnte jedoch kein Squelching-Effekt beobachtet werden.

4.6.4 Stabilität der Transaktivatorproteine

Das Fehlen leicht nachweisbarer Transaktivatormengen in stabil transfektierten Zelllinien und transgenen Mäusen kann neben der Selektion auf wenig aktive Integrationsorte (Squelching-Problem, siehe 4.6.3) auch auf die Instabilität des Transaktivatorproteins zurückgeführt werden. Western-Blot-Analysen transient mit Transaktivatorbausteinen transfektierten HeLa-Zellen zeigten die schnelle Degradierung der TetR-VP16 und vor allem der rTetR-VP16-Fusionsproteine anhand von Degradationsprodukten (Urlinger et al., 2000). Die in dem dargestellten Blot auftretende fast vollständige Degradierung des rTA war in unseren Versuchen nicht so drastisch. In den auf ähnliche Weise mit NIH/3T3-Zellen durchgeführten Versuchen (siehe 3.9.2 Abb. 3.28) trat hauptsächlich eine distinkte Abbaubande auf. Der nahezu vollständige Abbau blieb aus. Der Grund für den unterschiedlich starken Abbau könnte in der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien liegen. Der von uns durchgeführte Western-Blot sollte allerdings auch keinen Stabilitätstest darstellen, sondern nur den Nachweis der unterschiedlichen Proteingrößen der Multimere erbringen. Die Zellextrakte wurden deshalb mit verschiedenen Proteinase-Inhibitoren versetzt. Die im Vergleich zum tTA

besondere Instabilität des prokaryotischen rTet-Repressoranteils des rtTA-Proteins könnte ein Grund sein, wieso die ausreichende Produktion in einigen Geweben transgener Tiere und in verschiedenen Zelllinien trotz des Vorhandenseins der entsprechenden tTA-Maus- oder Zelllinie bisher nicht gelang (Urlinger et al., 2000).

4.6.5 Transgene/ keimzellspezifische Expression des Transaktivators

Die Expression des reversen Transaktivators sollte über den PGK2-Promotor spezifisch in Keimzellen erfolgen und das Expressionsfenster der Protamine abdecken, um die Effektormoleküle nicht nur zeitlich gesteuert, sondern auch lokalisiert zur Expression bringen zu können. Eine ausschließliche Expression von Effektormolekülen in einem einzelnen Gewebe oder Zelltyp ist bei einem Einsatz gegen die mRNA eines nur an dieser Stelle exprimierten Gens im Grunde nicht notwendig (sie wäre notwendig zur gewebsspezifischen Ausschaltung eines ubiquitär exprimierten Gens). Die Alternative zur Expression des Transaktivators bestünde in einem ubiquitär aktiven Promotor wie dem Cytomegalovirus „immediate early Enhancer/Promoter“ (CMV IE). Eine Expression in Keimzellen wäre dadurch allerdings keineswegs sichergestellt gewesen. Bei der Auflistung der tTA- und rtTA-exprimierenden Mauslinien auf der „Homepage“ des Bujard-Labors in Heidelberg wird für die CMV-Aktivatorlinien die „Gewebsspezifität Skelettmuskel und andere Gewebe“ angegeben. Innerhalb der aktiven Gewebe zeigte sich die Expression dieses Promotors zusätzlich heterogen. *In situ*-Analysen der CMV-getriebenen tTA-Expression zeigten mosaikartige Expressionsmuster (Furth et al., 1994, Hennighausen et al., 1995). Durch die Verwendung von gewebsspezifischen Promotoren konnte meist eine gleichmäßige Expression herbeigeführt werden, mittlerweile sind verschiedene Transaktivatormäuse (vor allem für tTA) verfügbar, die einen gewebsspezifischen Promotor zur Kontrolle des Transaktivators enthalten.

Der Nachweis des rtTA-Proteins in der Mauslinie PGK2Tet-On konnte nicht erbracht werden. Die Transfektion von Keimzellen mit Responderkonstrukten und die danach regulierbare Expression einer Reportergens wäre sicher der beste Beweis der Funktionalität gewesen. Aber selbst wenn die Transfektion erfolgreich gewesen wäre (vgl. 3.3.2), ist die regulierbare Expression auf diese Weise eher fraglich. Nach eigenen Erfahrungen (vgl. 3.9.7) ist die Regulation eines transient transfektierten Responders über ein chromosomal integriertes Aktivatorkonstrukt nur sehr eingeschränkt möglich. Zur Aktivierung der Transkription eines

Responders sind zwar nur sehr wenige Transaktivatormoleküle notwendig, nach transienter Transfektion sind einzelne Zellen aber regelrecht mit Responderplasmiden überladen. Eine effektive Regulation ist wegen der bekannten Basalaktivität des Responders TRE-(Luc) nicht mehr möglich (siehe 4.8). Ein Hinweis auf die Testung einer Aktivatorlinie auf diese Weise konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Der Nachweis des Transaktivatorproteins mit Antikörpern ist prinzipiell möglich. Er gelang jedoch nur nach transienten Transfektionen von Zellen (siehe 3.9.2), nicht aber unter Verwendung von Testisproteinextrakten der Linie PGK2Tet-On. Dieser Umstand an sich schließt das Vorhandensein eines funktionellen Transaktivatorproteins nicht aus. Die in der Literatur mit der Vorstellung des Tet-Off-Systems 1992 beschriebene HeLa-Zelllinie X1 erreicht z.B. ca. $2,5 \times 10^5$ RLU/ μ g Protein nach einer Aktivierung um den Faktor 10^5 . Trotzdem gelang der Nachweis des Transaktivatorkonstruktes in dieser doppelt stabilen HeLa-Zelllinie im Western-Blot nicht (Gossen und Bujard, 1992). Die pGK2Tet-On Mauslinie wurde deshalb trotz des fehlenden Proteinnachweises bei gleichzeitig deutlich nachweisbarem rtTA-Transkript (vgl. Abb. 3.11) weiterverwendet, weil bei der Sequenzierung der genomischen DNA kein Fehler (Mutation) nachgewiesen werden konnte. Die Aktivität des Transaktivators in der Linie PGK2Tet-On sollte nun über die regulierte Aktivität einer publizierten Respondermaus nachgewiesen werden. Dazu wurden Tiere mit Mäusen der Responderlinie L7 (Kistner et al., 1996), die nach der Verwendung in verschiedenen Laboren nach Bochum und von dort in unser Labor kam, verpaart und doppelt transgene Tiere mit Dox induziert. Es konnte in diesen doppelt transgenen Mäusen nach der Dox-Gabe über das Trinkwasser wiederholt keine Luciferaseexpression nachgewiesen werden. Die Linie L7 zeigte darüber hinaus in der Ohrfibroblastenkultur (vgl. 3.4.4) nur einmal eine nicht reproduzierbare, sehr schwache Luciferaseaktivität, so daß eine Inaktivität des Konstruktes in der Linie L7 angenommen wurde. Da nun wiederum der Beweis des Defektes in der Transaktivatorlinie fehlte, wurde sie mit eigenen Respondern verpaart (3.4.5). Da auf die Verwendung dieser z. T gut aktivierbaren Responder keine reproduzierbare Aktivität induziert werden konnte, kann man von einer Inaktivität der PGK2Tet-On-Aktivatormaus ausgehen. Das Fehlen einer Mutation auf genomischer Ebene bei gleichzeitiger starker Transkription der cDNA deutet auf eine verhinderte Translation oder eine extrem hohe Instabilität des Proteins hin. Tatsächlich ist laut Literatur die Instabilität des rtTA-Proteins (Tet-On) gegenüber dem tTA (Tet-Off) noch weiter erhöht. Diese Instabilität (vgl. 4.6.4) soll der Grund dafür sein, daß die Expression des tTA-Proteins als Transgen für mehr Gewebe publiziert ist, als die des rtTA-Proteins (Uhrlinger et al., 2000). Bisher wurde

für den Testis nur eine Regulation über das Tet-Off-System publiziert (Furth et al., 1994). Es bleibt also abzuwarten, ob rtTA überhaupt im Testis aktiv sein kann.

4.7 Modifikationen der Tet-Komponenten

Ein zu Beginn dieser Arbeit publizierter Ansatz zur Reduktion der negativen Auswirkungen starker Transaktivatorexpression (siehe 4.6.3) war der Ersatz der VP16-Domäne des Transaktivators, die mit verschiedenen Komponenten des Transkriptionsapparates interagieren kann (Baron et al., 1997, hierin zitiert). Die nur für das Tet-Off-System publizierten Modifikationen sollten auf das von uns verwendete System Tet-On übertragen werden. Dazu wurde die VP16-Domäne durch multimerisierte Minimalanteile hieraus ersetzt (siehe 3.9). Diese 12 Aminosäuren großen Minimaldomänen enthielten einen Phenylalaninrest (Position 442 der ursprünglichen VP16-Domäne, nach Seipel et al., 1992). Der Ersatz dieses Phenylalanins durch andere aromatische Aminosäuren hatte in vorhergegangenen Mutationsstudien zu einer Abnahme des Aktivierungspotentials von VP16 geführt. Nicht-aromatische Aminosäuren an Position 442 führten dabei zum Funktionsverlust der VP16-Domäne (Regier et al., 1993). Dieser für die Minimaldomänen namensgebender Aminosäurerest sollte also eine zentrale Rolle in der Transkriptionsaktivierung spielen. Für das tTA-Protein konnte mit 4fach multimerisierten F-Domänen eine Steigerung des Aktivierungspotentials um den Faktor 2,3 und eine verbesserte Tolerierung des tTA in HeLa-Zellen gezeigt werden (Baron et al., 1997). Da sich die Transaktivatoren tTA und rtTA nur in den *tetO*-Bindungseigenschaften des Tet-Repressoranteils unterscheiden, der keine Rolle in der Transkriptionsaktivierung spielt, sollte die Verwendung der multimerisierten F-Domänen auf das Tet-On-System (rtTA) übertragbar sein, um auch hier die Aktivierungseigenschaften und die tolerierte Proteinmenge zu erhöhen. Entsprechend hergestellte F-Multimere zeigten nach der Fusion mit dem reversen Tet-Repressor kein gesteigertes Aktivierungspotential. Mit dem Anfügen von F-Domänen stieg die nichtinduzierte Hintergrundaktivität stark an, multimerisierte Domänen dieses Typs waren im Tet-On-System also nicht verwendbar. In neueren Veröffentlichungen wird auf eine Dissertation verwiesen, bei der eine drastische Steigerung der Affinität des reversen Transaktivators zu *tetO* festgestellt wurde, wenn VP16 durch multimerisierte F-Domänen ersetzt worden war (Baron und Bujard, 2000; Urlinger et al., 2000 hierin zitiert). Die in dieser Arbeit getesteten L-Domänen zeichnen sich durch den Verlust des zentralen Teils der F-Domänen, des Phenylalanins (Pos. 442) und des Aspartats

(Pos. 443) aus vgl. 3.9.1). Dieser Umstand führte zu Minimaldomänen, die nach Multimerisierung und Fusion mit dem reversen Tet-Repressor eine erhöhtes Aktivierungspotential zeigten. Die Verwendung von mehr als 8 multimerisierten L-Domänen führte zu einem im Vergleich zum originalen Transaktivator deutlich gesteigerten Aktivierungspotential, das vor allem auf eine deutlich reduzierte Hintergrundaktivität zurückzuführen war. Mit der Addition weiterer L-Domänen stieg der nicht Dox-induzierte Hintergrund leicht an. Durch die weiterhin zu beobachtende Steigerung des Aktivierungspotentials war alles in allem eine Verbesserung des Aktivierungsverhaltens bis zum 17L-Konstrukt zu erreichen (siehe Abb. 3.29). Eine Erklärung für das Aktivierungsverhalten der L-Domänen bleibt schwierig. Möglicherweise verhindert die Faltung des Proteins, daß eine einzelne 12 Aminosäuren lange Domäne mit Transkriptions-Initiationsfaktoren interagiert. Wieso das stärkste Aktivierungspotential der F-Domänen nach 3 oder 4 Multimerisierungen erreicht ist, aber 16 oder 17 L-Domänen zum besten Ergebnis im Tet-On-System führen, ist bisher unerklärlich. Die Möglichkeit der Aktivierung durch L-Domänen zeigt aber, daß Phe⁴⁴² keine zur Transkriptions-Initiation essentielle Aminosäure ist. Angesichts der Überlegenheit der L- gegenüber den F-Domänen wäre es interessant, die L-Domänen jetzt in Fusion mit dem ursprünglichen Tet-Repressor (Tet-Off) zu testen.

Ein weiterer beobachteter Effekt der L-Domänen ist deren reduzierte Sensitivität gegenüber der Aktivierung mit Dox. Die volle Aktivierung des Responderkonstruktes mit dem 17L-Transaktivator (rTetR+17L) wurde erst bei einer Dox-Konzentration von 2 µg/ml Medium erreicht, während das Originalkonstrukt rTA (rTetR + VP16) schon bei 0,5 µg/ml (siehe 3.9.6) maximal aktiviert. Dies ist eine erstaunliche Beobachtung, da durch die L-Domänen nur der transkriptionsaktivierende Anteil des Fusionsproteins und nicht der Dox-bindende rTet-Repressoranteil verändert werden sollte. Man kann spekulieren, daß die L-Multimere mit der Dox-bindenden Domäne des reversen Tet-Repressors interagieren und ihre Zugänglichkeit für Dox reduzieren. Tests wie in Kapitel 3.9.6 beschrieben aber unter Einsatz der kleineren Multimere (L4-L10), könnten hier den Zusammenhang zwischen vergrößertem Protein und Verlust an Dox-Sensitivität herstellen. Die Interaktion mit dem Tet-Repressor könnte auch eine Erklärung für die deutlich reduzierte Hintergrundaktivität des Systems sein. Durch die Interaktion mit den L-Domänen sinkt die beschriebene Restaffinität des reversen Tet-Repressors zu den tetO-Sequenzen (Urlinger et al., 2000; Baron und Bujard, 2000). Nachdem Dox an den Transaktivator gebunden hat, induziert es eine Konformationsänderung, die zur Dimerisierung führt. Die Interaktion der L-Multimere mit dem reversen Tet-Repressoranteil des Fusionsproteins ist nun nicht mehr möglich. Diese Überlegung wird durch die Tatsache

gestützt, daß durch die am stärksten aktivierenden L-Konstrukte mindestens 100 % der durch das originale Fusionsprotein erhaltenen absoluten Aktivität erreicht wird (Abb. 3.29A).

Die verringerte Sensitivität gegenüber Dox hat praktische Konsequenzen in der Anwendung dieser Konstrukte. Durch den linearen Anstieg der Dox-vermittelten Aktivierung durch das Konstrukt 17L (Abb. 3.31) ist einerseits eine feinere abgestufte Aktivierung in der Zellkultur möglich. Dies ist von besonderem Vorteil, wenn eine Genexpression quantitativ reguliert werden soll. In transgenen Tieren wird dagegen der Nachteil des Tet-On-Systems gegenüber dem Tet-Off-System jedoch weiter verstärkt. Die sowieso schon gegenüber dem Tet-Off-System höhere notwendige Konzentration von Dox wird weiter erhöht. Dies kann zu ungenügenden Dox-Konzentrationen etwa im Gehirn führen, das durch die Blut-Hirn-Schranke schlechter für Dox zugänglich ist als andere Gewebe. Die Lösung dieses Problems könnte in der Veränderung des rTetR liegen. Urlinger und Mitarbeiter (Urlinger et al., 2000) isolierten eine mutierte Form des rTA, die 100%ige Aktivierung schon bei einer Dox-Konzentration von 0,1 µg/ml vermittelt. Weitere Mutationen des Tet-Repressoranteils führten zu zwei Proteinen mit dem vom rTA-Protein bekannten reversen Phänotyp, obwohl die neuen Mutationen nicht denen entsprachen, die zum ersten rTA geführt haben. Diese neuen rTAs erlauben zudem den Austausch der VP16-Domäne mit den F-Minimaldomänen ohne die Spezifität oder die Induzierbarkeit des Systems zu verändern.

Neben der Optimierung des Transaktivators besteht die Möglichkeit der Veränderung des Responders. Neben den *tetO*-Sequenzen, die die Bindung des Transaktivators vermitteln, besteht der Responder aus einem Minimalpromotor, der Teile des CMV „immediate early gene 1 promotor“ enthält. Der Ersatz dieses Minimalpromotors durch normalerweise pflanzenspezifische Promotorsequenzen reduziert die Basalaktivität des Responders und die Hintergrundaktivität des Tet-Systems nach der Transfektion von Aktivatoren (siehe 3.9.5). Der 17L-Transaktivator zeigte in Kombination mit diesen modifizierten Promotoren eine im Vergleich zur Verwendung mit den originalen Respondern überproportional reduzierte Hintergrundaktivität. Die Vorteile der Verwendung dieser „pflanzenspezifischen“ Responder liegen - insbesondere in Kombination mit den L-Aktivatorstrukturen - in der stringenteren Regulation. So könnte die regulierte Expression von Genen möglich werden, deren Genprodukte im nichtinduzierten Zustand keinesfalls auch nur minimal exprimiert werden dürfen. Dies ist der Fall bei Genen, die z.B. Apoptose-induzierende Genprodukte kodieren. Durch den linearen Anstieg der L-Domänen vermittelten Aktivierung nach der Zugabe von Dox kann die Expression kontrolliert hochreguliert werden.

4.8 Transaktivatormäuse mit 17L-Minimaldomänen

Für den Versuch der Expression des modifizierten Transaktivators 17L (3.9.7) wurde das Transaktivatorkonstrukt unter die Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV IE-Promotors gestellt. Dieser Promotor wurde ausgewählt, obwohl er bekanntermaßen in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark ist und im einzelnen Gewebe mosaikartig exprimiert sein kann (vgl. 4.6.5). Das primäre Ziel dieser Versuche ist aber zunächst die Untersuchung, ob mit dem neuen Konstrukt überhaupt eine transgene und möglichst stark exprimierende Maus erhalten werden kann. Während es für das Tet-Off-System funktionelle transgene Transaktivatormäuse mit den verschiedensten spezifisch exprimierten Promotoren gibt (vgl. „Homepage“ des Bujard-Labors: <http://www.zmbh.uni-heidelberg.de/Bujard/homepage.html>), sind für das Tet-On-System nur wenige Tiere bekannt. Der Versuch, mit den für Tet-Off erfolgreichen Promotoren auch Tet-On-Transgene zu erhalten, scheiterte oftmals (Urlinger et al., 2000). Unter der Kontrolle des hCMV IE-Promotors ist eine transgene Transaktivatormaus für das Tet-On-System beschrieben (Kistner et al., 1996). Bisherige Versuche mit transgenen 17L-Tieren bestätigen die Vermutungen, daß bei andauernder Expression nur ein bestimmtes Expressionslimit toleriert wird (Baron und Bujard, 2000). Die bisher im Northern-Blot getesteten transgenen Tiere zeigten kein Signal, was auf eine schwache Expression hindeutet. Trotzdem konnte in Zellkulturexperimenten eine Dox-vermittelte Zunahme der Luciferaseaktivität nachgewiesen werden, allerdings nur um einen Faktor von 2-3. Diese schlechte Aktivierbarkeit liegt möglicherweise an der Überladung der Zellen mit transient transfektierten Responderplasmiden und der daraus resultierenden Basalaktivität. Wenn nur diejenigen transgenen Tiere überleben, die eine geringe Expression des Transaktivators aufweisen, könnte die Transfektion einzelner Zellen mit Responderkonstrukten zu einer Basalaktivität führen, die von wenigen Transaktivatormolekülen nicht mehr zu steigern ist. Daß die gemessene Luciferaseaktivität wirklich aus der Basalaktivität des episomal vorliegenden Responderkonstruktes stammt, zeigen die Transfektionsversuche zum Expressionstest der Luciferase-enthaltenden Responderkonstrukte (LucBiRz, siehe 3.4.4). Hier konnte, bei chromosomal integriertem Responderkonstrukt, keine Basalaktivität und nach der Transfektion mit Transaktivatorkonstrukten auch keine Hintergrundaktivität festgestellt werden. Diese Überlegungen decken sich mit den Beobachtungen, die in der Literatur zur Basalaktivität des Responders beschrieben werden (Baron und Bujard, 2000). Einen weiteren Hinweis auf die Überlagerung der Transkriptionsaktivierung durch die Basalaktivität bei diesen Tests gaben die Transfektionen mit den Respondern, die aus

pflanzenspezifischen Minimalpromotoren aufgebaut sind und in Säugerzellen eine verringerte Basalaktivität aufweisen (3.9.5). Die über das Transgen vermittelte Aktivierung nach der Induktion mit Dox konnte mit diesen Respondern im Vergleich zum originalen Konstrukt verbessert werden (siehe 3.9.7). Die Untersuchung von doppelt transgenen Tieren wird zeigen, ob die Transaktivatorexpression einiger 171-Mäuse ausreicht, um in einer doppelt transgenen Maus Responderkonstrukte in einem s/a-Locus zu aktivieren. Die nächsten Schritte sind danach die Untersuchung der aktivierbaren Expression in den einzelnen Geweben dieser Tiere. Sollte eine gute Regulierbarkeit im Testis festgestellt werden, folgen dann erneut Versuche zur Repression der Prm3-Expression mit Hilfe von Effektormolekülen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, das System der Tetracyclin-induzierbaren Genexpression (Tet-System) mit einer Anti-mRNA-Strategie zu verbinden. Die entsprechenden Effektormoleküle wurden als „Minigene“ mit den Komponenten des Tet-Systems kombiniert, wodurch ihre endogene Expression durch die Verabreichung des Induktors regulierbar sein sollte.

- Prm1 und Prm3 wurden nach möglichen Ziel-Triplets für „Hammerhead“-Ribozyme durchsucht. Verschiedene mögliche Spaltstellen wurden identifiziert und die Aktivität einiger Ribozyme *in vitro* gezeigt. Dabei zeigte sich ein erheblicher Unterschied in der Aktivität der für verschiedene Spaltstellen spezifischen Ribozyme.
- Für *in vitro* aktive Ribozyme gegen die Prm3-mRNA wurden unter „single-turnover“-Bedingungen Spaltungskinetiken untersucht. Die Unterschiede in der Effektivität dieser Ribozyme konnte dadurch dargestellt werden.
- Es wurden *in vitro*-Versuche durchgeführt, bei denen der Einfluß verschiedener 3'-UTRs auf die Ribozymaktivität gezeigt wurde. Diese veränderten die Spaltungsaktivität spezifischer Ribozyme in unterschiedlicher Weise, wobei der Einfluß gleicher 3'-UTRs auf verschiedene spezifische Ribozyme ebenfalls unterschiedlicher Art war.
- Die Expression des reversen Tet-Transaktivatorproteins unter der Kontrolle des keimzellspezifischen Promotors PGK2 führte zu einer transgenen Mauslinie, die trotz starker Transkription des Transgens kein aktivierendes Protein produziert. Eine regulierbare Ribozymexpression in doppelt transgenen Mäusen war deshalb nicht möglich.
- Die cDNAs verschiedener Effektormoleküle gegen die Prm3-mRNA wurden in einen Respondervektor kloniert und nach Mikroinjektion wurden transgene Tiere erhalten. Da das Reportergen Luciferase in den Ribozym- und im „Antisense“-Konstrukt ebenfalls exprimiert wurde, konnte die (regulierbare) Expression in Zellkulturexperimente nachgewiesen werden. Die Expression einiger transgener Tiere mit Prm3 „Sense-Antisense“-Konstrukten konnte nicht untersucht werden. Ein neues Konstrukt zur RNAi, das Luciferase koexprimiert, ist kloniert worden.

Die konstitutiv exprimierende Mauslinie LucBiRz1/99 zeigte keine Reduktion in der Prm3-Expression.

- Es gelang, ein Prm3-GST-Fusionsprotein in *Saccharomyces* zu exprimieren und aufzureinigen, nach der Immunisierung von Kaninchen wurde ein Prm3-spezifisches Antiserum erhalten, mit dem sich Prm3 detektieren ließ.
- Die stabile Expression von Prm3 unter der Kontrolle eines Zinc-induzierbaren Promotors führte zur Etablierung eines Prm3-Zellkultursystems in NIH/3T3-Zellen.
- Die transiente Expression von Ribozymen mit Hilfe verschiedener Expressionssysteme führte zu keiner meßbaren Abnahme der Prm3-Produktion im Zellkultursystem. Die Etablierung von Zelllinien, die neben Prm3 ein über das Tet-System regulierbares Ribozym stabil exprimieren, zeigten bei ersten Experimenten eine Abnahme des Prm3-RNA-Gehalts nach induzierter Ribozymexpression.
- Die Modifikation des Transaktivatorproteins im Bereich der VP16-Domäne führte zu einem Protein mit deutlich verbesserten Aktivierungseigenschaften. Diese wurde in den verschiedensten Zellkulturexperimenten dargelegt. Die Eigenschaften des Proteins wurden zudem näher charakterisiert. Neben der verbesserten Aktivierungseigenschaften konnte eine verminderte Sensitivität gegenüber dem Induktor (Dox) festgestellt werden.
- Das verbesserte Transaktivatorprotein liegt bereits in verschiedenen Mauslinien als Transgen vor. Erste Zellkulturexperimente zeigen eine mögliche Aktivierung von Respondern. Die Aktivierung durch diese Transgene muß jetzt in doppelt transgenen Mäusen getestet werden.

Die Ergebnisse zeigen deutlich die Schwierigkeiten bei der Übertragung von Modellsystemen in eine komplexe *in vivo*-Umgebung. Das Tet-System ist bei transgener Expression in Mäusen oder auch nach stabiler Integration in Zellkulturen sehr stark abhängig von der chromosomalen Lokalisation. Es bedarf einer großen Zahl von Versuchen bis die optimalen transgenen Linien gefunden werden können. Ob mit der Expression von Effektormolekülen eine Reduktion der Prm3-Expression in der Maus erreicht werden kann bleibt abzuwarten.

6 Literaturverzeichnis

ADHAM, I. M., NAYERNIA, K., BURKHARDT-GÖTTGES, E., TOPALOGLU, Ö., DIXKENS, C., HOLSTEIN, A. F. und ENGEL, W. (2001). Teratozoospermia in mice lacking transition protein 2 (Tnp2). *Hum. Mol. Rep.* (zur Publikation angenommen).

AGRAWAL, S. und ZHAO, Q. (1998). Antisense therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 519-528.

AUSUBEL, F. M., BREUT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. und STRUHL, K. (1992). „Current Protocols in Molecular Biology“ John Wiley & Sons, Inc., USA.

BALHORN, R., REED, S. und TANPAICHITR, N. (1988). Aberrant protamine1/ protamine2 ratios in sperm of infertile human males. *Experimentia* **44**: 52-55.

BALHORN, R. (1989). Mammalian protamines: structure and molecular interactions. In: *Molecular Biology of Chromosome Function*. Hrsg.: K. W. Adolph. Springer-Verlag, New York/ Berlin/ Heidelberg, S. 366-395.

BARON, U., FREUNDLIEB, S., GOSSSEN, M. und BUJARD, H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucl. Acids Res.* **23**(17):3605-3606.

BARON, U., GOSSSEN, M und BUJARD, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2723-2729.

BARON, U und BUJARD, H. (2000). Tet Repressor-Based System for Regulated Gene Expression in Eukaryotic Cells: Principles and Advances. *Methods Enzymol.* **327**: 401-421.

BARRY, M. A., BARRY, M. E. und JOHNSTON, S. A. (1994). Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *Biotechniques* **16**: 616-620.

BELOKOPYTOWA, I. A., KOSTYLEWA, E. I., TOMILIN, A. N. und VOROBEB, V. I. (1993). Human male infertility may be due to decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol. Reprod. Dev.* **34**: 53-57.

BERGER, S. L., PIÑA, B., SILVERMAN, N., MARCUS, G. A., AGAPITE, J., REGIER, J. L., TRIEZENBERG, S. J. und GUARENTE, L. (1992). Genetic Isolation of ADA2: A Potential Transcriptional Adaptor Required for Function of Certain Acidic Activation Domains. *Cell* **70**: 251-265.

BIRIKH, K. R., BERLIN, Y. A., SOREQ, H. und ECKSTEIN, F. (1997). Probing accessible sites for ribozymes on human acetylcholinesterase RNA. *RNA* **3**: 429-437.

BIRIKH, K. R., HEATON, P. A. und ECKSTEIN, F. (1997). The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur. J. Biochem.* **245**: 1-16.

BÖHNER, S., LENK, I., RIEPING, M., HEROLD, M. und GATZ, C. (1999). Transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. *Plant J.* **19**(1): 86-95.

BÖHNER, S. (2000). Entwicklung eines Dexamethason-induzierbaren und Tetracyclin-reprimierbaren Genexpressionssystems in *Nicotiana tabacum*. Dissertation, Math.-Nat. Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen.

BOLIVAR, F. und BECKMANN, K. (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* **68**: 245-260.

BRADFORD, M. M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

BREAKER, R. R. (1999). Catalytic DNA: in training and seeking employment. *Nat. Biotech.* **17**: 422-423.

- BRINSTER, R. L., CHEN, H. Y., TRUMBAUER, M. E., YAGLR, M. K. und PALMITER, R. D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 4438-4442.
- BRONSTEIN, J., FORTIN, J. J., VOYTA, J. C., JUO, R. R., EDWARDS, B., OLESEN, C. E., LIJAM, N. und KRICKA, L. J. (1994). Chemiluminescent reporter gene assays: sensitive detection of the GUS and SEAP gene products. *Biotechniques* **17**(1): 172-174; 176-177.
- BRUENING, G. (1989). Compilation of self-cleaving sequences from plant virus satellite RNAs and other sources. *Methods Enzymol.* **180**: 546-558.
- BURFEIND, P., CHERNICKY, C. L., RININSLAND, F., ILAN, J und ILAN, J. (1996). Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 7263-7268.
- CAGNON, L. und ROSSI, J. J. (2000). Downregulation of the CCR5 β -Chemokine Receptor and Inhibition of HIV-1 Infection by Stable VA1-Ribozyme Chimeric Transcripts. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* **10**:251-261.
- CAIRNS, M. J., HOPKINS, T. M., WITHERINGTON, C., WANG, L. und SUN, L.-Q. (1999). Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. *Nat. Biotech.* **17**: 480-486.
- CALDWELL, K. A. und HANDEL, M. A. (1991). Protamine transcript sharing among postmeiotic spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2407-2411.
- CAMPBELL, T. B., McDONALD, C. K. und HAGEN, M. (1997). The effect of structure in a long target RNA on ribozyme cleavage efficiency. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4985-4993.
- CAPECCHI, M. (1989). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* **5**: 70-76.
- CATALDO, L., MASTRANGELO, M. A. und KLEENE, K. C. (1999). A quantitative sucrose gradient analysis of the translational activity of 18 mRNA species in testes adult mice. *Mol. Hum. Reprod.* **5**(3): 206-213.

CECH, T. R. (1990a). Self-splicing of group I introns. *Ann. Rev. Biochem.* **59**: 543-568

CHEN, Y., JI, Y.-J., ROXBY, R. und CONRAD, C. (2000). *In Vivo* Expression of Single-Stranded DNA in Mammalian Cells with DNA Enzyme Sequences Targeted to C-rf. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* **10**: 415-422.

CHIAL, H. J. und SPLITTGERBER, A. G. (1993). A comparison of the binding of Coomassie brilliant blue to proteins at low pH. *Anal. Biochem.* **213**(2): 362-369.

CHIBA, H., CHAMBON, P. und METZGER, D. (2000). F9 Embryonal Carcinoma Cells Engineered for Tamoxifen-Dependent Cre-Mediated Site-Directed Mutagenesis and Doxycycline-Inducible Gene Expression. *Exp. Cell Res.* **260**: 334-339.

CHOMCZYNSKI, P und SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

CLERMONT, Y., OKO, R. und HERMO, L. (1992). Cell biology of mammalian spermiogenesis. In: *Cell and molecular biology of the testis*. Hrsg.: L. Ewing und C. Desjardins. Oxford University Press, New York, 332-376.

CLOUET-D'ORVAL, B., STAGE, T. K. und UHLENBECK, C. (1995). Neomycin Inhibition of the Hammerhead Ribozyme Involves Ionic Interactions. *Biochemistry* **34**: 11186-11190.

CRISELL, P., THOMPSON, S. und JAMES, W. (1993). Inhibition of HIV-1 replication by ribozymes that show poor activity *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **21**(22): 5251-5255.

DADOUNE, J. P., MAYAUX, M. J. und GUIHARD-MOSCATO, M. L. (1988). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* **20**: 211-217.

DAGERT, M. und EHRLICH, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28.

DAWSON, P. A und MARINI, J. C. (2000). Hammerhead ribozymes selectively suppress mutant type I collagen mRNA in osteogenesis imperfecta fibroblasts. *Nucl. Acids Res.* **28**: 4013-4020.

DERYCKERE, F. und GANNON, F. (1994). A one-hour miniprep technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques* **16**(3): 405.

DE WET, J. R., WOOD, K. V. HELINSKI, D. R. und DELUCA, M. (1986). Cloning firefly luciferase. *Methods Enzymol.* **133**: 3-14.

DOMI, A., BEAUD, G. und FAVRE, A. (1996). Transcripts containing a small anti-HIV hammerhead ribozyme that are active in the cell cytoplasm but inactive *in vitro* as free RNA. *Biochimie* **78**: 654-662.

FEDOR, M. J. und UHLENBECK, O. C. (1992). Kinetics of intermolecular cleavage by hammerhead ribozymes. *Biochemistry* **31**: 12042-12054.

FEINBERG, A. P. und VOGELSTEIN, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.

FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. und MELLO, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-810.

FORSTER, A. C. und SYMONS, R. H. (1987). Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* **50**: 9-16.

FREUNDLIEB, S., BARON, U., BONN, A. L., GOSSEN, M. und BUJARD, H. (1997). Use of Tetracycline-Controlled Gene Expression Systems to Study Mammalian Cell Cycle. *Methods Enzymol.* **283**: 159-173.

FULTON, R. und VAN NESS, B. (1993). Luminescent reporter gene assay for luciferase and beta-galactosidase using a liquid scintillation counter. *Biotechniques* **14**(5): 762-763.

FURTH, P. A., ST. ONGE, L., BÖGER, H., GRUSS, P., GOSSEN, M., KISTNER, A., BUJARD, H. und HENNIGHAUSEN, L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9302-9306.

GALDERISI, U., CASCINO, A. und GIORDANO, A. (1999). Antisense Oligonucleotides as therapeutic agents. *J. Cell Physiol.* **181**: 251-257.

GILBERT, D. M., HEERY, D. M., LOSSON, R., CHAMBON, P. und LEMOINE, Y. (1993). Estradiol-inducible squelching and cell growth arrest by a chimeric VP16-estrogen receptor expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: suppression by an allele PDR1. *Mol. Cell Biol.* **13**: 462-472.

GILL, G. und PTASHNE, M. (1988). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* **334**: 721-724.

GLANVILLE, N., DURNAM, D. M. und PALMITER, R. D. (1981). Structure of mouse metallothionon-I gene and its mRNA. *Nature* **16**;(292): 267-269.

GONZÁLEZ, M. A., SERRANO, F., LLORENTE, M., ABAD, J. L., GARCÍA-ORTIZ, M. J. und BERNAD, A. (1998). A Hammerhead Ribozyme Targeted to the Human Chemokine Receptor CCR5. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **251**: 592-596.

GOSSEN, M. und BUJARD, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5547-5551.

GOSSEN, M., BONIN, A. L. und BUJARD, H. (1993). Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 471-475.

GOSSEN, M., FREUNDLIEB, S., BENDER, G., MÜLLER, G., HILLEN, W. und BUJARD, H. (1995). Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells. *Science* **268**: 1766-1769.

GU, H., ZOU, J. R. und RAJEWSKY, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**: 1155-1164.

GUARENTE, L. (1995). Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **20**(12):517-521.

GUNTHER, E. J., HAVRE, P. A., GASPARRO, F. P. und GLAZER, P. M. (1996). Triplex-mediated, *in vitro* targeting of psoralen photoadducts within the genome of a transgenic mouse. *Photochem. Photobiol.* **63**: 207-212.

GUO, S. und KEMPHUES, K. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**: 611-620.

HANAHAH, D. (1983). Studies of transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

HASELOFF, J. und GERLACH, W. L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activity. *Nature* **334**: 585-591.

HECHT, N. B. (1992). Gene expression during male germ cell development. In: *Cell and molecular biology of the testis*. Hrsg.: L. Ewing und C. Desjardins. Oxford University Press, New York, S. 400-432.

HEIDENREICH, O. und ECKSTEIN, F. (1992). Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* **267**: 1904-1909.

HEIDENREICH, O., BENSELER, F., FAHRENHOLZ, A. und ECKSTEIN, F. (1994). High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates. *J. Biol. Chem.* **269**: 2131-2138.

HEIDENREICH, O., KANG, S.-H., BROWN, D. A., XU, X., SWIDERSKI, P., ROSSI, J. J., ECKSTEIN, F. und NEHRENBURG, M. (1995). Ribozyme-mediated RNA degradation in nuclei suspension. *Nucl. Acids Res.* **23**: 2223-2228.

HEINEMEYER, W., KLEINSCHMIDT, J. A., SAIDOWSKY, J., ESCHER, C. und WOLF, D. H. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced protolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.* **10**(3): 555-562.

HENNIGHAUSEN, L., WALL, R. J., TILLMANN, U., LI, M. und FURTH, P. A. (1995). Conditional gene expression in secretory tissues and skin of transgenic mice using the MMTV-LTR and the tetracycline responsive system. *J. Cell. Biochem.* **59**(4): 463-472.

HERSCHLAG, D. (1995). RNA chaperones and the RNA folding problem. *J. Biol. Chem.* **270**: 20871-20874.

HERTEL, K. J., HERSCHLAG, D. und UHLENBECK, O. C. (1994). A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry* **33**: 3374-3385.

HILLEN, W. und BERENS, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 345-369.

HOGAN, B., BEDDINGTON, R., COSTANTINI, F. und LACY, E. (1986). *Manipulating the mouse embryo*. Cold Spring Harbour, NY, USA: Cold Spring Harbour Press.

ITO, H., JUKUDA, Y., MURATA, K. und KIMURA, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.

JAIN, V. K. und MAGRATH, I. T. (1991). A chemiluminescent assay for quantitation of beta-galactosidase in the femtogram range: application to quantitation of beta-galactosidase in lacZ-transfected cells. *Anal. Biochem.* **199**(1): 119-124.

- JEN, K.-J. und GERWITZ, A. M. (2000). Suppression of Gene Expression by Targeted Disruption of Messenger RNA: Available Options and Current Strategies. *Stem Cells* **18**: 307-319.
- JOHNSON, P. A., BUNICK, D. und HECHT, N. B. (1991). Protein binding regions in the mouse and rat protamine-2 genes. *Biol. Reprod.* **44**: 127-134.
- JONES, D., RUSSNAK, R. H., KAY, R. J. und CANDIDO, E. P. M. (1986). Structure, expression and evolution of an heat-shock gene locus in *C. elegans* that is flanked by repetitive elements. *J. Biol. Chem.* **261**: 12006-12015.
- KEIME, S. (1993). Die 5' nicht translatierte Region des Proakrosingens der Ratte: DNA-Protein-Interaktionen und partielle cDNA Klone für zwei potentielle DNA-bindende Proteine. Dissertation, Math.-Nat. Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen.
- KELLEHER, R. J., FLANAGAN, P. M. und KORNBERG, R. D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA Polymerase II transcription apparatus. *Cell* **61**: 1209-1215.
- KENNERDELL, J. R. und CARTHEW, R. W. (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotech.* **18**: 896-898.
- KISTNER, A., GOSEN, M., ZIMMERMANN, F., JERECIC, J., ULLMER, C., LÜBBERT, H. und BUJARD, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10933-10938.
- LEWIN, A. S., DRENSER, K. A., HAUSWIRTH, W. W., NISHIKAWA, S., YASUMURA, D., FLANNERY, G. und LAVAIL, M. M. (1998). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature Medicine* **4**(8): 967-971.
- LAIRD, P. W., ZIJDERWALD, A., LINDERS, K., RUDNICKI, M. A., JAENISCH, R. und BERNS, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* **19**:4293.

L'HUILLIER, P. J., DAVIS, S. R. und BELLAMY, A. R. (1992). Cytoplasmatic delivery of ribozymes leads to efficient reduction in α -lactalbumin mRNA levels in C 1271 mouse cells. *EMBO J.* **11**: 4411-4418.

L'HUILLIER, P. J. (1996). Efficacy of Hammerhead ribozymes targeting α -lactalbumin transcripts: Experiments in cells and transgenic mice. In: *Nucleic Acids and Molecular Biology Vol. 10*. Eds.: F. Eckstein und D. M. J. Lilley. Springer Verlag, Heidelberg. S. 283-300.

MARSHAL, P., THOMSON, J. N. und ECKSTEIN, F. (1994). Inhibition of gene expression with ribozymes. *Cel. Mol. Neurobiol.* **14**: 523-538.

MESSING, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**: 20.

MORISHITA, R., GIBBONS, G. H., HORIUCHI, A., ELLISON, K. E., NAKAJIMA, M., ZHANG, L., KANEDA, Y., OGIHARA, T. und DZAU, V. J. (1995). A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5855-5859.

MUKHERJEE, S., CASANOVA, J. E. und HUNZICKER-DUNN, M. (2001). Desensitization of the Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor in Ovarian Follicular Membranes is inhibited by Catalytically Inactive ARNO. *J. Bact. Chem.* (im Druck).

NAKAMAYE, K. L. und ECKSTEIN, F. (1994). AUA-cleaving hammerhead ribozymes: Attempted selection for improved cleavage. *Biochemistry* **33**: 1271-1277.

NATESAN, S., RIVERA, V. M., MOLINARI, E. und GILMAN, M. (1997). Transcriptional squelching re-examined. *Nature* **390**: 349-350.

NAYERNIA, K., BURKHARD, E., BEIMESCHE, S., KEIME, S. und ENGEL, W. (1992). Germ cell-specific expression of an proacrosin-CAT fusion protein in transgenic mouse testis. *Mol. Reprod. Dev.* **31**: 241-248.

- NGO, H., TSCHUDI, C., GULL, K. und ULLU, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 14687-14692.
- NO, D., YAO, T. P. und EVANS, R. M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalia and transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **16**;93(8): 3346-3351.
- NORANDER, J., KEMPE, T. und MESSING, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. Gene **26**: 101-106.
- PERRIMAN, R., DELVES, A. und GERLACH, W. L. (1992). Extended target-site specificity for hammerhead ribozyme. Gene **13**: 157-163.
- PERRIMAN, R., BRUENING, G., DAVIS, E. S. und PEACOCK, W. J. (1995). Effective ribozyme delivery in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 6175-6179.
- PTASHNE, M. und GANN, A. A. F. (1990). Activators and targets. Nature **346**: 329-331
- PUCK, T. T. und CIECIVRA, S. J. (1958). Genetics of somatic mammalian cells; III long term cultivation of euploid cells from human and animal subject. J. Exp. Med. **108**: 945-956.
- RAHA, M., WANG, G., SEIDMANN, M. M. und GLAZER, P. M. (1996). Mutagenesis by third-strand-directed psoralen adducts in repair-deficient human cells: high frequency and altered spectrum in a xeroderma pigmentosum variant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 2941-2946.
- RANG, A. und WILL, H. (2000). The tetracycline-responsive promotor contains functional interferon-inducible response elements. Nucl. Acids Res. **28** (5): 1120-1125.
- RAPP, G., KLAUDINY, J., HAGENDORFF, G., LUCK, M. R. und SCHEIT, K. H. (1989). Complete sequence of the coding region of human elongation factor 2 (EF-2) by enzymatic amplification of cDNA from human ovarian granulosa cells. Biol. Chem. Hoppe-Seyler **370**: 1071-1075.

REGIER, J. L., SHEN, F. und TRIEZENBERG, S. J. (1993). Pattern of aromatic and hydrophobic amino acids critical for one of two subdomains of the VP16 transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 883-887.

RIOND, J. L. und RIVIERE, J. E. (1988). Pharmacology and toxicology of doxycycline. *Vet. Human. Toxicol.* **5**: 431-443.

RUFFNER, D. E., STORMO, G. D. und UHLENBECK, O. C. (1990). Sequence requirements of the hammerhead ribozyme RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry* **29**: 10695-10702.

SAKAMOTO, N., WU, C. H. und WU, G. Y. (1996). Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of virus protein translation by hammerhead ribozymes. *J. Clin. Invest.* **98**: 2720-2728.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOON, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., EHRLICH, H. A. und ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. und MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbor, New York, USA.

SÁNCHEZ ALVARADO, A. und NEWMARK, P. A. (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5049-5054.

SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

SANTORO, S. W. und JOYCE, G. F. (1997). A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4262-4266

SARVER, N., CANTIN, E. M., CHANG, P. S., ZAIA, J. A., LADNE, P. A., STEPHENS, D. A. und ROSSI, J. J. (1990). Ribozymes as Potential Anti-HIV-1 Therapeutic Agents. *Science* **24**: 1222-1225.

SAVILLE, B. J. und COLLINS, R. A. (1990). A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria. *Cell* **61**: 685-696.

SCANLON, K. J., JIAO, L., FUNATO, T., WANG, W., TONE, T., ROSSI, J. J. und KASHAMI-SABET, M. (1991). Ribozyme-mediated cleavage of c-fos mRNA reduces gene expression of DNA synthesis enzymes and methallothionin. *Nucl. Acids Res.* **88**: 10591-10595.

SCHLÜTER, G. und ENGEL, W. (1995). The rat Prm3 gene is an intronless member of the protamine gene cluster and is expressed in haploid male germ cells. *Cytogenet. Cell. Genet.* **71**: 352-355.

SCHLÜTER, G. (1996). Der Protamin Gencluster beim Säuger: Zur Struktur und Expression eines keimzellspezifischen Multi-Gen-Locus. Dissertation, Math.-Nat. Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen.

SCHLÜTER, G., CELIK, A., OBATA, R., SCHLICKER, M., HOFFERBERT, S., SCHLUNG, A., ADHAM, I. M. und ENGEL, W. (1996). Sequence analysis of the conserved protamine gene cluster shows that it contains a fourth expressed gene. *Mol. Reprod. Dev.* **43**: 1-6.

SCHULTZE, N., BURKI, Y., LANG, Y., CERTA, U. und BLUETHMANN, H. (1996). Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nature Biotech.* **14**: 499-503.

SCZAKIEL, G., HOMANN, M. und RITTNER, K. (1993). Computer-aided search for effective antisense RNA target sequences of the human immunodeficiency virus type 1. *Antisense Res. Dev.* **3**: 45-52.

SHELDON, C. C. und SYMONS, R. H. (1993). Is hammerhead self-cleavage involved in the replication of a virusoid *in vivo*? *Virology* **194**: 463-474.

SHIMAYAMA, T., NISHIKAWA, S. und 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**: 3649-3654.

SHOCKETT, P. E. und SCHATZ, D. G. (1996). Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5173-5176.

SEIPEL, K., GEORGIEV, O. und SCHAFFNER, W. (1992). Different activation domains stimulate transcription from remote („enhancer“) and proximal („promoter“) positions. *EMBO. J.* **11**: 4961-4968.

SNYDER, D. S., WANG, Y., ROSSI, J. J., SWIDERSKI, P., KAPLAN, B. E. und FORMAN, S. J. (1993). Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a Philadelphia Chromosome-positive cell line. *Blood*. **82**: 600-605.

STAGE, T. K., HERTEL, J. und UHLENBECK, O. C. (1995). Inhibition of the hammerhead ribozyme by neomycin. *RNA* **1**: 95-101.

STAGE-ZIMMERMANN, T. K. und UHLENBECK, O. C. (1998). Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA* **4**: 875-889.

SYMONS, R. H., HUTCHINS, C. J., FORSTER, A. C., RATHJEN, P. D., KEESE, P. und VISVADER, J. E. (1987). Self-cleavage of RNA in the replication of viruids and virusoids. *J. Cell. Sci. Suppl.* **7**: 303-318.

SYMONS, R. H. (1992). Small catalytic RNAs. *Ann. Rev. Biochem.* **61**: 641-671.

SZYMANSKI, M., FÜRSTE, J. P., BARCISZEWSKA, M. Z., ERDMANN, V. A. und BARCISZEWSKI, J. (1997). Application of hammerhead ribozymes for structural studies of ribosomal 5S RNAs. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**: 439-447.

TANG, C. K., GOLDSTEIN, D. J., PAYNE, J., CZUBAYKO, F., ALIMANDI, M., WANG, L.-M., PIERCE, J. H. und LIPPMAN, M. E. (1998). ErbB-4 Ribozymes Abolish Neuregulin-induced Mitogenesis. *Cancer Res.* **58**: 3415-3422.

TANG, D., DeVIT, M. und JOHNSTON, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**: 152-154.

TAVERNARAKIS, N., WANG, S. L., DOROVKOV, M., RYAZYNOV, A. und DRISCOLL, M. (2000). Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genetics* **24**: 180-183.

THOMPSON, J. D., AYERS, D. F., MALMSTROM, T. A., MCKENZIE, T. L., GANOUSIS, L., CHOWRIRA, B. M., COUTURE, L. und STINCHCOMB, D. T. (1995). Improved accumulation and activity of ribozymes expressed from a tRNA-based RNA polymerase III promoter. *Nucl. Acids Res.* **23**(12): 2259-2268.

THOMPSON, T. A., GOULD, M. N., BURKHOLDER, J. K. und YANG, N. S. (1993). Transient promoter activity in primary rat mammary epithelial cells evaluated using particle bombardment gene transfer. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29A**(2): 165-170.

TOWBIEN, H., STAEHLIN, T. und GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

TRIEZENBERG, S. J., KINGSBURY, C. und McKNIGHT, S. L. (1988). Functional dissection of VP16, the transactivator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes & Development* **2**: 718-729.

TSUCHIHASHI, Z., KHOSLA, M. und HERSCHLAG, D. (1993). Protein enhancement of hammerhead ribozyme catalysis. *Science* **262**: 99-120.

UHLENBECK, O. C. (1995). Keeping RNA happy. *RNA* **1**: 4-6.

URLINGER, S., BARON, U., THELLMANN, M., HASAN, M. T., BUJARD, H. und HILLEN, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **97**: 7963-7968.

VOGELSTEIN, B. und GILLISPIE, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from Agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.

WANG, G., LEVY, D. D., SEIDMANN, L. L. und GLAZER, P. M. (1995). targeted mutagenesis in mammalian cells mediated by intracellular tripple helix formation. *Mol. Cell Biol.* **15**: 1759-1768.

WATERHOUSE, P. M., GRAHAM, M. W. und WANG, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13959-13964.

WEBER, K. und OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **224**: 4406-4412.

WEINMANN, P., GOSSEN, M., HILLEN, W., BUJARD, H. und GATZ, C. (1994). A chimeric transactivator allows tetracycline-response in whole plants. *Plant J.* **5**: 559-569.

WIANNY, F. und ZERNICKA-GOETZ, M. (2000). Specific interference with gene function by double stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* **2**: 70-75.

YEBRA, L., BALLESCA, J. L., VANRELL, J. A., BASSAS, L. und OLIVIA, R. (1993). Complete absence of protamin P2 in humans. *J. Biol. Chem.* **268**: 10553-10557.

YU, Y. E., ZHANG, Y., UNNI, E., SHIRLEY, C. R., DENG, J. M., RUSSELL, L. D., WEIL, M. M., BEHRINGER, R. R. und MEISTRICH, M. L. (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-defizient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(9): 4683-4688.

ZHAO, J. J. und PICK, L. (1993). Generating loss-of-function phenotypes of the *fushi tarazu* gene with a targeted ribozyme in *Drosophila*. *Nature* **365**: 448-451.

ZHOU, C., BAHNER, I., ROSSI, J. J. und KOHN, D. B. (1996). Expression of hammerhead ribozymes by retroviral vectors inhibit HIV replication: comparison of RNA level and viral inhibition. *Antisense and Nucl. Acid Drug Dev.* **6**: 17-24.

ZOUMADAKIS, M. und TABLER, M. (1995). Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX-down-arrow consensus target motif for hammerhead ribozymes. *Nucl. Acids Res.* **23**: 1192-1196.

ZUKER, M. und STIEGLER, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucl. Acids Res.* **9**: 133-148.

ZUKER, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **244**: 48-52.

ZUKER, M., JAEGER, J. A. und TURNER, D. H. (1991). A comparison of optimal and suboptimal RNA secondary structures predicted by free energy minimization with structures determined by phylogenetic comparison. *Nucl. Acids Res.* **19**: 2707-2714.

Danksagung

Zuallererst danke ich Prof. Dr. Wolfgang Engel für seine ständige Bereitschaft zur Unterstützung während meiner fast vierjährigen Doktorandenzeit an seinem Institut. Ohne seine enorme Nachsicht wäre die Forschung an einer Idee, deren Realisierung noch nicht abzusehen ist, niemals möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Gregor Schlüter, der durch seine Vorarbeiten die Voraussetzungen für diese Arbeit geschaffen hat. Zu Anfang hatte er eine schwere Zeit, mich vom „Elektronenmikroskopiker“ zum „Molekularbiologen“ umzuschulen. Später fand er, trotz manchmal recht schwieriger Umstände, immer noch Zeit für fruchtbare Gespräche.

Mein größter Dank geht an meine Freundin Nadine. Sie hatte es nicht leicht mit jemandem, der vier Jahre lang nur Ribozyme im Kopf hatte. Trotzdem hatte sie meistens Verständnis und ich hoffe, ich kann jetzt alles wiedergutmachen.

Den Mitarbeitern im Institut danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Ganz besonders betonen möchte ich die immer freundschaftliche Atmosphäre und die Zusammenarbeit im Labor 307. Den Tierpflegern danke ich für die Betreuung meiner vielen, vielen Mauslinien und für ihre Geduld mit meinem Beschriftungssystem und meinen Sonderwünschen.

Olav Grundmann danke ich ganz herzlich für die Mühe, die er sich bei der Arbeit mit meinen Hefen gemacht hat, obwohl er selbst mit seiner Arbeit mehr als genug zu tun hatte.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium der Biologie ermöglichten und mich auch während dieser Arbeit immer unterstützt haben.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Martin Kämper
geboren am 02. Dezember 1970 in Soest

SCHULAUSBILDUNG

1977-1990 Grundschule in Oestinghausen,
 Gymnasium in Soest

WEHRDIENST

1990-1991 Grundwehrdienst in Wolfhagen

STUDIUM

1991-1997 Diplombiologie an der Universität Göttingen
 Diplomprüfung in der Fächern: Mikrobiologie,
 Immunologie und Organische Chemie
 Diplomarbeit mit dem Titel: „Elektronenmikroskopische
 Analyse der Zusammensetzung von Biofilmen mit Hilfe
 cytochemischer Lokalisierungsmethoden“

Juni 1997 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden
 Dissertation