

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung

Nachweis der Effizienz eines neuen Ribozyms gegen den
Urokinase-Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPAR) in vitro und in vivo
sowie Erprobung einer neuen Methode zum Screening einer Random-Library
von Ribozymen in Bakterien

Stephan Hasmüller

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

| | |
|--------------------------|---|
| Vorsitzender: | Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier |
| Prüfer der Dissertation: | 1. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher 2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker |

Die Dissertation wurde am 21.08.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.11.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Zusammenfassung | 5 |
| 2 | Einleitung | 6 |
| 2.1 | Invasion und Metastasierung | 6 |
| 2.2 | Bedeutung des uPA/uPA-Rezeptor-Systems für Invasion und Metastasierung | 6 |
| 2.2.1 | Der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-Rezeptor (uPAR, CD87) | 8 |
| 2.2.2 | Der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und seine Inhibitoren | 10 |
| 2.2.3 | Klinische Relevanz von uPA und uPAR | 10 |
| 2.3 | Therapieansätze durch Unterdrückung der Expression oder Funktion des uPA/uPAR-Systems | 11 |
| 2.3.1 | Hemmung der Funktion auf Protein-Ebene | 11 |
| 2.3.2 | Hemmung der Funktion auf RNA-Ebene | 14 |
| 2.4 | Zielsetzung der Arbeit | 17 |
| 3 | Materialien und Methoden | |
| 3.1 | Zellbiologische Verfahren (Eukaryoten) | 19 |
| 3.1.1 | Zelllinien | 19 |
| 3.1.2 | Kultivierung der Zellen | 19 |
| 3.1.3 | Transiente Transfektion von Zellen | 20 |
| 3.1.4 | Stabile Transfektion mit peuTaruPAR und Selektion von Zellen | 21 |
| 3.1.4.1 | Transfektion der Zellen mit peuTaruPAR | 21 |
| 3.1.4.2 | Selektion der transfizierten Zellen | 21 |
| 3.1.5 | Luciferase-Assay | 22 |
| 3.1.6 | Blaufärbung von β -Galaktosidase exprimierenden Zellen | 23 |
| 3.2 | Zellbiologische Verfahren (Bakterien) | 24 |
| 3.2.1 | Bakterien-Stämme | 24 |
| 3.2.2 | Transformation von <i>E. coli</i> des Stammes SØ 3831 mit pTaruPAs und pCtrl durch Hitzeschock | 24 |
| 3.2.3 | Transfektion von <i>E.coli</i> -Tar und <i>E.coli</i> -Ctrl mit pRZL durch Elektroporation | 26 |
| 3.3 | Verfahren <i>in vitro</i> | 27 |
| 3.3.1 | <i>Cis</i> -Spaltung der Ribozyme <i>in vitro</i> | 27 |
| 3.3.2 | Spaltung der mRNA von uPAR durch Ribozyme <i>in vitro</i> | 29 |

| | |
|---|----|
| 3.3.3 RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese _____ | 31 |
| 3.4 Molekularbiologische Verfahren _____ | 31 |
| 3.4.1 Klonierung der Plasmide _____ | 31 |
| 3.4.2 Minipräparation von DNA zur Restriktionsfragmentanalyse _____ | 36 |
| 3.4.3 Maxipräparation von DNA aus transformierten Bakterien _____ | 38 |
| 3.5 Statistische Analyse _____ | 38 |
| 4 Ergebnisse | |
| 4.1 <i>In vivo</i> -Screening für ein aktives Ribozym gegen uPAR in Bakterien _____ | 39 |
| 4.1.1 Konstruktion der Target- und Kontroll-Plasmide _____ | 39 |
| 4.1.1.1 Konstruktion des Targetplasmids pTaruPARs für das bakterielle Screening _____ | 39 |
| 4.1.1.2 Konstruktion des Kontrollplasmids pCtrl für das bakterielle Screening _____ | 39 |
| 4.1.2 Bestätigung der Resistenz der transformierten Stämme und der Funktion der konstruierten Plasmide _____ | 40 |
| 4.1.3 Überprüfung der Subklonierung der Random-Ribozym- <i>Library</i> in pChop _____ | 41 |
| 4.1.3.1 Der Vektor der Ribozym- <i>Library</i> _____ | 41 |
| 4.1.3.2 Konstruktion des <i>Random-Ribozyme</i> als Insert für die Klonierung der <i>Library</i> _____ | 42 |
| 4.1.3.3 Subklonierung des <i>Random-Ribozym-Insert</i> _____ | 43 |
| 4.1.4 Das bakterielle Screening-Verfahren _____ | 44 |
| 4.1.4.1 Bestimmung der optimalen Bedingungen für das <i>Screening</i> der <i>Library</i> | |
| 4.1.4.2 Durchführung des <i>Screenings</i> _____ | 44 |
| 4.1.4.3 Kontrollen der gefundenen Ribozyme <i>in vivo</i> _____ | 46 |
| 4.1.4.4 Überprüfung der im Screening gefundenen Ribozyme <i>in vitro</i> _____ | 46 |
| 4.2 Konstruktion eines Ribozyms gegen uPAR, dessen Bindungsstelle <i>in vitro</i> bestimmt wurde _____ | 47 |
| 4.2.1 Bestimmung der möglichen Bindungsstellen eines Ribozyms gegen uPAR _____ | 47 |
| 4.2.2 Prüfung des Ribozyms RZ-957 gegen die mRNA von uPAR <i>in vitro</i> _____ | 48 |
| 4.2.2.1 Konstruktion des Plasmides pChop-957 für <i>in vitro</i> -Transcription _____ | 48 |
| 4.2.2.2 Test der <i>cis</i> -Spaltung durch die flankierenden Ribozyme <i>in vitro</i> _____ | 49 |
| 4.2.2.3 Test des RZ-957 <i>in vitro</i> gegen die mRNA von uPAR _____ | 49 |
| 4.3 Prüfung der Aktivität des Ribozyms RZ-957 <i>in vivo</i> in Zellkultur _____ | 51 |
| 4.3.1 Konstruktion der eukaryotischen Plasmide für die Zellkultur _____ | 51 |
| 4.3.1.1 Konstruktion des Targetplasmides peuTaruPAR _____ | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.1.2 Konstruktion eines Plasmides, das in eukaryotischen Zellen das Ribozym RZ-957 transkribiert _____ | 51 |
| 4.3.2 Bestimmung optimaler Bedingungen für die transiente Transfektion von NIH 3T3- und von COS 7-Zellen _____ | 52 |
| 4.3.3 Stabile Transfektion des uPAR-Luciferase-Fusionsgenes _____ | 53 |
| 4.3.3.1 Stabile Transfektion in NIH 3T3-Zellen _____ | 53 |
| 4.3.3.2 Stabile Transfektion in COS 7-Zellen _____ | 53 |
| 4.3.4 Transiente Transfektion des Ribozyms RZ-957 _____ | 54 |
| 4.3.4.1 in NIH-uPAR/Luc-C20 und -C22 _____ | 54 |
| 4.3.4.2 in Cos7-uPAR/Luc-C1, -C3 und -C6 _____ | 56 |
| 4.4 Test des bakteriellen Screenings mit RZ-957 als positiver Kontrolle _____ | 57 |
| 5 Diskussion | |
| 5.1 Screening einer Ribozym-Library in transfizierten Bakterien _____ | 59 |
| 5.2 Reduzierte Expression des uPAR-Luciferase-Fusionsgenes durch Transfektion von RZ-957 in Zellkultur _____ | 62 |
| 5.3 Ribozyme und Antisense-Strategien in der Tumorthherapie _____ | 65 |
| 5.4 Der uPA-Rezeptor als Angriffspunkt in der Tumorthherapie _____ | 65 |
| 6 Literaturverzeichnis _____ | 69 |
| 7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen _____ | 78 |
| 8 Abkürzungsverzeichnis _____ | 80 |
| 9 Danksagung _____ | 82 |
| 10 Lebenslauf _____ | 84 |

1 Zusammenfassung

Das Zusammenspiel des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und seinem Rezeptor (uPAR) ist für die Invasion und Metastasierung maligner Tumore von großer Bedeutung. Eine Überexpression von uPAR wird bei vielen Krebsarten mit schlechter Prognose assoziiert. Ziel der Arbeit war es ein Ribozym zu entwickeln, das in der Lage ist, die mRNA von uPAR *in vitro* und *in vivo* katalytisch zu spalten und so *in vivo* die Expression des uPAR zu reduzieren oder ganz zu unterdrücken. Da viele Ribozyme, die anhand von Computermodellen konstruiert wurden, zwar *in vitro* sequenzspezifisch an die mRNA des Zielgenes binden und diese spalten, aber in Zellkultur oder im Tiermodell dann nicht in der Lage sind, die Expression effektiv zu reduzieren, sollte ein neues Verfahren entwickelt werden, um in Bakterien eine *Library von Ribozymen* zu screenen und so aus einem Pool von mehr als einer Million Ribozyme die auszuwählen, die die mRNA von uPAR *in vivo* schneiden, und so aufwendigere Verfahren in Zellkultur erspart. Hierfür wurde ein Pool von Ribozymen konstruiert, in eine Tripel-Ribozym-Kassette subkloniert und ein Weg gefunden, diese auf bakteriellen Plasmiden effektiv per Elektroporation in die Test-Bakterien einzubringen. Um die Effektivität der Ribozyme in Bakterien und in Zellkultur messen zu können, wurde je ein Fusionsgen aus uPAR-Galaktosidase und aus uPAR-Luciferase kloniert und verschiedene Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien mit diesen Fusionsgenen stabil transfiziert. Es wurden mehrer Kontrollplasmide kloniert, um zu überprüfen, dass ein im Screening positives Ribozym tatsächlich die mRNA von uPAR schneidet. Mit Hilfe der in dieser Arbeit veränderten Zelllinien, wurde auch ein Ribozym gegen uPAR getestet, das nach der SELEX-Methode (*Selective Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) konstruiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass dieses die Expression von uPAR in verschiedenen Zelllinien signifikant reduziert. Es war jedoch ebenso wenig wie die im bakteriellen Screening selektionierten Ribozyme in der Lage, die Expression des uPAR-Galaktosidase-Fusionsgens im bakteriellen Test reproduzierbar und messbar zu unterdrücken.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass das Ribozym RZ-957 *in vitro* und *in vivo* die mRNA von uPAR sequenzspezifisch schneidet und zu einer signifikanten Reduktion der Expression des uPAR-Luciferase-Fusionsgenes führt. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass dieser Effekt in Bakterien nicht reproduzierbar ist.

2 Einleitung

2.1 Invasion und Metastasierung

Die wichtigste Eigenschaft, durch die sich maligne Zellen von gesunden Zellen und den Zellen benigner Tumoren unterscheiden, ist ihre Fähigkeit Gewebegrenzen zu überschreiten und Metastasen zu bilden. Sie sind in der Lage, vom Primärtumor ausgehend in die umgebende extrazelluläre Matrix (EZM), Blut- und Lymphgefäße einzudringen. Die EZM besteht vor allem aus proteinhaltigen Komponenten, darunter die Kollagene Typ I, II, III, IV, VII und X, Proteoglykane, Vitronektin, Fibronektin und Laminin. Das Kollagen Typ IV ist die Hauptkomponente der Basalmembran.

Einigen dieser Zellen gelingt es durch Adhäsion an und Invasion des Gefäßendothels Absiedelungen in anderen Organen zu bilden und dort durch Neovaskularisation und Abbau des umgebenden Gewebes Fernmetastasen zu bilden. Der Abbau der umgebenden EZM wird durch extrazelluläre proteolytische Enzyme (Peptidbindungs-hydro-lasen) ermöglicht, die von den Tumorzellen und zum Teil auch von umgebenden Bindegewebszellen (Fibroblasten) sezerniert werden. Dazu gehören die Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Cystein-Proteasen (u.a. Cathepsin B und L) und Serin-Proteasen wie Plasmin und der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA).

(Übersicht in DeClerck et al., 1996; Andreasen et al., 1997; Danø et al., 1999; Reuning et al., 1998; Schmitt et al., 2000; Allgayer 2006).

2.2 Die Bedeutung des uPA/uPA-Rezeptor-Systems für Invasion und Metastasierung

Das proteolytische Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-System umfasst die Serin-Protease Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), deren Rezeptor uPAR (CD 87) und deren Inhibitoren Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) und 2 (PAI-2) (Abb. 2.1). Zusammen mit anderen Mitgliedern der Familie der Serin-Proteasen (Plasmin, Gewebe-Kallikrein, membranständige Serin-Proteasen), Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Cystein-Proteasen nimmt es Einfluss auf den Abbau der Basalmembran und der EZM, Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung (Andreasen et al., 2000; Del Rosso et al., 2002; Ragno, 2006).

Durch die Anlagerung von pro-uPA an den uPA-Rezeptor auf der Krebszelloberfläche wird pro-uPA durch Plasmin zu uPA aktiviert, wodurch wiederum Plasminogen zu Plasmin aktiviert wird. Dadurch wird nicht nur die Aktivierung von Plasminogen in die Nähe der Tumorzelle fokussiert, sondern auch eine Kaskade von Ereignissen ausgelöst, die zu Zellproliferation, Adhäsion, Migration, Chemotaxis und Angiogenese führt (Rabbani und Mazar, 2001; Blasi und Carmeliet, 2002; Reuning et al., 2003). Die Aktivierung von Plasmin kann auch durch bestimmte bakterielle Proteine und durch den Gewebe-Typ Plasminogen Aktivator (tPA) katalysiert werden (Andreasen et al., 1997). tPA spielt eine wichtige Rolle bei der Auslösung von intravaskulärer Fibrinolyse. Die proteolytische Aktivität von uPA wird von seinen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 inhibiert (Blasi, 1997).

Die Expression des uPAR an der Zelloberfläche spielt auch eine Rolle bei der Adhäsion von Tumorzellen, durch seine Fähigkeit die Zelle an das Vitronectin der EZM mit hoher Affinität zu binden (Waltz and Chapman, 1994).

Aufgrund des Mangels einer transmembranösen Domäne muss uPAR für intrazelluläre Signaltransduktion mit anderen transmembranösen Rezeptoren zusammenarbeiten. So wurde über ein Zusammenspiel (cross talk) mit den Adhäsions- und Signaltransduktions-Rezeptoren der Integrine berichtet (Chapman und Wei, 2001). Integrine sind transmembranöse Rezeptoren der Zelloberfläche, die sobald sie an EZM gebunden haben eine regulatorische Funktion vieler Prozesse wie z.B. Zelladhäsion, Migration und Proliferation übernehmen (Blasi und Carmeliet, 2002; Reuning et al., 2003). Es wurde auch über eine Interaktion zwischen uPAR und dem für den Liganden fMet-Leu-Phe-Peptid (fMLP) hoch-affinen Rezeptor FPR berichtet. Es handelt sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der bei Chemotaxis eine Rolle spielt. fMLP ist ein Peptid bakterieller Herkunft, das eine starke chemotaktische Wirkung auf Leukozyten ausübt. Eine fMLP-abhängige Zellmigration setzt eine Expression von uPAR voraus (Montuori et al., 2002; Le et al., 2002).

Nach Bindung an den Rezeptor ist das enzymatisch aktive uPA auf die Zelloberfläche fokussiert, wodurch sich ein Zustand höherer uPA-Aktivität ergibt und eine mehrfach höhere Konversionsrate von Plasminogen zu Plasmin (Ellis et al. 1999). Plasminogen ist eine Serin-Protease, die im Plasma und in extrazellulärer Flüssigkeit vorkommt und eine hohe Aktivität gegen verschieden Bestandteile der EZM wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und Kollagen zeigt, und dadurch zu einem Abbau der EZM führt (Abb. 2.1). Tatsächlich wurde bei unterschiedlichen Krebserkrankungen von Brust, Ovar, Öso-

phagus, Magen, Kolorektum und Leber der wichtige klinische Stellenwert des Plasminogen-Aktivierungs-Systems für die Prädiktion von krankheitsfreiem und Gesamtüberleben gezeigt (Harbeck et al., 2002; Look et al., 2002).

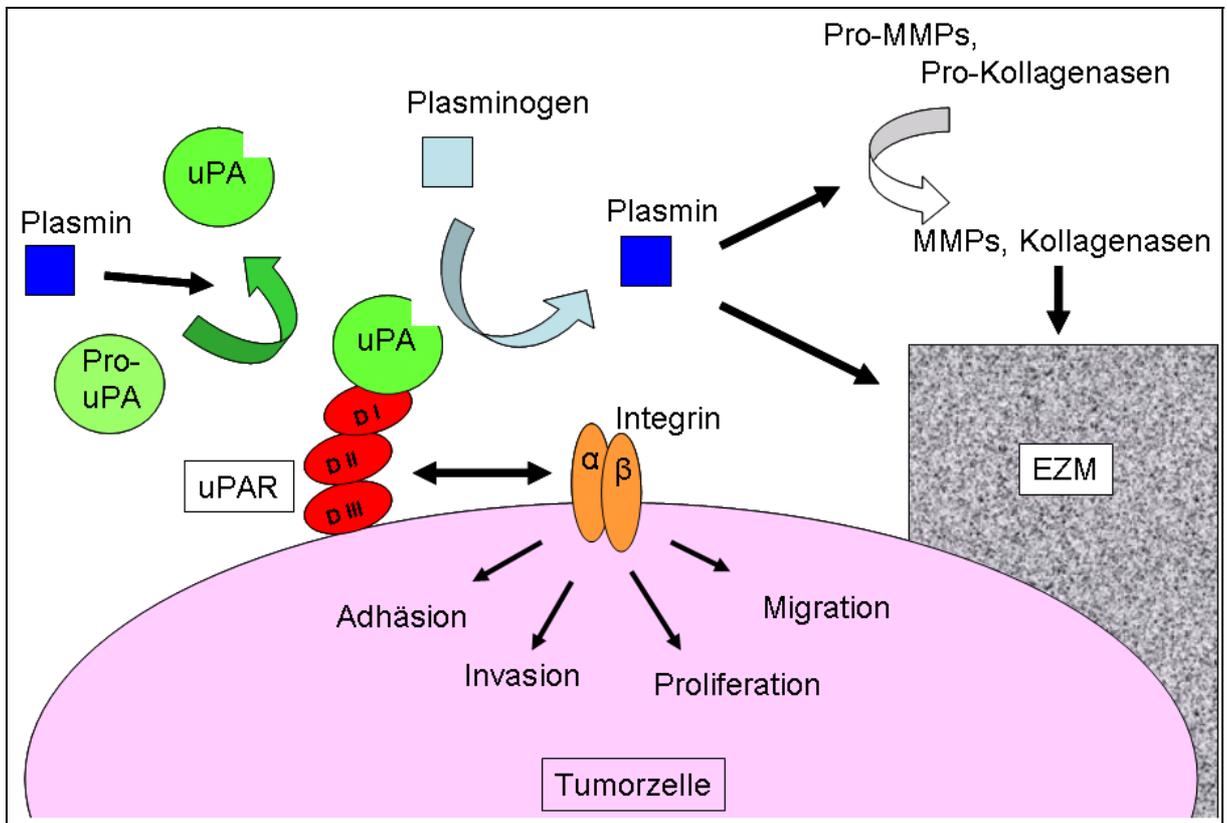


Abb. 2.1: Schematische Übersicht über die Rolle des uPA/uPAR-System für Tumordinvasion und -metastasierung. Die Bindung von uPA an uPAR konvertiert das einkettige Polypeptid Plasminogen in seine zweikettige Form Plasmin, wodurch die EZM abgebaut wird und eine Kaskade von weiteren biologischen Ereignissen wie Zelladhäsion, Invasion, Migration und Proliferation ausgelöst wird. Die proteolytische Aktivität von uPA wird von seinen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 kontrolliert. Integrine als Co-Rezeptoren ermöglichen dem uPA/uPAR-System intrazelluläre Signaltransduktion.

2.2.1 Der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-Rezeptor (uPAR, CD87)

uPAR, der zelluläre Rezeptor für uPA, ist ein Cystein-reiches Glykoprotein, das über einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker an die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran geknüpft ist (Ploug et al., 1991). Er besteht aus drei homologen, strukturell verwandten Protein-Domänen von ungefähr 90 Aminosäuren mit vier bis fünf Disulfid-Bindungen (Behrendt et al., 1991; Llinas et al., 2005, Abb. 2.2). Domäne I befindet sich am N-terminalen Ende des Rezeptors und ist für die Bindung von uPA

wichtig, wobei in Bindungs-Studien gezeigt wurde, dass die Affinität der Domäne I alleine für uPA mehrere hundert mal schwächer ist, als die des intakten uPAR (Behrendt et al., 1991; Rettenberger et al., 1994; Ploug et al., 1998, 2002). Llinas et al. (2005) ist es gelungen die Kristallstruktur des löslichen uPAR bei der Bindung an einen Antagonisten darzustellen und dadurch zu zeigen, dass die drei Domänen des Rezeptors fast eine Kugel bilden, die eine 19 Angström große Lücke zwischen Domäne I und III aufweist in der der Ligand bindet. Die Bindung von uPA hängt im Wesentlichen von Domäne I und II ab, während Domäne III eine wichtige stabilisierende Rolle spielt.

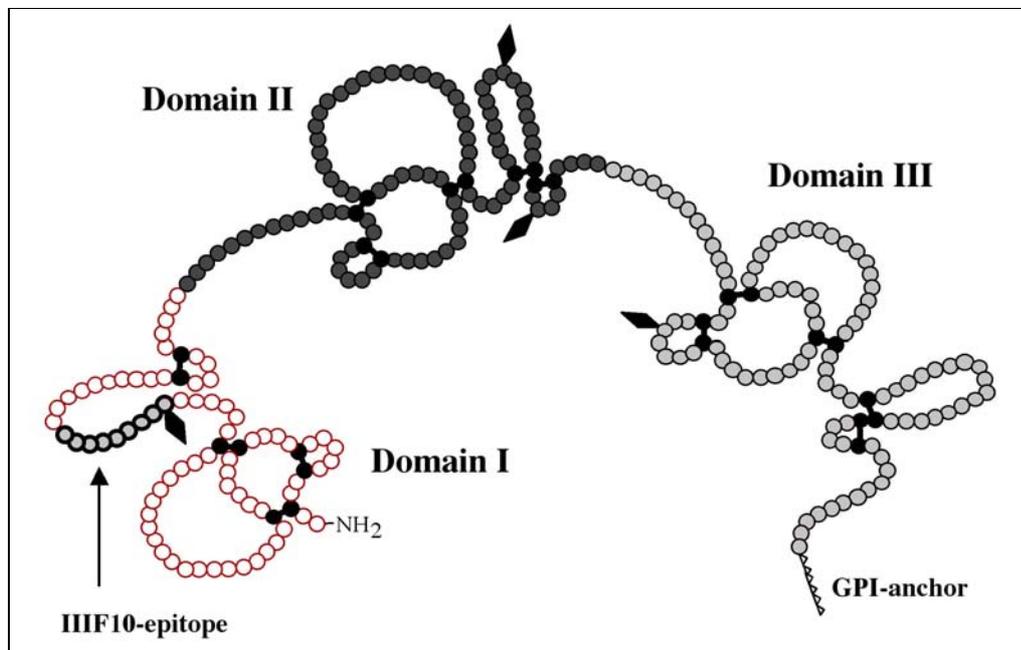


Abb. 2.2: Die Domain-Struktur des uPA-Rezeptor. uPAR besteht aus drei in ihrer Struktur homologen Domänen und ist über ein C-terminales Glycanlipid- (GPI-) Anker mit der Zelloberfläche verbunden (verändert nach Ploug et al. 1994). Die Positionen der Glykosylierung (Ploug et al. 1998) sind durch ein $\langle \rangle$ gekennzeichnet, Di-sulfidbrücken sind schwarz. Das Epitop des mAb III F10 ist grau dargestellt (Luther et al. 1997).

Es gibt auch eine lösliche (*soluble*) Form des uPAR die von der Zelle sezerniert werden kann (suPAR). Diese lösliche Form findet sich in biologischen Flüssigkeiten sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Diese Formen können durch differentielles *Splicing* oder durch eine Abspaltung des GPI-Ankers durch Phospholipase C entstehen (Høyer-Hansen et al., 1992; Montuori et al., 2002, 2005; Jo et al., 2003).

2.2.2 Der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und seine Inhibitoren

Es gibt zwei Arten von Plasminogen-Aktivatoren, den Urokinase-Typ und den Gewebe-Typ Plasminogen-Aktivator (tPA). Beide sind in der Lage das inaktive Zymogen Plasminogen zur aktiven Proteinase Plasmin zu aktivieren, welche extrazelluläre Matrix abbauen kann. tPA wird in Endothelzellen synthetisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der intravaskulären Fibrinolyse.

uPA ist eine 55 kDa Serin-Protease welche von verschiedenen gesunden und entarteten Zellen als inaktives einkettiges Protein hergestellt wird. Pro-uPA, das Zymogen von uPA hat eine mehrere hundert Mal niedrigere Aktivität als der aktivierte zweikettige uPA (Andreasen et. al., 1997). Die beiden Ketten von uPA werden durch zwei Disulfidbrücken verbunden. Die B-Kette enthält C-terminal die Domäne mit der katalytisch wirksamen Serin-Protease, die A-Kette bindet mit ihrem aminoterminalen Fragment (ATF) an den uPAR. Die Aktivität von uPA auf Plasminogen wird von seinen beiden Inhibitoren PAI-2 und dem effektiveren PAI-1 kontrolliert. PAI-1 ist außerdem in der Lage an uPAR-gebundenes uPA zu binden und so mit dem multifunktionellen transmembranösen α_2 -Makroglobulin/LDL-Rezeptor-related Protein (LRP) einen Komplex zu bilden, der rasch durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (Cubellis et al., 1990). Nach Aufnahme wird der Komplex abgebaut und der uPAR in die Zelloberfläche reintegriert (Nykjaer et al., 1997). PAI-1 ist neben der Inhibition von uPA in der Lage Migration, Invasion und Angiogenese selbst zu stimulieren (Bajou et al., 1998).

2.2.3 Klinische Relevanz von uPA und uPAR

Bereits 1988 wurde gezeigt, dass erhöhte uPA-Werte in primärem Brustkrebsgewebe mit einem hoch invasiven Phänotyp und schlechter Prognose vergesellschaftet sind (Duffy et al., 1988). Jänicke et al. beschrieben als Erste die prognostische Bedeutung von PAI-1 bei Brustkrebserkrankung (Jänicke et al., 1991; 2001). Hierbei zeigte sich, dass hohe Werte für PAI-1 im ELISA ein unabhängiger und signifikanter Prädiktor für eine schlechte Prognose sind. In einer multivariaten prospektiven Analyse von 3424 primären Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass uPA und PAI-1 nicht nur eine klinisch relevanten prognostischen sondern auch prädiktiven Einfluss haben (Harbeck et al., 2002). Diese Veröffentlichung ist ein zusätzlicher Beleg für den

Nutzen einer uPA/PAI-1-Bestimmung in der klinischen Routine, da sie den Effekt von adjuvanter systemischer Therapie bei Patientinnen mit hohen Proteasenwerten belegt. Gleichzeitig wird gezeigt, dass man nodal-negativen Brustkrebs-Patientinnen mit unauffälligen uPA- und PAI-1-Werten ggf. sogar die Belastung einer Chemotherapie ersparen kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Analyse zur prognostischen Bedeutung von uPA/PAI-1 von 8377 Brustkrebs-Patientinnen (Look et al., 2002). Abgesehen vom Lymphknotenstatus waren erhöhte Werte von uPA oder PAI-1 der stärkste Prädiktor für kurzes krankheitsfreies Überleben und niedriges Gesamtüberleben.

Auch eine hohe Menge an PAI-1 mRNA wurde als wichtiger und unabhängiger prognostischer Faktor für die Entwicklung einer Fernmetastasierung und das brustkrebspezifische Überleben bei nodal-positiven, hormonrezeptor-positiven Brustkrebspatientinnen publiziert (Leissner et al., 2006). Für die mRNA von uPA konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht gezeigt werden, wodurch suggeriert wird, dass PAI-1 eine größere prognostische Bedeutung als uPA zukommt.

Erhöhte Werte von uPA, PAI-1 und uPAR im Tumorgewebe sind mit schlechtem Krankheitsverlauf und hohem Tumor-Grading assoziiert und führen zur Streuung von Tumorzellen und Fernmetastasierung (Schmitt et al., 1997; Reuning et al., 1998; Duffy, 2002; Harbeck et al., 2002).

Aufgrund dieser Daten sind uPA, uPAR und PAI-1 wichtige Angriffspunkte für die Entwicklung neuer, auf der Tumorbiologie aufbauender Therapeutika, welche das Ziel haben die Expression der Komponenten des uPA/uPAR-Systems zu unterdrücken, die Bindung von uPA an uPAR zu hemmen, oder die enzymatische Aktivität von uPA zu reduzieren (Schmitt et al., 2000; Sperl et al., 2001; Muehlenweg et al., 2001; Reuning et al., 2003).

2.3 Therapieansätze durch Unterdrückung der Expression oder Funktion des uPA/uPAR-Systems

2.3.1 Hemmung der Funktion auf Protein-Ebene

In den letzten Jahren wurde bei der Entwicklung neuer Medikamente ein großer Fortschritt auf dem Gebiet der Tumorthherapie auf Protein-Ebene gemacht. Antikörper, Antikörperfragmente wie Fab-Fragmente oder scFvx und so genannte Small

Molecules werden in klinischen Studien untersucht oder wurden bereits als Medikamente zugelassen. So wurde z.B. Trastuzumab (Herceptin[®]) sowohl für die Behandlung des primären als auch des metastasierten Mammakarzinoms zugelassen (Smith et al, 2007). Trastuzumab ist ein humanisierter Maus-Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne von HER-2/*neu* (c-erbB-2) gerichtet ist, einem Rezeptor der Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) Familie, der bei 25% der Brustkrebspatientinnen überexprimiert wird. Ebenfalls für metastasierten Brustkrebs, Kolonkarzinom und Lungenkrebs (NSCLC) zugelassen wurde der Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]), der in mehreren Studien bei weiteren Krebsarten wie dem metastasierten Ovarialkarzinom untersucht wird. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper, der gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gerichtet ist (Miller et al., 2007). Antikörper werden nicht nur in der Onkologie, sondern auch zur Verhinderung von Transplantat-Abstoßungen, als Antiallergikum, bei rheumatoider Arthritis, bei Virusinfektionen und zur passiven Immunisierung eingesetzt. Therapie mit Antikörpern hat oft beträchtliche Nebenwirkungen (z.B. Kardiotoxizität bei Trastuzumab) oder verursacht eine Immunantwort gegen die verabreichten Antikörper: HAMA (human anti-mouse immunoglobulin antibody response) oder HACA (human anti-chimeric antibody response). Diese Immunantwort des Körpers, die gegen die verabreichten therapeutischen Antikörper gerichtet sind kann wohl in einigen Fällen Teil der Wirkung darstellen. Sie bewirkt jedoch meist allergische Antikörper-Reaktionen und führt zum vorzeitigen Abbau des therapeutischen Antikörpers und damit zur Unwirksamkeit der Therapie, so dass die Entwicklung von HAMA/HACA in der Regel einen Abbruch der Therapie bedeutet. Bei soliden Tumoren werden diese Antikörper in 40-80% der Patienten gebildet (Mirick et al., 2004).

Bereits 1983 konnten Ossowski und Reich zeigen, dass ein Antikörper gegen uPA im Hühnerembryo die Metastasierung eines Karzinoms verringern oder verhindern kann (Ossowski und Reich, 1983). Trotz erfolgreicher Ergebnisse im Tiermodell sind jedoch noch keine klinischen Studien publiziert worden. Aus der EGF-ähnlichen Domäne von murinem uPA und dem Fc-Teil eines Immunglobulin G wurde bereits 1996 ein Fusionsmolekül konstruiert, das mit hoher Affinität an den uPAR bindet und durch seine antagonistische Wirkung im Mausmodell die Neoangiogenese und dadurch das Tumorwachstum behindert (Min et al., 1996). Auch gegen den uPAR wurden Antikörper hergestellt. So konnten Rabbani und Gladu mit einem Antikörper

gegen den uPAR von Ratten erreichen, dass orthotope Mammakarzinome bei Ratten durch s.c. Injektion des Antikörpers an der Stelle der Tumorinoculation langsamer wuchsen und die Tiere weniger Metastasen entwickelten (Rabbani und Gladu, 2002). Auch hier laufen noch Versuche einen humanisierten Antikörper zu entwickeln, der beim Menschen eingesetzt werden kann, wobei noch keine klinischen Studien publiziert wurden.

Einen neueren pharmakologischen Ansatz stellen die Small Molecules dar. So sind Gefitinib (Iressa[®]) und Erlotinib (Tarceva[®]) synthetische Anilin-Quinazoline, die die intrazelluläre Tyrosinkinase des EGFR kompetitiv hemmen, für die Behandlung des NSCLC nach Chemotherapie zugelassen und werden bei weiteren Tumoren in klinischen Studien untersucht (Blackhall et al., 2007).

Lapatinib (Tyverb[®]) ist ein oral verabreichter Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI), der gegen die Tyrosinkinasen des EGFR (c-erbB-1) und des Her2/neu-Rezeptors (c-erbB-2) gerichtet ist. Es besteht die Hoffnung, dass durch den dualen Ansatz das Problem einer Resistenz, z.B. gegen Trastuzumab überwunden werden kann. Dem entsprechend besteht eine Zulassung neben Lungenkarzinom auch für das metastasierte Her2/neu-positive Mammakarzinom bei Patientinnen, die bereits mit Trastuzumab behandelt wurden. Im Rahmen der Phase III TEACH-Studie wird Lapatinib derzeit in der adjuvanten Therapie überprüft (Moy und Goss, 2006). In der Phase III Studie GeparQuinto wird Lapatinib beim Mammakarzinom in der neoadjuvanten Situation in Kombination mit Chemotherapie mit einem Trastuzumab-Standardarm verglichen. Hier wurden noch keine Daten publiziert. Sunitinib (Sutent[®]), das ebenfalls zur Zeit bei Brustkrebspatientinnen untersucht wird, hemmt mehrere Tyrosinkinase-Rezeptoren, darunter alle PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor) und VEGF-R (vascular endothelial growth factor receptor) (Demetri et al., 2006).

Eine weitere Alternative zur Antikörper-Therapie wird nicht nur in der Onkologie in den relativ neu entdeckten Lipocalinen gesehen. Es handelt sich um 160-180 Aminosäuren große, funktionell vielfältige Proteine, die in vielen Lebewesen wie Bakterien und Menschen durch spezifische Aufnahme von verschiedensten Stoffen und spezifische Bindung an Rezeptoren Transport- und Speicheraufgaben ausführen. Durch gezielte Veränderung der hypervariablen *Loops* entstehen ‚Anticaline‘, die mit hoher Affinität und Spezifität z.B. Toxine binden, Medikamente transportieren oder Rezeptoren blockieren können (Schlehuber und Skerra, 2005).

Phase I Studien mit dem *small molecule* uPA-Inhibitor WX-UK1 und seiner oral applizierbaren *pro-drug* WX-671 sind abgeschlossen.

2.3.2 Hemmung der Funktion auf RNA-Ebene

Ein weiterer Ansatz der zielgerichteten Therapie ist es, die Expression der für bestimmte Krebsarten wichtigen Proteine bereits auf der posttranskriptionalen Ebene zu hemmen oder ganz zu unterdrücken. In den letzten Jahren sind besonders durch die Entwicklung der *Gene Arrays* viele neue Erkenntnisse über die Amplifikation oder vermehrte Transcription von Genen in Tumorgewebe gewonnen worden. Diese stellen mögliche Ziele einer ‚*targeted Therapy*‘ in der Onkologie dar.

Die meisten Strategien, die Expression auf mRNA-Ebene zu hemmen beruhen darauf, dass ein zur Ziel-mRNA komplementärer (*antisense*) RNA- oder DNA-Strang in die Krebszelle eingebracht wird und dort durch sequenzspezifische Bindung an die Ziel-mRNA zu deren Abbau führt oder zumindest deren Translation verhindert.

Bereits 1967 postulierten Carl Woese, Francis Crick, and Leslie Orgel, dass RNA aufgrund seiner Sekundärstruktur katalytisch aktiv sein könnte. Cech entdeckte 1981 das erste Ribozym, und zeigte dass auch RNA katalytische Aktivität haben kann (Cech, 1990). Ribozyme sind in der Lage mRNA zu schneiden und können damit zum einen die Translation definitiv unterbinden, und zum anderen mehrere mRNA-Moleküle nacheinander schneiden. Dies verspricht eine höhere therapeutische Effektivität, da nur eine begrenzte Menge von *antisense*-RNA in eine Zielzelle eingebracht werden kann (Wang und Dolnick, 1993). Es wurden bisher 13 in der Natur vorkommende Arten von Ribozymen beschrieben: Gruppe-I-Intron-Ribozyme (Grabowski et al., 1981) und Ribonuklease P (Guerrier-Takada et al., 1983) wurden zuerst entdeckt, wofür Cech und Altman den Nobelpreis für Chemie erhielten. 1986 entdeckten Prody et al. das *Hammerhead*-Ribozym in pflanzlichen Viroiden, das durch *cis*-Spaltung seiner eigenen pathogenen RNA mehrere Kopien seines Genoms freisetzt. Nachdem bekannt wurde, dass dieses kleinste natürlich vorkommende Ribozym in der Lage ist durch *trans*-Spaltung ein anderes, teilweise komplementäres RNA-Molekül zu spalten, bestand sofort großes Interesse aufgrund der potentiellen Bedeutung in Labor und Klinik für die Unterdrückung der Funktion einzelner Gene (Uhlenbeck et al., 1987). Das am besten beschriebene Ribozym ist das *Hammerhead*-Ribozym, das aufgrund seiner Sekundärstruktur diesen Namen erhalten hat. Es gibt

verschiedene Varianten des *Hammerhead*-Ribozyms, die jedoch alle eine konservierte Sequenz enthalten, die für die katalytische Aktivität verantwortlich ist und zusätzlich bis zu drei variable *stems*, die unterschiedliche Sequenzen enthalten können. In der Natur kommen Typ I und III vor, die respektive an *stem* I oder III das 3'- und 5'-Ende des RNA-Stranges haben. Im Labor wird meist ein ‚minimales‘ *Hammerhead*-Ribozym eingesetzt, das nur die Basen enthält, die für die katalytische Aktivität unerlässlich sind. *Hammerhead*-Ribozyme verfügen am 3'- und 5'-Ende der *Cleavage site* über flankierende Sequenzen, die die Ziel-mRNA sequenzspezifisch binden. Voraussetzung hierfür ist, dass die Ziel-mRNA dort eine NUH-Sequenz aufweist, wo die *Cleavage site* sein soll. Hierbei steht N für eine beliebige der vier RNA-Nucleotidbasen Cytosin (C), Guanin (G), Adenin (A) oder Uracil (U). H steht für A, C oder T. (s. Abb. 4.2) Die flankierende ‚Erkennungssequenz‘ ist meist 6 bis 8 Nukleotide lang. Somit kann theoretisch gegen jedes beliebige Gen, dessen Sequenz bekannt ist ein Ribozym hergestellt werden, das die Expression dieses Genes unterdrückt. Vor allem *in vivo* aber auch *in vitro* gelingt es jedoch oft nicht, die Expression zu unterdrücken. Dies liegt zunächst daran, dass die mRNA in der Zelle zum Teil gefaltet ist und Proteine an die mRNA binden, so dass die *target site* ggf. nicht zugänglich ist (Heidenreich et al., 1995). Das Ribozym muss in die Zelle eingebracht oder dort transkribiert werden und dort in die Nähe der mRNA in das gleiche subzelluläre Kompartiment gelangen (Sullenger und Cech, 1993). Die Ribozyme müssen in ausreichendem Überschuss in der Zelle vorhanden sein. Außerdem sind Ribozyme als RNA empfindlich und werden *in vivo* und *in vitro* rasch durch RNasen abgebaut. Um mehrmals katalytisch aktiv werden zu können, sollte sich das Ribozym nach der Spaltung rasch von der gespaltenen RNA lösen.

Das Hauptproblem ein effektiv wirksames Ribozym zu generieren liegt daher in der Wahl der *Cleavage site* bzw. der Bindungssequenz. Hierfür werden verschiedene Computerprogramme verwendet, um ‚*in silico*‘ die Sekundärstruktur und damit die Zugänglichkeit der Ziel-mRNA vorherzusagen (Citti und Rainaldi, 2005). Da sich diese Vorhersagen *in vivo* oft nicht bestätigen, werden Strategien untersucht geeignete Ribozyme *in vitro* (Tuerk et al., 1990) oder aus einem Pool von Ribozymen zu selektionieren (Lieber und Strauss, 1995). Nachteile dieser Methoden sind, dass auch *in vitro* selektionierte und katalytisch effektive Ribozyme *in vivo* oft keine nachweisbare Aktivität zeigen, und dass Selektionsmethoden *in vivo* direkt in Zellkultur technisch zu aufwendig, zeit- und kostenintensiv wären. So wurde bereits

1994 über ein Ribozym berichtet, dass zumindest *in vitro* in der Lage war, die mRNA von uPAR zu spalten und das mit Hilfe von Lipofectamin® in Sarkomzellen eingebracht werden konnte (Kariko et al., 1994). Es wurde jedoch auch in der Folge keine effektive Spaltung der mRNA in Zellkultur berichtet, was zum einen daran liegen kann, dass die Zielsequenz auf der mRNA unter *in vivo*-Bedingungen nicht mehr für das Ribozym zugänglich war, oder dass das Ribozym, das selbst bei zwanzigfachem molarem Überschuss *in vitro* nur 3,9% der mRNA spalten konnte *in vivo* zu wenig effektiv war um eine messbare Reduktion an mRNA zu erzielen.

Revolutioniert wurde das *Gene Silencing* auf posttranscriptionaler Ebene durch die Entdeckung dass doppelsträngige RNA die Expression eines Genes effektiv unterdrücken kann (Fire et al., 1998). Für die Entdeckung der RNA *interference* (RNAi) erhielten Fire und Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. RNAi ist ein für die Regulation der Genexpression wichtiger natürlicher Prozess. So werden aus Introns durch die RNA-Polymerase II primäre Transcripte hergestellt, die durch die Ribonuklease Drosha (RNase III) unter Mithilfe des *Doublestrand-RNA-Binding-Complex* (Pasha) zur aus ca. 70 Nukleotiden bestehenden pre-miRNA gekürzt wird. Diese ‚prä-Mikro-RNA‘ bildet durch ihre *Hairpin*-Form einen Doppelstrang und wird ins Zytoplasma exportiert. Hier wird sie von dem Enzym Dicer zur aus 22 Nukleotiden langen Mikro-RNA (miRNA) gekürzt. Hier wird die miRNA an den aus mehreren Proteinen bestehenden RNA-*induced silencing complex* (RISC) gebunden, der den *sense*-Strang abbaut und mit dem *antisense*-Strang sequenzspezifisch an die Ziel-mRNA bindet und diese spaltet. Eine weitere Möglichkeit der RNAi besteht darin, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) von außerhalb, z.B. durch Viren in die Zelle eingebracht wird. Diese exogene dsRNA kann ebenfalls durch den Dicer zu sog. *small interfering RNA* (siRNA) von 21-23 Nukleotiden gekürzt werden und anschließend ebenfalls analog zur miRNA an den RISC binden (Gewirtz, 2007). Somit besteht die Möglichkeit sowohl von außen dsRNA in die Zellen einzubringen als auch von der Zelle selbst transcribieren zu lassen, die dann unter Mithilfe des RISC sequenzspezifisch die mRNA eines Gens schneidet und dadurch dessen Expression unterdrückt.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit war es aufgrund der oben genannten Nachteile der Selektion von Ribozymen *in vitro* zum einen ein bakterielles Screening-Verfahren zu entwickeln. Dieses sollte es erlauben, aus einer *Random Library*, die einen Pool von Ribozymen aller möglicher Bindungssequenzen darstellt, die Ribozyme zu selektionieren, die die Expression eines gegebenen Genes durch Spaltung seiner mRNA auch *in vivo* effektiv unterdrücken. Des Weiteren sollte *in vitro* und in Zellkultur die Effektivität eines Ribozyms, das mit Hilfe der SELEX-Methode konstruiert wurde, gegen die mRNA des uPAR getestet werden (Tuerk et al. 1990).

Für den Aufbau des bakteriellen Screenings sollte zunächst das Ziel-Gen uPAR mit dem Gen der Galaktosidase als Reportergen fusioniert und nach Subklonierung in ein Plasmid in Bakterien eingebracht werden. Zur Kontrolle sollte ein weiteres Plasmid ohne das uPAR-Gen kloniert und ebenfalls auf einem Plasmid in Bakterien eingebracht werden. Es sollten aus Oligonukleotiden, die durch ihre zufällige Zusammensetzung alle möglichen Variationen an Bindungssequenzen enthalten, doppelsträngige DNA hergestellt und diese in eine Expressionskassette auf eukaryotischen und prokaryotischen Plasmiden subkloniert werden, so dass sie *in vitro*, in Bakterien und in Zellkultur *Hammerhead*-Ribozyme mit allen erdenklichen Bindungssequenzen transkribieren. Die so im bakteriellen Screening selektionierten Ribozyme sollten *in vitro* und in der Kontrolle in Bakterien auf effektive Spaltung der mRNA von uPAR überprüft werden. Im Anschluss sollten die so selektierten Ribozyme auf ihre Effektivität in eukaryotischen Zellen getestet werden, um so die Strategie der Effektivität von in Prokaryoten selektionierten Ribozymen in Eukaryoten zu belegen.

Das anhand der SELEX-Methode konstruierte Ribozym RZ-957 sollte nach Überprüfung der korrekten Freisetzung und Spaltung der mRNA von uPAR *in vitro* in Zellkultur auf seine Effektivität bei der Unterdrückung der Expression von uPAR getestet werden. Hierfür sollte ein uPAR-Luciferase-Fusionsgen kloniert und stabil in verschiedene Zelllinien transfiziert werden. Sowohl die im bakteriellen Screening selektionierten Ribozyme als auch RZ-957 sollten transient in diese Zelllinien transfiziert werden, um anhand der Luciferase-Aktivität die Expression des uPAR-Luciferase-Fusionsgenes zu messen. Zur Validierung des bakteriellen Screenings sollte ein in Zellkultur effektives Ribozym als positive Kontrolle in die Bakterien mit

dem uPAR-Galaktosidase-Fusionsgen eingebracht werden, um das Funktionieren des Systems durch Suppression der uPAR-Galaktosidase-Expression zu bestätigen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Zellbiologische Verfahren (Eukaryoten)

3.1.1 Zelllinien

In Zellkultur wurden mehrere Zelllinien verwendet, die seit langem in unserem Institut etabliert sind. Für die hier aufgeführten Versuche wurden embryonale Mausfibroblasten der Zelllinie NIH 3T3 (Jainchill et al, 1969) und SV40-transformierte Fibroblasten aus Affenieren der Zelllinie COS 7 (Gluzman et al, 1981) verwendet.

3.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Forma Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator, Thermo Life Sciences, Staufeu, Deutschland) kultiviert.

Die Zellen wurden auf Plastik in DMEM-Komplettmedium kultiviert und dreimal pro Woche in der logarithmischen Wachstumsphase (70-80% Konfluenz) passagiert. Hierfür wurde mit 5 ml PBS einmal gewaschen, die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst und die Lösung in 9 ml DMEM aufgenommen. Für eine 1:10 Verdünnung wurde 1 ml der Lösung in 9 ml vorgelegtes, vorgewärmtes DMEM gegeben.

Verwendete Reagenzien:

DMEM-Komplettmedium:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1x) 500ml (Biochrom KG, Berlin)
- Fötale Kälberserum 50 ml (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe)
- HEPES Pufferlösung 1M 5 ml (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe)
- Asparagin/Arginin 1 ml (Biochrom KG, Berlin, Germany)
- L-Glutamin 5 ml, (Biochrom KG, Berlin, Germany)

Phosphate Buffered Saline (PBS) w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom KG, Berlin, Germany)
Trypsin/EDTA (Versene) (1:50 verdünnt in PBS) (Seromed, Biochrom KG, Berlin)

3.1.3 Transiente Transfektion von Zellen

An Tag 1 wurde wie bei der normalen Passage der Zellen das DMEM abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin abgelöst und in zusätzliche 4 ml DMEM aufgenommen. Nachdem in einer Neubauer-Zählkammer die Konzentration von Zellen/ml Medium bestimmt wurde, wurden diese in eine 6-Well-Plate gegeben. Wir verwendeten nach einigen Versuchen für optimale Bedingungen stets 100.000 NIH-3T3-Zellen bzw. 200.000 COS7-Zellen pro Well.

An Tag 2 wurde 2 Stunden vor Transfektion das Medium aus allen Wells abgesaugt und je 2 ml frisches auf Raumtemperatur erwärmtes DMEM pro Well zugegeben.

In einer 96-Well-Plate wurden pro Transfektionsansatz 100 μl Optimem (OptiMEM Reduced Serum Medium, Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany) mit Lipofectamin® (Lipofectamine Reagent, 2 mg/ml; Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany) bzw. Fugene® (Fugene 6 Transfection Reagent, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA) gemischt. Der Mischung wurde die errechnete Menge DNA zugegeben, um für 15 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Inzwischen wurden 2 Stunden nach Wechsel des Mediums in den Wells mit den Zellen, das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde die DNA-haltige Lösung in die 6-Well-Plate zu den Zellen gegeben. Die Platten wurden nach leichtem Schwenken für 5 Stunden in den Inkubator gestellt, bevor das Optimem abgesaugt und durch 2,5 ml DMEM ersetzt wurde.

Wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, war die transiente Transfektion optimal bei Verwendung von 3 μl Fugene® und 2 μg DNA.

An Tag 4 wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden sie mit je 500 μl Lyse-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) 250 mM mit 0,1% Triton X-100, pH 7,8) für 10 Minuten bei RT inkubiert, bevor die Zellen abgeschabt wurden. Die Zellen wurden in Eppendorf-Cups aufgenommen und auf Eis gestellt.

3.1.4 Stabile Transfektion mit peuTaruPAR und Selektion von Zellen

3.1.4.1 Transfektion der Zellen mit peuTaruPAR

An Tag 1 wurde wie bei der normalen Passage der Zellen das DMEM abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin abgelöst und in zusätzliche 4 ml DMEM aufgenommen. Nachdem in einer Neubauer-Zählkammer die Konzentration von Zellen/ml Medium bestimmt wurde, wurden diese in zwei 6cm-Petrischalen gegeben und das Medium auf 5 ml ergänzt. Wir verwendeten für stabile Transfektionen 200.000 NIH-3T3-Zellen bzw. 400.000 COS7-Zellen pro Petrischale.

An Tag 2 wurde 2 Stunden vor Transfektion das Medium aus allen Wells abgesaugt und je 2 ml frisches auf Raumtemperatur erwärmtes DMEM pro Well zugegeben.

In einer 24-Well-Plate wurden pro Transfektionsansatz 300 µl Optimem mit 10 µl Lipofectamin® gemischt. Der Mischung wurden 2 µg peuTaruPAR (s. Kap. 3.4.1) in 300 µl Optimem zugegeben, um für 15 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Zur Kontrolle wurde eine zweite Lösung aus 600 µl Optimem und 10 µl Lipofectamin® ohne Zugabe von DNA hergestellt. Inzwischen wurden 2 Stunden nach Wechsel des Mediums in den Wells mit den Zellen, das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde die DNA-haltige Lösung in die eine 6cm-Petrischale zu den Zellen gegeben. Die Kontroll-Lösung ohne DNA auf die andere 6cm-Petrischale. Die Petrischalen wurden nach leichtem Schwenken für 5 Stunden in den Inkubator gestellt, bevor das Optimem abgesaugt und nach Waschen mit Medium durch 4 ml DMEM ersetzt wurde.

An Tag 4 wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden sie unter kurzer Einwirkung von 1 ml Trypsin gelöst und in 3 ml DMEM resuspendiert. Diese 3 ml wurden auf drei 10cm-Petrischalen verteilt und je 9 ml Selektionsmedium aufgefüllt.

3.1.4.2 Selektion der transfizierten Zellen

Auf den Petrischalen wird nun zweimal wöchentlich das Selektionsmedium gewechselt. Das Medium wird dabei abgesaugt und jeweils durch 8 ml DMEM ersetzt, das bei NIH 3T3-Zellen 187,5 µg/ml und bei COS 7-Zellen 200 µg/ml Hygromycin

enthält. Bei den NIH 3T3-Zellen waren nach 18 Tagen auf den Kontrollplatten keine Zellen mehr zu sehen, bei den COS 7-Zellen nach 21 Tagen.

Auf den Transfektionsplatten wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Auf jede zu pickende Kolonie wurde ein autoklavierter Klonierungszyylinder gesetzt und in jeden Zylinder 50 µl Trypsin/EDTA gegeben. Nach 3 Minuten wurden die Zellen in ihren Zylindern mit weiteren 50 µl DMEM vorsichtig resuspendiert und in 24-Well-Plates gegeben, in denen bereits 1 ml Medium ohne Hygromycin vorgelegt worden war. Zwei Tage später waren die Klone dicht gewachsen, wurden nach Absaugen des Mediums mit 1 ml PBS gewaschen, mit einigen Tropfen Trypsin gelöst, in 1 ml DMEM resuspendiert und in 6 cm-Petrischalen gegeben, in denen 4 ml DMEM vorgelegt worden war. Nach weiteren 3 Tagen waren die Klone dicht gewachsen und wurden in vorbeschriebener Weise auf 10 cm-Petrischalen umgesetzt. Für die weitere Kultivierung wurden die Zellen wie in Kap. 3.1.2 beschrieben dreimal wöchentlich passagiert und dem Medium kein Hygromycin mehr beigegeben.

3.1.5 Luciferase-Assay

Es wurden 2 µl Luciferase (20 ng/µl von Roche, Mannheim, Deutschland) in 98 µl Lyse-Puffer gelöst. In einer schwarzen 96-Well-Plate wurde zur Erstellung des Standards eine Verdünnungsreihe dieser Luciferase-Lösung in 15 Wells pipettiert. Das erste Well enthielt 4 ng Luciferase, jedes folgende jeweils die Hälfte des vorangehenden, so dass das 15. Well 4×2^{-14} ng, also ca. 0,244 pg Luciferase enthielt. Alle fünfzehn Wells wurden ad 50 µl mit Lyse-Puffer gefüllt. Ein sechzehntes enthielt 50 µl Lyse-Puffer ohne Luciferase.

Von den bereits in Lyse-Puffer aufgenommenen (s. Kap. 3.1.3) zu messenden Zellen wurden jeweils 50 µl in ein Well pipettiert. Es wurden den zu messenden Zellen, der Verdünnungsreihe und der Nullprobe jeweils 100 µl Luciferin-Puffer lichtgeschützt zugegeben und unter Vermeidung von Blasenbildung vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Biolumineszenz mit dem Messgerät TopCount (Canberra Packard, Groningen, Niederlande) mit dem Programm „Luciferase 6 sec“ bei „Counttime“ 0,20 Minuten und „Count Delay“ 1,00 Minuten gemessen. Anschließend wurden mit der Verdünnungsreihe als Standard die Luciferase-Mengen in den Zellen in pg bestimmt.

Zur Proteinbestimmung aus denselben Zelllysaten wurde in einer durchsichtigen 96-Well-Plate zur Erstellung eines Standards eine Verdünnungsreihe aus BSA (1,45 mg/ml, Bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) erstellt. Das erste Well enthielt 9,66 µg Protein, jedes folgende jeweils zwei Drittel des vorangehenden, so dass das 11. Well $9,66 \times (\frac{2}{3})^{10}$ µg, also 0,167 µg enthielt. Ein 12. Well wurde mit Wasser ohne Zugabe von BSA gefüllt. Von den zu messenden Proben wurden jeweils 10 µl in ein leeres Well pipettiert. Alle Wells der Proben und der Verdünnungsreihe wurden mit Wasser ad 160 µl gefüllt. Anschließend wurden allen Wells 40 µl des BioRad-Reagenz für Proteinbestimmung nach Bradford (BioRad, München, Deutschland) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen die Absorption mit dem Biolumin ELISA Reader (biolumin reader, Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) gemessen und anhand des Standards die Proteinmenge in den Zelllysaten bestimmt.

Luciferin-Puffer:

- 60 mM Dithothreitol (DTT)
 - 10 mM Magnesiumsulfat (MgSO₄)
 - 1 mM Adenosintriphosphat (ATP)
 - 30 M D(-)-Luciferin (Boehringer Mannheim, Deutschland)
- In 25 mM Glycyl-Glycin bei pH 7,8

3.1.6 Blaufärbung von β-Galaktosidase exprimierenden Zellen

Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben transient mit dem Plasmid pLZ12 (Krüger *et al.*, 2000) transfiziert. An Tag 4 wurden die Zellen jedoch nicht abgelöst, sondern zweimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten in 2 ml Fixierpuffer (PBS, 0,2% Glutaraldehyd, 2% Formaldehyd) inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit 2 ml PBS gewaschen und die Zellen dann über Nacht mit 2 ml X-Gal-Färbelösung (1 mg/ml) gefärbt.

X-Gal-Färbelösung (1 mg/ml):

- 1 g 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal)
- 25 ml Dimethylformamid
- gelöst in 0,975 l X-Gal-Ausgangslösung

X-Gal-Ausgangslösung:

- 1 l PBS
- 1,62 g $K_3Fe(CN)_6$
- 2,10 g $K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$
- 2 ml 1M $MgCl_2$
- 1 ml 10% Natriumdesoxycholat
- 2 ml 10% NP40

3.2 Zellbiologische Verfahren (Bakterien)

3.2.1 Bakterien-Stämme

Grundlage für Versuche mit Bakterien waren *Escherichia coli* des Stammes SØ 3831 (Chen et al., 1997 und Jensen et al., 1988) deren Ribosomen aufgrund einer Mutation langsamer als die des Wildtyps translatieren (s. Kap. 5.1).

Für die Erstellung der Ribozym-Library wurden die Plasmide pRZL in Elektromax DH10B-Zellen (Gibco BRL, Life Technologies, Cat. No. 18290-015) verwendet.

3.2.2 Transformation von *E. coli* des Stammes SØ 3831 mit pTaruPAs und pCtrl durch Hitzeschock

E. coli des Stammes SØ 3831 wurden nach dem Protokoll von Sambrook et al. (1989) für Transformation durch Hitzeschock kompetent gemacht und mit den Plasmiden pTaruPAs bzw. pCtrl transformiert, so dass die Stämme *E.coli*-Tar und *E.coli*-Ctrl entstanden.

Hierfür wurden die Bakterien in 100 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C im Schüttler (Controlled Environment Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600}=0,5$ (0,4-0,6) inkubiert. Alle Schritte erfolgten aseptisch mit sterilen Gefäßen. Es wurden 50 ml in ein 50 ml Polypropylen-Tube (Falcon 2070) gefüllt und für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen bei 2700g/ 4°C/10 Min. abzentrifugiert (Beckman J2 HS Zentrifuge; Beckman Instruments, Palo Alto, USA), der Überstand abgegossen

und das Pellet nach 1 Minute trocknen in 10 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und auf Eis gelagert. Die Zellen wurden erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und in 2 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und auf Eis gelagert. Mit einer sterilen, gekühlten Pipette wurden 200 µl in ein Eppendorf-Cup gegeben und 50 ng pTaruPARs bzw. 50 ng pCtrl hinzugefügt. Nach mischen durch vorsichtiges Wirbeln wird das Gefäß 30 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Eppendorf-Cups für 90 Sekunden in einen auf 42°C vorgewärmten Hitzeblock (Heatblock, Eppendorf, Deutschland) gesteckt und sofort danach für 2 Minuten in ein Eisbad gestellt. Dann wurden die Zellen in 900 µl SOC-Medium aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C im Schüttler inkubiert, bevor 200 µl auf ein 90mm-Agarplatte ausplattiert wurden. Die Agarplatten enthielten 40 µg/ml Chloramphenicol als Selektionsmedium.

(Zur Konservierung wurden von unter Chloramphenicol in LB-Medium über Nacht gewachsene Kulturen je 1 ml zusammen mit 1 ml Glycerin 40% gemischt und bei -70°C gelagert)

Verwendete Reagenzien:

LB-Medium (*lysogeny broth*, ‚Lucia-Bertani-Medium‘)

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- Dest. H₂O ad 1000 ml, anschließend wird mit NaOH auf pH 7,0 titriert

SOC-Medium (1000 ml)

- 20 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 0,5 g NaCl
- 2,5 ml 1M KCl
- Dest. H₂O ad 1000 ml, anschließend wird mit NaOH auf pH 7,0 titriert
- 10 ml 1M MgCl₂ und 20 ml 1M sterile Glucose unmittelbar vor Benutzung zugeben

3.2.3 Transfektion von E.coli-Tar und E.coli-Ctrl mit pRZL durch Elektroporation

E.coli-Tar bzw. E.coli-Ctrl wurden nach dem Protokoll von Sambrook et al. (1989b) für Transformation durch Elektroporation kompetent gemacht und mit den Plasmiden pRZL transformiert.

Hierfür wurde eine Kolonie E.coli-Tar bzw. E.coli-Ctrl über Nacht in 5 ml LB-Medium im Schüttler bei 37°C inkubiert. Davon wurden 2,5 ml in 250 ml LB-Medium in einem 2-Liter-Gefäß im Schüttler bei 300 U/Min bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600}=0,5-0,6$ inkubiert. Die Lösungen wurden 15 Minuten in Eiswasser gekühlt und in vorgekühlte 500 ml-Zentrifugengefäße umgefüllt. Die Bakterien wurden für 20 Minuten bei 4200 U/Min und 2°C abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen in 5 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Es wurden 250 ml eiskaltes Wasser hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet im verbleibenden Wasser durch Wirbeln gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Tube aufgenommen, 40 ml eiskaltes Glycerin 10% hinzugefügt und 10 Minuten bei 4200 U/Min und 2°C abzentrifugiert. Das Volumen des Pellets wurde geschätzt und in derselben Menge eiskaltem Glycerin 10% gelöst. Die elektrokompetenten Bakterien wurden in Aliquots a 20 µl bei -80°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden je 20 µl der Bakterien auf Eis aufgetaut und 10,4 ng pRZL in 1 µl Wasser gelöst hinzugegeben. Die Lösung wurde in eine 0,1 cm-Küvette (Gene Pulser Cuvette, 0,1 cm, Cat.No. 165-2089, Biorad, München, Deutschland) gefüllt, blasenfrei geklopft und im Biorad Gene Pulser bei 1,8kV Spannung, 25 µF Kapazität und 200 Ω Widerstand elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen mit 800 µl SOC-Medium aufgewaschen und für 30 Minuten bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl der Bakteriensuspension mit 100 µl LB-Medium auf die 15cm-Testplatten ausplattiert. Nachdem die Platten einige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet waren, wurden sie umgedreht und für ca. 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Verwendete Reagenzien:

Testplatten (alle Reagenzien von Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)

- 15 g Agaragar in 1l LB-Medium (s.o.), autoklavieren und abkühlen auf 55°C
- Ampicillin 100 µg/ml
- Chloramphenicol 40 µg/ml
- IPTG 60 µg/ml (Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranosid)
- XGal 60 µg/ml (5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-Galaktopyranosid)

3.3 Verfahren *in vitro*

3.3.1 *Cis*-Spaltung der Ribozyme *in vitro*

Das Plasmid pChop-957 wurde mit dem Restriktionsenzym Mlu I linearisiert. Je 1 µg DNA des Plasmides und des Markers (RNA-Century-Marker Plus Template Set, Ambion, Woodward, USA) dienen als Template zur Transcription. Durch Transcription des Markers entstehen RNA-Fragmente definierter Längen, die in der Gelelektrophorese parallel laufen und so eine Bestimmung der Größe der Fragmente von pChop erlauben. Hierfür wurden zwei Ansätze pipettiert (s. Tab. 3.1)

| | pChop-957 | Marker |
|-----------------------|-----------|----------|
| 1 µg DNA | 4 µl | 1 µl |
| DMPC-H ₂ O | 6,875 µl | 9,875 µl |
| 5x Tx-Puffer | 5 µl | 5 µl |
| 100 mM DTT | 2,5 µl | 2,5 µl |
| 10 mM ATP | 1,25 µl | 1,25 µl |
| 10 mM CTP | 1,25 µl | 1,25 µl |
| 10 mM GTP | 1,25 µl | 1,25 µl |
| 1 mM UTP | 1,25 µl | 1,25 µl |
| RNasin | 0,625 µl | 0,625 µl |
| ³² P-αUTP | 2 µl | 2 µl |
| Sp6-Polymerase | 1 µl | - |
| T7-Polymerase | - | 1 µl |
| Gesamtvolumen | 25 µl | 25 µl |

Tab. 3.1: Ansätze *in vitro* Transcription für *cis*-Spaltung

Beide Ansätze wurden bei 37°C für 1 Stunde inkubiert, dann je 0,5 µl RNase-freie DNase zugegeben, und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Es wurden 2 Chroma Spin Columns® unbeladen bei 4000 U/Min abzentrifugiert und anschließend mit den je 25,5 µl der Ansätze beladen. Es wurde erneut 2 Minuten bei 4000 U/Min zentrifugiert und danach die Chromaspinns mit einer mit Ethanol und DMPC-H₂O gereinigten Pinzette extrahiert und verworfen. Es wurde die Radioaktivität der beiden Eluate gemessen.

Für die eigentliche *Cleavage*-Reaktion wurden 13,5 µl H₂O, 9 µl des Ribozym-Eluates (\approx 30.000 cpm) mit 2,5 µl ‚Cleavage-Buffer 45‘ für 2 Minuten auf 70°C erwärmt und dann in Eiswasser abgekühlt. Es wurde 1 µl RNasin zugegeben, um einen Abbau der RNA durch eine eventuelle Kontamination von RNasen zu hemmen, und der Ansatz bei 37°C für 2 Stunden inkubiert, um dann die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 1x *Loading-Buffer* zu stoppen. Danach wurde die Probe für 2 Minuten auf 90°C erhitzt und dann bis zum Start der Gelelektrophorese auf Eis gelegt.

Verwendete Reagenzien:

(alle Reagenzien von Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)

Cleavage Buffer 45:

- 500 mM TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
- 0,1 mM EDTA
- 250 mM MgCl₂
- dH₂O ad 100 ml
- pH-Wert wird auf 7,5 eingestellt
- 0,1% DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-phosphocholine)
- dann Autoklavieren der Lösung

1x-Loading Buffer:

- 95% deionisiertes Formamid
- 20 mM EDTA pH 7,5
- 0,01% Bromphenolblau

³²P-αUTP (EasyTides, NEN Life Science Products, Boston, USA)

- 0,1% DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-phosphocholine)
- Sp6-Polymerase (Promega, Madison, USA)
- T7-Polymerase (Promega, Madison, USA)
- Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA)
- DNase (RNase-free) (Promega, Madison, USA)
- Chroma Spin Columns® (Clontech, Heidelberg, Deutschland)

3.3.2 Spaltung der mRNA von uPAR durch Ribozyme *in vitro*

Das Targetplasmid pcDNA3.1-uPAR wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI linearisiert, die Ribozym-Plasmide pChop-957, pRZL-#168 und pRZL-#1355 mit dem Restriktionsenzym Mlu I. Es wurden die Transcriptionsansätze nach Tab. 3.2 pipetiert.

| | RZ-957 | RZ-#168 | RZ-#1355 | uPAR | Marker |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1 µg DNA | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 2 µl |
| DMPC-H ₂ O | 5,875 µl | 5,875 µl | 5,875 µl | 3,875 µl | 6,875 µl |
| 5x Tx-Puffer | 5 µl |
| 100 mM DTT | 2,5 µl |
| 10 mM ATP | 1,25 µl |
| 10 mM CTP | 1,25 µl |
| 10 mM GTP | 1,25 µl |
| 10 mM UTP | 1,25 µl | 1,25 µl | 1,25 µl | - | - |
| 1 mM UTP | - | - | - | 1,25 µl | 1,25 µl |
| RNasin | 0,625 µl |
| ³² P-αUTP | - | - | - | 2,0 µl | 2,0 µl |
| Sp6-Polymerase | 1 µl | 1 µl | 1 µl | - | - |
| T7-Polymerase | - | - | - | 1 µl | 1 µl |
| Gesamtvolumen | 25 µl |

Tab. 3.2: Ansätze *in vitro* Transcription zur Spaltung von uPAR

Anschließend wurden von den Ansätzen ‚cold‘ RZ-957, RZ-#168, RZ-#1355 und Marker (s. 3.3.1) je 5 µl in ein neues Eppendorf-Cup aliquotiert und je 0,25 µl ³²P-αUTP zugegeben. Alle 9 Ansätze wurden bei 37°C für 1 Stunde inkubiert, dann je 0,5

μl RNase-freie DNase zugegeben und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Für die 5 ‚hot‘ Ansätze, die ^{32}P - αUTP enthalten wurden je 2 Eppendorf-Cups mit je $10 \mu\text{l}$ DMPC- H_2O vorbereitet und ‚vorher‘ bzw. ‚nachher‘ beschriftet. Alle 9 Ansätze wurden mit DMPC- H_2O ad $50 \mu\text{l}$ verdünnt und je $1 \mu\text{l}$ der ‚hot‘-Proben in das ‚vorher‘-Cup gegeben. Es wurden 9 Chroma Spin Columns® unbeladen bei 4000 U/Min abzentrifugiert und anschließend mit den je 50 bzw. $49 \mu\text{l}$ der Ansätze beladen. Es wurde erneut 2 Minuten bei 4000 U/Min zentrifugiert, wodurch die transkribierte RNA die Röhrechen verlässt und die einzelnen Nucleotide in den Filtern hängen bleiben. Es wurden dann die Chroma Spin Columns® mit einer mit Ethanol und DMPC- H_2O gereinigten Pinzette extrahiert und verworfen. Aus dem Eluat wurde je $1 \mu\text{l}$ in das ‚nachher‘-Cup gegeben.

Es wurde die Radioaktivität aller ‚vorher‘- und ‚nachher‘-Cups gemessen und anhand des Quotienten nachher/vorher die Einbauraten errechnet. Für den Ansatz ‚uPAR‘ lässt sich anhand des Nucleotid-Gewichtes von 330 g/mol berechnen, dass er zu Beginn insgesamt 1683 ng Nucleotide enthält (ohne Template-DNA), für die Ribozym-Ansätze waren es jeweils 3300 ng . Da das Targettranscript 1150 und das Ribozymtranscript 240 Nucleotide enthalten, wiegt deren RNA für uPAR 379500 g/mol und für das Ribozym 79200 g/mol . Damit und mit der Einbauraten wurde berechnet wie viel Target- bzw. Ribozym-RNA in $\text{fMol}/\mu\text{l}$ in den Ansätzen war, und diese auf $5 \text{ fMol}/\mu\text{l}$ Target und $250 \text{ fMol}/\mu\text{l}$ Ribozym verdünnt.

Für die eigentliche Cleavage-Reaktion wurden $12,5 \mu\text{l}$ H_2O , $5 \mu\text{l}$ Target ($\triangleq 25 \text{ fMol}$) und $5 \mu\text{l}$ Ribozym ($\triangleq 1250 \text{ fMol}$) mit $2,5 \mu\text{l}$ ‚Cleavage-Buffer 45‘ für 2 Minuten auf 70°C erwärmt und dann in Eiswasser abgekühlt. Es wurde je $1 \mu\text{l}$ RNasin zugegeben und die Ansätze bei 37°C für die gewünschte *Cleavage-Zeit* inkubiert, um dann die Reaktion durch Zugabe von $25 \mu\text{l}$ $1\times$ *Loading-Buffer* zu stoppen. Die *Cleavage-Zeit* betrug für die Kontrollen 0 Stunden, für maximale Spaltung 6 Stunden, und für die Kinetik zusätzlich je einen Ansatz mit 1, 2 und 4 Stunden. Nach Zugabe des *Loading-Buffers* wurden die Proben für 2 Minuten auf 90°C erhitzt und dann bis zum Start der Gelelektrophorese auf Eis gelegt.

3.3.3 RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Spaltprodukte nach der *Cleavage*-Reaktion wurden 5-prozentige, denaturierende Polyacrylamidgele im Sequi-Gen GT Cell® (Biorad, München, Deutschland) verwendet. Als Laufpuffer diente RNase-freie 1x-TBE-Lösung. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel durch Anlegen einer Spannung von 1000 Volt auf ca. 45°C vorgewärmt und die Taschen mit Laufpuffer gespült. Nach Einfüllen der Proben wurden die Spaltprodukte über 1,5 Stunden bei 1000 Volt aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf Papier getrocknet und für zunächst 2 Stunden und dann noch mal 23 Stunden auf je einen X-Omat® Autoradiographie-Film (Kodak, Stuttgart, Deutschland) aufgelegt.

Verwendete Reagenzien:

Ultrapure Sequagel® (National Diagnostics, Atlanta, USA)

480 µl 10 % (w/v) APS (Amoniumpersulfat)

32 µl Temed (Tetramethylethyldiamin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)

3.4 Molekularbiologische Verfahren

3.4.1 Klonierung der Plasmide

Für die Klonierung der Plasmide pACYC184-LacZ, pACYC184-uPAR-LacZ, pTaruPARs, pCtrl-LacZ, pCtrl, pcDNA3.1-uPAR, pGL3-uPAR, pRZL, pChop-957, peuTaruPAR und peuRZ-957 wurden die folgenden Ausgangsplasmide verwendet:

pACYC184 (NIH GenBank® accession Nr. X06403, New England Biolabs, Beverly, USA)

pChop (Benedict et al., 1998; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jim Norris, Keck Medical School, University of Southern California, USA)

pMA23 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Martina Anton,

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung,
Technische Universität München, Deutschland)

pBSM13-uPAR (Bluescript M13+ von Stratagene, La Jolla, USA, das uPAR-
Gen wurde subkloniert und das Plasmid freundlicherweise zur
Verfügung gestellt von Dr. Viktor Magdolen, Frauenklinik der
Technischen Universität München, Deutschland)

pUC18 (NIH GenBank[®] accession Nr. L09136, Fermentas, Glen Burnie, USA)

pGL3 Control Vector (Promega, Cat.Nr. E1741, Mannheim, Deutschland)

pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Cat. Nr. V790-20, Carlsbad, USA)

pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen, Cat. Nr. V860-20, Carlsbad, USA)

pcDNA3.1/hygro(+) (Invitrogen, Cat. Nr. V870-20, Carlsbad, USA)

Es wurden je 5 µg des Vektor-Plasmids (Tab. 3.3, Spalte 2) und des Insert-Plasmids (Tab. 3.3, Spalte 3) in getrennten Ansätzen mit je 20 U des in der Tab 3.3 angegebenen Restriktionsenzym (Afl III, BamH I, Bgl II, EcoR I, EcoR V, Hind III, Nco I, NotI, Sal I, Xho I; New England Biolabs, Beverly, USA) verdaut. Der Verdau lief über 2 Stunden bei 37°C mit 10µl Restriktionspuffer B, H oder M (Sure/Cut Buffer for restriction enzymes, Roche Applied Science, Indianapolis, USA) wie in Tab. 3.3 angegeben. Wenn bei zwei Restriktionsenzymen beide im selben Puffer arbeiten, wurden sie demselben Ansatz zugegeben. Sonst wurde zunächst ein Verdau durchgeführt, die DNA mit dem Wizard-Kit für DNA-Isolierung (Wizard PCR Preps DNA Purification System, Katalog-Nr. A7170, Promega, Madison, USA) aufgereinigt und der zweite Verdau in einem getrennten Ansatz durchgeführt. Anschließend wurde das unverdaute Plasmid und 2 µl des Verdau auf 1%-High-melting-Point-agarose-TAE-Gel aufgetragen und der gelungene Verdau per Gelelektrophorese überprüft (s. Kap. 3.4.2). Das Fragment für die Ligation wurde durch Elektrophorese auf einem 0,8%-LMP-Agarose-TAE-Gel vom Rest des Plasmides getrennt und mit dem Wizard-Kit für DNA-Isolierung (s.o.) die DNA aus dem Gel isoliert. Die DNA-Konzentration wurde von einem Aliquot auf einem Elektrophorese-Gel durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe von *Ladder*-Marker (1 kb DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, USA) geschätzt. Wenn es kein für Vektor und Insert geeignetes Restriktionsenzym gab, wurde eines der Fragmente modifiziert (Modifikation 4 in Tab 3.3, s.u.) oder das Insert per PCR aus dem Plasmid amplifiziert und so durch entsprechende Konstruktion der Primer die entsprechende Schnittstelle für das Restriktionsenzym an das Insert

angefügt (Modifikation 1, 3, 5 und 6 in Tab 3.3, s.u.). Wurde ein Plasmid mit nur einem Restriktionsenzym zur Aufnahme des Insert geöffnet, wurden die Enden dephosphoryliert, um eine Religation ohne Insert zu verhindern (Modifikation 2 in Tab 3.3, s.u.).

Die gereinigten DNA-Fragmente von Vektor und Insert wurden in drei Ansätzen ligiert, wobei im ersten das Insert in ca. 5-fachem molarem Überschuss vorlag, im zweiten Ansatz in 10-fachem Überschuss, und im dritten Ansatz als Kontrolle gar kein Insert. (DNA-Mengen des besten Ansatzes in Tab 3.3) Die Ansätze wurden vollständig evaporisiert, mit einer Lösung aus 11 µl ddH₂O und 3 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (New England Biolabs, Beverly, USA) resuspendiert und mit je 1 µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Beverly, USA) über 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Aus den Ansätzen wurden je 5 µl entnommen, zur Inaktivierung der Ligase für 10 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend per Hitzeschock in DH10β-Bakterien oder E. coli des Stammes SØ 3831 transformiert (s. Kap 3.2.2).

| neues Plasmid | Vektor Verdau | Insert Verdau | *Modifikation | Vek.Größe Lig.Menge | Ins.Größe Lig.Menge | Probeverdau Banden |
|---------------------------|--|--|--|---------------------|---------------------|--|
| pACYC184-LacZ | pACYC184 BamH I (B) Sal I (H) | pMA23 BamH I (B) Xho I (B) | | 4,2 kbp 25 ng | 3,0 kbp 100 ng | Hind III: 7,0 kbp EcoR I: 2,1 u. 4,9 kbp |
| pACYC184-uPAR-LacZ | pACYC184- LacZ Hind III (B) BamH I (B) | pBSM13- uPAR (1) Hind III (B) Bgl II (M) | 1) PCR mit uPARF1-HindIII uPARB1005-BglIII | 7,0 kbp 26,5 ng | 1,0 kbp 210 ng | Nco I: 2,5 u. 5,5 kbp |
| pTaruPARs | pACYC184- uPAR-LacZ Hind III (B) (2) | pUC18 (3) Hind III (B) | 2) dephosphoryliert 3) PCR mit pUC18-F470 pUC18-B685 | 8,0 kbp 80 ng | 0,22 kbp 45 ng | PCR mit pUC18-B685 uPARB1005- BglIII: 1235 bp |
| pCtrl-LacZ | pACYC184- LacZ Hind III EcoR V | pMA23 Hind III EcoR V | | 5,6 kbp 150 ng | 1,2 kbp 30 ng | EcoR V u. Hind III: 1,2 u. 5,6 kbp |
| pCtrl | pCtrl-LacZ Xho I (B) (4), (2) | pUC18 (3) Hind III (B) (4) | 4) mit dem Klenow- Fragment aufgefüllt 2) s.o. 3) s.o. | 6,8 kbp 60 ng | 0,22 kbp 52,8 ng | PCR mit pUC18-B685 pMA23- B2290: 401 bp |
| pcDNA3.1-uPAR | pcDNA3.1+ Hind III (B) BamH I (B) | pBSM13- uPAR (5) Hind III (B) Bgl II (M) | 5) PCR mit uPARF1-HindIII uPARB1005-BglIII | 5,4 kbp 200 ng | 1,0 kbp 200 ng | Hind III u. BamH I: 0,5 u. 5,9 kbp |
| pGL3-uPAR | pGL3 CV Hind III (B) Nco I (H) | pBSM13- uPAR (6) Hind III (B) Afl III (H) | 6) PCR mit uPARF1-HindIII uPARB1005-AflIII | 5,2 kbp 37,5 ng | 1,0 kbp 80 ng | Sca I: 1462, 1083 u. 3626 bp |
| pRZL | pChop BamH I (B) EcoR I (B) | RzLibSense u. RzLibAnti- sense (7) | RzLibSense u. RzLibAntisense vor Ligation <i>annealed</i> | 4,0 kbp 500 ng | 0,04 kbp 1 ng | Hind III u. XbaI: 242 bp |
| pChop-957 | pChop BamH I (B) EcoR I (B) | RZ957Sense u. RZ957Anti- sense (7) | RZ957Sense u. RZ957Anti-sense vor Ligation <i>annealed</i> | 4,0 kbp | 0,04 kbp | Hind III u. XbaI: 263 bp |
| peuTaruPAR | pcDNA3.1/h ygro(+) Xba I (H) Hind III (B) | pGL3-uPAR Xba I (H) Hind III (B) | | 5,6 kbp 600 ng | 2,6 kbp 50 ng | Xba I u. Hind III: 2,6 u. 5,6 kbp |
| peuRZ-957 | pcDNA3.1/Z eo Hind III (B) NotI | pChop-957 Hind III (B) NotI | | 5,0 kbp 60 ng | 0,24 kbp 55 ng | BamH I: 5,0 linearisiert |

Tab. 3.3: Selbst klonierte Plasmide mit Vektor-Plasmid, Insert, Restriktionsenzyme und Puffer, für die Subklonierung notwendige Modifikationen an Vektor oder Insert, Größe und Menge der verwendeten DNA-Segmente, sowie die zur Kontrolle verwendeten Restriktionsenzyme und dadurch erhaltenen Fragmente

Modifikationen 1-6 (zu Tab. 3.3):

- 1) Es wurden 100 ng Plasmid pBSM13-uPAR als Template für die PCR mit den Primern uPARF1-HindIII (Sequenz: TTTAAGCTTATGGGTCACCCGCCGCTG) u. uPARB1005-BglIII (Sequenz: TTAGATCCCGGTCCAGAGGAGAGTGCC) zusammen mit 10 µl 10 x PFU buffer, 1,0 µl PFU-Turbo DNA-Polymerase und 2 µl 10 mM dNTP (alle Reagenzien von Stratagene, Heidelberg, Deutschland) in einen Ansatz mit H₂O ad 100 µl gegeben. Alle PCRs wurden im Thermozykler durchgeführt, wobei die Temperatur zunächst für 3 Min. auf 94°C gebracht wurde. Anschließend erfolgten 29 Zyklen mit je einer Minute bei 94°C, 55°C und 72°C. Am Ende weitere 10 Min bei 72°C und langsame Abkühlung auf 4°C. (Der unterstrichene Teil der Primer-Sequenz entspricht dem Teil des Primers, der komplementär an das Plasmid bindet. Der restliche Teil enthält die Bindungssequenz für das jeweilige Restriktionsenzym, die so das jeweilige Ende des PCR-Produktes bildet.)
- 2) Das mit HindIII gespaltene Plasmid pACYC184-uPAR-LacZ bzw. das mit XhoI gespaltene und mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I (Boehringer, Mannheim, Deutschland) aufgefüllte Plasmid pCtrl-LacZ wurde zur Dephosphorylierung mit 1 U alkalischer Phosphatase (Calf intestine Phosphatase, New England Biolabs, Beverly, USA) über 15 Minuten bei 37°C inkubiert, die Phosphatase bei 65°C inaktiviert, und erneut mit 1 U CIP für 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
- 3) Es wurden 5 Ansätze mit je 100 ng Plasmid pUC18 als Template für die PCR mit den Primern pUC18-F470 (Sequenz: TTTAAGCTTAGCTGTTTCCTGTGTGA AATTG) und pUC18-B685 (Sequenz: TTTAAGCTTAGCGCCCAATACGCA AACCG) verwendet und die PCR wie in Modifikation 1 (s.o.) durchgeführt.
- 4) Zur ‚stumpfen‘ Ligation wurden die nach Verdau isolierten und gereinigten Vektoren und Inserts mit 1 µl Klenow-Fragment über 30 Minuten bei 37°C in einem Ansatz mit 1 µl 10 mM dNTP, 6 µl Buffer H und H₂O ad 60 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA erneut mit dem Wizard-Kit für DNA-Isolierung (Wizard PCR Preps DNA Purification System, Katalog-Nr. A7170, Promega, Madison, USA) aufgereinigt.
- 5) Es wurden 100 ng Plasmid pBSM13-uPAR als Template für die PCR mit den Primern uPARF1-HindIII (Sequenz: TTTAAGCTTATGGGTCACCCGCCGCTG)

und uPARB1005BglIII (Sequenz: TTTAGATCCCCGGTCCAGAGGAGAGTGCC) verwendet und die PCR wie in Modifikation 1 (s.o.) durchgeführt.

- 6) Es wurden 100 ng Plasmid pBSM13-uPAR als Template für die PCR mit den Primern uPARF1-HindIII (Sequenz: TTTAAGCTTATGGGTCACCCGCCGCTG) und uPARB1005-AflIII (Sequenz: TTTACATGTCCGGTCCAGAGGAGAGTGCC) verwendet und die PCR wie in Modifikation 1 (s.o.) durchgeführt.
- 7) Je 5 µg der Oligonukleotide RzLibSense und RzLibAntisense bzw. RZ957Sense u. RZ957Anti-sense wurden mit 20 µl Ligationspuffer (T4-DNA-Ligase-Puffer, New England Biolabs, Beverly, USA) in H₂O ad 100 µl in einem Eppendorf-Cup für 1 Minute in kochendes Wasser gehalten und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.4.2 Minipräparation von DNA zur Restriktionsfragmentanalyse

Für Minipräparationen von DNA wurde das Wizard[®] Plus Miniprep-Kit verwendet (Mini Wizard[®] Plus Minipreps; Promega, Madison, USA) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. In 5 ml LB-Medium mit Ampicillin 100 µg/ml bzw. Chloramphenicol 40 µg/ml wurde eine Einzelkolonie von Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 2 ml der Bakteriensuspension wurden 2 Minuten bei 14.000 U/Min (Hettich Tischzentrifuge EBA 12; Hettich, Tuttlingen, Germany) abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde in 200 µl Zellresuspensionslösung resuspendiert, 200µl Zellyse-Lösung zugegeben und das Gefäß invertiert. 200µl Neutralisationslösung wurden zugegeben, das Gefäß geschwenkt, und danach das Lysat bei 10.000g (14.000 U/Min) 10 Minuten abzentrifugiert.

Eine Minisäule (Aufreinigungssäule) wurde auf eine Spritze gesteckt und auf eine Öffnung des Vacuum Manifolds gesteckt. 1 ml der auf 37°C vorgewärmten resuspendierten Lösung wurde in jede Spritze gefüllt und der Überstand aus dem vorhergehenden Zentrifugationsschritt (s.o.) auf die Resin-Lösung gegeben. Hatte das Vakuum das Gemisch durch die Säule gezogen, wurde diese mit 2 ml Waschlösung per Vakuum gereinigt und die Minisäule in ein 1,5 ml Gefäß überführt und 2 Minuten bei 14.000 U/Min abzentrifugiert, um überschüssige Waschlösung zu entfernen. Danach wurde die Säule auf ein neues, steriles Eppendorf-Tube überführt, 50 µl

ddH₂O zugegeben und 1 Minute inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt für 20 s bei 14.000 U/Min wurde die DNA eluiert.

Ein Aliquot der DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen und den entsprechenden Puffern (s. Tab. 3.3) über 2 Stunden bei 37°C verdaut. Nach entsprechender Inkubation wurde die DNA mit *loading buffer* vermischt. Mit den einzelnen Proben und einem geeigneten DNA-Marker (1 kbp- bzw. 100 bp-Ladder) wurde ein 1 %-iges Agarose-Gel, das 2 µl Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) enthielt, beladen und bei 70 V in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte anhand des Vergleichs der Restriktionsfragmentgrößen der Proben mit den definierten Bandengrößen des DNA-Markers.

Verwendete Reagenzien und Geräte:

Stammlösung Loading Buffer (6x)

- 60% v/v Glycerin
 - 60 mM EDTA
 - 0,05% w/v Bromphenolblau
- pH=7,4

TAE-Puffer

- 0,1% v/v Eisessig
 - 40 mM Tris
 - 1 mM EDTA
- pH = 8,3

1 kB-Ladder bzw. 100 bp-Ladder (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)

Agarose Genetic Technology Grade (ICN, Aurora, Ohio, USA)

Elektrophoresekammer Hoefer HE33 Mini Horizontal Submarine Unit

Power Supply Power Pac 200 (BioRad, München, Deutschland)

3.4.3 Maxipräparation von DNA aus transformierten Bakterien

250 ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin bzw. Chloramphenicol 40 µg/ml wurden mit 20 µl der Bakteriensuspension, die zur Restriktionsfragmentanalyse hergestellt wurde, angeimpft, und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die DNA nach dem Qiagen-Kit-Protokoll unter Verwendung der im Kit enthaltenen Lösungen gewonnen (Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Die Bakteriensuspension wurde bei 6000g/15min/4°C (Beckman J2 HS Zentrifuge, Beckman Instruments, Palo Alto, USA) abzentrifugiert, in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, Puffer P2 (Lysepuffer) wurde zugegeben, nach 5 Minuten Inkubation Puffer P3 (Neutralisationspuffer) zugegeben und für 20 Minuten auf dem Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung bei 20000g/30 min/4°C zentrifugiert (Beckman J2 HS Zentrifuge, s.o.) und der Überstand auf eine Qiagen-Säule (Qiagen-tip 500), die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert worden war, gegossen. Die Säule wurde zweimal mit Puffer QC gewaschen, danach wurde die DNA mit 15 ml Puffer QF aus der Säule eluiert. Nach Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde bei 15000g/30 min/4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgegossen.

Das Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen, bei 15000g/10 min zentrifugiert, und der Überstand abgegossen. Die im luftgetrockneten Pellet enthaltene DNA wurde in 300 µl ddH₂O aufgenommen.

3.5 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse der gemessenen Luciferase-Werte wurde der Mann-Whitney-U-Test als Rangsummentest für die exakte zweiseitige Signifikanz zweier unabhängiger Stichproben verwendet. Die Berechnung erfolgte mit SPSS 12.0 für Windows (SPSS Inc., USA).

4 Ergebnisse

4.1 *In vivo*-Screening für ein aktives Ribozym gegen uPAR in Bakterien

4.1.1 Konstruktion der Target- und Kontroll-Plasmide

4.1.1.1 Konstruktion des Targetplasmids pTaruPARs für das bakterielle Screening

Um das Targetplasmid herzustellen wurde der Promotor des Lac-Operons (LacP), das für den uPA-Rezeptor kodierende Gen und das für die β -Galaktosidase kodierende LacZ-Gen in den prokaryotischen Expressionsvektor pACYC184 subkloniert, der bereits ein Resistenzgen für Chloramphenicol enthielt. Das Plasmid pACYC184 wurde als Targetplasmid gewählt, da es ein ‚low copy‘-Plasmid ist, und man damit einen hohen molaren Überschuss von Ribozymen gegenüber dem Target erwarten kann. Dabei wurde das LacZ als Fusionsgen so hinter das uPAR-Gen kloniert, dass das Leseraster erhalten blieb (*in frame*) und LacZ hinter uPAR auf eine mRNA transkribiert wurde. Diese mRNA kodiert für das Fusionsprotein uPAR-LacZ in dem das LacZ-Enzym (β -Galaktosidase) aktiv ist.

Der korrekte Einbau in *sense*-Richtung wurde per PCR kontrolliert, wobei der Forwardprimer an LacP und der Backwardprimer an uPAR band. Die PCR zeigte als Produkt die erwartete Bande von 1235 bp.

Das vollständige Targetplasmid pTaruPARs wurde mit demselben Forwardprimer kommerziell sequenziert und wies die korrekte Sequenz auf (Sequiserv, Vaterstetten, Deutschland).

4.1.1.2 Konstruktion des Kontrollplasmids pCtrl für das bakterielle Screening

Um ein Kontrollplasmid zu erhalten wurde das vollständige LacZ-Gen (mit ATG-Codon) und der Lac-Promotor in das Plasmid pACYC184 subkloniert, so dass es wie das Targetplasmid β -Galaktosidase exprimierte, aber kein uPAR enthielt.

Das neue Plasmid pCtrl wurde wie in Kap. 4.1.1.1 per PCR überprüft. Der korrekte Einbau in *sense*-Richtung wurde per PCR kontrolliert, wobei der Forwardprimer an

LacP und der Backwardprimer an LacZ band. Die PCR zeigte als Produkt die erwartete Bande von 401 bp.

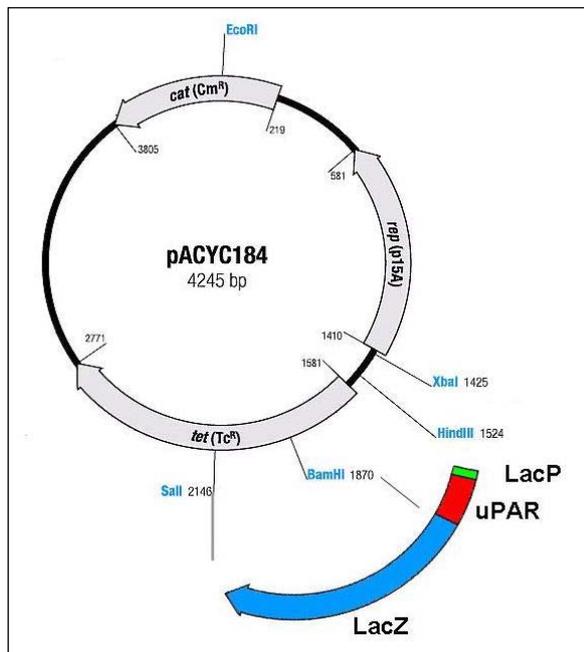


Abb. 4.1a: Plasmid pTaruPARs

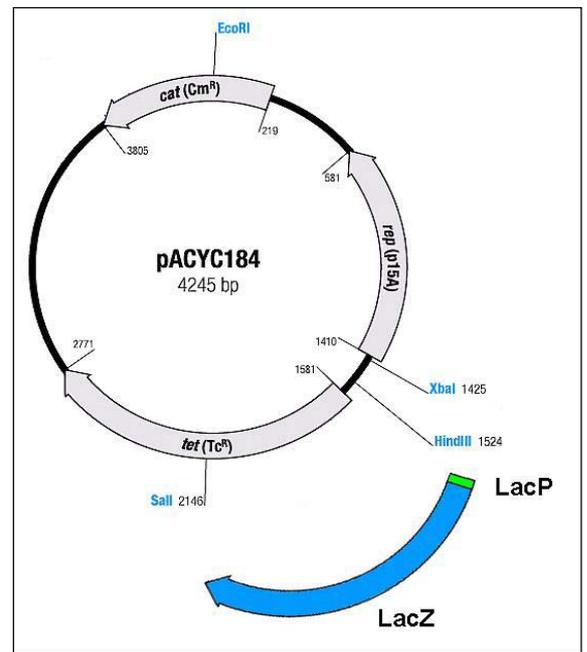


Abb. 4.1b: Plasmid pCtrl

4.1.2 Bestätigung der Resistenz der transformierten Stämme und der Funktion der konstruierten Plasmide

E. coli Bakterien des Stammes SØ 3831 (Chen *et al.*, 1997) deren Ribosomen aufgrund einer Mutation langsamer als die des Wildtyps translatieren (s. Kap. 5.1) wurden mit dem Plasmid pTaruPARs bzw. pCtrl transformiert, so dass die Stämme *E. coli*-Tar und *E. coli*-Ctrl entstanden. Außerdem als Kontrollbakterien die Plasmide pACYC184-LacZ-uPAR und pCtrl-LacZ, die beide kein LacP enthalten. Die transformierten Bakterien wurden auf Agarplatten mit Chloramphenicol ausplattiert und so die Transformanten selektioniert.

Es wurden Agarplatten hergestellt, die alle Chloramphenicol, Streptomycin und X-Gal enthielten, und weitere Platten, die zusätzlich IPTG enthielten.

Die Bakterien wuchsen auf allen Platten. Das heißt, dass sie alle das Plasmid mit der Chloramphenicol-Resistenz enthielten, und dass es sich bei den Bakterien tatsächlich um den Stamm von Mutanten handelte, deren veränderte Ribosomen sie resistent gegen Streptomycin machen.

Die Bakterien auf den Platten ohne IPTG (induziert den Lac-Promotor) waren weiß, da keine β -Galaktosidase exprimiert wurde. Auf den Platten mit IPTG bildeten sich blaue Kolonien, da die β -Galaktosidase das X-Gal umwandelte. Die Kolonien der Bakterien mit dem Targetplasmid waren denen mit dem Kontrollplasmid identisch.

4.1.3 Überprüfung der Subklonierung der Random-Ribozym-*Library* in pChop

4.1.3.1 Der Vektor der Ribozym-*Library*

Als Expressionsvektor für die Ribozym-*Library* wurde das Plasmid pChop gewählt, das das Plasmid pCR II als Expressionsvektor für eine Tripel-Ribozym-Kassette nutzt. Außerdem kodiert der Vektor ein Resistenzgen für Ampicillin, einen Sp6-Promotor für *in vitro*-Transcription, und den Lac-Promotor. Dieser Promotor reguliert die Expression einer Kassette, die im Zentrum Schnittstellen für BamH I und EcoR I enthält, wo die randomisierten Ribozyme der *Library* eingesetzt werden sollten. Dieses zentrale Ribozym wird von zwei weiteren Ribozymen flankiert, die nach Transcription der Kassette durch *cis*-Spaltung das zentrale Ribozym aus der mRNA freisetzen sollten (s. Abb. 4.2). Zusätzlich wird dadurch sichergestellt, dass das freigesetzte zentrale Ribozym immer die gleichen Endsequenzen hat, da bei der Transcription so keine zusätzlichen Nukleotide angehängt werden können.

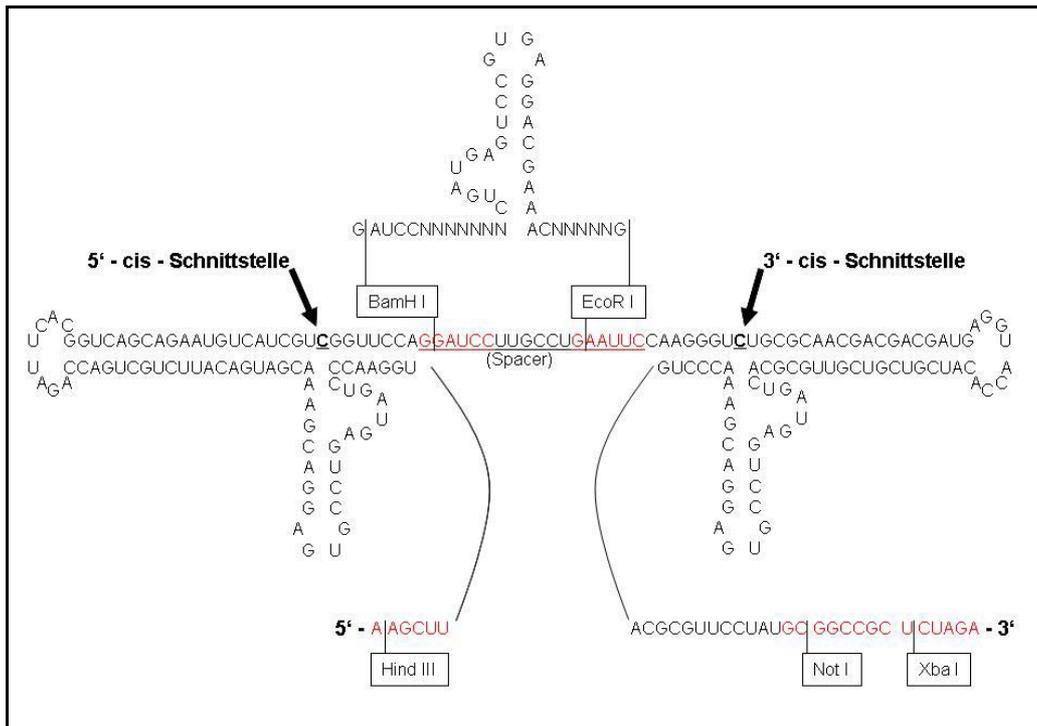


Abb. 4.2: Tripel-Ribozym-Kassette mit Restriktionsstellen (rot) und Insertionsstelle, die durch Ribozyme der Library ersetzt wird (unterstrichen)

4.1.3.2 Konstruktion des *Random-Ribozym* als Insert für die Klonierung der *Library*

Es wurden die Oligonucleotide RzLibSense (S) und RzLibAntisense (AS) kommerziell mit folgender Nucleotidsequenz hergestellt:

S: 5'-GATCC NNNNN CTGATGAGTCCGTGAGGACGAAA NNNNN G-3'

AS: 5'-AATTC NNNNN TTTCGTCCTCACGGACTCATCAG NNNNN G-3'

Hierbei kodierte die unterstrichene Sequenz des *sense*-Oligonucleotids den katalytisch aktiven Teil des Ribozyms (*hammerhead-core*). Die beiden unterstrichenen Sequenzen waren komplementär (nach Watson und Criggs).

Die N-Nukleotide setzten sich nach dem Zufallsprinzip aus den Nukleotiden Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), und Thymin (T) zusammen und kodierte für die Sequenzen mit denen die Ribozyme spezifisch an komplementäre Sequenzen von mRNA banden. Die Lösungen enthielten also Oligonucleotide unterschiedlicher Sequenzen, die für etwas mehr als eine Million (4^{10}) Ribozyme unterschiedlicher Bindungssequenz kodieren, bzw. für den komplementären Strang.

Die beiden 5'-Enden ergeben nach komplementärer Anlagerung Überhänge, die den Enden eines mit BamH I bzw. EcoR I verdauten DNA-Doppelstranges entsprechen.

Um den für die Subklonierung in die Ribozym-Kassette notwendigen DNA-Doppelstrang zu erhalten, wurden die Lösungen mit den Oligonucleotiden RzLibSense und RzLibAntisense gemischt und angelagert (*annealed*). Die gelungene Anlagerung wurde auf einem 20%-Polyacrylamidgel bestätigt (Abb. 4.3).



Abb. 4.3: Anlagerung der Ribozym-*Library*

Spur 1: RzLibSense

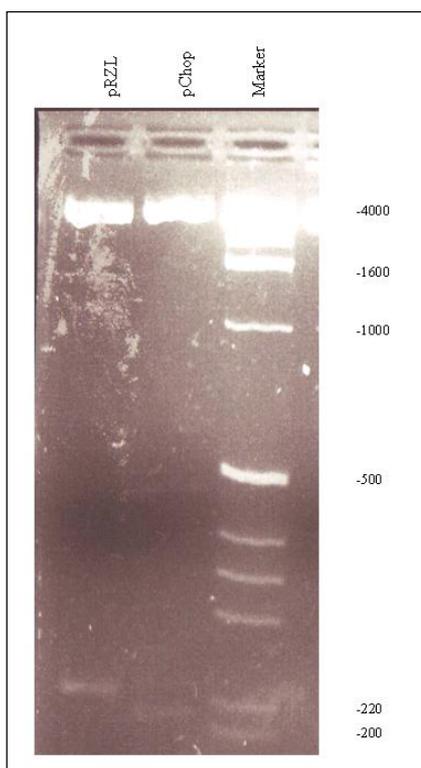
Spur 2: RzLibAntisense

Spur 3: RzLibSense und RzLibAntisense annealed und einzeln

Spur 4: Marker

4.1.3.3 Subklonierung des *Random*-Ribozym-Insert

Von Vektor und Insert wurden mehrere Testligationen gemacht, um den effizientesten Ansatz zu finden und so eine vollständige Repräsentation aller Ribozymsequenzen zu erreichen. Die Plasmide wurden per Elektroporation in DH10 β -Bakterien eingebracht und anhand der Kolonienzahl die Effizienz der Ansätze berechnet. Schließlich wurde soviel Ligat hergestellt und transformiert, dass man mit 10^9 transformierten Klonen und somit mit einer vollständigen Repräsentation aller Ribozymvarianten in der



Library rechnen kann. Aus dem gereinigten Plasmid pRZL wurde parallel zu pChop die Sequenz der Ribozym-Kassette herausgeschnitten. In der Gelelektrophorese konnte so durch die nun 30 bp längere Bande die gelungene Subklonierung des zentralen Ribozyms gezeigt werden (Abb. 4.4). Diese ergibt sich aus Einsatz des zentralen Ribozyms (42 bp) und Herausschneiden des *Spacers* (12 bp) (Abb. 4.2).

Abb. 4.4: Kontrollverdau Plasmid pRZL mit Kontrolle pChop

4.1.4 Das bakterielle Screening-Verfahren

Für das bakterielle Screening-Verfahren wurden die Plasmide der Ribozym-Library per Elektroporation in Form eines sog. *shotgun-cloning* in die E.coli-Mutanten transformiert, die bereits das Targetplasmid pTaruPARs (E.coli-Tar) tragen. Diese Bakterien bildeten bei Anwesenheit von X-Gal und IPTG blaue Kolonien, da sie die β -Galaktosidase exprimieren. Weiße Kolonien enthalten entweder ein aktives Ribozym gegen die mRNA des uPAR-Abschnittes oder gegen die des LacZ-Abschnittes des Fusionsgens. Diese weißen Kolonien wurden selektioniert und das Ribozym kodierende Plasmid isoliert. Dieses wurde nun per Elektroporation in E.coli-Mutanten eingebracht, die das Kontrollplasmid ohne die uPAR-Sequenz tragen. Entstanden auch hier weiße Kolonien, so war das gefundene Ribozym gegen die mRNA von LacZ selbst gerichtet und konnte verworfen werden. Entstanden aber dieses Mal blaue Kolonien, so kodierte das Plasmid für ein aktives Ribozym gegen das uPAR-Gen. Das wurde zunächst dadurch überprüft, dass das Plasmid nochmals in Bakterien gebracht wurde, die das Plasmid pTaruPARs mit dem Gen des uPA-Rezeptors enthielten.

4.1.4.1 Bestimmung der optimalen Bedingungen für das *Screening* der *Library*

Die bereits mit den Plasmiden pTaruPARs bzw. pCtrl transformierten E.coli wurden kompetent für die Transformation per Elektroporation gemacht und in Glycerolstocks a 20 μ l aliquotiert. Tests ergaben, dass man bei der Elektroporation von 20 μ l bakterienhaltiger Lösung mit 10,4 ng pRZL-DNA bei 1,8kV Spannung, 25 μ F Kapazität und 200 Ω Widerstand eine optimale Dichte von ca. 15.000 Kolonien auf einer Agarplatte von \varnothing 15 cm erhielt.

Der Agar enthielt Chloramphenicol und Ampicillin, um die Bakterien auf das Vorhandensein des Target- und des RZ-Plasmides zu selektionieren, IPTG und X-Gal, um Bakterien, die die β -Galaktosidase exprimieren an ihrer Blaufärbung zu erkennen.

Es wurde festgestellt, dass die Agarplatten 48h bei 37° C im Dunkeln inkubieren müssen, damit die Kolonien deutlich blau wurden.

4.1.4.2 Durchführung des Screenings

Es wurden insgesamt 960 μl Bakterienlösung elektroporiert und auf 48 Agarplatten ausgebracht. Dabei wurden alle deutlich weißen und einige hellblaue Kolonien gepickt. Diese wurden zunächst über Nacht in einer Vorkultur unter Beigabe der Antibiotika angezüchtet und davon je 2 μl auf Testplatten aufgetropft, die ebenfalls Chloramphenicol, Ampicillin, IPTG und X-Gal enthielten. So entstanden insgesamt 2206 größere, isolierte Kolonien, die sich besser auf ihre Färbung untersuchen und mit den ebenfalls aufgeimpften Blaukontrollen vergleichen ließen. Hierbei wurden 23 Kolonien als weiß eingestuft, da sie deutlich heller als die blauen Negativkontrollen waren (Beispiel s. Abb. 4.5).

Von den Bakterien dieser Kolonien wurden Glycerolstocks angelegt und das Plasmid isoliert, das das Gen des Ribozyms trägt (z.B. pRZL-#1857 und pRZL-#1917).

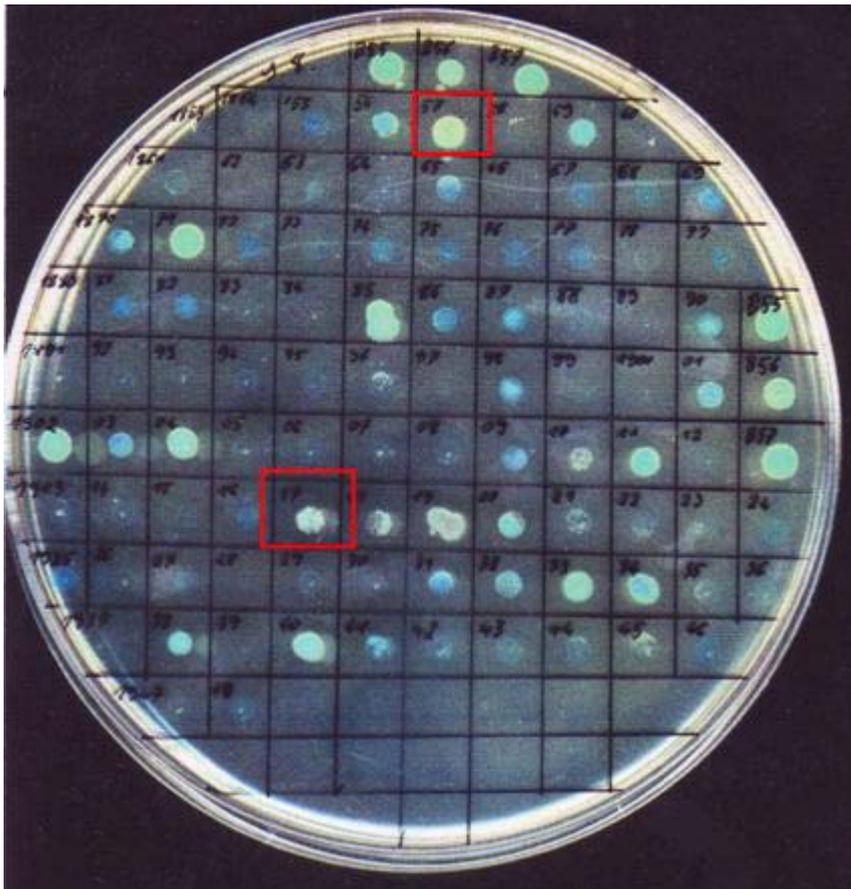


Abb. 4.5: Beispiel einer Agar-Platte mit Tropfkolonien, hier mit den weißen Kolonien #1857 und #1917

Die isolierten Ribozym-Plasmide wurden in gleicher Menge und unter gleichen Bedingungen wie zuvor die Plasmide der Library in E.coli elektroporiert, die das

Kontrollplasmid pCtrl ohne uPAR tragen. Diese Bakterien bildeten auf den Testplatten deutlich blaue Kolonien, die dieselbe Intensität hatten wie die blauen Negativkontrollen. Dies sprach dafür, dass die Ribozyme nicht gegen die mRNA der β -Galaktosidase gerichtet waren.

4.1.4.3 Kontrollen der gefundenen Ribozyme *in vivo*

Die Ribozym-Plasmide (pRZL) wurden unter denselben Bedingungen erneut in *E. coli* elektroporiert, die das Targetplasmid trugen (*E. coli*-Tar). Dieses Mal wurden aber alle Kolonien deutlich blau und waren nicht von den Blaukontrollen zu unterscheiden.

Da die ursprünglich gepickten Bakterien zwar jedes Mal weiße Kolonien bildeten, wenn sie auf die Testplatten aufgebracht wurden, sich der Effekt aber nicht mit demselben Ribozymplasmid in anderen Bakterien, die auch das Targetplasmid enthalten reproduzieren ließ, sollte *in vitro* geprüft werden, ob die isolierten Ribozyme eine Aktivität gegen die mRNA von uPAR zeigen.

4.1.4.4 Überprüfung der im Screening gefundenen Ribozyme *in vitro*

Um die mRNA des uPA-Rezeptors *in vitro* transkribieren zu können, wurde das Gen des uPAR in die Multicloningsite des Plasmids pcDNA3.1(+) subkloniert, das den Promotor für die T7-Polymerase enthält.

Das Target wurde durch die T7- Polymerase *in vitro* in Anwesenheit von ^{32}P - αUTP transkribiert, so dass radioaktiv markierte RNA entstand. Ebenso wurde der RNA-Century-Marker mit der T7-Polymerase transkribiert und die RNA mit ^{32}P markiert.

Die beiden Ribozymplasmide pRZL-#168 und pRZL-#1355, die im bakteriellen Screening aus Kolonien isoliert wurden, die deutlich weiß waren, wurden mit der Sp6-Polymerase transkribiert, aber nicht radioaktiv markiert.

Die beiden Ribozym-RNA wurden jeweils für 0 und 6 Stunden in Cleavage-Buffer mit der uPAR-RNA inkubiert. Die Spaltprodukte wurden anschließend mit dem transkribierten Marker auf einem 5%-Polyakrylamidgel aufgetrennt. Der Autoradiographiefilm zeigte nach Exposition nur die intakten Banden der uPAR-RNA. Die Banden nach 6 Stunden Spaltung waren den Banden der 0-Stunden-Negativkontrolle identisch. Es waren keine Banden von Spaltprodukten zu sehen (s. Abb. 4.6)

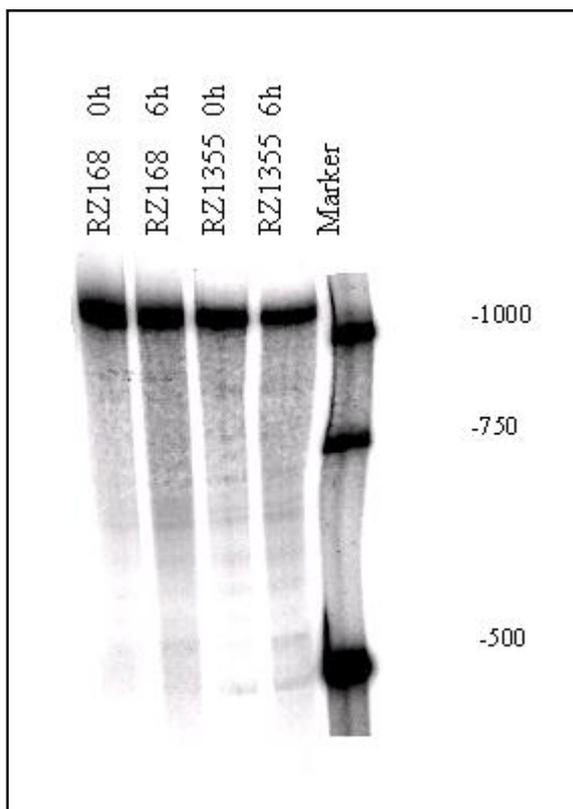


Abb. 4.6: Autoradiographiefilm zeigt keine Spaltprodukte nach 6 Stunden.

4.2 Konstruktion eines Ribozyms gegen uPAR, dessen Bindungsstelle *in vitro* bestimmt wurde

4.2.1 Bestimmung der möglichen Bindungsstellen eines Ribozyms gegen uPAR

Von Dr. Elena Rojo wurden nach der Selex-Methode (Selective Evolution of Ligands by EXponential enrichment) (Tuerk *et al.*, 1990) aus einer Random-Library von Oligonucleotiden durch mehrere Zyklen von Hybridisierung mit der mRNA des uPAR-Rezeptors und Vervielfältigung durch RT-PCR und Transcription die Oligonucleotide herausgefiltert, die in der Lage sind an die unter *in-vitro*-Bedingungen gefaltete mRNA zu binden. Durch Sequenzierung der vervielfältigten Oligonucleotide wurde die Sequenz und damit die Position dieser zugänglichen Abschnitte in der mRNA

bestimmt. Davon kamen vier *hotspots* in Betracht. Sie lagen an den Positionen 367, 943, 957 and 1025 (gerechnet in Basen ab dem Startcodon).

Es wurden vier Ribozyme konstruiert, die alle den *hammerhead* als katalytisches Zentrum beinhalten und als Bindungssequenzen die Sequenzen, die diese vier *hotspots* flankieren. Das Bindungsverhalten und die intramolekulare Faltung der Ribozyme wurden am Computer simuliert. Hierfür wurden die Programme Mfold (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) und RNAPlotFold (Zuker und Steigler, 1981) verwendet (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Prüfung des Ribozyms RZ-957 gegen die mRNA von uPAR *in vitro*

Es wurde das Ribozym RZ-957 unter den vier Ribozymen ausgewählt, da es nicht nur alle Bedingungen für eine mögliche Spaltung der mRNA von uPAR erfüllt, sondern das Nucleotid 957 außerhalb des Bereiches liegt, der für den löslichen uPA-Rezeptor suPAR kodiert (Krüger *et al*, 2000). Sollte es gelingen, mit Hilfe von RZ-957 die Expression von uPAR *in vivo* zu reduzieren, könnte man das Ribozym eventuell in Kombination mit dem löslichen uPA-Rezeptor suPAR einsetzen.

4.2.2.1 Konstruktion des Plasmides pChop-957 für *in vitro*-Transcription

Das für das Ribozym 957 kodierende Insert wurde wie die Ribozym-*Library* in Kap. 4.1.3.3. in die Tripel-Ribozym-Kassette des Expressionsvektors pChop zwischen die flankierenden cis-Ribozyme subkloniert. Für die Konstruktion des Inserts wurden die Oligonukleotide RZ957Sense (S) und RZ957Antisense (AS) verwendet:

S: GATCCCAGGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAATGGTGAGAACCG
GATGCCTGGCATCCGGTTG – 3'

AS: TTAAGTTGGCCTACGGTCCGTAGGCCAAGAGTGGTAAAGCAGGAGT
GCC TGAGTAGTCTGGGACC – 3'

Die unterstrichenen Sequenzen entsprechen den Enden nach einem Verdau mit BamHI und EcoR I.

Das neue Plasmid pChop-957 wurde per Probeverdau überprüft und die korrekte Subklonierung des Ribozyms bestätigt.

4.2.2.2 Test der *cis*-Spaltung (*self-cleavage*) durch die flankierenden Ribozyme *in vitro*

Das Plasmid pChop-957 wurde hinter der Tripel-Ribozym-Kassette mit Mlu I linearisiert. Mit der Sp6-Polymerase wurde das Ribozym-Triplett *in vitro* unter Anwesenheit von ^{32}P - αUTP transkribiert, so dass radio-aktiv markierte mRNA entstand. Ebenso wurde der RNA-Century-Marker mit der T7-Polymerase transkribiert und die RNA mit ^{32}P markiert.

Die Ribozym-RNA wurde 2 Stunden in Cleavage-Buffer inkubiert und die Spaltprodukte anschließend mit dem transkribierten Marker auf einem 5%- Polyakrylamidgel aufgetrennt. Der Autoradiographiefilm zeigte nach Exposition die mRNA der gesamten Ribozym-Kassette ab Transcriptionsbeginn (263 Basen) und die Banden der größeren Spaltprodukte (188 bzw. 159 Basen) bei einer *cis*-Spaltung. Das sind Fragmente mit 188 Basen von Transcriptionsbeginn bis zur 3'-*cis*-Schnittstelle und 159 Basen von der 5'-*cis*-Schnittstelle bis zum Transcriptionsende an der Mlu I-Schnittstelle. Außerdem die Banden bei 104, 84 und 75 Basen, die bei kompletter *self-cleavage*-Reaktion entstehen (Abb. 4.5). Das heißt, dass unter diesen Bedingungen durch beide *cis*-Ribozyme Spaltung stattfand, und so das zentrale RZ-957 aus der RNA freigesetzt werden kann (Abb. 4.7).

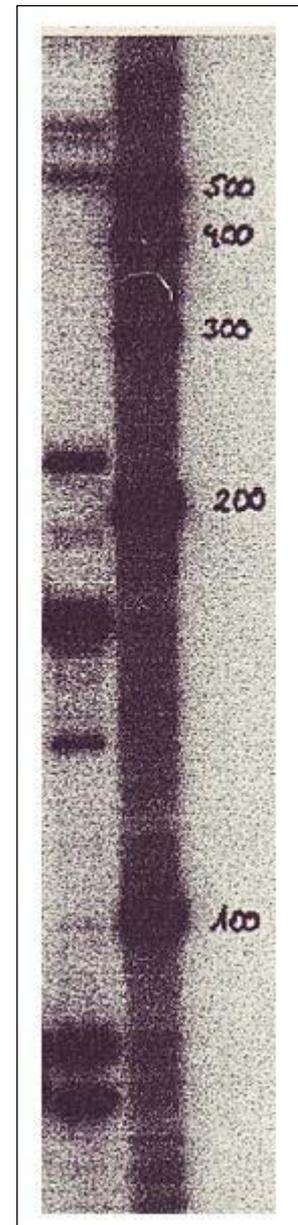


Abb. 4.7: Spaltprodukte der *self-cleavage* von RZ-957

4.2.2.3 Test des RZ-957 *in vitro* gegen die mRNA von uPAR

Das Ribozym RZ-957 wurde wie in Kap. 4.2.2.2 transkribiert, aber nicht radioaktiv markiert. Das Plasmid pcDNA3.1-uPAR wurde hinter uPAR linearisiert. Die mRNA von uPAR wurde mit der T7-Polymerase unter Anwesenheit von ^{32}P - αUTP transkribiert. Das Ribozym und die Ziel-mRNA wurden gemeinsam für 2 Stunden

inkubiert. Hierbei lag das Ribozym in einem molaren Überschuss von 50:1 vor. Der Ansatz wurde vollständig auf ein 5%-Polyakrylamidgel aufgetragen. Der dem Gel exponierte Autoradiographiefilm zeigte drei Banden, die der ungeschnittenen mRNA von uPAR und den beiden Spaltprodukten entsprachen.

Um eine Kinetik der Spaltung zu zeigen wurde unter denselben Bedingungen das Target mit dem Ribozym in mehreren Ansätzen für 0h, 1h, 2h, 4h, und 6h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Target ohne Ribozym für 0 und 6 Stunden inkubiert. Um auszuschließen, dass die Spaltung eine Trans-Spaltung durch die flankierenden Ribozyme der Tripel-Ribozym-Kassette sind, wurde das Target in zwei weiteren Ansätzen mit zwei anderen Tripel-Ribozym-RNA über 0 und 6 Stunden inkubiert, die ein anderes zentrales Ribozym enthalten, aber die gleichen flankierenden Ribozyme. Der Autoradiographiefilm zeigte, dass in der Kinetik die Menge der Ziel-mRNA über 6 Stunden streng monoton abnahm, und die Menge der Spaltprodukte in gleichem Maße zunahm. Alle 6 Negativkontrollen zeigten keine Spaltprodukte (s. Abb. 4.8). Das heißt, dass das Ribozym RZ-957 *in vitro* die mRNA von uPAR sequenzspezifisch schnitt.

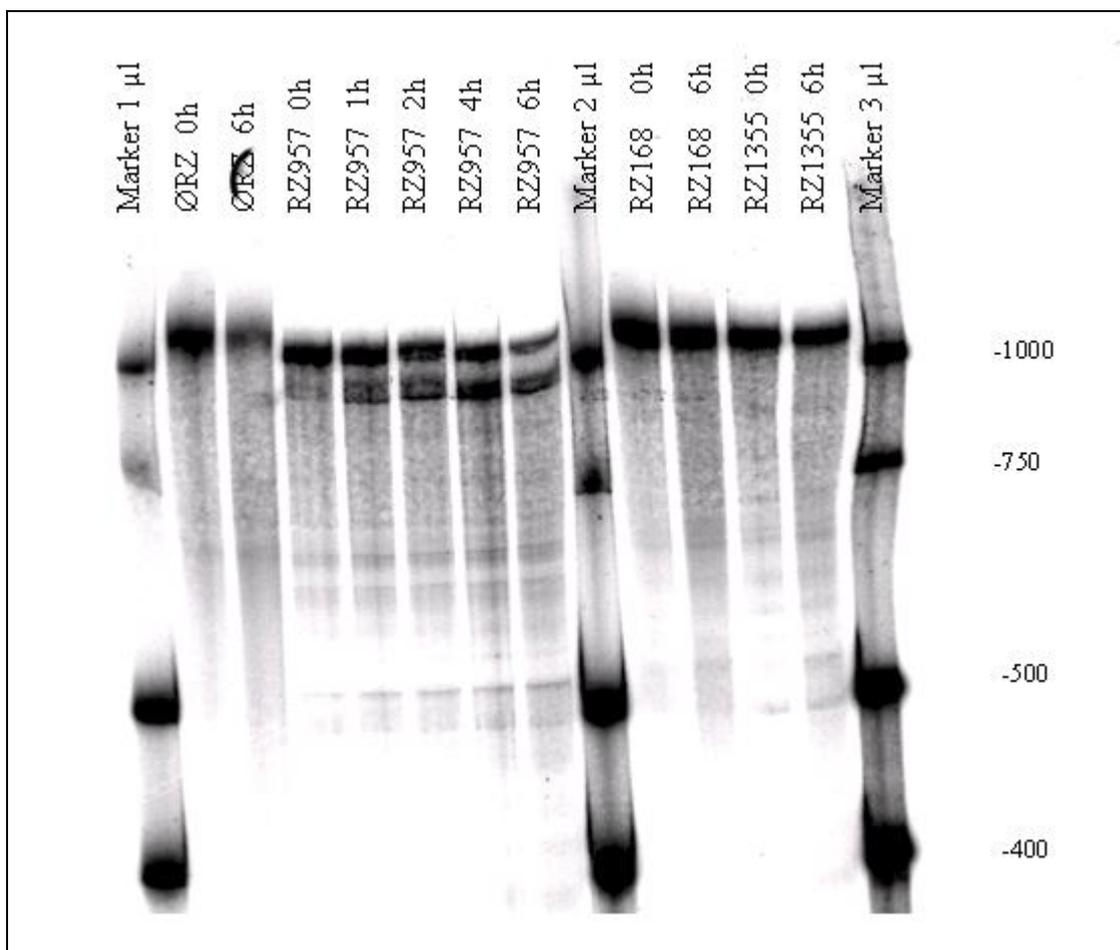


Abb. 4.8: Kinetik der Spaltung von uPAR mit RZ-957, RZ-168 und RZ-1355

4.3 Prüfung der Aktivität des Ribozyms RZ-957 *in vivo* in Zellkultur

Für alle hier gezeigten Experimente *in vivo* wurden NIH 3T3 und COS 7-Zellen verwendet, da sie nach eigenen Daten im ELISA keine endogene Expression des uPA-Rezeptors zeigen, die mit dem transfizierten uPAR-Konstrukt um das Ribozym konkurrieren könnte. Ein weiterer Vorteil der COS 7 Zellen ist, dass transient transfizierte Plasmide, die den SV40-origin-of-replication enthalten, in ihnen repliziert werden können, weil sie das SV40 TAG stabil exprimieren und somit in höherer Zahl vorliegen.

4.3.1 Konstruktion der eukaryotischen Plasmide für die Zellkultur

Es wurde die Aktivität des Ribozyms nach einer Methode getestet, die das gleiche Prinzip beinhaltet wie bereits das bakterielle Screeningverfahren. In einem Targetplasmid wurden uPAR und ein Markergen so hintereinander kloniert, dass sie auf eine mRNA transkribiert wurden. Eine Spaltung der mRNA durch das Ribozym führt auch zu einer Reduktion der Expression des Markergens Luciferase, was sich quantitativ messen lässt.

4.3.1.1 Konstruktion des Targetplasmides peuTaruPAR

Das uPAR-Gen wurde per PCR aus dem Plasmid pBSM13-uPAR herauskopiert und so in das Plasmid pGL3 control vector vor das Luciferasegen subkloniert, dass das Leseraster erhalten blieb. Das uPAR-Luc-Konstrukt wurde in die Multicloningsite des Plasmides pcDNA3.1/hygro(+) subkloniert. So wird die Transcription des Konstruktes über den CMV-Promotor reguliert. Der Kontrollverdau zeigt die erwarteten Fragmente von 2,6 und 5,6 kbp.

4.3.1.2 Konstruktion eines Plasmides, das in eukaryotischen Zellen das Ribozym RZ-957 transkribiert

Es wurde die vollständige Tripel-Ribozym-Kassette aus dem Plasmid pChop-957 herausgeschnitten und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) eingefügt.

kloniert. Das neu konstruierte Plasmid *peuRZ957* wurde linearisiert und zeigt dadurch den Einbau der Ribozym-Kassette.

4.3.2 Bestimmung optimaler Bedingungen für die transiente Transfektion von NIH 3T3- und von COS 7-Zellen

Die Zellreihen NIH 3T3 und Cos7 wurden transient mit den Plasmiden *peuTaruPAR* bzw. *pLZ12* transfiziert. Dabei erlaubte die Transfektion von *peuTaruPAR* über einen Luciferase-Assay Aussagen über die Stärke der Expression und damit die Effektivität der Transfektion zu machen. Da das Plasmid *pLZ12* für die β -Galaktosidase kodiert, konnte analog hier die Transfektion anhand ihrer Blaufärbung durch Zugabe von X-Gal bewertet werden. Bei diesen Testtransfektionen wurde zunächst immer dieselbe Zahl von Zellen ausgesät. Es wurden die Transfektionsmediatoren Lipofectamin® und Fugene® in mehreren Konzentrationen unter Zugabe unterschiedlicher DNA-Mengen getestet. Dabei zeigte sich, dass für beide Zellreihen Fugene® in allen Ansätzen effizienter ist als Lipofectamin®. Für beide Zellreihen wurde bei Verwendung von 3 μ l Fugene® und 2 μ g DNA bei ansonsten gegebenen Transfektionsbedingungen die höchste Luciferase-Aktivität gemessen (s. Abb. 4.9). Die X-Gal-Färbung der mit *pLZ12* transfizierten Zellen bestätigte dies.

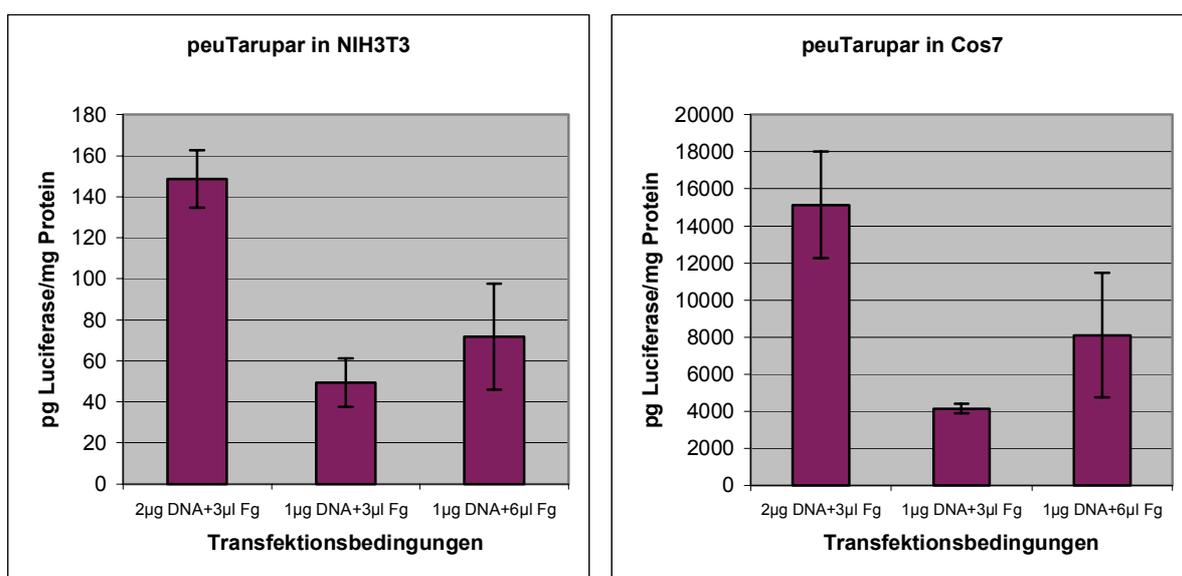


Abb. 4.9: Expression von Luciferase nach Transfektion von *peuTaruPAR*

4.3.3 Stabile Transfektion des uPAR-Luciferase-Fusionsgenes in NIH 3T3- und COS 7-Zellen

Um in Eukaryoten die Aktivität eines Ribozyms gegen die mRNA von uPAR quantitativ bestimmen zu können, sollte das für das Fusionsprotein uPAR-Luciferase kodierende Plasmid *peuTaruPAR* stabil in diese beiden Zelllinien transfiziert werden. So kann die Menge des translatierten Fusionsgens bzw. dessen Reduktion anhand der messbaren Luciferase-Aktivität in diesen Zellen bestimmt werden.

4.3.3.1 Stabile Transfektion des uPAR-Luciferase-Fusionsgenes in NIH 3T3-Zellen

NIH 3T3-Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin® mit dem Plasmid *peuTaruPAR* transfiziert. Die Zellen wurden unter Hygromycin selektioniert und 22 Klone von hygromycinresistenten Zellen gepickt. Es wurde die Expression des Zielgens aller Klone im Luciferase-Assay gemessen. Der Klon Nr. 20 zeigte die stärkste Expression, der Klon Nr. 22 ist einer derer, die eine mittlere Expression zeigten. (Daten nicht gezeigt.) Diese beiden Klone wurden als die neuen Zellreihen NIH-uPAR/Luc-C20 und NIH-uPAR/Luc-C22 etabliert.

4.3.3.2 Stabile Transfektion des uPAR-Luciferase-Fusionsgenes in COS 7-Zellen

Nach demselben Muster wurden Cos7-Zellen mit dem Plasmid *peuTaruPAR* transfiziert und unter Hygromycin selektioniert. Es wurden 6 Klone gepickt und ihre Expression im Luciferase-Assay gemessen. Die Klone Nr. 1, 3 und 6 exprimierten das Konstrukt unterschiedlich stark (Daten nicht gezeigt.) und wurden als die neuen Zellreihen Cos7-uPAR/Luc-C1, Cos7-uPAR/Luc-C3 und Cos7-uPAR/Luc-C6 etabliert.

4.3.4 Transiente Transfektion des Ribozyms RZ-957 in stabil mit uPAR-Luc transfizierte Zellreihen

4.3.4.1 Transiente Transfektion von RZ-957 in NIH-uPAR/Luc-C20 und –C22

Das Plasmid *peuRZ957* wurde nach den erprobten Bedingungen (s. Kap. 4.3.2) transient in die Zellreihen NIH-uPAR/Luc-C20 und –C22 transfiziert. Als Kontrolle wurde das Plasmid *pcDNA3.1/Zeo* unter den gleichen Bedingungen transfiziert. Dieses Plasmid bildet das Grundgerüst für das Plasmid *peuRZ957*, enthält aber nicht die Trippel- Ribozym-Kassette. Die vier Transfektionen wurden jeweils parallel in sechs getrennten Ansätzen durchgeführt. Zwei Tage nach Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität aller 24 Transfektionen gemessen.

Es zeigte sich, dass die Zellen der Reihe NIH-uPAR/Luc-C20, die mit dem Ribozym transfiziert wurden, nur 59% der Luciferase-Aktivität der Kontrollzellen aufweisen. In der Zellreihe NIH-uPAR/Luc-C22 betrug die Aktivität der mit dem Ribozym transfizierten Zellen nur 60% gegenüber der Kontrolle (s. Abb. 4.10).

Die absolut gemessenen Werte für Luciferase zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen *peuTaruPAR* und dem Kontrollplasmid, bezogen auf die Gesamtmenge an Protein zeigte sich für den Klon C20 noch immer ein deutlich signifikanter Unterschied, für Klon C22 war der Unterschied noch deutlich, jedoch nicht mehr signifikant (s. Tab. 4.1a und b).

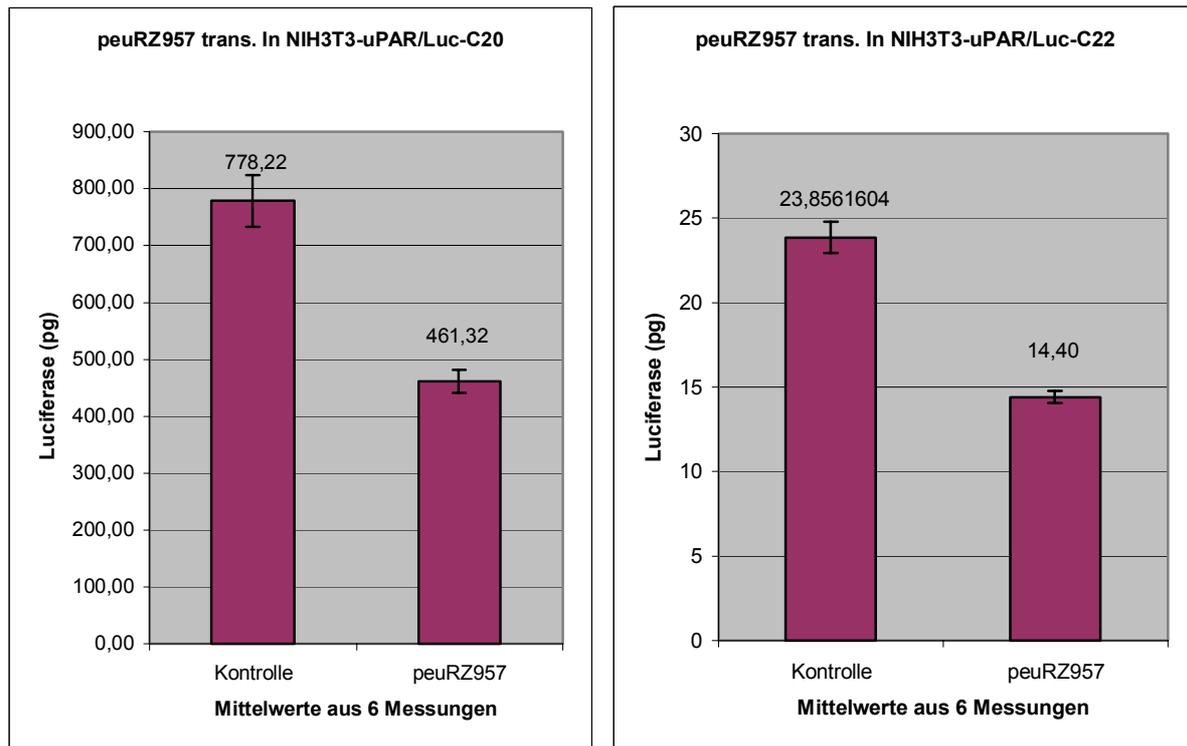


Abb. 4.10: Expression von Luciferase nach Transfektion von peuRZ957 bzw. des Kontrollplasmids

| pg Luciferase im gemessenen Zellextrakt | | | | |
|---|---------------------|------------|---------------------|------------|
| Klon | NIH3T3-uPAR/Luc-c20 | | NIH3T3-uPAR/Luc-c22 | |
| Transfektion | Kontrolle | peuRZ957 | Kontrolle | peuRZ957 |
| Ansatz 1 | 715,493976 | 447,052548 | 23,5490796 | 13,9295774 |
| Ansatz 2 | 753,794689 | 470,678915 | 24,2976999 | 14,7652115 |
| Ansatz 3 | 791,541091 | 434,989069 | 24,0805431 | 14,0082339 |
| Ansatz 4 | 771,282356 | 484,026335 | 24,017264 | 14,3124093 |
| Ansatz 5 | 851,447869 | 480,699549 | 25,1373876 | 14,8743756 |
| Ansatz 6 | 785,768316 | 450,449467 | 22,0549885 | 14,5370327 |
| Mittelwert | 778,221383 | 461,31598 | 23,8561604 | 14,4044734 |
| Standardabw. | 41,1825816 | 18,2290078 | 0,93553204 | 0,35579014 |
| Signifikanz | | 0,002 | | 0,002 |

Tab. 4.1a: Absolutwerte von Luciferase

| pg Luciferase/mg Protein im gemessenen Zellextrakt | | | | |
|--|---------------------|------------|---------------------|------------|
| Klon | NIH3T3-uPAR/Luc-c20 | | NIH3T3-uPAR/Luc-c22 | |
| Transfektion | Kontrolle | peuRZ957 | Kontrolle | peuRZ957 |
| Ansatz 1 | 676,692015 | 495,455909 | 27,7159554 | 22,7454259 |
| Ansatz 2 | 744,77506 | 504,530433 | 33,9434789 | 21,5564204 |
| Ansatz 3 | 839,24925 | 447,47015 | 31,4168121 | 33,5253591 |
| Ansatz 4 | 764,284309 | 723,36576 | 45,816628 | 20,0499525 |
| Ansatz 5 | 847,519707 | 571,943691 | 27,0549586 | 27,181725 |
| Ansatz 6 | 788,294402 | 605,868099 | 29,9638246 | 31,9944122 |
| Mittelwert | 776,802457 | 558,105674 | 32,6519429 | 26,1755492 |
| Standardabw. | 58,0763219 | 90,2026928 | 6,31689181 | 5,15616611 |
| Signifikanz | | 0,004 | | 0,180 |

Tab. 4.1b: Werte von Luciferase bezogen auf Gesamtprotein

4.3.4.2 Transiente Transfektion von RZ-957 in Cos7-uPAR/Luc-C1, -C3 und -C6

Das Plasmid *peuRZ957* und das Kontrollplasmid wurden wie in Kap. 4.3.4.1 transient in die Zellreihen Cos7-uPAR/Luc-C1, -C3 und -C6 transfiziert. Nach 2 Tagen wurde die Luciferase-Aktivität aller 36 Transfektionsansätze gemessen, wobei bei Klon C1 vier der 12 Messungen technisch nicht ausgewertet werden konnten.

Es zeigt sich, dass die unter Anwesenheit des Ribozyms gemessene Luciferase-Aktivität in Cos7-uPAR/Luc-C1 nur 49,1% der Kontrolle beträgt, in Cos7-uPAR/Luc-C3 nur 15,8% und in Cos7-uPAR/Luc-C6 nur 34,9% der Kontrolle (s. Abb. 4.11).

In Klon C6 war der Unterschied trotz einer Reduktion der Expression 65,1% nicht signifikant. (s. Tab. 4.2a und b). Dieser Klon zeigt die geringste Hintergrund-Expression des uPAR-Luciferase-Fusionsgens.

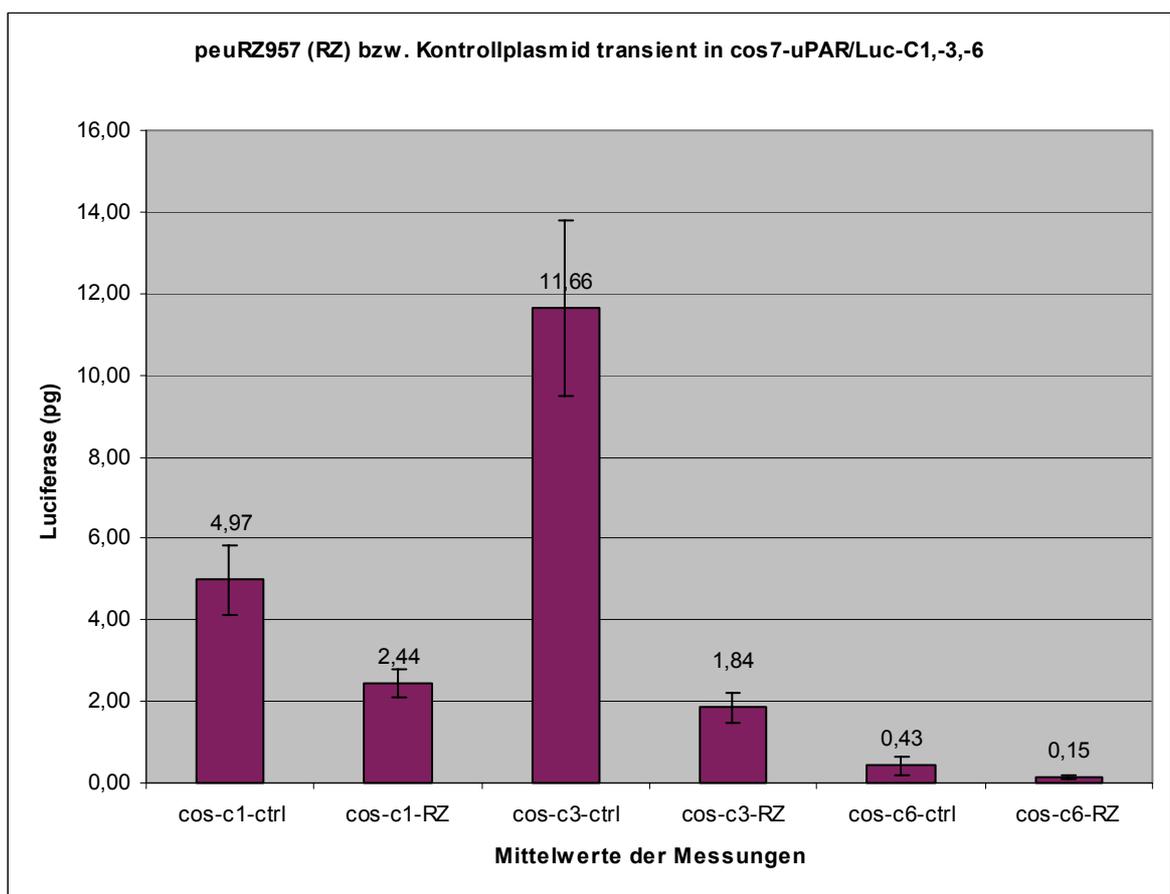


Abb. 4.11: Expression von Luciferase nach Transfektion von *peuRZ957* bzw. des Kontrollplasmids

| pg Luciferase im gemessenen Zellextrakt | | | | | | |
|---|------------------|------------|------------------|------------|------------------|------------|
| Klon | Cos7-uPAR/Luc-c1 | | Cos7-uPAR/Luc-c3 | | Cos7-uPAR/Luc-c6 | |
| Transfektion | Kontrolle | peuRZ957 | Kontrolle | peuRZ957 | Kontrolle | peuRZ957 |
| Ansatz 1 | 6,3000107 | 1,96663043 | 10,59034306 | 2,25594716 | 0,09023135 | 0,08838311 |
| Ansatz 2 | 5,49663966 | 2,74534928 | 12,31902056 | 1,78297114 | 0,19901482 | 0,13647625 |
| Ansatz 3 | 4,58058614 | 2,60327107 | 8,25302691 | 1,17145863 | 0,5077115 | 0,1071774 |
| Ansatz 4 | 3,82669635 | | 10,38740812 | 1,96930738 | 0,72640791 | 0,12769122 |
| Ansatz 5 | 4,62994696 | | 14,05375333 | 2,20063188 | 0,45976438 | 0,18601225 |
| Ansatz 6 | | | 14,36045459 | 1,68825955 | 0,58961693 | 0,24840369 |
| Mittelwert | 4,96677596 | 2,43841693 | 11,66066776 | 1,84476262 | 0,42879115 | 0,14902399 |
| Standardabw. | 0,85095808 | 0,33860836 | 2,153599202 | 0,36351908 | 0,21948741 | 0,05367408 |
| Signifikanz | | 0,036 | | 0,002 | | 0,065 |

| pg Luciferase/mg Protein im gemessenen Zellextrakt | | | | | | |
|--|------------------|------------|------------------|------------|------------------|------------|
| Klon | Cos7-uPAR/Luc-c1 | | Cos7-uPAR/Luc-c3 | | Cos7-uPAR/Luc-c6 | |
| Transfektion | Kontrolle | peuRZ957 | Kontrolle | peuRZ957 | Kontrolle | peuRZ957 |
| Ansatz 1 | 6,54886803 | 2,08694769 | 15,68780164 | 7,27965281 | 0,74850535 | 1,02404324 |
| Ansatz 2 | 5,73296336 | 2,91207473 | 17,48717141 | 5,32363879 | 1,68432789 | 1,68088025 |
| Ansatz 3 | 4,76651572 | 2,8099428 | 12,66549525 | 4,77365119 | 4,65776359 | 1,19063022 |
| Ansatz 4 | 3,9047264 | | 14,97688324 | 3,04954295 | 5,57492366 | 1,59029881 |
| Ansatz 5 | 4,74994676 | | 19,56693648 | 7,2141063 | 3,84964896 | 2,16230643 |
| Ansatz 6 | | | 20,87098552 | 6,55560138 | 4,86846405 | 2,64668493 |
| Mittelwert | 5,14060406 | 2,6029884 | 16,87587892 | 5,69936557 | 3,56393892 | 1,71580731 |
| Standardabw. | 0,91148733 | 0,36727034 | 2,778530455 | 1,50247377 | 1,75516058 | 0,55335573 |
| Signifikanz | | 0,036 | | 0,002 | | 0,132 |

Tab. 4.2a und b: Expression von Luciferase nach Transfektion von peuRZ957 bzw. des Kontrollplasmids absolut und bezogen auf die Proteinmenge

4.4 Test des bakteriellen Screenings mit RZ-957 als positiver Kontrolle

Nachdem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen wurde, dass das Ribozym RZ-957 die mRNA von uPAR spaltet, bestand nun die Möglichkeit dieses Ribozym als Positivkontrolle für das bakterielle Screening zu verwenden.

Wie in Kap. 4.1.4.3 wurde als Positivkontrolle das Ribozymplasmid pChop-957 in E.coli-Mutanten per Elektroporation transformiert, die bereits das Targetplasmid pTaruPARs (E.coli-Tar) bzw. das Kontrollplasmid pCtrl (E.coli-Ctrl) enthalten. Zum Vergleich wurden ebenso die falsch-positiven Plasmide pRZL-#168 (aus zwei Ansätzen) und pRZL-#1355 elektroporiert. Diese beiden Plasmide waren beim Screenen der Ribozym-Library aus weißen (positiven Kolonien) extrahiert worden.

Als Negativkontrolle diente das Plasmid pChop, das eine ‚leere‘ Tripel-Ribozym-Kassette enthält.

Zum weiteren Vergleich wurden neben den so transformierten Bakterien als weitere Negativkontrollen Bakterien der Kolonien B14, B15 und 746 aufgetragen. Diese waren im Rahmen des bakteriellen Screenings (s. Kap. 4.1.4.2) als Beispiele für blaue Kolonien selektioniert worden.

Die transformierten Bakterien wurden auf eine Testplatte aufgebracht, die Ampicillin, Chloramphenicol, X-Gal, und IPTG enthält. Alle acht Kolonien zeigten in zwei Verdünnungsstufen (1:1 und 1:100) über zwei Tage Inkubationszeit hinweg stets die gleiche Blaufärbung wie die Negativkontrollen (s. Abb. 4.12).

Das heißt, dass auch das Ribozym RZ-957, dessen Aktivität *in vivo* und *in vitro* belegt ist, in diesem System nicht in der Lage war, die Expression des uPAR-LacZ-Fusionsgens sichtbar zu unterdrücken.

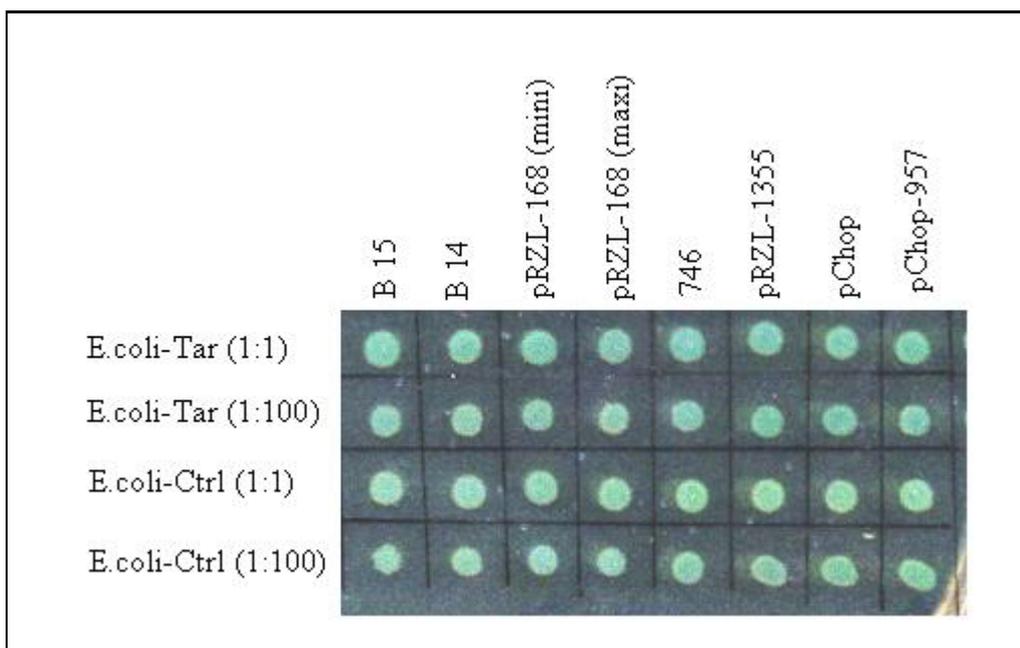


Abb. 4.12: Kolonien auf Testplatte nach 48h Inkubationszeit

5 Diskussion

5.1 Screening einer Ribozym-Library in transfizierten Bakterien

Um ein möglichst sensitives bakterielles Screening für die Funktion eines Ribozyms zu generieren, sollte der mRNA des Fusionsgens uPAR-LacZ *in vivo* ein möglichst großer Überschuss an Ribozymen gegenüberstehen. In der Literatur findet man z.T. Angaben, die einen 100-1000 fachen Überschuss empfehlen (Lieber und Strauss, 1995; Wang und Dolnick, 1993). Deshalb wurde als Vektor für das *Target* das *Low-copy*-Plasmid pACYC184 und für die Ribozym-*Library* das *High-copy*-Plasmid pCR II gewählt. Um die Zugänglichkeit der Ziel-mRNA für das Ribozym weiter zu erhöhen, wurden E.coli Bakterien ausgewählt, deren Ribosomen aufgrund einer Mutation die mRNA besonders langsam translatieren (Chen et al., 1997). Die Rationale hierfür war, die Erreichbarkeit der mRNA für die Ribozyme zu erhöhen und damit die Bedingungen des bakteriellen Modells an die Situation in Eukaryoten anzupassen. In Eukaryoten findet die Transcription im Zellkern und die Translation im Zytoplasma statt. Durch diese räumliche Trennung haben Ribozyme die Gelegenheit an die mRNA zu binden und diese zu spalten bevor sie von den Ribosomen translatiert wird. In Prokaryoten finden Transcription und Translation fast zeitgleich im Zytoplasma statt. Noch während die mRNA transkribiert wird, können bereits mehrere Ribosomen an die mRNA binden und diese translatieren, so dass diese für das Ribozym nicht, oder zu spät, zugänglich ist. Durch die Mutation haben die Ribosomen eine geringere Translationsgeschwindigkeit als der Wildtyp. Sie bleiben dadurch hinter der transkribierenden Polymerase zurück, und dieser physikalisch größere Abstand zueinander auf dem mRNA-Strang erhöht die Wahrscheinlichkeit eines Ribozyms vor Translation an die mRNA zu binden. Dadurch entspricht die Situation in den gewählten Bakterienstämmen eher als bei E.coli des Wildtyps der Situation in Eukaryoten.

Alle verwendeten Agar-Platten enthielten Ampicillin und Chloramphenicol. So wurde sichergestellt, dass nur Bakterien wachsen können, die sowohl das Plasmid mit dem Fusionsgen als auch das Plasmid mit dem Ribozym enthalten. Außerdem enthielten die Platten sowohl IPTG, das über den Lac-Promoter die Expression des Fusionsgens uPAR-LacZ induziert, als auch XGal als Farbsubstrat für die Galaktosidase. So konnte anhand der Blaufärbung der Bakterien mit Ziel- und Kontrollplasmiden gegenüber der weißen Farbe von Bakterien mit unvollständigen Plasmiden das Funktionieren des

Test-Systems gezeigt werden. Anhand von Kontrollverdauen und Gelelektrophoresen wurde gezeigt, dass die Ribozym-Library korrekt konstruiert wurde (Abb. 4.3 und 4.4).

Es wurde eine große Zahl von transfizierten Kolonien gescreent und dabei aufgrund ihrer deutlich weißen Farbe mehr als 2000 ausgewählt, die möglicherweise ein aktives Ribozym enthalten. In einem ersten Kontrollschritt wurden diese erneut über Nacht angezüchtet und auf identische Platten aufgebracht, wobei nur 23 erneut eine deutlich weiße Farbe zeigten (Abb. 4.5). Warum aufgrund dieser Kontrolle fast 99% als falsch positiv eingestuft werden mussten ist unklar. Ein Verlust des Ribozym-Plasmids sollte ausgeschlossen sein, da allen Kulturmedien immer Ampicillin beigemischt wurde. Kolonien, die das Plasmid mit dem uPAR-LacZ Fusionsgen verloren haben und dadurch weiß wurden, hätten aufgrund des Chloramphenicols zumindest in der Über-Nacht-Kultur nicht mehr wachsen können. Eine einfachere Erklärung wäre, dass die Kolonien aufgrund der geringen Größe optisch falsch eingeschätzt wurden, was sich dann bei den deutlich größeren Kontrollen leicht bemerkbar machte. Des Weiteren bestand die Überlegung, dass ein aktives Ribozym die Translation des Fusionsgens nicht vollständig unterdrückt, aber deutlich reduziert. So wäre es möglich, dass auf der Testplatte mit hoher Koloniendichte und begrenzter Inkubationszeit aufgrund der reduzierten Expression von Galaktosidase eine weiße Kolonie entsteht, während dieselben Bakterien unter günstigeren Wachstumsbedingungen aufgrund des wirksamen Ribozyms auch eine reduzierte Expression von Galaktosidase haben, sich aber genug von dem stabilen Protein akkumuliert, um die Bakterien so blau zu färben, dass sie sich nicht mehr von der Blaukontrolle unterscheiden lassen. Um das zu untersuchen wurden aufwendige Messungen durchgeführt, bei denen die zu untersuchenden Bakterien und ihre Kontrollen in flüssigem Medium, bei optimaler Wachstumsphase und gleicher optischer Dichte gemessen wurden (Daten nicht gezeigt). Es konnte jedoch auch hier kein Unterschied zwischen ursprünglich als weiß selektionierten Bakterien und den Blaukontrollen gemessen werden. Außerdem müsste man so jede einzelne Kolonie einzeln anzüchten und messen, was aufgrund des Aufwandes die Idee von einem einfachen Screening-Verfahren *ad absurdum* führt.

Aus den 23 auch in den Kontrollen positiven (weißen) Bakterien wurden die Ribozym-Plasmide extrahiert und sowohl in die Kontroll-Bakterien, die nur das LacZ-Gen enthalten, als auch erneut in die Zielbakterien, die das uPAR-LacZ-Fusionsgen enthalten, eingebracht, um auszuschließen, dass ein Ribozym isoliert wurde, das gegen

das LacZ Gen gerichtet ist und dadurch die Translation des Fusionsgens unterdrückt. Alle Kolonien, sowohl der Ziel- als auch der Kontrollbakterien, zeigten die gleiche Blaufärbung, die Aktivität der selektierten Ribozyme war damit *in vivo* nicht reproduzierbar. Um unter optimalen Bedingungen eine eventuelle Aktivität nachweisen zu können, wurden einige der isolierten Ribozyme *in vitro* untersucht, wobei auch hier keine Spaltprodukte von mRNA des uPAR nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.6).

Nachdem wir sowohl *in vitro* (Abb. 4.8) als auch *in vivo* (Kap. 4.3.4) nachweisen konnten, dass RZ-957 die mRNA von uPAR katalytisch spaltet, wurde dieses als positive Kontrolle für das Screening-Verfahren in die *Target*-Bakterien transfiziert. Auch hier zeigten sich blaue Kolonien und es konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Es gibt mehrere Gründe, warum ein Ribozym, das *in vitro* Aktivität zeigt die Translation der Ziel-mRNA in Bakterien nicht verhindern kann. Diese wurden bereits in der Einleitung genannt, da sie eben die Motivation waren ein Screening-Verfahren *in vivo* in Bakterien zu entwickeln.

Als Erklärung dafür, warum ein Ribozym, das in Zellkultur eine nachgewiesene Aktivität *in vivo* hat, diese in Bakterien verliert, kommen mehrere Gründe für sich alleine oder in Kombination in Frage: So ist es möglich, dass sich das Ribozym in Zellkultur im gleichen (Sub-) Kompartiment mit der mRNA befindet, was für die Funktion entscheidend ist (Sullenger und Cech, 1993), die beiden in Bakterien jedoch nicht in unmittelbaren Kontakt treten können. Wie bereits in der Einleitung angesprochen ist für die wirksame Suppression des Zielgens ein ausreichender molarer Überschuss des Ribozyms notwendig (Lieber und Strass, 1995; Wang und Dolnick, 1993), der möglicherweise trotz der Auswahl eines *Low-copy*-Plasmids für das Zielgen nicht ausreichend gegeben war. Der wahrscheinlichste Grund ist eine mangelnde Zugänglichkeit der Ziel-Sequenz um die Base 957 in der mRNA. Eine Ursache hierfür könnte eine andere Sekundärstruktur der mRNA von uPAR in Bakterien und in eukaryotischen Zellen sein. Eine weitere mögliche Ursache hierfür könnte das unterschiedliche Fusionsgen sein. Während RZ-957 bei dem Fusionsgen uPAR-Luc in Zellkultur effektiv war, wurde die Aktivität in Bakterien bei dem Fusionsgen uPAR-LacZ getestet. Hinzu kommt, dass bei einer mRNA von 3 kb für β -Galaktosidase und 1,6 kb für Luciferase bereits aufgrund der größeren Länge des Transcriptes von einer geringeren Zugänglichkeit der *Target-Site* auszugehen ist (Heidenreich et al., 1995). In

derselben Publikation weißt Heidenreich nach, dass im Zellkern Proteine vorhanden sind, die die Funktion von Ribozymen unterstützen können, welche im Zytoplasma von Bakterien so möglicherweise nicht vorhanden sind. Andere Proteine können durch ihr Vorhandensein in Bakterien die *Target-Site* auch maskieren, so dass sie nicht für das Ribozym zugänglich ist (Lieber und Strauss, 1995).

Im Umkehrschluss besteht so gleichermaßen die Möglichkeit, dass ein Ribozym, das im Rahmen des bakteriellen Screenings erfolgreich selektioniert wurde, ebenfalls aufgrund der aufgeführten Unterschiede zwischen Prokaryoten und Eukaryoten, in Zellkultur keine Aktivität gezeigt hätte. So kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass ein unter anderen Umständen erfolgreiches hypothetisches Selektionsverfahren in Bakterien bezüglich zeitlichem Aufwand und Kosten Vorteile bringen könnte, aber aufgrund der ungewissen Reproduzierbarkeit in Zellkultur oder gar im Tiermodell auch einen Umweg darstellt, der dem Weg über Selektion *in vitro* und direktem Transfer in Zellkultur nicht notwendigerweise überlegen ist.

5.2 Reduzierte Expression des uPAR-Luciferase-Fusionsgenes durch Transfektion von RZ-957 in Zellkultur

Parallel zum Versuch der bakteriellen Selektion eines gegen die mRNA von uPAR aktiven Ribozyms, wurde der alternative Weg der Selektion *in vitro* mit anschließender Überprüfung der Aktivität in Zellkultur versucht. Von den vier anhand der SELEX-Methode (Tuerk et al., 1990; Pan et al., 2001) als für ein Ribozym erreichbar ermittelte Bindungsstellen, wurde die therapeutisch interessanteste gewählt und nach der oben beschriebenen Methode ein Plasmid konstruiert, das das RZ-957 als zentrales Ribozym der Tripel-Ribozym-Kassette transkribiert. Dieses Plasmid sollte, wie zuvor beschrieben, *in vivo* und *in vitro* in der Lage sein, eine RNA zu kodieren, die drei Ribozyme enthält, wobei die beiden flankierenden Ribozyme das zentrale Ribozym RZ-957 aus dem RNA-Strang herauslösen. Dieses Ribozym sollte aufgrund seiner Bindungssequenzen spezifisch an die mRNA von uPAR binden und diese an der Position 957 spalten. Anschließend wurde *in vitro* sowohl die Freisetzung des zentralen Ribozyms durch *cis*-Spaltung der flankierenden Ribozyme nachgewiesen (Abb. 4.7) als auch die *trans*-Spaltung der mRNA von uPAR durch RZ-957 (Abb. 4.8).

Für die Experimente in Zellkultur wurden NIH 3T3-Zellen (embryonale Maus-fibroblasten) und COS 7-Zellen (SV40-transfizierte Nieren-Fibroblasten der Grünen Meerkatze) verwendet, da diese keine endogene uPAR-Expression haben, die mit der Ziel-mRNA um ein transfiziertes Ribozym kompetitieren könnte (Daten nicht gezeigt). Analog zur Strategie, die für das bakterielle Screening verwendet wurde, haben wir ein Targetplasmid konstruiert, in das ein uPAR-Luciferase Fusionsgen subkloniert wurde, um so die Expression des Fusionsgens bzw. dessen Reduktion durch ein aktives Ribozym anhand der Enzymaktivität der Luciferase messen zu können. Dieses Plasmid wurde zusammen mit einem Plasmid, das die β -Galaktosidase kodiert zunächst dazu verwendet, die optimalen Bedingungen für die transiente Transfektion von Plasmiden in NIH 3T3- und COS 7-Zellen zu bestimmen. Eine möglichst hohe Effektivität der Transfektion ist Voraussetzung für einen ausreichenden molaren Überschuss des Ribozyms gegenüber der Ziel-mRNA intrazellulär (Lieber und Strass, 1995; Wang und Dolnick, 1993). Um dies zu gewährleisten wurde die Tripel-Ribozym-Kassette mit dem RZ-957 in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) subkloniert, der ebenfalls den SV40ori (*Origin of Replication*) enthält, so dass nach transienter Transfektion in COS 7-Zellen durch Replikation des Plasmids eine höhere Kopienzahl in der Zelle vorliegt. So zeigten die COS 7-Zellen bei den Messungen für die Ermittlung optimaler Transfektionsbedingungen stets deutlich höhere Luciferase-Aktivität als die NIH 3T3-Zellen, was eher auf die Replikation des Targetplasmides *peuTarupar* aufgrund des SV40ori als auf eine höhere Transfektionsrate zurückzuführen ist (Abb. 4.9).

Wir haben die Zelllinien COS 7 und NIH 3T3 stabil mit dem Targetplasmid *peuTarupar* transfiziert und die Expression des uPAR-Luc Fusionsgens anhand der Luciferase-Aktivität in ca. 30 Klonen gemessen. Davon wurden fünf ausgewählt, die zum Teil eine sehr hohe und zum Teil eine mittlere Aktivität von Luciferase haben. Wir wollten keine Klone mit zu niedriger Aktivität, da es hier schwierig sein könnte eine Reduktion zu messen. Bei sehr stark exprimierenden Klonen bestand dagegen die Gefahr, dass die Aktivität des Ribozyms nicht ausreicht, um eine messbare Reduktion zu erzeugen.

Das Plasmid mit dem RZ-957 wurde in mehreren Ansätzen transient in die fünf ausgewählten Zellklone transfiziert. Hierbei lies sich eine deutlich reduzierte Luciferase-Aktivität in allen Zelllinien messen, die mit dem Ribozymplasmid transfiziert wurden, im Vergleich zu den Zellen, die transient mit dem Kontrollplasmid

ohne zentrales Ribozym transfiziert wurden. Dies spricht für eine effektive Spaltung der mRNA des Fusionsgens in Zellkultur (Kap. 4.3.4).

Dabei waren die Unterschiede zwischen Ribozym und Kontrolle bei allen Klonen außer bei Cos7-uPAR/Luc-c6 für die absolut gemessenen Luciferase-Aktivitäten signifikant ($p < 0,05$). Selbst bei Klon c1, bei dem 4 der 12 Ansätze technisch nicht messbar waren, zeigte sich trotz der wenigen Messungen eine signifikante Reduktion. Der p-Wert von 0,065 bei Klon c6 ist der einzige größer 0,05 für die absoluten Luciferase-Aktivitäten, wobei sich auch hier ein deutlicher Trend mit einer Reduktion des Mittelwertes von 0,428 auf 0,149 pg zeigt. Auffällig ist ein Ausreißer in Ansatz 1' wo die Kontrolle eine niedrigere Luciferase-Aktivität/Gesamtprotein zeigt als alle Ribozym-Ansätze und weniger als die Hälfte der Aktivität der nächst niedrigeren Kontrolle (44%). Hätten man damit diesen Wert vor Durchführung der Statistik als unplausibel eliminiert, wäre natürlich auch diese Reduktion absolut und auf Protein bezogen signifikant ($p = 0,018$ auf Gesamtprotein bezogen). Dass die Zellen in diesem Well nach Transfektion nicht gewachsen sein könnten, ist als Erklärung unwahrscheinlich, da die Gesamtproteinmenge in diesem Well der der anderen Kontrollansätze in der Messung absolut identisch ist (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt ist die relative Reduktion der Luciferase-Aktivität in allen Ansätzen aller Klone deutlicher bei der Messung der absoluten Aktivität als bei der Berechnung Luciferase (in pg) pro Gesamtprotein (in mg). So verliert der Klon NIH3T3-uPAR/Luc-c22 bei dieser Berechnung die Signifikanz ($p = 0,18$). Tatsächlich zeigen alle Ansätze für Ribozym und Kontrolle innerhalb ihrer Sechser-Gruppe fast identische Werte für das Gesamtprotein mit nur geringsten Abweichungen (Daten nicht gezeigt). Die geringeren Unterschiede bei der Berechnung der Reduktion im Bezug auf die Gesamtproteinmenge liegen daran, dass die Proteinmenge in allen Messungen in der Ribozym-Gruppe geringer ist, als in der Kontroll-Gruppe. Dies ist zumindest teilweise dadurch zu erklären, dass das RZ-957 durch die katalytische Spaltung der mRNA des Fusionsgens nicht nur die Luciferase-Aktivität reduziert, sondern diese Reduktion eben dadurch erreicht, dass dessen Translation verhindert wird und somit weniger Protein in der Zelle produziert wird. Dadurch verschiebt sich der Quotient in der sonst üblichen Berechnung der Luciferase-Aktivität zu ungunsten des Ribozyms, und es scheint in diesem Fall die absolute Menge an Luciferase aussagekräftiger für die Funktion des Ribozyms.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Ribozym RZ-957 *in vitro* und *in vivo* eine signifikante katalytische Aktivität gegen die mRNA des uPA-Rezeptors hat und dessen Expression signifikant reduzieren kann.

5.3 Ribozyme und *Antisense*-Strategien in der Tumorthherapie

Nachdem die *Antisense*-Strategie seit Jahrzehnten *in vitro* und im Tiermodell erforscht wurde, und Wege gefunden wurden um *Antisense*-Oligonucleotide und speziell Ribozyme vor Abbau durch RNasen zu schützen, sie besser im Bezug auf die Erreichbarkeit der *Target-site* und ihre katalytische Aktivität zu selektionieren und virale und nicht-virale Applikationswege zu entwickeln (Citti und Rainaldi, 2005), werden nun bei verschiedensten malignen und nichtmalignen Erkrankungen *antisense*-Oligonucleotide in der Klinik erprobt. Gleichzeitig werden im Labor neue Ribozyme erforscht, die neue Möglichkeiten der *Antisense*-Therapie eröffnen (Kim und Liu., 2007).

So gibt es derzeit laufende oder vor kurzem abgeschlossene Studien zur Behandlung von muskulärer Dystrophie Duchenne (van Deutekom et al., 2007), Restenose bei Koronarer Herzerkrankung (Kipshidze et al., 2007), Hyperlipidämie (Ito, 2007), Colitis ulcerosa (van Deventer et al., 2004), malignem Gliom (Hau et al., 2007), metastasiertem Nierenzellkarzinom (Margolin et al., 2007 und Levine et al., 2006), fortgeschrittenen soliden Tumoren (Levine et al., 2006; Goel et al., 2006; Advani et al., 2004 und Yuen et al., 1999), metastasiertem Colonkarzinom (Mita et al., 2006), hormonrefraktärem Prostatakarzinom (Tolcher et al., 2002) und Brustkrebs (Juhász et al., 2006; Marshall et al., 2004 und Adjei et al., 2003).

Hierbei handelt es sich jedoch fast ausschließlich um Phase I-Studien in denen nur in Einzelfällen ein Therapieerfolg nachgewiesen werden konnte, oder Phase II-Studien die keinen Vorteil gegenüber der Kontrolle zeigen konnten. Das bisher einzige von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) und in Deutschland zugelassene Medikament, das auf *antisense*-Technologie beruht ist Fomivirsen (Vitravene®), das eine Zulassung für CMV-Retinitis bei AIDS-Patienten hat.

5.4 Der uPA-Rezeptor als Angriffspunkt in der Tumorthherapie

Aufgrund der großen Bedeutung des uPA-Rezeptors für Invasion und Metastasierung von Tumorzellen wurde von vielen Arbeitsgruppen der Versuch unternommen, die

Expression dieses Rezeptors auf RNA-Ebene durch *Antisense*-Oligonucleotide, mit und ohne katalytischer Wirkung, durch Ribozyme und durch RNA-*Interference* zu unterdrücken.

Bereits 1994 konnte (Kook et al., 1994) mit *Antisense*-Sequenzen von 296 Basen Länge gegen die mRNA des uPA-Rezeptors, die stabil in HEp3-Zellen transfiziert wurden gezeigt werden, dass die transfizierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht nur *in vitro* weniger invasiv waren, sondern auch im Hühnerembryo weniger Metastasen bildeten. Auch konnten Wang et al. (2001) mit der Expression von *Antisense*-Sequenzen zum uPAR in Colonkarzinomzellen (HCT 116) die Expression des uPAR reduzieren. Diese Zellen waren aufgrund der reduzierten Expression von uPAR im Matrigel-Invasionsassay weniger invasiv und erzeugten *in vivo* im Nacktmausmodell im Gegensatz zu normalen HCT 116-Zellen signifikant weniger Lungenmetastasen.

Um den Abbau eines *Antisense*-Oligonukleotids, das gegen die mRNA des uPA-Rezeptors gerichtet ist, durch RNasen zu verhindern, verwendeten z.B. Gyetko et al. (1994) ein Molekül aus 18 Nukleotiden mit Phosphothionat-Bindungen, die statt Sauerstoff Schwefel enthalten und daher von den RNasen nicht katalysiert werden können. Mit diesen *Antisense*-Molekülen wurden mononukleäre Phagozyten über 24h inkubiert und es konnte so effektiv deren Chemotaxis *in vitro* gehemmt werden. Dies ist ein Beispiel wie *Antisense*-Moleküle gegen Abbau durch RNasen stabilisiert werden können, um *in vitro* die Bedeutung des uPAR zu untersuchen. *Antisense*-Oligodeoxyribonucleotide mit Phosphorothioat-Struktur (aODN) wurden auch von D'Alessio et al. (2004) verwendet, um *in vitro* die Invasivität verschiedener Krebszelllinien zu reduzieren und in Nacktmäusen mit malignen Melanomen durch i.v. Gaben den Primärtumor zu verkleinern und die Zahl der Metastasen zu reduzieren. Auch bei intraperitonealen Gaben entwickelten Nacktmäuse nach Injektion von Prostatakarzinomzellen weniger Knochenmetastasen (Margheri et al., 2005).

Um eine effektive Therapie gegen bereits bestehende Tumore im Tiermodell und später auch im Menschen entwickeln zu können, verfolgen die meisten Gruppen den Ansatz Expressionsvektoren – vor allem mit Hilfe von Adenoviren – in Tumorzellen einzubringen, die dann in der Tumorzelle selbst das *Antisense*-Molekül generiert. Die größten Erfolge soweit hat die Arbeitsgruppe von Rao et al. publiziert, die durch einfache *Antisense*-Oligonukleotide bzw. durch RNA-*Interference* gegen den uPA-Rezeptor vor allem Glioblastome, aber auch das Mammakarzinom behandelt.

Zunächst wurde gezeigt, dass aggressive Glioblastome ebenfalls erhöhte Level an uPAR exprimieren, die durch transiente Transfektion von *Antisense*-Molekülen gegen uPAR unterdrückt wurden und dass Zelllinien die diese stabil exprimieren nicht mehr in der Lage sind in Nacktmäusen Tumore zu bilden (Go et al., 1997). Daraufhin wurde ein Adenovirus konstruiert, der nach Transfektion in Gliomzellen eben dieses aus 300 Basen bestehende *Antisense*-Oligonukleotid gegen uPAR generiert. Mit diesem Virus konnten im Tiermodell durch intratumorale Injektion erfolgreich Nacktmäuse behandelt werden, bei denen zuvor ein subkutaner Glioblastom erzeugt worden war (Mohan et al., 1999), und dass mit ihm transfizierte NSCLC-Zelllinien im Tierversuch weniger pulmonale Metastasen erzeugen (Lakka et al., 2001).

Um die therapeutische Effektivität weiter zu erhöhen wurden auch Versuche unternommen, neben der Unterdrückung des uPAR gleichzeitig entweder die Expression weiterer Gene zu unterdrücken, die für Invasion und Proliferation der Tumorzelle wichtig sind, oder die Translation von Proteinen zu fördern, die Invasion und Proliferation der Tumorzelle hemmen, um so einen Synergismus zu erzeugen. So waren Adenoviren die *Antisense*-Oligonukleotide gegen uPAR und MMP9 (Lakka et al., 2003), uPAR und uPA (Gondi et al., 2003) bzw. uPAR und Cathepsin B (Gondi et al., 2004) in der Tumorzelle generierten *in vitro* und im Tiermodell bei Glioblastomen noch effektiver als das Virus, das nur gegen uPAR gerichtet war. Ebenso ein Adenovirus für *Antisense*- gegen uPAR und *Sense*-Oligonukleotid für das p16 Tumorsuppressorgen (Adachi et al., 2002 und Nalabothula et al., 2007).

Trotz dieser Ergebnisse im Tiermodell mit der Kombination aus Adenoviren und *Antisense*-Oligonukleotiden wird der Erfolg dadurch eingeschränkt, dass der Effekt transient ist und eine hohe intrazelluläre Molarität der *Antisense*-Oligonukleotiden notwendig ist. (Lakka et al., 2005) Diese ist limitiert durch potenziell toxische Virusmengen. Da dies die applizierte Menge an Vehikeln begrenzt muss für ein besseres Ergebnis die Effektivität des eingeschleusten Therapeutikums erhöht werden. Dies wäre möglich durch eine katalytische Spaltung der Ziel-mRNA, so dass ein Oligonukleotid in der Lage ist mehrere Kopien von mRNA zu spalten und dadurch eine geringere molare Menge ausreicht. Dies wäre möglich für ein Ribozym wie RZ-957 oder durch RNA-Interferenz. Aufgrund dieser Überlegungen werden aktuell statt einsträngiger Oligonukleotide verschiedene Formen doppelsträngiger RNA eingesetzt. Im Tiermodell wurde siRNA bzw. shRNA (*small hairpin RNA*) zum Teil mit Hilfe von Adenoviren oder Plasmiden als Expressionsvektoren erfolgreich gegen uPAR und

gegen Kombinationen aus uPAR mit Cathepsin B, MMP-9 bzw. uPA bei Glioblastomen, NSCLC und malignem Meningeom eingesetzt (Gondi et al., 2004b und 2007; Lakka et al., 2005).

Auch zur Therapie von Brustkrebs wurden siRNA gegen uPAR und uPA in Zelllinien (Subramanian et al., 2006) verwendet. Mit siRNA gegen uPAR und MMP-9 gelang es sogar bei orthotopen Mammakarzinomen in Nacktmäusen eine Komplettremission zu erreichen (Kunigal et al., 2007).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das uPA/uPAR-System insbesondere in Kombination mit MMPs ein wesentlicher Angriffspunkt für die Therapie unterschiedlicher solider Tumore ist. Und dass das Wachstum und die Metastasierung von Tumorzellen auch durch *Antisense*-Strategie wie z.B. RNAi oder ggf. auch Ribozyme verhindert werden kann. Es wurde auch gezeigt, dass die gleichzeitige Suppression mehrerer Gene effektiver ist, als die Suppression eines einzelnen überexprimierten Genes, da Tumorzellen hier alternative Pathways oder Proteine nutzen können, um Proliferation und Invasion fortzusetzen. Es geht bei der zielgerichteten oder ‚*tailored*‘ Tumorthherapie also zunächst darum, die für den Krankheitsverlauf wesentlichen Gene zu identifizieren bzw. die verschiedenen Tumorentitäten nach ihrem Expressionsmuster in Untergruppen einzuteilen. Diese können so einer zielgerichteten Therapie zugeführt werden, so wie z.B. das Mammakarzinom schon seit langem in Hormonrezeptor positive und negative, in Her2/neu überexprimierende und nicht überexprimierende Tumore eingeteilt wird, um dann antihormonell oder mit Trastuzumab behandelt zu werden. Ebenso gilt es Wege zu finden die untersuchten aODN, Ribozyme und siRNA auch *in vivo* in ausreichender Menge in einer für den menschlichen Organismus verträglichen Art und Weise in die Krebszellen einzubringen.

6 Literaturverzeichnis

- Adachi Y, Chandrasekar N, Kin Y, Lakka SS, Mohanam S, Yanamandra N, Mohan PM, Fuller GN, Fang B, Fueyo J, Dinh DH, Olivero WC, Tamiya T, Ohmoto T, Kyritsis AP, Rao JS: Suppression of glioma invasion and growth by adenovirus-mediated delivery of a bicistronic construct containing antisense uPAR and sense p16 gene sequences. *Oncogene* 21 (2002) 87-95
- Adjei AA, Dy GK, Erlichman C, Reid JM, Sloan JA, Pitot HC, Alberts SR, Goldberg RM, Hanson LJ, Atherton PJ, Watanabe T, Geary RS, Holmlund J, Dorr FA: A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 115-23
- Advani R, Peethambaram P, Lum BL, Fisher GA, Hartmann L, Long HJ, Halsey J, Holmlund JT, Dorr A, Sikic BI: A Phase II trial of aprinocarsen, an antisense oligonucleotide inhibitor of protein kinase C alpha, administered as a 21-day infusion to patients with advanced ovarian carcinoma. *Cancer* 100 (2004) 321-6
- Allgayer H: Molecular regulation of an invasion-related molecule - options for tumor staging and clinical strategies. *Eur J Cancer* 24 (2006) 811-819
- Andreasen P, Kjoller L, Christensen L, Duffy M: The urokinase plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72 (1997) 1-22
- Andreasen PA, Egelun R, Peterson H: The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Moll Life Sci* 57 (2000) 25-40
- Bajou K, Noel A, Gerard RD, Brünner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig N, Carmeliet P, collen D, Foidart JM: Absence of host plasminogen activator inhibitor-1 prevents cancer invasion and vascularisation. *Nat Med* 4 (1998) 923-928
- Behrendt N, Ploug M, Patthy L, Houen G, Blasi F, Dano K: The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *Biol Chem* 266 (1991) 7842-7847
- Benedict CM, Pan W, Loy SE, Clawson GA: Triple ribozyme-mediated down-regulation of the retinoblastoma gene. *Carcinogenesis* 19 (1998) 1223-1230
- Blackhall F, Ranson M, Thatcher N: Where next for gefitinib in patients with lung cancer? *Lancet Oncol* 7 (2006) 499-507
- Blasi F: uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunology Today* 18 (1997) 415-417
- Blasi F, Carmeliet P: uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 932-43
- Chapman H, Wei Y: Protease crosstalk with integrins: the urokinase paradigm. *Thromb Haemost* 86 (2001) 124-129

- Cech TR: Nobel lecture. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena. *Biosci Rep* 10 (1990) 239-61
- Chen H, Ferbeyre G, Cedergren R: Efficient hammerhead ribozyme and antisense RNA targeting in a slow ribosome Escherichia coli mutant. *Nat Biotechnol* 15 (1997) 432-5
- Citti L, Rainaldi G: Synthetic hammerhead ribozymes as therapeutic tools to control disease genes. *Curr Gene Ther* 5 (2005) 11-24
- Cubellis MV, Wun TC, Blasi F: Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-I. *EMBO* 9 (1990) 1079-1085
- D'Alessio S, Margheri F, Pucci M, Del Rosso A, Monia BP, Bologna M, Leonetti C, Scarsella M, Zupi G, Fibbi G, Del Rosso M.: Antisense oligodeoxynucleotides for urokinase-plasminogen activator receptor have anti-invasive and anti-proliferative effects in vitro and inhibit spontaneous metastases of human melanoma in mice. *Int J Cancer* 110 (2004) 125-33
- Danø K, Romer J, Nielsen BS, Bjorn S, Pyke C, Rygaard J: Cancer invasion and tissue remodelling-cooperation of protease systems and cell types. *APMIS* 107 (1999) 120-127
- DeClerck Y, Laug WE: Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme Protein* 49 (1996) 72-84
- Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, D'Alessio S, Del Rosso A, Magnelli L: Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin Exp Metastasis* 19 (2002) 193-207
- Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG: Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 368 (2006) 1329-38
- van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Koop K, van der Kooi AJ, Goemans NM, de Kimpe SJ, Ekhart PF, Venneker EH, Platenburg GJ, Verschuuren JJ, van Ommen GJ: Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 357 (2007) 2677-86
- van Deventer SJ, Tami JA, Wedel MK: A randomised, controlled, double blind, escalating dose study of alicaforsen enema in active ulcerative colitis. *Gut* 53 (2004) 1646-51
- Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorian L, Fennelly JJ, Lijnen HJ: Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinoma: preliminary report. *Cancer* 63 (1988) 531-533
- Duffy MJ: Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 48 (2002) 1194-1197

- Ellis V, Whawell SA, Werner F, Deadman J: Assembly of urokinase receptor-mediated plasminogen activation complexes involves direct, non-active site interactions between urokinase and plasminogen. *Biochem* 38 (1999) 651-659
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (1998) 806-11
- Gewirtz AM: On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *J Clin Invest* 117 (2007) 3612-4
- Gluzman Y.: SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23 (1981) 175-182
- Go Y, Chintala SK, Mohanam S, Gokaslan Z, Venkaiah B, Bjerkvig R, Oka K, Nicolson GL, Sawaya R, Rao JS: Inhibition of in vivo tumorigenicity and invasiveness of a human glioblastoma cell line transfected with antisense uPAR vectors. *Clin Exp Metastasis* 15 (1997) 440-6
- Goel S, Desai K, Macapinlac M, Wadler S, Goldberg G, Fields A, Einstein M, Volterra F, Wong B, Martin R, Mani S: A phase I safety and dose escalation trial of docetaxel combined with GEM231, a second generation antisense oligonucleotide targeting protein kinase A R1alpha in patients with advanced solid cancers. *Invest New Drugs* 24 (2006) 125-34
- Gondi CS, Lakka SS, Yanamandra N, Siddique K, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS: Expression of antisense uPAR and antisense uPA from a bicistronic adenoviral construct inhibits glioma cell invasion, tumor growth, and angiogenesis. *Oncogene* 22 (2003) 5967-5975
- Gondi CS, Lakka SS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, Tung CH, Weissleder R, Rao JS: Adenovirus-mediated expression of antisense urokinase plasminogen activator receptor and antisense cathepsin B inhibits tumor growth, invasion, and angiogenesis in gliomas. *Cancer Res* 64 (2004) 4069-77
- Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS: RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas. *Oncogene* 23 (2004) 8486-96
- Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS: Intraperitoneal injection of a hairpin RNA-expressing plasmid targeting urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor and uPA retards angiogenesis and inhibits intracranial tumor growth in nude mice. *Clin Cancer Res* 13 (2007) 4051-60
- Grabowski PJ, Zaug AJ, Cech TR: The intervening sequence of the ribosomal RNA precursor is converted to a circular RNA in isolated nuclei of *Tetrahymena*. *Cell* 23 (1981) 467-76
- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S: The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35 (1983) 849-57

- Gyetko MR, Todd RF, Wilkinson CC, Sitrin RG: The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 93 (1994) 1380-1387
- Harbeck N, Kates R, Look M, Meijer-van Gelder E, Klijn J, Krüger A, Kiechle M, Jänicke , Schmitt M, Foekens J: Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res* 62 (2002) 4617-4622
- Hau P, Jachimczak P, Schlingensiepen R, Schulmeyer F, Jauch T, Steinbrecher A, Brawanski A, Proescholdt M, Schlaier J, Buchroithner J, Pichler J, Wurm G, Mehdorn M, Strege R, Schuierer G, Villarrubia V, Fellner F, Jansen O, Straube T, Nohria V, Goldbrunner M, Kunst M, Schmaus S, Stauder G, Bogdahn U, Schlingensiepen KH: Inhibition of TGF-beta2 with AP 12009 in recurrent malignant gliomas: from preclinical to phase I/II studies. *Oligonucleotides* 17 (2007) 201-12
- Heidenreich O, Kang SH, Brown DA, Xu X, Swiderski P, Rossi JJ, Eckstein F, Nerenberg M.: Ribozyme-mediated RNA degradation in nuclei suspension. *Nucleic Acids Res* 23 (1995) 2223-8
- Høyer-Hansen G, Ploug M, Behrendt N, Rønne E, Danø K. et al: Cell surface acceleration of urokinase-catalysed receptor cleavage. *Eur J Biochem* 243 (1997) 21-26
- Ito MK: ISIS 301012 gene therapy for hypercholesterolemia: sense, antisense, or nonsense? *Ann Pharmacother* 41 (2007) 1669-78
- Jainchill JL et al.: Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 4 (1969) 549-553
- Jensen KF: Hyper-regulation of pyr gene expression in Escherichia coli cells with slow ribosomes. Evidence for RNA polymerase pausing in vivo? *Eur J Biochem* 175 (1988) 587-93.
- Jo M, Thomas KS, Wu L, Gonias SL: Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling. *J Biol Chem* 278 (2003) 46692-8
- Juhasz A, Vassilakos A, Chew HK, Gandara D, Yen Y: Analysis of ribonucleotide reductase M2 mRNA levels in patient samples after GTI-2040 antisense drug treatment. *Oncol Rep* 15 (2006) 1299-304
- Karikó K, Megyeri K, Xiao Q, Barnathan ES: Lipofectin-aided cell delivery of ribozyme targeted to human urokinase receptor mRNA. *FEBS Lett* 352 (1994) 41-4
- Kim K, Liu F: Inhibition of gene expression in human cells using RNase P-derived ribozymes and external guide sequences. *Biochimica et Biophysica Acta* 1769 (2007) 603-612
- Kipshidze N, Iversen P, Overlie P, Dunlap T, Titus B, Lee D, Moses J, O'Hanley P, Lauer M, Leon MB: First human experience with local delivery of novel antisense AVI-4126

- with Infiltrator catheter in de novo native and restenotic coronary arteries: 6-month clinical and angiographic follow-up from AVAIL study. *Cardiovasc Revasc Med* 8 (2007) 230-5
- Kook YH, Adamski J, Zelent A, Ossowski L: The effect of antisense inhibition of urokinase receptor in human squamous cell carcinoma on malignancy. *EMBO J* 13 (1994) 3983-3991
- Krüger A, Soeltl R, Lutz V, Wilhelm OG, Magdolen V, Rojo EE, Hantzopoulos PA, Graeff H, Gänsbacher B, Schmitt M.: Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther* 7 (2000) 292-9
- Kunigal S, Lakka SS, Gondi CS, Estes N, Rao JS: RNAi-mediated downregulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in human breast cancer cells results in decreased tumor invasion, angiogenesis and growth. *Int J Cancer* 121 (2007) 2307-16
- Lakka SS, Rajagopal R, Rajan MK, Mohan PM, Adachi Y, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Ali-Osman F, Roth JA, Yung WK, Kyritsis AP, Rao JS: Adenovirus-mediated antisense urokinase-type plasminogen activator receptor gene transfer reduces tumor cell invasion and metastasis in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 1087-93
- Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS: Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. *Cancer Res* 63 (2003) 2454-61
- Lakka SS, Gondi CS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao VH, Sioka C, Rao JS: Specific interference of urokinase-type plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 gene expression induced by double-stranded RNA results in decreased invasion, tumor growth, and angiogenesis in gliomas. *J Biol Chem* 280 (2005) 21882-92
- Le Y, Murphy P, Wang J: Formyl-peptide receptors revisited. *Immunol Rev* 23 (2002) 541-548
- Leissner P, Verjat T, Bachelot T, Paye M, Krause A, Puisieux A, Mougin B: Prognostic significance of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in lymph node- and hormone receptor positive breast cancer. *BMC* 6 (2006) 1-9
- Levine AM, Tulpule A, Quinn DI, Gorospe G 3rd, Smith DL, Hornor L, Boswell WD, Espina BM, Groshen SG, Masood R, Gill PS: Phase I study of antisense oligonucleotide against vascular endothelial growth factor: decrease in plasma vascular endothelial growth factor with potential clinical efficacy. *J Clin Oncol* 24 (2006) 1712-9
- Lieber A, Strauss M: Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 540-51

- Llinas P, Le Du MH, Gardsvoll H, Dano K, Ploug M, Gilquin B: Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO* 24 (2005) 1655-1663
- Look M, van Putten W, Duffy M, Harbeck N, Christensen I, Thomssen C, Kates R, Spyrtatos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep F, Ulm K, Peyrat JP, Martin P, Magdelenat H, Brünner N, Duggn C, Lisboa B, Bendahl P, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder M, Manders P, Fiets E, Blankensein M, Broet P, Omain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex L, Klijn J, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens J: Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Nat Cancer Inst* 94 (2002) 116-128
- Luther T, Magdolen V, Albrecht S, Kasper M, Riemer C, Kessler H, Graeff H, Müller M, Schmitt M: Epitope-mapped monoclonal antibodies as tools for functional and morphological analyses of the human urokinase receptor in tumor tissue. *Am J Pathol* 150 (1997) 1231-1244
- Margolin K, Synold TW, Lara P, Frankel P, Lacey SF, Quinn DI, Baratta T, Dutcher JP, Xi B, Diamond DJ, Gandara DR: Oblimersen and alpha-interferon in metastatic renal cancer: a phase II study of the California Cancer Consortium. *J Cancer Res Clin Oncol* 133 (2007) 705-11
- Margheri F, D'Alessio S, Serratí S, Pucci M, Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Angeli R, Angelucci A, Gravina GL, Rucci N, Bologna M, Teti A, Monia B, Fibbi G, Del Rosso M.: Effects of blocking urokinase receptor signaling by antisense oligonucleotides in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. *Gene Ther* 12 (2005) 702-14
- Marshall J, Chen H, Yang D, Figueira M, Bouker KB, Ling Y, Lippman M, Frankel SR, Hayes DF: A phase I trial of a Bcl-2 antisense (G3139) and weekly docetaxel in patients with advanced breast cancer and other solid tumors. *Ann Oncol* 15 (2004) 1274-83
- Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE: Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 357 (2007) 2666-76
- Min HY, Doyle LV, Vitt CR, Zandonella CL, Stratton-Thomas JR, Shuman MA, Rosenberg S: Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngeneic mice. *Cancer Res* 56 (1996) 2428-33
- Mirick GR, Bradt BM, Denardo SJ, Denardo GL: A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 48 (2004) 251-7
- Mita MM, Ochoa L, Rowinsky EK, Kuhn J, Schwartz G, Hammond LA, Patnaik A, Yeh IT, Izbicka E, Berg K, Tolcher AW: A phase I, pharmacokinetic and biologic correlative study of oblimersen sodium (Genasense, G3139) and irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 17 (2006) 313-21

- Mohan PM, Chintala SK, Mohanam S, Gladson CL, Kim ES, Gokaslan ZL, Lakka SS, Roth JA, Fang B, Sawaya R, Kyritsis AP, Rao JS: Adenovirus-mediated delivery of antisense gene to urokinase-type plasminogen activator receptor suppresses glioma invasion and tumor growth. *Cancer Research* 59 (1999) 3369–3373
- Montuori N, Carriero MV, Salzano S, Rosi G, Ragno P: The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *Biol Chem* 277 (2002) 46932-46939
- Montuori N, Visconte V, Rossi G, Ragno P. Soluble and cleaved forms of the urokinase receptor: degradation products or active molecules? *Thromb Haemost* 93(2005) 192-198
- Moy B, Goss PE: Lapatinib: current status and future directions in breast cancer. *Oncologist* 11 (2006) 1047-57
- Nalabothula N, Lakka SS, Dinh DH, Gujrati M, Olivero WC, Rao JS: Sense p16 and antisense uPAR bicistronic construct inhibits angiogenesis and induces glioma cell death. *Int J Oncol* 30 (2007) 669-78
- Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, Olson D, Cremona O, Gliemann J, Blasi F: Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA: serpin complexes. *EMBO* 16 (1997) 2610-2620
- Ossowski L, Reich E: Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell* 35 (1983) 611-9
- Pan WH, Devlin HF, Kelley C, Isom HC, Clawson GA: A selection system for identifying accessible sites in target RNAs. *RNA* 7(2001) 610-21
- Perry CM, Balfour JA: Fomivirsen. *Drugs* 57 (1999) 375-80
- Ploug M, Rønne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Danø K: Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxy-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidyl-inositol. *Biol Chem* 266 (1991) 1926-1933
- Ploug M, Rahbek-Nielsen H, Nielsen PF, Roepstorff P, Dano K: Glycosylation profile of a recombinant urokinase-type plasminogen activator receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biol Chem* 273 (1998) 13933-43
- Ploug M, Gårdsvoll H, Jorgensen TJ, Lonborg Hansen L, Danø K: Structural analysis of the interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor: a potential target for anti-invasive cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 30 (2002) 177-183
- Prody GA, Bakos JT, Buzayan JM, Schneider IR, Bruening G: Autolytic Processing of Dimeric Plant Virus Satellite RNA. *Science* 231 (1986) 1577-1580
- Rabbani SA, Mazar AP: The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 10 (2001) 393-415
- Rabbani SA, Gladu J: Urokinase receptor antibody can reduce tumor volume and detect the presence of occult tumor metastases in vivo. *Cancer Res* 62 (2002) 2390-7

- Ragno P: The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. *Cell Mol Life Sci* 63 (2006) 1028-1037
- Rettenberger P, Wilhelm O, Oi H, Weidle UH, Goretzki L, Koppitz M, Lottspeich F, König B, Pessara U, Kramer MD, Schmitt M, Magdolen V: A competitive chromogenic assay to study the functional interaction of urokinase-type plasminogen activator with its receptor. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376 (1995) 587-594
- Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H: Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumour invasion and metastasis. *Int J Oncol* 13 (1998) 893-906
- Reuning U, Sperl S, Koppitz C, Kessler H, Krüger A, Schmitt M and Magdolen V. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* 9 (2003) 1529-1543
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Transformation of competent E.coli. In "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2. Auflage, 1.76-1.81
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Electrotransformation. In "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2. Auflage, 1.74-1.75
- Schlehuber S, Skerra A: Anticalins as an alternative to antibody technology. *Expert Opin Biol Ther* 5 (2005) 1453-62
- Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Fischer K, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F, Graeff H: Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 78 (1997) 285-96
- Schmitt M, Wilhelm OG, Reuning U, Krüger A, Harbeck N, Lengyel E: The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumour therapy. *Fibrinolysis* 6 (2000) 114-132
- Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, Bell R, Bergh J, Coleman R, Wardley A, Harbeck N, Lopez RI, Mallmann P, Gelmon K, Wilcken N, Wist E, Sánchez Rovira P, Piccart-Gebhart MJ; HERA study team: 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 369 (2007) 29-36
- Subramanian R, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Rao JS: siRNA-mediated simultaneous downregulation of uPA and its receptor inhibits angiogenesis and invasiveness triggering apoptosis in breast cancer cells. *Int J Oncol* 28 (2006) 831-9
- Sullenger BA, Cech TR: Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* 262 (1993) 1566-9

- Tolcher AW, Reyno L, Venner PM, Ernst SD, Moore M, Geary RS, Chi K, Hall S, Walsh W, Dorr A, Eisenhauer E: A randomized phase II and pharmacokinetic study of the antisense oligonucleotides ISIS 3521 and ISIS 5132 in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 2530-5
- Tuerk C, Gold L.: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249 (1990) 505-10.
- Uhlenbeck OC : A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* 328(1987) 596-600
- Waltz D, Chapman H: Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy. *J Biol Chem* 269 (1994) 14746-14750
- Wang S, Dolnick BJ: Quantitative evaluation of intracellular sense: antisense RNA hybrid duplexes. *Nucleic Acids Res* 21 (1993) 4383-91
- Yuen AR, Halsey J, Fisher GA, Holmlund JT, Geary RS, Kwoh TJ, Dorr A, Sikic BI: Phase I study of an antisense oligonucleotide to protein kinase C-alpha (ISIS 3521/CGP 64128A) in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 3357-63

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

7.1 Abbildungen

- Abb. 2.1:** Schematische Übersicht über die Rolle des uPA/uPAR-System für Tumorinvasion und –metastasierung.
- Abb. 2.2:** Die Domain-Struktur des uPA-Rezeptor
- Abb. 4.1a:** Plasmid pTaruPARs
- Abb. 4.1b:** Plasmid pCtrl
- Abb. 4.2:** Tripel-Ribozym-Kassette mit Restriktionsstellen (rot) und Insertionsstelle, die durch Ribozyme der Library ersetzt wird (unterstrichen)
- Abb. 4.3:** Anlagerung der Ribozym-*Library*
- Abb. 4.4:** Kontrollverdau Plasmid pRZL mit Kontrolle pChop
- Abb. 4.5:** Beispiel einer Agar-Platte mit Tropfkolonien, hier mit den weißen Kolonien #1857 und #1917
- Abb. 4.6:** Autoradiographiefilm zeigt keine Spaltprodukte nach 6 Stunden.
- Abb. 4.7:** Spaltprodukte der *self-cleavage* von RZ-957
- Abb. 4.8:** Kinetik der Spaltung von uPAR mit RZ-957, RZ-168 und RZ-1355
- Abb. 4.9:** Expression von Luciferase nach Transfektion von peuTaruPAR
- Abb. 4.10:** Expression von Luciferase nach Transfektion von peuRZ957 bzw. des Kontrollplasmids in NIH3T3-uPAR/Luc-c20 und -c22
- Abb. 4.11:** Expression von Luciferase nach Transfektion von peuRZ957 bzw. des Kontrollplasmids in COS 7-uPAR/Luc-c1, -c3 und -c6
- Abb. 4.12:** Kolonien auf Testplatte nach 48h Inkubationszeit

7.2 Tabellen

- Tab. 3.1:** Ansätze in vitro Transcription für *cis*-Spaltung
- Tab. 3.2:** Ansätze in vitro Transcription zur Spaltung von uPAR

- Tab. 3.3:** Selbst klonierte Plasmide mit Vektorplasmid, Insert, Restriktionsenzyme und Puffer, für die Subklonierung notwendige Modifikationen an Vektor oder Insert, Größe und Menge der verwendeten DNA-Segmente, sowie die zur Kontrolle verwendeten Restriktionsenzyme und dadurch erhaltenen Fragmente
- Tab. 4.1:** Luciferase in NIH3T3-uPAR/Luc-c20 und – c22
a) Absolutwerte von Luciferase
b) Werte bezogen auf Gesamtprotein
- Tab. 4.2:** Luciferase in COS 7-uPAR/Luc-c1, -c3 und –c6
a) Absolutwerte von Luciferase
b) Werte bezogen auf Gesamtprotein

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| aODN | <i>antisense</i> Oligodeoxyribonucleotide |
| C | Cytosin |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| c-erbB1 u. 2 | <i>human epidermal growth factor receptor 1 und 2</i> |
| cpm | <i>counts per minute</i> |
| Da | Dalton |
| DDT | Dithiothreitol |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| DMPC | 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-phosphocholine |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dsRNA | doppelsträngige RNA |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFR | Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>) |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| fMLP | fMet-Leu-Phe-Peptid |
| g | Gramm bzw. Ortsfaktor |
| G | Guanin |
| GPI-Anker | Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker |
| G-Protein | Guaninnucleotid-bindendes Protein |
| Her2/neu | <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> |
| HMP | <i>High melting point</i> |
| IPTG | Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranosid |
| kbp | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| LMP | <i>Low melting point</i> |
| mAB | monoklonaler Antikörper |
| μ F | 10^{-6} Farad |
| Min. | Minute(n) |

| | |
|-------------|---|
| miRNA | Micro-RNA |
| MMP | Matrix-Metalloproteinasen |
| mRNA | <i>messenger-RNA</i> |
| NSCLC | Nichtkleinzelliges (Bronchial-)Karzinom |
| Ω | Ohm |
| PAI-1 u. -2 | Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 und 2 |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PDGF-R | <i>platelet-derived growth factor receptor</i> |
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| RNAi | <i>RNA interference</i> |
| RNase | Ribonuklease |
| SELEX | <i>Selective Evolution of Ligands by EXponential enrichment</i> |
| shRNA | <i>short bzw. small hairpin RNA</i> |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| suPAR | löslicher (<i>soluble</i>) Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-Rezeptor |
| Tab. | Tabelle |
| tPA | Gewebe-Typ Plasminogen Aktivator (<i>tissue-type plasminogen activator</i>) |
| TP | Triphosphat (z.B. in ATP, GTP, CTP, UTP) |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Uracil bzw. Einheiten (<i>Units</i>) |
| U/Min | Umdrehungen pro Minute |
| uPA | Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator |
| uPAR | Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-Rezeptor |
| X-Gal | 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-Galaktopyranosid |

9 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher dafür, dass ich diese Arbeit an seinem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung durchführen durfte. Ich bedanke mich für die herzliche Art und große Geduld. Für den Wunsch, uns alle zu kritischen Wissenschaftlern und guten Ärzten auszubilden.

Besonders danken möchte ich Dr. Elena Rojo Romeo für die Überlassung dieser Arbeit. Dank für den weitergegebenen Enthusiasmus ein neues Verfahren entwickeln zu wollen und dieses mit selbst konstruierten Ribozymen zu untersuchen. Dank für die Vorarbeit, die Entwicklung der Ribozyme nach der Selex-Methode. Ihr meinen ganzen Respekt dafür, die Betreuung nach ihrem Weggang aus dem Institut fortgesetzt zu haben und dafür, dass sie trotz der neuen Aufgaben diesen Weg bis zum Ende mitgegangen ist.

Deshalb auch meinen Dank an PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Achim Krüger, der mich und diese Arbeit nach dem Weggang von Dr. Rojo adoptiert hat. Vielen Dank für die kritische und anspruchsvolle Unterstützung, für die zur Verfügung gestellten Mittel, und vor allem für das unersetzliche Fachwissen, das diese Arbeit ermöglicht hat.

Ich danke den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe und des ganzen Labors für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die gemeinsame Zeit: PD Dr. Christian Plank und Ursula Putz für Hilfe bei der Luciferase-Messung, Dr. Per S. Holm für seine Erfahrung mit Ribozymen, Dr. Martina Anton für das Plasmid und kurzfristige Tipps am Wochenende, Katja Honert, Charlotte Kopitz und Dr. Matthias Arlt für gute Ratschläge. Claudius Vidal, Sven Kröning und Jutta N.K. Szillis für die gemeinsamen, radioaktiven ersten Schritte, die wir gemeinsam *in vitro* gegangen sind.

Ermöglicht wurde mir die Durchführung dieser Arbeit durch das Vorbild und die Unterstützung von Prof. Dr. med. Michael Untch, PD Dr. med. Uwe Hasbargen, Dr. med. Ernst Lengyel und Dr. Henning K.F. Michels.

Für kritische Diskussion und gute Ratschläge beim Verfassen der Arbeit danke ich ganz herzlich und vor allem Dr. Jutta Berster, Dr. Angela Kirschenhofer, Dr. Rita Sörtl-Biess und Dr. Cyrill Emanuel Hornuss.

Einen ganz herzlichen Dank an meine Eltern, die mir durch ihre Unterstützung und ihr Vorbild meine Ausbildung und meine Arbeit ermöglicht haben. Die meinen Weg über viele Jahre durch viele Länder mit mir gegangen sind.

Ich widme diese Arbeit meiner Frau, Dott. Denise Pasqualini und meinen Töchtern Sophia und Giulia, die immer ein Ansporn waren und stets Grund sind, das Beste zu geben. Danke ihnen auch für manchen Verzicht und viel Geduld.

10 Lebenslauf

Name: STEPHAN HASMÜLLER

Geburtsdatum: 23. September 1973

Geburtsort: Stuttgart

Familienstand: verheiratet, zwei Töchter

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1983 bis 1991 SCHICKHARDT-GYMNASIUM STUTTGART

1991 bis 1992 YOSEMITE HIGH-SCHOOL IN OAKHURST/USA
Mitglied der California Scholarship Federation
High-School Diploma 4,3 GPA, 1/162

1992 bis 1994 SCHICKHARDT-GYMNASIUM STUTTGART
allgemeine Hochschulreife 1,3

Zivildienst: RETTUNGSSANITÄTER, AUSBILDER FÜR ERSTE HILFE
Malteser-Hilfsdienst Stuttgart
von 04.10.94 bis 31.12.95

Medizinstudium:

1995 bis 1999 ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG I.BR.
Begabtenförderung der Konrad-Adenauer-Stiftung

1998 bis 1999 UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, SPANIEN
Im Erasmus-Programm der Europäischen Union

1999 bis 2002 TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Praktisches Jahr:

08.10.01 bis 02.12.01 INNERE MEDIZIN (KARDIOLOGIE UND ONKOLOGIE)
New York University School of Medicine, New York/USA

17.12.01 bis 08.02.02 CHIRURGIE (ALLGEMEINCHIRURGIE)
Centre Hospitalo-Universitaire Saint Eloi, Montpellier/Frankreich

11.02.02 bis 05.04.02 CHIRURGIE (ALLGEMEINCHIRURGIE)
Chirurgische Klinik des Klinikum rechts der Isar der TU München

08.04.02 bis 31.05.02 INNERE MEDIZIN (GASTROENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE)
II. Medizinische Klinik des Klinikum rechts der Isar der TU München

03.06.02 bis 30.09.02 GYNÄKOLOGIE UND GEBURTSHILFE
Frauenklinik des Klinikum rechts der Isar der TU München

Berufliche Tätigkeit:

Arzt im Praktikum: KLINIK UND POLIKLINIK FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
KLINIKUM DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN – GROSSHADERN
von 01.12.02 bis 31.05.04

Assistenzarzt seit 01.06.2004

Publikationen:

Kiewe P, Hasmüller S, Kahlert S, Heinrigs M, Rack B, Mermé A, Korfel A, Jäger M, Lindhofer H, Sommer H, Thiel E, Untch M.: Phase I trial of the trifunctional anti-Her2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. Clin Cancer Res. 12 (2006) 3085-91

Hasmüller S, Wirtz RM, Lenhard M, Rückert S, Kahlert S, Bauerfeind I, Ditsch N, Rühl I, Fasching P, Untch M: Response of basal-like tumors defined by ESR1, Her-2/neu, MLPH and MMP7 to neoadjuvant chemotherapy. Eur J Cancer Suppl. 6 (2008) 190

Lenhard M, Wirtz R, Hasmüller S, Rückert S, Ditsch N, Rühl I, Fasching P, Kahlert S, Bauerfeind I, Untch M: Relation of intratumoral B-Cells and response to neoadjuvant chemotherapy. Eur J Cancer Suppl. 6 (2008) 101

Rückert S, Wirtz RM, Lenhard MS, Hasmüller S, Ditsch N, Rühl I, Kahlert S, Bauerfeind I, Fasching PA, Untch M: Microtubule-associated protein tau is a marker of pathological complete response in Her-2/neu positive neoadjuvant treated breast cancer patients. Eur J Cancer Suppl. 6 (2008) 191

Lenhard MS, Wirtz RM, Hasmueller S, Rueckert S, Ditsch N, Ruehl I, Kahlert S, Bauerfeind I, Untch M: Relation of intratumoral B-cells and response to neoadjuvant chemotherapy. Breast Cancer Research and Treatment 106 (2007) Abstr. 2110

Rueckert S, Wirtz R, Lenhard M, Hasmueller S, Ditsch N, Ruehl I, Kahlert S, Bauerfeind I, Untch M: Microtubule-associated protein tau is a marker of pathological complete response in Her-2/neu positive neoadjuvant treated breast cancer patients. Breast Cancer Research and Treatment 106 (2007) Abstr. 2016

Wirtz RM, Lenhard MS, Rückert S, Hasmüller S, Konecny G, Fasching P, Euting H, Claas S,

- Ditsch N, Rühl I, Bauerfeind I, Untch M: Determination of Her-2/neu status by semi-automated qRT-PCR in core needle biopsy FFPE tissues, correlation with standard IHC / FISH technology and response to neoadjuvant Trastuzumab-containing regimen (TECHNO-Trial). American Association for Clinical Chemistry 2007, Abstr. C42
- Hasmüller S, Wirtz RM, Lenhard M, Nina D, Rueckert S, Ruehl I, Bauerfeind I, Untch M: Amplification of Her2/neu and transcription levels of Her2/neu mRNA measured by RT-PCR in paraffin-embedded core-needle biopsies as predictive markers for response to neoadjuvant therapy with trastuzumab, epirubicin, cyclophosphamide and paclitaxel in early breast cancer (TECHNO-trial). Breast Cancer Research and Treatment 100 (2006) Abstr. 1042
- Euler U, Meisner C, Kates R, Friedel C, Hasmüller S, Untch M, Schmidt M, Lisboa BW, Lux MP, Jaenicke F, Kiechle M, Schmitt M, Thomssen C, Harbeck N: Comparison of DFS and OS outcome estimates by Adjuvant Online with 10-year follow-up data of the chemo N0 trial using biomarkers uPA/PAI-1 for risk group stratification in node-negative breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment 100 (2006) Abstr. 2087
- Lenhard MS, Wirtz RM, Rückert S, Hasmüller S, Ditsch N, Rühl I, Bauerfeind I, Untch M: Correlation of quantitative Her-2/neu gene expression (TaqMan PCR) with standard immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in core needle biopsies. Breast Cancer Research and Treatment 100 (2006) Abstr. 4009
- Rueckert S, Wirtz RM, Lenhard M, Ruehl I, Hasmueller S, Ditsch N, Bauerfeind I, Untch M: Response prediction in neoadjuvant trastuzumab treated HER-2/neu-positive breast cancer by quantitative RT-PCR analysis of FFPE tissue. Breast Cancer Research and Treatment 100 (2006) Abstr. 3042
- Ruehl IM, Wirtz RM, Lenhard M, Hasmueller S, Rueckert S, Ditsch N, Kahlert, Bauerfeind I, Untch M: Significance of cyclin D1 expression and amplification status in paraffin-embedded tissue of Her2/neu positive breast cancer patients treated in a neoadjuvant trastuzumab-containing protocol (TECHNO-trial). Breast Cancer Research and Treatment 100 (2006) Abstr. 3027
- Euler U, Meisner C, Friedel C, Schmidt M, Untch M, Lisboa B, Kiechle M, Jaenicke F, Schmitt M, Hasmüller S, Thomssen C, Lux MP, Harbeck N: Vergleich der Risikoabschätzung beim nodal-negativen Mammakarzinom durch uPA/PAI-1 und Adjuvant Online™ anhand der 10-Jahres Nachbeobachtungsdaten der *Chemo N0* Studie. DGGG (2006) Abstr. PO-O 02.39
- Hasmüller S, Löhe F, Löhrs B: Radiologische Komplettremission bei metastasiertem Endometriumkarzinom nach Kombinations-Chemotherapie mit Carboplatin, Epirubicin und Paclitaxel. BGGF (2006) Abstr. P2.11
- Kiewe P, Hasmüller S, Kahlert S, Heinrigs M, Rack B, Marmé A, Korfel A, Thiel E, Sommer H, Untch M: Phase I trial of the trifunctional anti-Her2 x anti-CD3 antibody Ertumaxomab in metastatic breast cancer. J Clin Oncol 23 (2005) Abstr. 2530
- Hasmüller S, Löhrs B, Untch M: Vorstellung eines neuen Projektes zur besseren Überwachung und Therapie der sekundären Osteoporose bei Patientinnen mit Mammakarzinom. DGGG 2004 Poster

Beiträge:

Rückert S, Lenhard MR, Hasmüller S, Kahlert S, Friese K, Bauerfeind I: Neuigkeiten zur Therapie des Mammakarzinoms. Der Gynäkologe 12 (2002) 295-302

Hasmüller S: Knochengesundheit bei Mammakarzinom. (State of the art 2004 – Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms. M. Untch. Zuckschwert-Verlag München)