

Kontrolle des prä-mRNA Spleißens durch das Tetrazyklin-Aptamer

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

M.Sc. Marc Vogel

aus Ladenburg

1. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß

2. Referent: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Tag der Einreichung: 19.07.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2016

Darmstadt 2017

D 17

Danksagung

Ich danke Frau **Prof. Dr. Beatrix Süß** für die Vergabe des interessanten Themas, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Darüber hinaus möchte ich mich für die unterstützende Teilnahme an unterschiedlichsten Tagungen, die außerordentlich gute Betreuung und die nette Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Dieter Steinhilber** für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei **Dr. Manuel Grez** und **Dr. Stefan Stein** möchte ich mich für die Einführung in die Durchflussszytometrie, sowie die Hilfe bei Fragen zu CD20 bedanken.

Bei **Prof. Dr. Cristina Cardoso** möchte ich mich für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Kooperationspartnern **Prof. Dr. Josef Wachtveitl, Prof. Dr. Thomas Prisner, Prof. Dr. Snorri Sigurdsson, Dr. Björn Corzilius, Dr. Alice Bowen, Andreas Reuss, Henrik Gustmann, Patricia Wenk, Diane Daube** und **Thilo Hetzke** für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Bei dem **SFB902** möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei **Dr. Julia Weigand** und **Dr. Michael Vockenhuber** für die netten Diskussionen sowie die entgegengebrachte Hilfe bedanken.

Bei **Dr. Alexander Wittmann** möchte ich mich für die Einführung in das Thema, sowie die anfängliche Betreuung bedanken.

Für Hilfe bei administrativen Angelegenheiten möchte ich mich herzlich bei **Dunja Sehn** bedanken.

Bei **Britta Kluge** möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken.

Bei allen weiteren **Mitgliedern des Arbeitskreises Süß** möchte ich mich für die gute Zeit, die lustigen Feiern, den Spaß auf Tagungen sowie die netten Diskussionen und die gute Laboratmosphäre bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin **Katharina Keim** für die Hilfe und die Unterstützung in den letzten Jahren.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen **Eltern**, sowie meinem Bruder **Ralf** bedanken, die mir immer geholfen und an mich geglaubt haben.

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	Genexpression in Eukaryoten	2
2.2	Spleißen.....	3
2.2.1	Übersicht über das prä-mRNA Spleißen	3
2.2.2	Verschiedene Intron-Gruppen.....	4
2.2.3	Das Spleißosom	5
2.2.4	Exon- vs. Intronddefinition	7
2.2.5	Alternatives Spleißen.....	8
2.2.6	Fehlspleißen verursacht Krankheiten	10
2.3	Katalytische und regulatorische RNA-Moleküle.....	11
2.3.1	Die „RNA-Welt“ Theorie	11
2.3.2	Regulatorische RNAs.....	11
2.3.3	Aptamere	13
2.4	Das Tetrazyklin-bindende Aptamer	15
2.5	Zielsetzung dieser Arbeit	17
3	ERGEBNISSE	18
3.1	Kontrolle des alternativen Spleißens in einem Minigen-System	18
3.1.1	Kontrolle des BP durch das Tc-Aptamer	19
3.1.2	Kontrolle der 3' SS durch das Tc-Aptamer	21
3.2	Kontrolle des alternativen Spleißens in einem Luziferase-Reportergen	24
3.3	Charakterisierung des Riboswitches	26
3.3.1	Vergleich des L2-Riboswitches in verschiedenen Zelllinien.....	26
3.3.2	Konzentrationsabhängigkeit der Regulation des Riboswitches.....	27
3.3.3	Einfluss der Expressionsstärke auf den Riboswitch	28
3.4	Verbesserung der Basalexpression durch ein Aptazym	29
3.5	Kontrolle des Transkriptionsfaktors MAX durch den entwickelten Riboswitch	31
3.6	Entwicklung eines Suizidgens durch die kontrollierte Expression von CD20.....	33

Inhaltsverzeichnis

3.7	Das Schalten zwischen zwei Spleiß-Isoformen ermöglicht die Expression zweier Proteine	37
4	DISKUSSION	40
4.1	Vor- und Nachteile unterschiedlicher Designs zur Kontrolle des Spleißens durch einen Riboswitch ..	40
4.2	Der Einfluss des Aptamers auf das Spleißen	41
4.3	Der Einfluss des Liganden Tc auf das Regulationssystem	41
4.4	Möglicher Wirkmechanismus des Aptamers.....	42
4.5	Analyse der unterschiedlichen Minigen-Konstrukte	43
4.6	Das aptamer-kontrollierte Exon kann in einen anderen Kontext transferiert werden	44
4.7	Das aptamer-kontrollierte Exon im Vergleich zu anderen synthetischen Spleiß-Riboswitchen	46
4.8	Kritische Betrachtung des Suizidsystems	47
4.8.1	Vergleich der stabilen Integration mit der transienten Transfektion.....	47
4.8.2	Die Antwort der Zelle auf Rituximab	47
4.8.3	Das CD20 basierte Suizidgen: Anwendungsbereiche und der Vergleich zu anderen Systemen	48
4.9	Kritische Analyse des Designs zur Expression zweier Spleiß-Isoformen	49
5	MATERIAL UND METHODEN	51
5.1	Material.....	51
5.1.1	Verwendete Basisvektoren.....	59
5.1.2	Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide.....	63
5.2	Methoden.....	69
5.2.1	Methoden mit <i>E. coli</i>	69
5.2.2	Methoden mit humanen Zellen.....	70
5.3	Biochemische Standardmethoden	74
5.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	74
5.3.2	SDS-PAGE und Westernblot.....	74
5.4	Molekularbiologische Standardmethoden.....	75
5.4.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen.....	75
5.4.2	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	75
5.4.3	Fällen von Nukleinsäuren	75

Inhaltsverzeichnis

5.4.4	Phenolisierung von Nukleinsäuren	75
5.4.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren für Klonierungen	75
5.4.6	Phosphorylierung von Oligonukleotiden	76
5.4.7	Hybridisieren von Oligonukleotiden	76
5.4.8	Restriktionsverdau	76
5.4.9	Ligation	76
5.4.10	Polymerase-Kettenreaktion	76
5.4.11	RT-PCR	77
5.5	Verwendete Software.....	78
6	ANHANG	79
6.1	Abkürzungen	79
6.2	Einheiten	80
6.3	Dimensionen	80
6.4	Nukleobasen.....	80
6.5	Sequenzen	81
6.6	Zusätzliche Tabellen	83
6.7	Zusätzliche Abbildungen	84
7	LITERATURVERZEICHNIS	85
8	VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN	91
9	PUBLIKATIONEN	92
10	CURICULUM VITAE	93

1 Zusammenfassung

Ein Ziel der synthetischen Biologie ist es, neuartige konditionelle Genexpressionssysteme zu entwickeln. Diese Systeme sind für die Etablierung von synthetisch genetischen Schaltkreisen essentiell. Für die Entwicklung dieser Schaltkreise muss es möglich sein, die Genexpression auf allen Ebenen kontrollieren zu können. Während es verschiedene, gut charakterisierte Systeme gibt, die eine kontrollierte Genexpression auf Transkriptionsebene erlauben, ist die Anzahl an Kontrollelementen für die posttranskriptionelle Regulation begrenzt. Insbesondere zur Kontrolle des alternativen Spleißens gibt es bislang kaum Schalterelemente, obwohl dies in höheren Eukaryoten einen essentiellen Schritt in der Reifung von mRNAs darstellt. Fehler des alternativen Spleißens führen zu verschiedenen schwerwiegenden Krankheiten wie zum Beispiel Krebs.

In dieser Arbeit wurde ein RNA-Schalter entwickelt, welcher das alternative Spleißen eines Kassetten-Exons mithilfe eines Tetrazyklin-bindenden (Tc) Aptamers reguliert. Hierfür wurde entweder die Zugänglichkeit der 3' Spleißstelle (SS) oder des Verzweigungspunktes (BP) durch das Aptamer reguliert, indem diese Stellen in den P1 Stamm des Aptamers integriert wurden. Durch dieses Design ist die Spleißstelle in Abwesenheit von Tc für das Spleißosom zugänglich, in Anwesenheit von Tc wird sie durch eine stabilisierte Aptamerstruktur blockiert.

Zur Kontrolle des Spleißens wurden verschiedene Konstrukte angefertigt, die sich in der Sequenz und Stabilität des P1 Stammes sowie der relativen Lage des Aptamers zur Spleißstelle unterscheiden. Die Ergebnisse zeigen, dass Konstrukte mit einem stabileren Stamm das Spleißen besser regulieren können. Hierbei war zu beobachten, dass eine Stabilisierung des P1 Stammes nahe der Bindetasche den Regulationsfaktor verbessern konnte, eine Stabilisierung am anderen Ende zeigte jedoch keinen Effekt auf die Regulation.

Fünf Konstrukte, die eine signifikante Spleißregulation in einem Minigensystem aufwiesen, wurden auf ihre Übertragbarkeit im Kontext einer vollständigen mRNA (Luziferase-Reportergen, Kontrolle des humanen Transkriptionsfaktors MAX und Kontrolle des B-Zell-Rezeptors CD20) getestet. Für alle Konstrukte konnte gezeigt werden, dass sie in den drei Genen erfolgreich das Spleißen regulieren. Hierzu wurde das Aptamer komplett mit dem Kassetten-Exon und Teile der beiden flankierenden Introns übertragen. Bei der Insertionsstelle wurde darauf geachtet, dass es sich um eine natürliche Intronposition handelt. War eine solche nicht vorhanden, wurde eine Sequenz gesucht, die Ähnlichkeiten zu den Insertionsstellen in bereits erfolgreich angewandten Systemen hatte. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Kontext-unabhängiges aptamer-kontrolliertes Exon entwickelt werden konnte, mit dem die Kontrolle jedes beliebigen Gens möglich sein sollte. Das Exon zeigt eine dosisabhängige, zelltypunabhängige Regulation, die außerdem unabhängig von der Expressionsstärke des jeweiligen Gens ist. Basierend auf der konditionalen Expression des Rezeptors CD20 durch das aptamer-kontrollierte Exon konnte ein Suizidgen aufgebaut werden, das es ermöglicht, Zellen gezielt abzutöten. Durch Tc kommt es zu einer erhöhten Expression von CD20, wodurch die Zellen in Gegenwart von Rituximab absterben. Die Anwendung eines solchen Systems könnte im Bereich der Krebstherapie oder als Sicherheitsschalter in der Gentherapie liegen.

2 Einleitung

2.1 Genexpression in Eukaryoten

Die Genexpression in eukaryotischen Zellen ist äußerst komplex (siehe Abbildung 2.1). Zuerst muss das jeweilige Gen in eine prä-mRNA (englisch: *pre-mRNA*, was für *precursor messenger RNA* steht) umgeschrieben werden. Diese prä-mRNA wird in mehreren Schritten prozessiert und anschließend durch die Translation in ein Protein übersetzt.

Damit die Transkription eines Gens beginnen kann, muss zunächst dafür gesorgt werden, dass der Promotor für Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder die Polymerase zugänglich ist, da die DNA aus Platzgründen stark komprimiert vorliegt. Diese Komprimierung wird unter anderem dadurch erreicht, dass die DNA um Histon-Proteine gewickelt ist. So kondensiert ist sie jedoch nicht für den Transkriptionsapparat zugänglich. Daher muss die DNA vor der Transkription von den Histon-Proteinen abgewickelt werden, sodass die RNA-Polymerase II (Pol II) an die DNA binden kann (Jin et al., 2005). Die Pol II ist die häufigste Polymerase und transkribiert alle für Proteine codierenden Gene. Zum Start der Transkription bindet die Pol II mit Hilfe von Transkriptionsinitiationsfaktoren an die Promotorsequenz eines Gens und beginnt *de novo* die DNA in RNA umzuschreiben (Boeger et al., 2005). Hierdurch entsteht die prä-mRNA, die durch eine Reihe an Modifikationen zur reifen mRNA wird. Eukaryotische Gene bestehen aus Exons (englisch: *expressed region*) und Introns (englisch: *intervening regions*). Vor der Translation müssen die nicht codierenden Introns in einem Prozess, der als Spleißen bezeichnet wird, aus der prä-mRNA entfernt werden. Das Spleißen ist ein hoch komplexer Prozess, der kotranskriptionell stattfindet (Kornbliht et al., 2013). Durch weitere

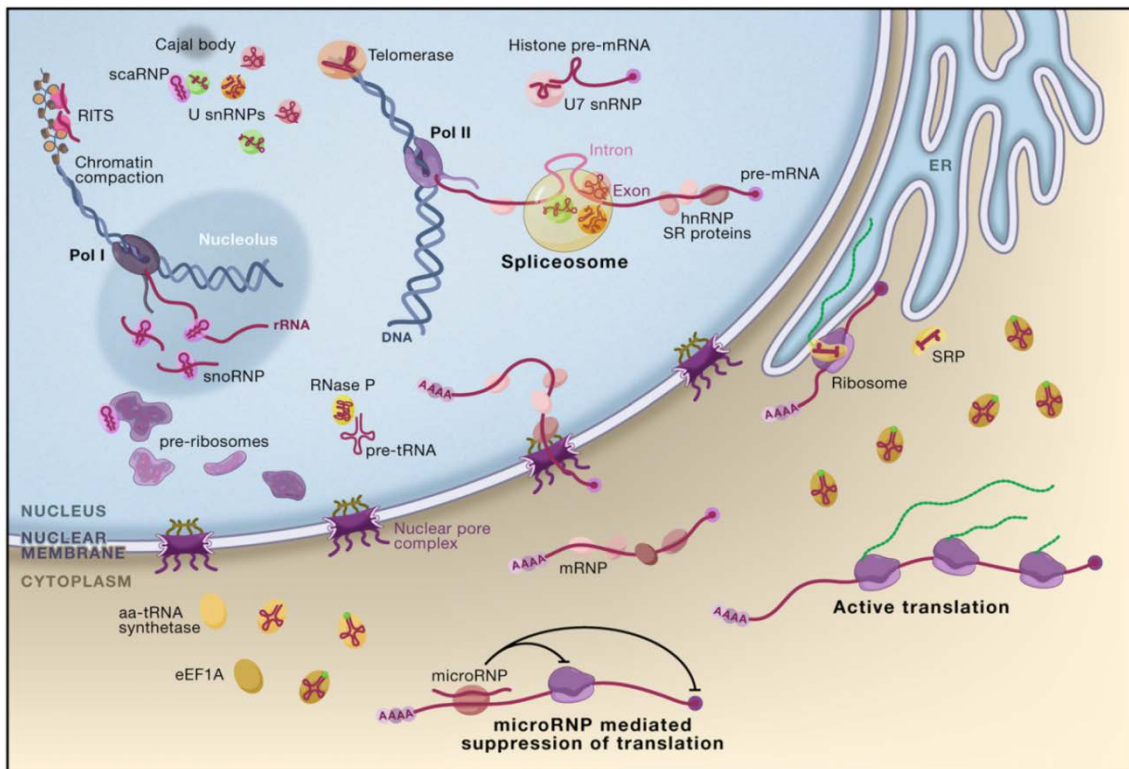


Abbildung 2.1 Übersicht über die eukaryotische Genexpression

Die eukaryotische DNA wird im Nucleus durch die RNA-Polymerase II (Pol II) in eine prä-mRNA transkribiert. Cotranskriptionell werden die Introns aus der prä-mRNA gespleißt und es wird ein 5'-Cap sowie ein Poly-A-Schwanz an die mRNA angehängt. Die modifizierte reife mRNA kann aktiv durch die Kernpore in das Cytoplasma exportiert werden, wo sie durch das Ribosom in ein Protein translatiert wird (entnommen aus (Wahl et al., 2009))

Modifikationen der Enden der prä-mRNA wird ein 5'-Cap und ein Poly-A-Schwanz angehängt. Bei dem 5'-Cap handelt es sich um ein 7-Methylguanosin, welches durch eine Guanylyltransferase an das 5'-Ende angefügt wird. Das 3'-Ende wird durch die Poly-A-Polymerase mit einem Poly-A-Schwanz modifiziert. Die Modifikationen an den Enden schützen die RNA vor einer Degradation durch Nukleasen (Bentley, 2005). Die modifizierte RNA wird aktiv als reife mRNA durch die Kernpore in das Zytoplasma exportiert. Im Zytoplasma findet anschließend die Translation der reifen mRNA durch das Ribosom statt. Das eukaryotische Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten, der 40S und der 60S Untereinheit. Damit das Ribosom die reife mRNA in ein Protein übersetzen kann, muss die 40S Untereinheit an das 5'-Cap der mRNA binden. Die 40S Untereinheit fährt nun in 5'→3' Richtung entlang der mRNA, bis es auf die Startsequenz AUG stößt. Dieser Prozess wird als Scannen bezeichnet und endet damit, dass die Initiator-tRNA mit dem AUG-Startcodon interagiert. Die große 60S Untereinheit wird nun rekrutiert, wodurch das katalytisch aktive Ribosom entsteht, welches die mRNA in eine Proteinsequenz translatieren kann (Ramakrishnan, 2010).

2.2 Spleißen

2.2.1 Übersicht über das prä-mRNA Spleißen

Unter dem Begriff „Spleißen“ versteht man das Entfernen der Introns aus einem prä-mRNA Transkript. Erstmals wurde Spleißen 1977 bei Untersuchungen mit dem humanpathogenen Adenovirus entdeckt (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977). Hierbei wurde festgestellt, dass alle mRNAs des Virus das gleiche 5'-Ende besitzen, obwohl sie für verschiedene Proteine codieren. Es stellte sich heraus, dass alle mRNAs als prä-mRNA transkribiert werden, welche dann durch einen Spleißvorgang zu unterschiedlichen reifen mRNAs prozessiert werden. Jede der resultierenden mRNAs codiert ein anderes Protein. Dieser Prozess ermöglicht es dem Virus, eine Vielfalt an Proteinen auf Grundlage eines einzelnen Gens zu erzeugen (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977).

Damit ein Intron aus der prä-mRNA entfernt werden kann, werden zwei aufeinanderfolgende Phosphoryl-Transferreaktionen (Umesterungen) benötigt. Da bei den zwei Reaktionen zwei Phosphatbindungen gespalten und zwei neue geknüpft werden, kann die Reaktion ohne die Hydrolyse eines Nukleotidtriphosphat stattfinden. Allerdings wird das Spleißen in Eukaryoten durch das Spleißosom, einen Multi-RNA-Protein-Komplex katalysiert, dessen Assemblierung mehrere Nukleotidtriphosphatmoleküle benötigt. Damit das Spleißosom ein Intron korrekt erkennen kann, bindet es an konservierte Bereiche des Introns (siehe Abbildung 2.2). Diese werden als 5' Spleißstelle (5' SS), Verzweigungspunkt (englisch: *branch point*, BP) und 3' Spleißstelle (3' SS) bezeichnet. Zwischen der 3' SS und dem BP befindet sich ein 19 bis 23 nt langer Abschnitt, der überwiegend Pyrimidine enthält und deshalb auch als Polypyrimidin-Trakt bezeichnet wird (Chua and Reed, 2001). Diese Abschnitte definieren das Intron und sind essentiell für die zwei Phosphoryl-Transferreaktionen



Abbildung 2.2 Übersicht über die konservierten Intron-Sequenzen in Eukaryoten

Jedes Intron besitzt eine 5'-Spleißstelle (5' SS) und eine 3'-Spleißstelle (3' SS). 19 bis 23 Nukleotide stromaufwärts der 3' SS befindet sich der Verzweigungspunkt (BP) mit einem konservierten Adenosin (modifiziert nach (Will and Luhrmann, 2011)).

(Will and Luhrmann, 2011).

In der ersten Phosphoryl-Transferreaktion greift ein konserviertes Adenosin des BP die 5' SS an (siehe Abbildung 2.3 A). Dies führt zur Spaltung des Zuckerphosphat-Rückgrats der prä-mRNA, wobei das 5'-Ende des Introns kovalent an die 2'-OH-Gruppe des konservierten Adenosins bindet (siehe Abbildung 2.3 B). Hierdurch bildet das Intron eine lassoformige Schleife (englisch: *lariat*). Das freie 3'-OH-Ende des Exons reagiert nun mit dem 5'-Ende des folgenden Exons, wodurch beide Exons miteinander verbunden werden und das Intron als *lariat* freigesetzt wird. Das freie *lariat* wird sehr schnell durch Nukleasen abgebaut (Newman, 2001).

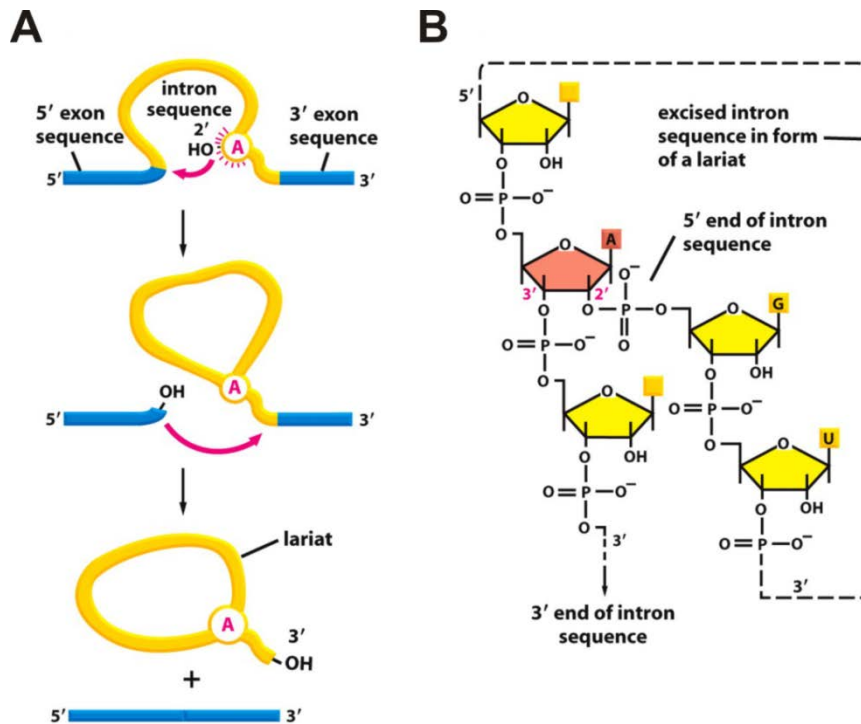


Abbildung 2.3 Phosphoryl-Transferreaktionen beim Spleißen

(A) zeigt die zwei Phosphoryl-Transferreaktionen, die für das Entfernen des Introns benötigt werden. Zuerst greift die 2'-OH Gruppe eines konservierten Adenosins das 5'-Ende des Introns an. Hierdurch bildet sich eine lassoformige Struktur aus (B). Als nächstes greift die freie 3'-OH Gruppe des Exons das 3'-Ende des Introns an, wodurch beide Exons miteinander verbunden werden und das Intron freigesetzt wird (verändert nach (Alberts, 2015)).

2.2.2 Verschiedene Intron-Gruppen

Das Spleißen der prä-mRNA-Transkripte in höheren Eukaryoten wird ausschließlich durch das Spleißosom katalysiert. Allerdings findet Spleißen nicht nur in Eukaryoten, sondern in begrenztem Maße auch in Prokaryoten und Organellen statt, in denen es kein Spleißosom oder einen ähnlichen Komplex gibt (Woodson, 1998). In diesem Fall kann sich das Intron in eine hochkomplexe Struktur falten, die in der Lage ist, die zwei benötigten Phosphoryl-Transferreaktionen zum Entfernen des Introns zu katalysieren. Solche Introns werden selbstspleißend genannt. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsmechanismen der selbstspleißenden Introns werden diese in zwei Gruppen unterteilt.

Die Gruppe I der selbstspleißenden Introns wurde erstmals durch Thomas R. Cech und seine Arbeitsgruppe in dem eukaryotischen Modellorganismus *Tetrahymena thermophila* entdeckt (Kruger et

al., 1982). Das Gruppe I Intron bildet eine Bindestelle für ein Guanosin aus, wobei es keine Rolle spielt, ob dieses als Guanosin-Nukleotid oder Guanosin-Nukleosid vorliegt. Dieses Guanosin-Molekül greift mit seiner 3'-OH-Gruppe die 5' SS an. Hierdurch wird das Zucker-Phosphat-Rückgrat gespalten und das Guanosin wird kovalent an das 5'-Ende des Introns gebunden. Das freie 3'-Ende des Exons kann nun die 3' SS angreifen, wodurch die beiden Exons miteinander verbunden werden und das Intron freigesetzt wird. In diesem Fall bildet sich kein lassoförmiges Intron (*lariat*) aus. Die Struktur der Gruppe I Introns ist sehr konserviert. Zusätzlich zu der Bindetasche für das Guanosin enthält das Intron eine Sequenz, die in der Lage ist, mit der 5' SS zu interagieren, wodurch die Position des ersten nukleophilen Angriffs definiert wird (Cech, 1990).

Die Reaktion der selbstsplicingen Introns der Gruppe II ist identisch zu der Reaktion, die durch das Spleißosom katalysiert wird. Zuerst greift ein im Intron liegendes, konserviertes und hoch reaktives Adenosin die 5' SS an und es bildet sich eine lassoförmige Struktur (*lariat*) aus. In der zweiten Reaktion greift das Exon mit seinem freien 3'-OH-Ende die 3' SS an (Batey, 2014).

Die selbstsplicingen Introns sind mit 400 bis 1.000 nt verhältnismäßig kurz und ihre Sequenz ist stark konserviert. Dies hängt damit zusammen, dass die Sequenz der selbstsplicingen Introns wichtig für die Spleißreaktion ist, da sich das Intron in eine definierte Struktur falten muss. Für die Katalyse der Spleißreaktion werden prinzipiell keine Proteine benötigt. *In vivo* sind jedoch Proteine dafür verantwortlich, dass sich die selbstsplicingen Introns in ihre richtige Konformation falten. Dies kann *in vitro* durch unphysiologisch hohe Salzkonzentrationen erreicht werden.

2.2.3 Das Spleißosom

Das Spleißosom ist in Eukaryoten für das Entfernen der Introns aus der prä-mRNA verantwortlich. Es besteht aus den fünf Untereinheiten U1, U2, U4, U5 und U6 (Brody and Abelson, 1985; Frendewey and Keller, 1985; Grabowski et al., 1985). Die Untereinheiten bilden snRNPs (englisch: *small nuclear ribonucleoprotein*, kleines Kernribonukleoprotein) und bestehen sowohl aus Proteinen als auch aus einer kleinen, nicht codierenden RNA-Komponente, der snRNA (englisch: *small nuclear RNAs*, kleine Kern-RNAs). Die snRNAs sind komplementär zu spezifischen intronischen Sequenzen, wodurch die Untereinheiten in der Lage sind, die 5' SS, den BP und die 3' SS zu erkennen. Bei dem Spleißosom handelt es sich um ein sogenanntes Ribozym, da die RNA für die Katalyse der zwei benötigten Phosphoryl-Transferreaktionen verantwortlich ist. Die Proteine helfen der RNA bei der Faltung in ihre katalytisch aktive Form. Keine der Untereinheiten alleine bildet ein aktives Zentrum, erst durch komplexe Umfaltungen der einzelnen Untereinheiten kommt es zur Ausbildung des katalytisch aktiven Spleißosoms (Brow, 2002).

Im Gegensatz zu den selbstsplicingen Introns können die eukaryotischen Introns eine Länge von mehr als 10.000 nt erreichen. Das Spleißosom muss in der Lage sein, die richtigen Spleißstellen aus einer Vielzahl ähnlicher Sequenzen zu erkennen. Darüber hinaus sind eukaryotische Introns aufgrund ihrer variablen Sequenz nicht in der Lage, eine definierte Struktur einzunehmen. Dennoch müssen die Spleißstellen für die zwei Phosphoryl-Transferreaktionen in räumliche Nähe gebracht werden. Diese Aufgabe übernimmt das Spleißosom (Brow, 2002).

Die Assemblierung der spleißosomalen Untereinheiten an die prä-mRNA ist in Abbildung 2.4 gezeigt. Diese beginnt damit, dass U1 an die 5' SS bindet. Hierfür befindet sich in der U1 snRNA am 5'-Ende eine komplementäre Sequenz zur 5' SS (Rosbash and Seraphin, 1991; Ruby and Abelson, 1988). Die Interaktion von U1 mit der mRNA ist relativ schwach und wird deshalb durch SR-Proteine (englisch: *serin-arginine-rich*, reich an Serin und Arginin) sowie Proteine des U1-Komplexes stabilisiert. Zusätzlich zu U1 binden die Proteine SF1 (in Hefe BBP) und U2AF (englisch: *U2 auxiliary factor*, U2-Hilfsfaktor) kooperativ an die mRNA. Hierbei bindet SF1 an den BP und U2AF an den Polypyrimidin-Trakt (Arning et al., 1996; Zamore and Green, 1989). SF1 interagiert mit Hilfe seines C-Terminus mit der U2AF65 Untereinheit von U2AF. U2AF35, eine Untereinheit von U2AF65, bindet an die 3' SS und erkennt dort das Dinukleotid AG der 3' SS. Dieser Komplex wird in seiner Gesamtheit auch als spleißosomaler E-Komplex bezeichnet. Er ist dafür verantwortlich, dass die Spleißstellen richtig erkannt werden (Wahl et al., 2009).

Als nächstes bindet U2 durch komplementäre Basenpaar-Interaktionen seiner snRNA an den BP des Introns, wodurch sich der spleißosomale A-Komplex bildet. Bei der Interaktion von U2 mit der prä-

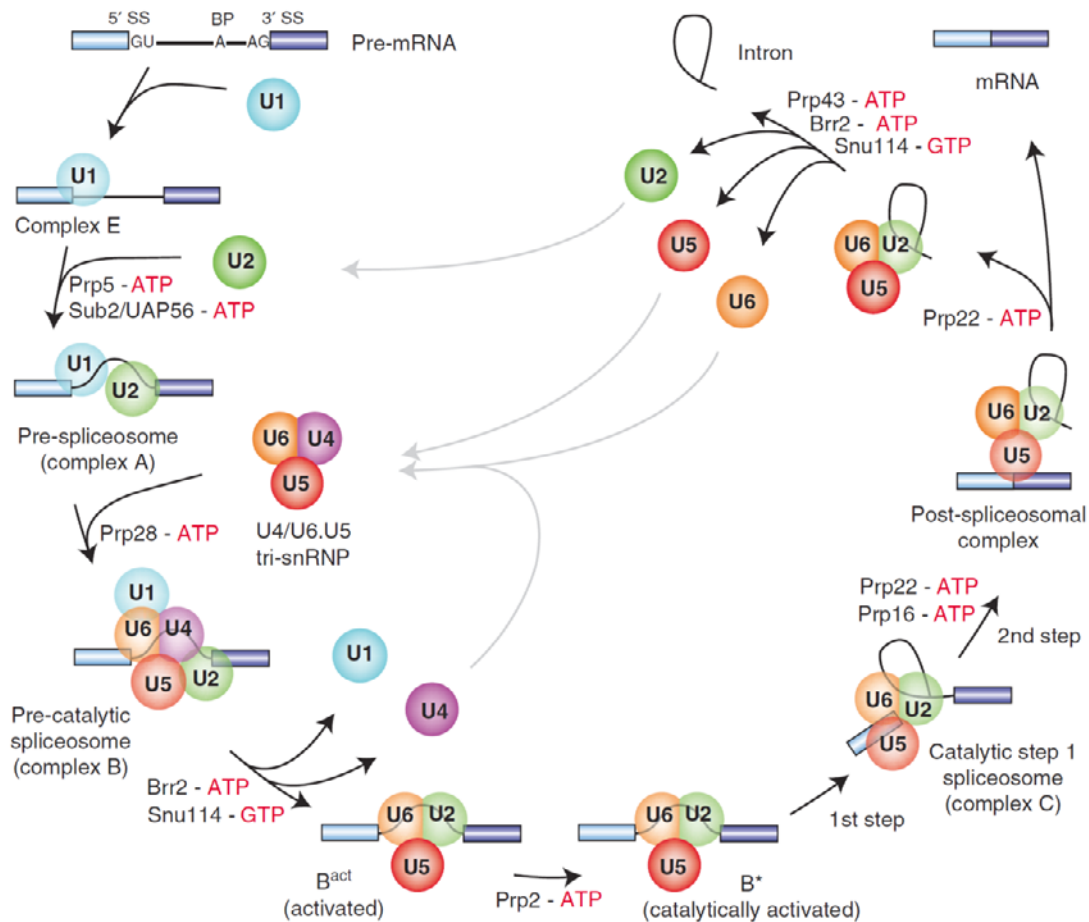


Abbildung 2.4 Aufbau des Spleißosoms

Die Abbildung zeigt die Assemblierung des katalytisch aktiven Spleißosoms (complex C) aus den Untereinheiten U1, U2, U4, U5 und U6 (Brody and Abelson, 1985). Zuerst bindet U1 an die 5' SS und U2 bindet an den BP. Hierdurch formiert sich der A-Komplex. Als nächstes binden die Untereinheiten U4, U5 und U6 als tri-snRNP an die RNA, wodurch der B-Komplex ausgebildet wird. Es kommt zu verschiedenen Umfaltungen und der Dissoziation von U1 und U4. Der so ausgebildete B*-Komplex ist in der Lage, die erste Phosphoryl-Transferreaktion zu katalysieren, wodurch der C-Komplex ausgebildet wird. Nach erneuten Umfaltungen kommt es zur zweiten Phosphoryl-Transferreaktion. Zuletzt dissoziiert das Spleißosom und die mRNA sowie das Intron werden freigesetzt (entnommen aus (Wahl et al., 2009)).

mRNA kommt es zur Hydrolyse von ATP und SF1 dissoziiert von der prä-mRNA (Das et al., 2000). Die schwache Interaktion von U2 mit der RNA wird durch die U2 Untereinheiten SF3a und SF3b, sowie durch die Arginin-Serin reiche Domäne von U2AF65 verstärkt (Wahl et al., 2009).

Die Untereinheiten U4, U5 und U6 binden als U4/U6.U5 tri-snRNP an die prä-mRNA, wodurch sich der B-Komplex ausbildet. Dieser Komplex enthält alle Untereinheiten des Spleißosoms, allerdings ist er noch nicht katalytisch aktiv. Es bedarf immer noch einiger Umfaltungen, die dazu führen, dass U1 und U4 von der prä-mRNA dissoziieren. Dieser Komplex wird auch als B*-Komplex bezeichnet. (Will and Luhrmann, 2011). Der B*-Komplex katalysiert die erste Phosphoryl-Transferreaktion, was im C-Komplex resultiert. Vor der nächsten Phosphoryl-Transferreaktion kommt es erneut zu einigen Umfaltungen, bevor die beiden Exons miteinander ligiert und das Intron freigesetzt wird (Wahl et al., 2009).

Nach der zweiten Phosphoryl-Transferreaktion zerfällt das Spleißosom in seine Untereinheiten und die gespleißte mRNA wird freigesetzt. Die freien Untereinheiten können nun erneut zum katalytisch aktiven Spleißosom assoziieren, wodurch der Kreislauf von vorne beginnt (Wahl et al., 2009).

Generell fällt beim Aufbau des Spleißosoms auf, dass die gleichen Bindesequenzen (5' SS, BP und 3' SS) mehrfach durch unterschiedliche snRNPs erkannt werden. Außerdem handelt es sich bei der Interaktion der snRNPs mit der RNA immer um schwache Wechselwirkungen, die jedoch durch die Interaktion mit anderen Komponenten des Spleißosoms verstärkt werden. Diese Kontrollmechanismen bilden die Grundlage des alternativen Spleißens und stellen sicher, dass die snRNPs aus einer Vielzahl ähnlicher Sequenzen die richtigen Spleißstellen erkennen (Wahl et al., 2009).

2.2.4 Exon- vs. Introndefinition

Die Größe der Exons und Introns unterscheidet sich in höheren und niedrigen Eukaryoten. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sowie die kleine Taufliege *Drosophila melanogaster* haben relativ kurze Introns, die meist nicht länger als 100 nt sind. Humane Introns können hingegen mehrere 1.000 bis 10.000 nt lang sein. Hierbei stellt sich die Frage, wie das Spleißosom in der Lage ist, die Grenzen der Introns bzw. Exons zu erkennen. Es gibt die Möglichkeit, dass zuerst die Exons erkannt und dann das Intron entfernt wird (Exon-Definition) oder dass zuerst das Intron erkannt wird (Intron-Definition) (Berget, 1995; Robberson et al., 1990). In niederen Eukaryoten mit kurzen Introns (kleiner 250 bp) wird das Introns durch Intron-Definition erkannt, während es in höheren Eukaryoten mit sehr langen Introns durch Exon-Definition erkannt wird. Bei der Exon-Definition findet eine Art Kommunikation von der 5' SS über das Exon zur stromabwärts gelegenen 3' SS statt. Für das erste und das letzte Exon einer prä-mRNA gibt es jedoch keine korrespondierende 3' SS bzw. 5' SS. In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass für die Definition des ersten Exons das 5'-Cap essentiell ist (Izaurralde et al., 1994). Das letzte Exon wird durch seine 3' SS und die Polyadenylierungs-Faktoren definiert (De Conti et al., 2013).

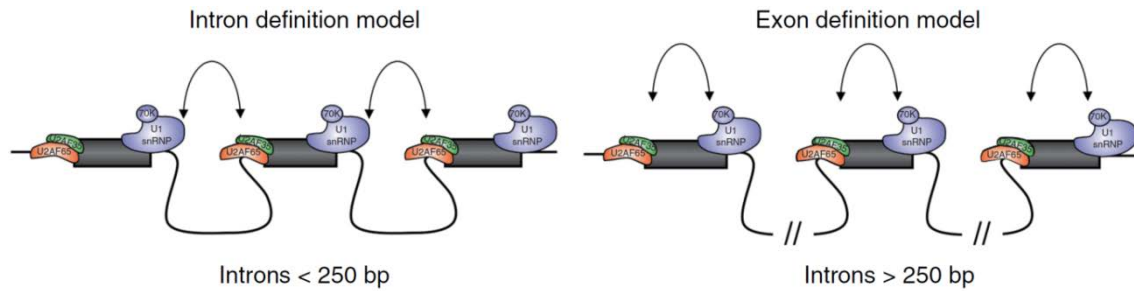


Abbildung 2.5 Exon- und Intron-Definition

Links ist das Modell der Intron-Definition gezeigt. Hierbei wechselwirken die Untereinheiten des Spleißosoms über das Intron miteinander. Dies ist bei kurzen Introns (kleiner 250 bp) und langen Exons der Fall. Das rechte Modell stellt die Exon-Definition dar. In diesem Modell sind die kurzen Exons durch relativ lange Introns (größer 250 bp) unterbrochen, weshalb die Kommunikation über das Exon verläuft (entnommen aus (De Conti et al., 2013)).

2.2.5 Alternatives Spleißen

Niedere Eukaryoten wie *S. cerevisiae* haben nur wenige Gene, die Introns enthalten (Parenteau et al., 2008). Diese Gene werden meist konstitutiv gespleißt, wobei das Intron immer an den gleichen Positionen aus der prä-mRNA entfernt wird. Höhere Eukaryoten sind hingegen in der Lage, aus einem Gen durch alternatives Spleißen verschiedene mRNAs zu erzeugen. Hierdurch können höhere Eukaryoten ihre Proteindiversität um ein Vielfaches steigern. Der Mensch hat mit seinen 20.000 Genen nur etwa 1.000 Gene mehr als *Caenorhabditis elegans* (19.000 Gene). Allerdings ist der Mensch durch alternatives Spleißen in der Lage, eine Vielzahl an Proteinen herzustellen. Deshalb wird vermutet, dass alternatives Spleißen für die höhere Komplexität von höheren Eukaryoten mitverantwortlich ist (Kornblihtt et al., 2013). Generell werden in Säugetieren ca. 95% der Gene alternativ gespleißt (Barash et al., 2010; Pan et al., 2008), wobei zwischen verschiedenen Arten des alternativen Spleißens unterschieden wird (siehe Abbildung 2.6). Eine Form ist die Verwendung von Kassetten-Exons. Hierbei wird ein Exon entweder in die mRNA eingebaut oder nicht. In höheren Eukaryoten ist dies mit 40% die häufigste Form des alternativen Spleißens (Alekseyenko et al., 2007; Sugnet et al., 2004). In niederen Eukaryoten wie *S. cerevisiae* kommen Kassetten-Exons hingegen gar nicht vor.

Eine weitere Form des alternativen Spleißens ist die Verwendung von alternativen 5' SS bzw. 3' SS. Diese Formen des alternativen Spleißens treten auf, wenn es in einem Intron mehrere 5' SS bzw. 3' SS gibt. Es ist auch möglich, dass ein Intron in der prä-mRNA verbleibt. Bei dieser Form des alternativen Spleißens spricht man von der *Intron Retention*. Diese Form des alternativen Spleißens ist sowohl in Wirbeltieren als auch in Wirbellosen die seltenste Form des alternativen Spleißens. In Pflanzen, Pilzen und Protozoen ist *Intron Retention* hingegen weit verbreitet (Kim et al., 2008b). Darüber hinaus gibt es noch Exons, deren Einbau sich wechselseitig ausschließt. Wird ein Exon in die mRNA eingebaut, so wird automatisch das andere Exon übersprungen.

Die Diversität des alternativen Spleißens führt dazu, dass dieser Prozess genau kontrolliert werden muss. Hierbei spielen sogenannte Spleiß-*Enhancer* und Spleiß-*Silencer* eine wichtige Rolle. Bei den *Enhancern* handelt es sich überwiegend um Vertreter der SR-Proteine, während es sich bei *Silencern* hauptsächlich um hnRNPs (englisch: *heterogenous nuclear ribonucleoproteins*) handelt.

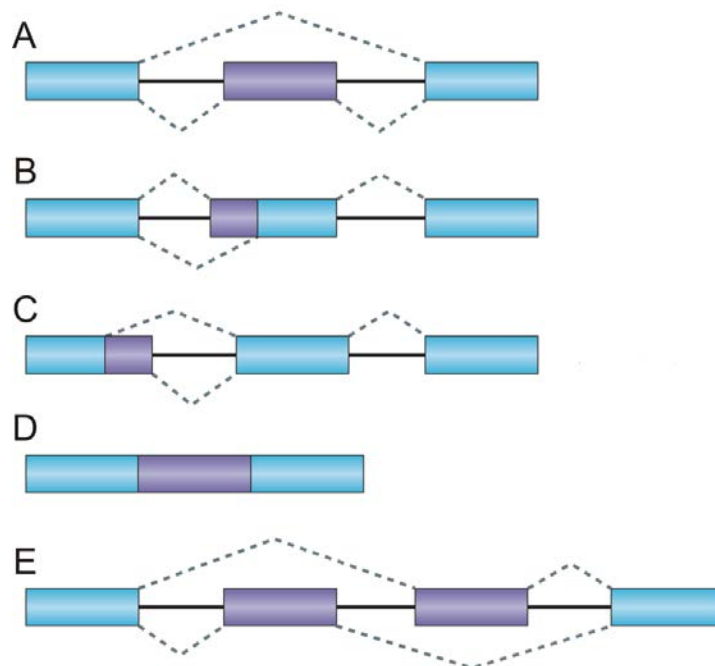


Abbildung 2.6 Übersicht über das alternative Spleißen

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Formen des alternativen Spleißens. **(A)** Kassetten-Exon, ein Intron kann in die mRNA eingebaut oder übersprungen werden. Es können verschieden 3' SS **(B)** oder 5' SS **(C)** verwendet werden. **(D)** stellt *Intron Retention* dar, hierbei kann ein Intron in der mRNA bleiben. **(E)** stellt eine Form des alternativen Spleißens dar, bei der sich zwei Exons gegenseitig ausschließen. Ist das eine Exon Bestandteil der reifen RNA, wird das andere automatisch durch Spleißen entfernt (verändert nach (Keren et al., 2010)).

Binden die *Enhancer* bzw. *Silencer* im Exon werden sie als ESE (englisch: *exonic splicing enhancer*) bzw. ESS (englisch: *exonic splicing silencer*) bezeichnet. Binden sie hingegen im Intron, nennt man sie ISE (englisch: *intronic splicing enhancer*) bzw. ISS (englisch: *intronic splicing silencer*) (siehe Abbildung 2.7). Diese *Enhancer* und *Silencer* sind maßgeblich an der Regulation des alternativen Spleißens beteiligt. Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben wurde, binden die einzelnen Untereinheiten des Spleißosoms nur schwach an die RNA. Die Bindung der Untereinheiten wird durch die *Enhancer* verstärkt bzw. durch die *Silencer* verhindert (Kornblihtt et al., 2013).

Die Stärke der Spleißstelle (5' SS, 3' SS) ist ebenfalls wichtig für die Kontrolle des Spleißens. Ist eine Spleißstelle komplementär zu der entsprechenden Bindestelle der snRNA, so handelt es sich um eine starke Spleißstelle, kommt es zu Fehlpaarungen einzelner Positionen, werden weniger Wasserstoffbrücken zwischen der snRNA und der Spleißstelle ausgebildet und die Spleißstelle ist schwächer. Durch einen ESE bzw. einen ISE kann eine schwache Spleißstelle verstärkt werden, wohingegen ein ISS oder ein ESS verhindern kann, dass eine starke Spleißstelle erkannt wird. Somit ist das Zusammenspiel von *Enhancern* und *Silencern* maßgeblich für die Kontrolle des alternativen Spleißens verantwortlich (Kornblihtt et al., 2013).

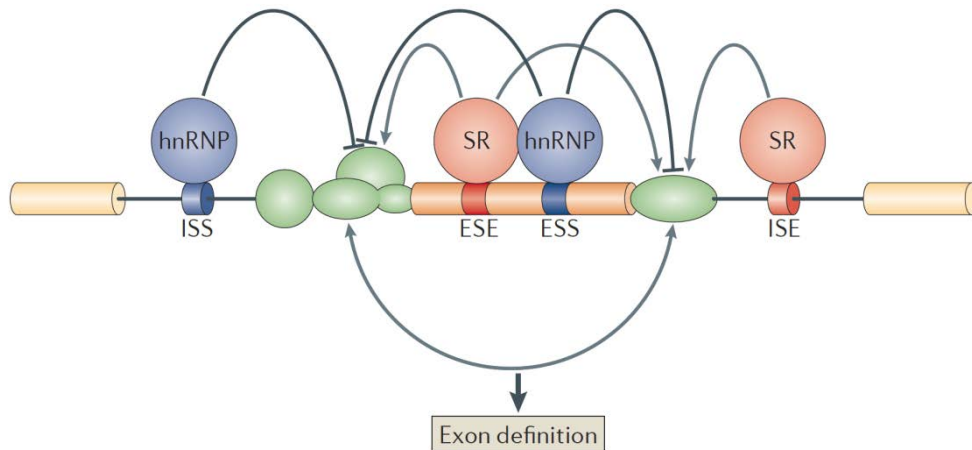


Abbildung 2.7 Übersicht über verschiedene Spleißfaktoren

Die Erkennung einer Spleißstelle durch das Spleißosom kann durch verschiedenen Spleißfaktoren beeinflusst werden. Wird eine Spleißstelle besser erkannt, so spricht man von einem *Enhancer*, wird sie schlechter erkannt, so handelt es sich um einen *Silencer*. Sitzt der *Enhancer* im Exon wird er als ESE (englisch: *exonic splicing enhancer*) bezeichnet, sitzt er jedoch im Intron, so spricht man von einem ISE (englisch: *intrinsic splicing enhancer*). Bei *Silencern* ist die Nomenklatur ähnlich, ein *Silencer* im Exon wird als ESS (englisch: *exonic splicing silencer*) bezeichnet und ein *Silencer* im Intron als ISS (englisch: *intrinsic splicing silencer*) bezeichnet. Bei Enhancern handelt es sich meist um Vertreter der SR-Proteine die reich an Serin und Arginin sind, wobei Vertreter der *Silencer* meist zu den hnRNPs (englisch: *heterogenous ribonucleoprotein particle*) gehören (entnommen aus (Kornblihtt et al., 2013))

2.2.6 Fehlspleißen verursacht Krankheiten

Alternatives Spleißen wird äußerst genau kontrolliert. Kommt es zu Fehlern kann dies schwere Krankheiten hervorrufen (Tazi et al., 2009). Eine Mutation einer *Enhancer*- oder *Silencer*-Bindestelle kann dazu führen, dass falsche Spleißstellen verwendet werden. Etwa 60% aller Mutationen, die eine Krankheit hervorrufen, sind auf Spleißfehler zurückzuführen (Lopez-Bigas et al., 2005). Doch nicht nur Mutationen in *Enhancer*- oder *Silencer*-Sequenzen wirken sich auf das Spleißen aus. Auch Mutationen in den Untereinheiten des Spleißosoms können zu Krankheiten führen. *Retinitis Pigmentosa* ist eine erbliche, nicht heilbare Augenkrankheit, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:40.000 auftritt. Bei betroffenen Patienten kommt es durch Zerstörung der Netzhaut zum Erblinden. Ein Grund für die Krankheit sind Mutationen in den Genen *PRP31*, *PRPF8* und *HPRP3*. Alle drei Gene sind an der Assemblierung des trimeren Komplexes U4/U6.U5 beteiligt, der eine essentielle Komponente des Spleißosoms darstellt (Wang and Cooper, 2007).

Durch Veränderungen des Spleißens kann es auch zur Entstehung von Krebs kommen. Oft ist dies durch eine Änderung der Expression der SR-Proteine bedingt. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem SR-Protein SF2/ASF um ein Protoonkogen handelt. Die Überexpression von SF2/ASF führte in Mäusen zur Bildung von Tumoren (Wang and Cooper, 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von SF2/ASF das alternative Spleißen des Protoonkogens *RON* (Tyrosin-Kinase-Rezeptor) kontrolliert. Durch das Überspringen von Exon 11 wird die konstitutiv aktive Variante Δ RON exprimiert, die vermehrt in Brustkrebs-Zellen gefunden wurde. Alternatives Spleißen von Exon 11 wiederum wird durch die Expressionstärke von SF2/ASF beeinflusst (Ghigna et al., 2005).

Das veränderte Spleißen in Krebszellen bietet jedoch auch einen Diagnose-Ansatz. Durch Mikroarrays kann das Spleißverhalten von Genen gezielt analysiert werden, um Krebs frühzeitig zu erkennen und

Tumore genau zu charakterisieren, was für deren Behandlung von entscheidender Bedeutung ist. Erste Ansätze dieser Methode sind vielversprechend. Die Menge spezifischer Spleiß-Isoformen konnte nicht nur einzelnen Krebs-Arten zugeordnet werden, es konnten darüberhinaus unterschiedliche Spleiß-Isoformen verschiedenen Krebsstadien zugeordnet werden (Gardina et al., 2006; Religio et al., 2005).

2.3 Katalytische und regulatorische RNA-Moleküle

2.3.1 Die „RNA-Welt“ Theorie

In den letzten Jahrzehnten hat sich immer mehr gezeigt, dass RNA nicht nur ein Zwischenprodukt der Genexpression ist, sondern dass sie in der Lage ist, eine Vielzahl von Aufgaben zu übernehmen, von denen man ursprünglich dachte, dass diese nur durch Proteine ausgeführt werden können (Breaker, 2012). Vor allem die Tatsache, dass der katalytische Schritt im Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms durch RNA katalysiert wird (Ramakrishnan, 2010), hat die Theorie untermauert, dass nicht DNA, sondern RNA der Ursprung des Lebens war. Diese Theorie besagt, dass unserer heutigen Welt, in der hauptsächlich Proteine für die Katalyse verantwortlich sind, eine „RNA-Welt“ vorausging (Joyce and Orgel, 1993). In dieser „RNA-Welt“ gab es primitive Zellen, deren Informationsträger RNA war. Das Bartel-Labor konnte 2001 zeigen, dass RNA ohne Proteine repliziert werden kann. Sie konnten durch Selektion ein RNA-Molekül finden, das in der Lage war, an eine Matrize zu binden und ausgehend von einem Starter-Oligonukleotid den Komplementärstrang zu synthetisieren (Johnston et al., 2001). Solche katalytisch aktiven RNAs werden auch als Ribozyme bezeichnet. Es gibt eine Reihe an Ribozymen, die in der Lage sind, chemische Reaktionen zu katalysieren. Die bekanntesten Ribozyme der heutigen Zeit sind sicherlich das Ribosom und das Spleißosom. Aus diesem Grund wird vermutet, dass es sich bei diesen Komplexen um „Fossile“ aus der RNA-Welt handelt (Alberts, 2015).

2.3.2 Regulatorische RNAs

Sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten gibt es nicht codierende RNAs (ncRNA, englisch: *non coding RNA*) die verschiedenste Aufgaben übernehmen. ncRNAs wurden unter anderem in Form von snRNAs als strukturelle Bestandteil der spleißosomalen Untereinheiten in Abschnitt 2.2.3 vorgestellt. Darüber hinaus gibt es in Eukaryoten und in Prokaryoten eine Vielzahl an ncRNAs, die auf RNA-Ebene die Genexpression kontrollieren. Durch die Regulation auf RNA-Eben können die Zellen schneller auf äußere Einflüsse reagieren, da die mRNA meist schon vorhanden ist und nur translatiert werden muss. Außerdem können die Zellen durch eine weitere Regulationsmöglichkeit ihre Genexpression besser an die äußeren Bedingungen anpassen. Obwohl ncRNAs in Eu- und Prokaryoten vorkommen, unterscheidet sich die Regulation durch ncRNAs in den unterschiedlichen Dömänen des Lebens (He and Hannon, 2004; Storz et al., 2011).

In Prokaryoten können ncRNAs in Form von kleinen RNAs (sRNA, englisch: *small RNA*) die Genexpression regulieren, indem sie in den meisten Fällen nahe oder direkt auf der ribosomalen Bindestelle binden und hierdurch die Translation blockieren. Jedoch gibt es auch Fälle, in denen die sRNAs weit entfernt von der ribosomalen Bindestelle binden und dafür sorgen, dass sich die mRNA Stabilität verändert. Einige mRNAs bilden eine Struktur aus, die die ribosomale Bindestelle blockiert. Bindet eine sRNA an die mRNA wird die Struktur aufgelöst und die Translation wird angeschaltet.

(Storz et al., 2011). Eine weitere Form von sRNAs sind so genannte Gegensein-RNAs (asRNA, englisch: *antisense RNA*). Diese entstehen, wenn neben dem codogenen Strang auch der nicht codogene Strang transkribiert wird. Hierdurch entsteht eine RNA, die komplementär zu der mRNA ist und hierdurch die Translation blockieren kann (Georg and Hess, 2011). Darüber hinaus gibt es in Prokaryoten *cis*-regulatorische RNA-Elemente, die in der Lage sind, als sogenannte Riboswitche die Genexpression zu regulieren (Breaker, 2012). Ein Riboswitch ist ein Strukturelement der RNA, das aus einer Aptamer-Domäne und einer Expressionsplattform besteht. Durch die Interaktion eines Liganden mit der Aptamer-Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung der Expressionsplattform (Breaker, 2012). Diese Konformationsänderung kann dazu führen, dass die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) maskiert wird und hierdurch die RNA nicht mehr translatiert wird (siehe Abbildung 2.8). Bei einem Riboswitch, der die Genexpression auf Transkriptionsebene kontrolliert, kann die Expressionsplattform eine Terminatorstruktur ausbilden (AUS-Schalter) oder auflösen (AN-Schalter)(Breaker, 2012).

In Eukaryoten gibt es ebenfalls ncRNAs, die an der Genexpression beteiligt sind. Hierzu zählen unter anderem die microRNAs (miRNA). Der Vorläufer der miRNA wird im Zellkern transkribiert und bildet eine nicht perfekte Stammschleifenstruktur aus. Noch im Zellkern wird die Vorläufer miRNA durch das Enzym Droscha zu einer ca. 70 nt langen RNA prozessiert, die auch als prä-miRNA bezeichnet wird. Die prä-miRNA wird durch Exportin 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert und dort durch Dicer weiter zu einem 21 bis 25 nt langen Doppelstrang prozessiert. Die einzelsträngige miRNA bildet mit einer Reihe von Proteinen den sogenannten RISC-Komplex (englisch: *RNA-induced silencing komplex*, RNA induzierter Stilllegungsprozess). Hierbei wird gezielt die miRNA in den RISC-Komplex eingebaut, während der Gegenstrang degradiert wird (He and Hannon, 2004). Die miRNA ist in der

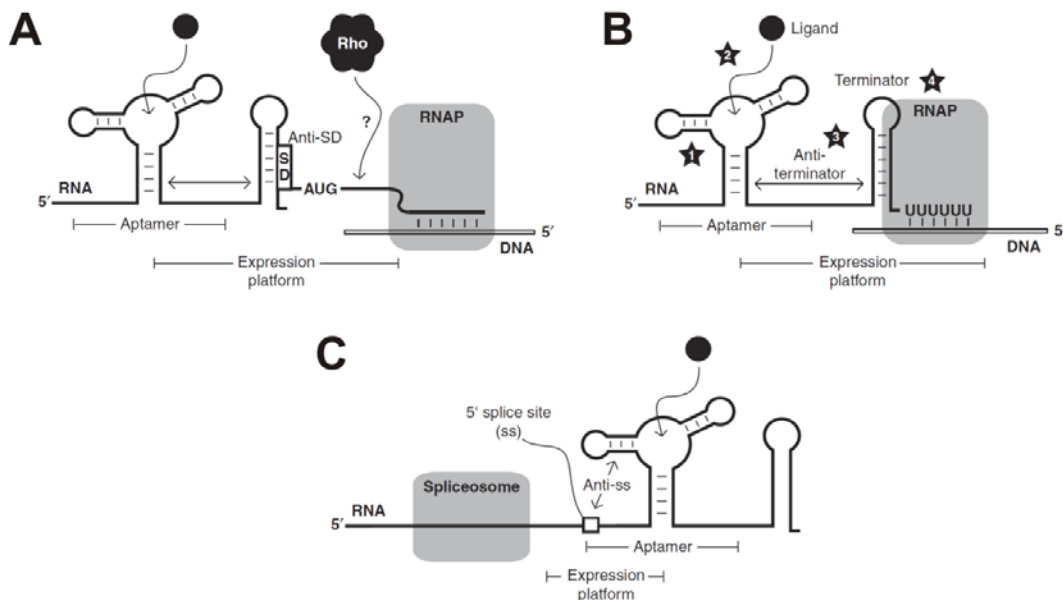


Abbildung 2.8 Wirkmechanismen natürlicher Riboswitche

In der Abbildung sind die häufigsten Wirkungsweisen von natürlichen Riboswitchen dargestellt. **(A)** zeigt die Regulation der Translation. Hierbei wird in Abhängigkeit des Liganden die Shine-Dalgarno-Sequenz blockiert, wodurch die RNA nicht translatiert werden kann. **(B)** stellt die Regulation der Transkription dar. In diesem Fall kommt es in Abhängigkeit des Liganden zur Ausbildung einer Terminator-Stammschleife wodurch die Transkription abgebrochen wird. In Eukaryoten kontrollieren Riboswitche meist das alternative Spleißen, wobei in Abhängigkeit des Liganden eine zweite Spleißstelle verwendet wird **(C)** (Verändert nach (Breaker, 2012)).

Lage, mit komplementären Bereichen zu paaren und so den RISC-Komplex an eine spezifische RNA-Sequenz zu geleiten. Meistens findet die Interaktion im 3' untranslatierten Bereich (englisch: *untranslated region*, UTR) der mRNA statt wodurch es zur Repression der Translation kommt. In wenigen Fällen spaltet das Argonaut-Protein, welches Teil des RISC ist, den Poly-A-Schwanz der mRNA ab, wodurch diese abgebaut wird. Eine weitere Form der durch RNAs hervorgerufenen Genregulation ist die RNA-Interferenz (RNAi) (Fire et al., 1998). Die RNA-Interferenz wird durch doppelsträngige RNAs, die von Viren oder Transposons stammen können, ausgelöst. Diese doppelsträngigen RNAs werden im Zytoplasma ebenfalls durch Dicer in eine 21-25 nt lange sogenannte siRNA (englisch *small interfering RNA*, kleine Interferenz-RNA) prozessiert und als Einzelstrang in den RISC-Komplex eingebaut. Hierdurch können sie den RISC-Komplex ähnlich wie die miRNAs zu seiner Ziel RNA führen.

RNAi lässt sich in vielen Organismen dazu verwenden, um gezielt die Expression einzelner Proteine zu unterbinden. Dies gelang erstmals 1998 in *Caenorhabditis elegans*. Hierbei konnte durch künstlich hergestellte doppelsträngige RNA die Expression einzelner Gene kontrolliert werden (Fire et al., 1998). Seitdem hat sich RNAi zu einem nützlichen Werkzeug entwickelt, mit dem in unterschiedlichsten eukaryotischen Organismen die Genexpression kontrolliert werden kann.

Die Regulation der Genexpression in Eukaryoten über Riboswitche spielt eher eine untergeordnete Rolle. Die wenig bekannten Beispiele wurden in Genen gefunden, die an der Biosynthese von Thiaminpyrophosphat (TPP) beteiligt sind. Der TPP-Riboswitch aus *Arabidopsis thaliana* befindet sich im 3' UTR des Gens *THIC* und kontrollieren dort das alternative Spleißen. In Abwesenheit von TPP ist die 5' SS durch den Riboswitch maskiert, wodurch die prä-mRNA nicht gespleißt wird. Hierdurch wird ein kurzer 3' UTR ausgebildet und die mRNA wird translatiert. In Anwesenheit von TPP bindet dieses an den Riboswitch, wodurch aufgrund einer Konformationsänderung die 5' SS frei wird und ein sehr langer 3' UTR ausgebildet wird (siehe Abbildung 2.8 C). Dies führt zu einer instabilen mRNA die schnell degradiert wird (Wachter et al., 2007). In *Neurospora crassa* wird das Gen *NMT1* ebenfalls durch einen TPP-Riboswitch reguliert. Hierbei wird in Anwesenheit von TPP eine alternative 5' SS verwendet, wodurch ein stromaufwärts liegendes Startcodon inseriert wird. Dies führt zur Translation eines anderen Leserahmens, wodurch die Expression von *NMT1* verringert wird (Cheah et al., 2007).

2.3.3 Aptamere

Wie in dem vorangehenden Abschnitt schon beschrieben wurde, sind natürliche Riboswitche in der Lage, mit ihrer Aptamer-Domäne einen Liganden spezifisch und hoch affin zu binden. Durch ein *in vitro* Selektionsverfahren namens SELEX (englisch: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*) ist es möglich, Oligonukleotide zu selektieren, die beliebige Liganden hoch affin und spezifisch binden können (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). Zu Beginn der Selektion wird eine Bibliothek mit 10^{14} bis 10^{15} verschiedenen Sequenzen benötigt. Diese Ausgangsbibliothek wird mit einem immobilisierten Liganden inkubiert. Durch einen Waschschrift werden alle Oligonukleotide entfernt, die nicht in der Lage sind, den Liganden zu binden. Anschließend werden die mit dem Liganden interagierenden Oligonukleotide eluiert und durch PCR bzw. im Falle von RNA durch RT-PCR, amplifiziert. Mit dem erhaltenen Pool wird eine erneute Runde SELEX durchgeführt. Dieser Vorgang kann so lange wiederholt werden, bis der Pool in der Lage ist, den Liganden zu binden. Anschließend werden einzelne Kandidaten des Pools sequenziert und weiter

charakterisiert (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). Solche *in vitro* selektierten Oligonukleotide werden als Aptamere bezeichnet und können entweder aus RNA oder einzelsträngiger DNA bestehen.

Eine wesentliche Eigenschaft von Aptameren ist ihre hohe Selektivität gegenüber ihrem Liganden. Sie falten sich in eine spezifische dreidimensionale Struktur, die in der Lage ist, den Liganden mit einer Dissoziationskonstante (K_D) im nano- oder sogar im picomolaren Bereich zu binden. Aptamere erkennen, ähnlich wie Antikörper, spezifische Strukturelemente, weswegen sie auch als „chemische Antikörper“ bezeichnet werden. Aptamere bieten gegenüber Antikörpern einige Vorteile. So werden sie nicht vom Immunsystem erkannt, wodurch es zu keiner Abwehrreaktion kommt. Sie können sich nach einer Denaturierung wieder in ihre Struktur zurückfalten und können leicht und relativ billig in großem Maßstab hergestellt werden. Für die Produktion von Aptameren werden im Gegensatz zu Antikörpern keine Tiere benötigt. Darüber hinaus sind Aptamere in der Lage, verschiedenste Liganden wie Ionen, Toxine, Peptide, Proteine, Viren, Bakterien, Zellen und sogar Gewebe zu erkennen. (Sun et al., 2014).

Aufgrund ihrer guten Eigenschaften gibt es verschiedenste Ansätze für Aptamere in der Diagnostik, Therapie und zur Kontrolle der Genregulation. Das Aptamer AS1411 bindet das Protein Nucleolin, welches überwiegend auf der Oberfläche von einigen Krebszellen vorkommt. Durch die Bindung an Nucleolin wird AS1411 in die Zelle aufgenommen und verhindert, dass Nucleolin an die mRNA von BCL2 binden kann. Dies verringert die Stabilität der BCL2 mRNA und somit die Proteinexpression. Die geringere BCL2 Expression führt vermutlich zur Apoptose der jeweiligen Zelle (Soundararajan et al., 2008). Zu AS1411 gibt es eine klinische Studie der Phase II in der gezeigt werden konnte, dass das Aptamer gezielt Krebszellen erkennt und kaum Nebenwirkungen für den Menschen aufweist (Rosenberg et al., 2014).

Durch die Fusion von einem Aptamer mit einer siRNA kann man Chimäre herstellen, die gezielt Krebszellen erkennen und dort ihre Wirkung entfalten können. Das Sullenger-Labor verwendete ein Aptamer, welches das in Prostatakrebszellen überexprimierte Oberflächenprotein PSMA erkennt und fusionierte es mit einer siRNA gegen BCL2. Hierdurch wird die Chimäre durch das Aptamer gezielt zu den Krebszellen geleitet, wo die siRNA durch die Regulation von BCL2 den Zelltod auslöst. Solche Chimäre bieten eine gezielte Möglichkeit der Krebstherapie (McNamara et al., 2006).

Darüber hinaus sind Aptamere in der Lage, in Form von synthetischen Riboswitchen die Genexpression zu regulieren. Ein Beispiel ist das Neomycin-Aptamer, das im 5' UTR die Assemblierung des katalytisch aktiven 80S Ribosoms verhindert. Hierdurch ist das Neomycin-Aptamer in der Lage die Translation zu kontrollieren (Weigand et al., 2008).

Obwohl es eine Vielzahl an Aptameren gibt, konnten bis jetzt nur wenige Aptamere zum Aufbau von Riboswitchen verwendet werden. Hierzu zählen unter anderem das Theophyllin-Aptamer, das Neomycin-Aptamer, das Tetrazyklin(Tc)-Aptamer und das Malachitgrün-Aptamer. (Berens et al., 2001; Grate and Wilson, 1999; Jenison et al., 1994; Weigand et al., 2008). Es stellt sich natürlich die Frage, was dazu führt, dass ein Aptamer als Riboswitch für die Genexpression verwendet werden kann? Anhand des Neomycin-Aptamers konnte gezeigt werden, dass es wichtig ist, die erhaltenen Aptamere aus der SELEX noch einmal in einem *in vivo*-Screeningsystem zu testen. Das Aptamer R23 aus der Neomycin-SELEX, war nicht in der Lage, die Genexpression zu kontrollieren, obwohl es Neomycin mit

einer sehr hohen Affinität bindet. Erst durch ein *in vivo*-Screening konnte das Aptamer N1 gefunden werden, welches die Translation in Hefe regulieren kann (Weigand et al., 2008). Der Unterschied zwischen R23 und N1 besteht darin, dass es bei N1 durch die Interaktion mit dem Liganden zu einer Konformationsänderung kommt (Weigand et al., 2011). Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass diese Konformationsänderung wichtig dafür ist, dass ein Aptamer auch als Riboswitch aktiv ist (Berens et al., 2015; Wittmann and Suess, 2012).

2.4 Das Tetrazyklin-bindende Aptamer

Tc ist aufgrund seiner guten Verträglichkeit und der guten antibiotischen Wirkung gegen die meisten Mikroorganismen ein weit verbreitetes Antibiotikum (Schnappinger and Hillen, 1996). Anfang des 21. Jahrhunderts war die Wirkung von Tc zwar bekannt und man wusste unter anderem, dass Tc an das Ribosom bindet und dort die Bindung einer neuen Aminoacetyl-tRNA verhindert. Es war ebenfalls bekannt, dass es neben dieser hoch affinen Bindestelle noch weitere Bindestellen für Tc an beiden ribosomalen Untereinheiten (30S und 50S Untereinheit) gibt (Epe et al., 1987; Spahn and Prescott, 1996). Allerdings war es nicht möglich, die Tertiärstruktur der Tc-Bindestellen zu identifizieren. Um nun mehr über eine mögliche Struktur der Bindestellen für Tc zu erfahren, wurde eine *in vitro* Selektion durchgeführt. Diese sollte es ermöglichen, über die erhaltenen Aptamere Informationen über die RNA-Bindung von Tc zu erhalten und hierdurch mehr über die Wirkungsweise des Antibiotikums zu erfahren.

Die Selektion des Tc-Aptamers gelang 2001 im Labor von René Schröder (Berens et al., 2001). Für die *in vitro* Selektion wurde ein Pool mit 74 randomisierten Nukleotiden verwendet. Nach 15 Runden SELEX ergab sich eine Anreicherung und durch Analyse des Pools konnte das Aptamer cb28 identifiziert werden, welches Tc mit einer ähnlichen Affinität wie das Ribosom bindet (K_D 1 μ M). Durch Verkürzungen von cb28 entstand ein aus 60 nt bestehendes Minimalmotiv. Eine leicht modifizierte Variante dieses Minimalmotivs ist in der Lage, Tc mit einem K_D von 770 pM zu binden (siehe Abbildung 2.9 B). Dies ist der niedrigste K_D , der bis jetzt für Aptamere, die kleine Moleküle binden, veröffentlicht wurde (Muller et al., 2006). Die Struktur des Aptamers wurde sowohl durch enzymatisches und chemisches Probing als auch durch Röntgenkristallographie analysiert (Hanson et al., 2005; Xiao et al., 2008). Es bildet eine h-förmige Struktur aus, die aus den Stämmen P1, P2 und P3 sowie den Schleifen L2 und L3 besteht (siehe Abbildung 2.9). Die Stämme P1 und P2 werden durch den Bereich B1-2 und die Stämme P2 und P3 durch den Bereich B2-3 verbunden. Die Helices P1 und P3 sowie die Schleife L3 sind in der Tertiärstruktur aufeinander gestapelt. Die beiden einzelsträngigen Bereiche B2-3 und B1-2 bilden eine unkonventionelle Helix aus, auf der P2 gestapelt ist. An der Ausbildung dieser Tertiärstruktur sind mindestens drei Magnesiumionen beteiligt (Xiao et al., 2008).

Die Bindetasche wird durch Nukleotide der Bereiche B1-2, B2-3 und der Schleife L3 geformt. Hierbei bindet Tc ausschließlich als Chelat-Komplex mit einem zweiwertigen Kation wie Magnesium. Die Bindung von Tc an das Aptamer erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Zuerst bindet Tc schwach und reversibel an das Aptamer. Hierdurch ändert sich die Konformation des Aptamers und die Interaktionen zum Liganden werden verstärkt, wodurch Tc in die Bindetasche eingebettet wird (Forster et al., 2012). Wesentlich für die Interaktion mit dem Aptamer ist die Hydroxylgruppe an C6 von Tc (siehe Abbildung 2.9 A). Diese Hydroxylgruppe bildet zwei Wasserstoffbrücken mit dem

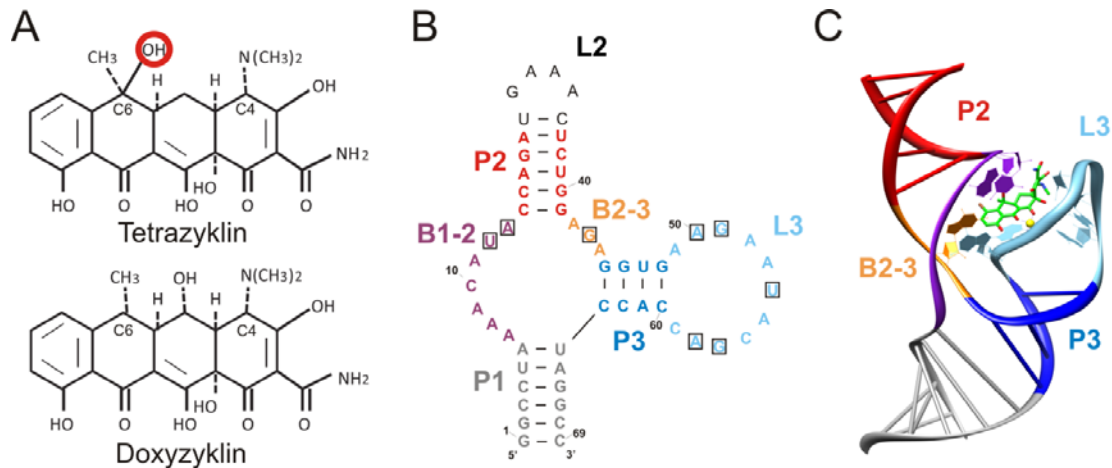


Abbildung 2.9 Das Tetrazyklin-Aptamer

(A) zeigt die beiden Tetrazyklinderivate Tetrazyklin (Tc) und Doxyzyklin, wobei nur Tc von dem Tc-Aptamer gebunden wird. Die Sequenz sowie die Sekundärstruktur des Tc-Aptamers (B), besteht aus drei Stämmen (P1, P2 und P3) zwei Schleifen (L2 und L3) sowie zwei einzelsträngigen Verbindungsregionen (B1-2 und B2-3). Die durch Kästchen markierten Nukleotide sind an der Interaktion mit Tc beteiligt. Die Tertiärstruktur eines modifizierten Tc-Aptamers ist in (C) zu sehen (Xiao et al., 2008). Die Bindetasche wird durch die Bereiche B1-2, B2-3 und L3 ausgebildet. In der Bindetasche befindet sich Tc (grün) mit einem koordinierten Magnesium-Ion (gelber Punkt).

Adenosin an Position 13 aus. Aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe an C6 ist Doxyzyklin (Dox) nicht in der Lage, an das Aptamer zu binden (Muller et al., 2006; Xiao et al., 2008).

Die Bereiche P1, P2 und L2 sind nicht an der Interaktion mit dem Liganden beteiligt und können deshalb modifiziert werden, ohne die Funktionalität des Aptamers zu beeinflussen (Berens et al., 2001; Hanson et al., 2005). Für den P1 Stamm konnte durch *in-line Probing* gezeigt werden, dass dieser in Abwesenheit von Tc teilweise einzelsträngig vorliegt. Durch Tc stabilisiert sich der Stamm und liegt ausschließlich doppelsträngig vor (Weigand and Suess, 2007).

Die gute Zellgängigkeit von Tc sowie die hohe Affinität und Spezifität des Aptamers sind ideale Voraussetzungen, um damit in Eukaryoten die Genexpression zu regulieren. Dies gelang erstmals 2003 in dem eukaryotischen Modellorganismus *S. cerevisiae*. Wird das Tc-Aptamer in der Nähe des 5'-Caps platziert, so blockiert es in Anwesenheit von Tc die Bindestelle der kleinen ribosomalen Untereinheit (40S) (siehe Abbildung 2.10 A). Wird das Tc-Aptamer hingegen in der Nähe des Startcodons platziert, so interferiert es mit dem Scannen der kleinen ribosomalen Untereinheit (40S) nach dem Startcodon. In beiden Fällen wird in Anwesenheit von Tc die Translation inhibiert, während es ohne Tc zur Translation der jeweiligen mRNA kommt (siehe Abbildung 2.10 B)(Hanson et al., 2003; Suess et al., 2003).

Auch in Archaeen konnte die Translation mit dem Tc-Aptamer reguliert werden. Hierfür wurde die ribosomale Bindestelle in den P1 Stamm des Aptamers integriert, wodurch in Abwesenheit von Tc das Ribosom binden konnte und in Anwesenheit von Tc jedoch die Translation durch das Aptamer blockiert wird (Demolli et al., 2014).

Das Tc-Aptamer ist ebenfalls in der Lage, die Genexpression in humanen Zellen zu kontrollieren. Hierfür wurde es mit dem aus *Schistosoma mansoni* stammenden Hammerhead-Ribozym über einen Linker zu einem Aptazym fusioniert. Die Aktivität des Aptazyms wird durch das Tc-Aptamer gesteuert, wobei es sich um einen AN-Schalter handelt, der in Abwesenheit von Tc die RNA spaltet. Wird das Aptazym im 3' UTR eines eukaryotischen Gens platziert, kann es dort die RNA-Stabilität kontrollieren.

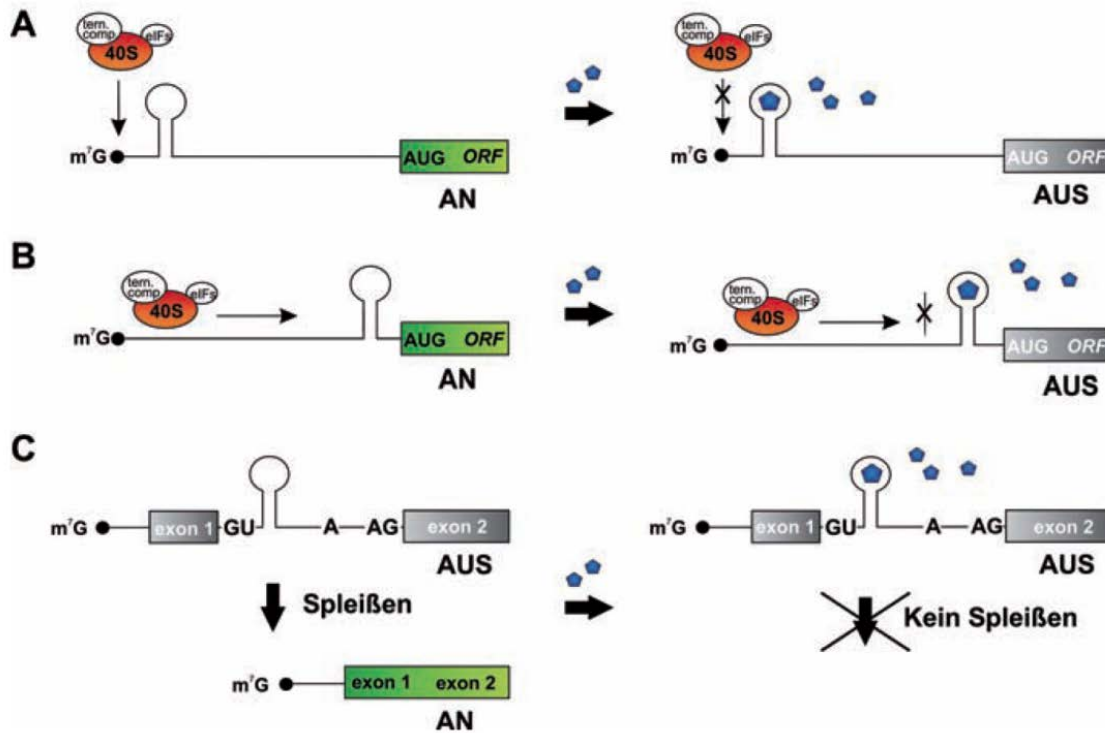


Abbildung 2.10 Genregulation mit dem Tc-Aptamer in *S. cerevisiae*

Das Tc-Aptamer ist in der Lage die Genexpression von *S. cerevisiae* auf unterschiedliche Arten zu beeinflussen. Wird es nahe des 5'-Caps platziert, so kann die kleine ribosomale Untereinheit (40S) nicht an die mRNA binden (A). In der Nähe des Startcodons verhindert das Aptamer in Anwesenheit von Tc das Scannen der kleinen Untereinheit nach dem Startcodon (B). Das Aptamer ist ebenfalls in der Lage das Spleißen in *S. cerevisiae* zu kontrollieren. Durch die Integration der 5' SS in den P1 Stamm ist diese in Anwesenheit des Liganden nicht zugänglich und das Intron verbleibt in der RNA (C). (entnommen aus (Weigand and Suess, 2009)

In Abwesenheit von Tc wird der Poly-A-Schanz abgeschnitten, wodurch die mRNA degradiert wird. Durch die Regulation eines Luciferase-Reportergens konnte ein Regulationsfaktor von 4,8 erzielt werden (Beilstein et al., 2015).

Darüber hinaus konnte mit dem Tc-Aptamer das konstitutive Spleißen in *S. cerevisiae* reguliert werden. Hierfür wurde die 5' SS eines konstitutiv gespleißten Hefe-Introns in den P1 Stamm des Tc-Aptamers integriert. Aufgrund der Flexibilität des P1 Stamms ist die 5' SS in Abwesenheit des Liganden für das Spleißosom zugänglich. Durch die Interaktion von Tc mit dem Aptamer wird der P1 Stamm stabilisiert und die 5' SS ist nicht mehr für das Spleißosom zugänglich. Diese Flexibilität des P1 Stamms wird auch als *breathing* bezeichnet (Demolli et al., 2014; Weigand et al., 2012).

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Genexpression in humanen Zellen auf Ebene des prä-mRNA Spleißens zu regulieren. Hierdurch würde der „Werkzeugkasten“, der den synthetischen Biologen zur Verfügung steht, durch eine neue Art der Genexpressionskontrolle erweitert werden. Um dieses Ziel zu realisieren, sollte der BP und die 3' SS eines Kassetten-Exons durch das Tc-Aptamer reguliert werden. Damit die Genexpression auf jede beliebige Stärke eingestellt werden kann, müssen unterschiedliche Schalter entwickelt werden. Darüber hinaus sollte das System optimalerweise auf jedes beliebige Gen übertragbar sein und unabhängig von der Insertionsstelle die Genexpression kontrollieren.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Riboswitch zu entwickeln, mit dem sich das alternative Spleißen in eukaryotischen Zellen kontrollieren lässt. Hierfür wurde das Tc-Aptamer verwendet, da es sich als geeignet zur Entwicklung von Riboswitchen unterschiedlichster Art erwiesen hat (Kötter et al., 2009; Suess et al., 2003; Weigand and Suess, 2007). In dieser Arbeit sollte versucht werden das Spleißen eines Kassetten-Exons, zu kontrollieren. Dies ist prinzipiell über verschiedene Strategien realisierbar. (Kontrolle der Zugänglichkeit der 5' SS, der 3' SS und des BP). In früheren Arbeiten (Schwarz, 2011) konnte gezeigt werden, dass die 5' SS nicht kontrollierbar ist, deshalb sollte in dieser Arbeit der Fokus auf der Kontrolle der 3' SS und des BP liegen.

3.1 Kontrolle des alternativen Spleißens in einem Minigen-System

Initiale Experimente wurden an einem Minigen-System durchgeführt (Zhang and Chasin, 2004). Dieses Minigen bestand aus drei Exons und enthält kein Startcodon, wird also nicht translatiert. Die Exons 1 und 3 stammen aus dem Dihydrofolatreduktase-Gen des Chinesischen Hamsters (siehe Abbildung 3.1 A). Exon 2 ist ein synthetisches Exon, welches aus mehreren Wiederholungen der Sequenz 5'-CCAAACAA-3' besteht. Diese Sequenz enthält keine bekannten Bindestellen für Spleiß-*Enhancer* oder -*Silencer*. Der Polypyrimidin-Trakt von Intron 1 enthält überwiegend Uracil und ist somit relativ stark. Bei der 5' SS von Intron 2 handelt es sich ebenfalls um eine starke Spleißstelle (5'-CAG/GTTGGT-3'), wodurch Exon 2 zu 90% in der RNA vorkommt. Tc hat keinen Einfluss auf das Spleißen des Minigen-System (siehe Abbildung 3.1 B).

Es wurden unterschiedliche Strategien verfolgt, um das alternative Spleißen durch das Tc-Aptamer zu regulieren.

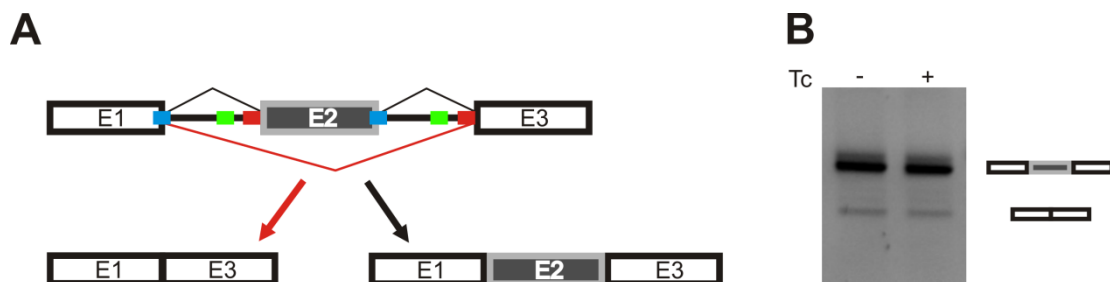


Abbildung 3.1 Übersicht über das verwendete Minigen-System

Das in (A) gezeigte Minigen besteht aus drei Exons (E1, E2 und E3), die durch zwei Introns getrennt sind. E1 und E3 sowie beide Introns stammen aus dem Dihydrofolatreduktase-Gen des Chinesischen Hamsters. E2 ist ein synthetisches Exon und wird alternativ gespleißt, was in zwei unterschiedlichen RNAs resultiert (E1-E3 bzw. E1-E2-E3). Die 5' SS ist blau, die 3' SS rot und der BP grün dargestellt. (B) zeigt eine RT-PCR des Minigens mit und ohne 50 µM Tc. Das untere Signal entspricht der Spleiß-Isoform ohne Exon 2 und das obere Signal der Spleiß-Isoform mit Exon 2.

3.1.1 Kontrolle des BP durch das Tc-Aptamer

Zur Kontrolle des BP durch das Tc-Aptamer wurde die Konsensus-Sequenz des BP (Gao et al., 2008) in den P1 Stamm des Tc-Aptamers integriert (siehe Abbildung 3.2). Da der Abstand zwischen dem BP



Abbildung 3.2 Schema der Konstrukte, bei welchen der BP durch das Aptamer reguliert wurde

Bei dem dargestellten Konstrukt wird der BP durch das Tc-Aptamer reguliert. Der BP ist grün, die 3' SS rot und die 5' SS blau dargestellt (nur im 1. Intron). E1, E2 und E3 stellen die Exons aus dem Minigen dar, die Striche dazwischen die Introns.

und der 3' SS zwischen 19 und 23 nt lang sein sollte und sich ein längerer Abstand negativ auf das Spleißen auswirkt (Chua and Reed, 2001), wurde das Aptamer stromaufwärts des BP integriert. Hierdurch bleibt auch der Polypyrimidin-Trakt unverändert. Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass sowohl die Position als auch die Stabilität des Aptamers die Regulationseffizienz beeinflusst (Weigand and Suess, 2007). Deshalb wurden unterschiedliche Konstrukte hergestellt, die in Abbildung 3.4 dargestellt sind. Die Konstrukte unterscheiden sich in der relativen Lage des BP zum Aptamer und der Stabilität des Stamms P1. Des Weiteren wurde die Stabilität des Aptamers über Variationen des Loops L2 verändert. Bei Konstrukt BP-1 wurde die BP-Konsensussequenz bis auf ein Nukleotid in den P1 Stamm des Aptamers integriert. Für Hefe konnte mit einem ähnlichen Konstrukt eine 16-fache Regulation der 5' SS erzielt werden (Weigand and Suess, 2007). Ausgehend von diesem Konstrukt wurde der P1 Stamm durch den Austausch von A-U- zu G-C-Basenpaaren stabilisiert. Bei BP-2 bzw. BP-3 wurden zwei bzw. drei A-U- durch G-C-Basenpaare ersetzt. Bei dem Konstrukt BP-4 wurde der P1 Stamm um zwei Basenpaare verkürzt. Bei dem Konstrukt BP-5 wurde der P1 Stamm um zwei Basenpaare verlängert, wodurch die BP-Konsensussequenz komplett in den P1 Stamm integriert wurde. Bei BP-6 wurde der AAAG Tetraloop L2 durch einen stabileren Loop (UUCG) ausgetauscht. Alle Konstrukte wurden in HEK293 Zellen transfiziert und die Zellen wurden mit bzw. ohne 50 µM Tc für 24 h inkubiert. Anschließend wurde RNA aus den Zellen präpariert und das Spleißverhalten der Konstrukte mittels RT-PCR getestet (siehe Abbildung 3.3). In der RT-PCR sollten Signale erkennbar sein, die den beiden Spleiß-Isoformen E1-E3 und E1-E2-E3 entsprechen. Durch Anwesenheit von Tc

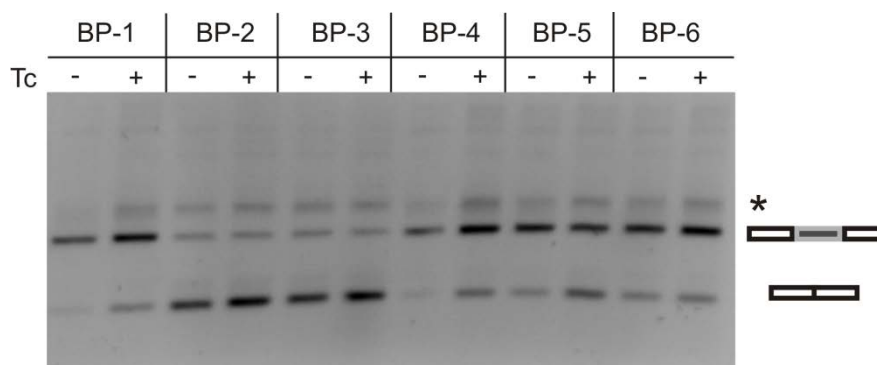


Abbildung 3.3 RT-PCR der BP-Konstrukte

Die Konstrukte BP1 bis BP6 wurden in HEK293-Zellen transfiziert und mit bzw. ohne 50 µM Tc für 24 h inkubiert. Mit der aus den Zellen isolierten RNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Das untere Signal entspricht jeweils der RNA ohne Exon 2 und das Signal darüber entspricht jeweils dem Produkt mit Exon 2. Das mit einem Stern gekennzeichnete Signal ist unspezifisch.

Ergebnisse

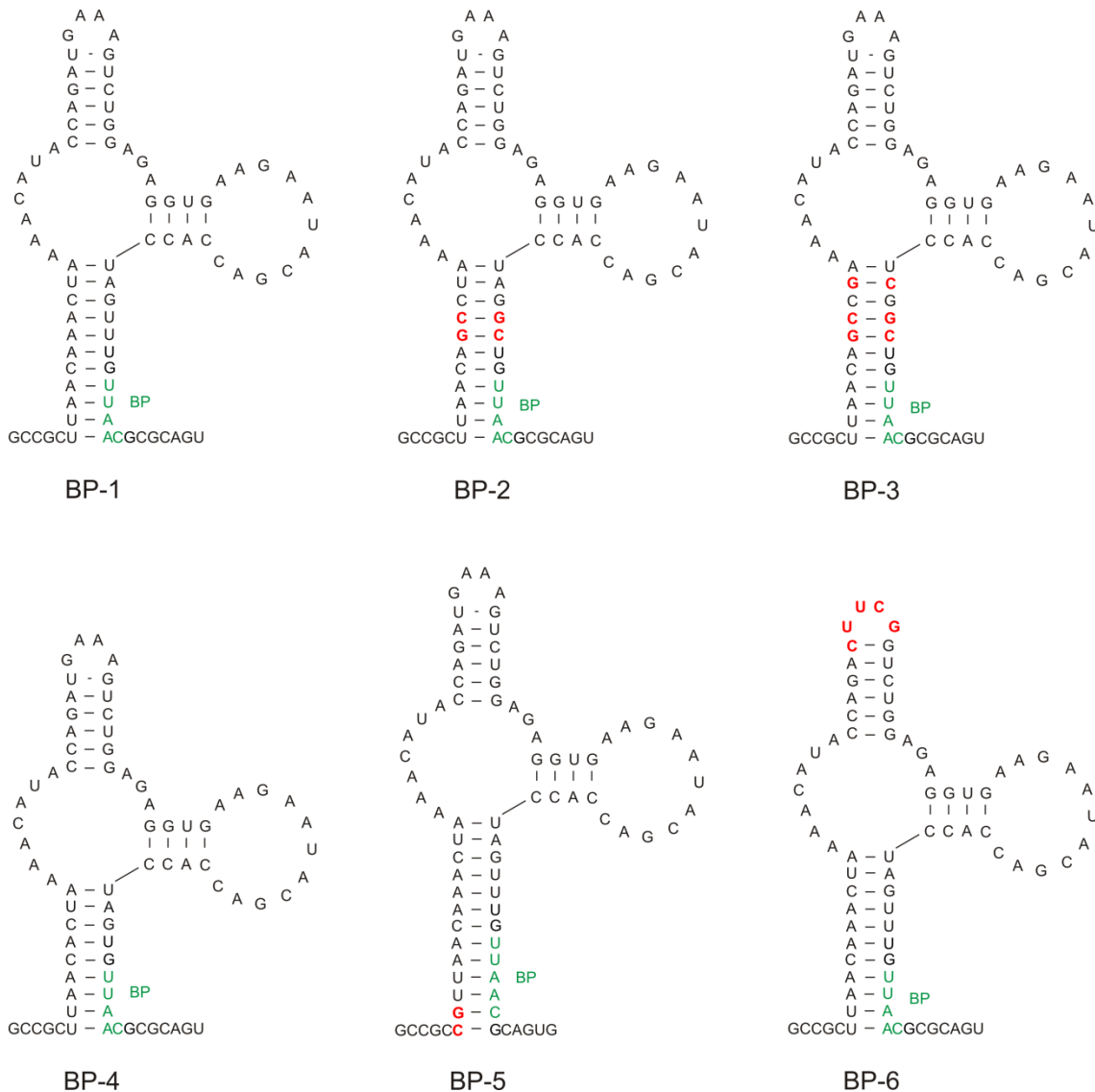


Abbildung 3.4 Konstrukte bei welchen der BP durch das Tc-Aptamer kontrolliert wurde

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Konstrukte mit welchen der BP durch das Tc-Aptamer reguliert wurde. Die BP-Konsensussequenz ist in grün dargestellt. Modifikationen im Vergleich zu dem Konstrukt BP-1 sind in rot markiert.

sollte sich das Verhältnis dieser beiden Isoformen ändern. Eine signifikante Änderung war jedoch bei keinem der getesteten Konstrukte zu beobachten.

Interessanterweise ist das Verhältnis der Spleiß-Isoformen bei den Konstrukten BP-1, BP-4, BP5 und BP-6 vergleichbar, obwohl sich die Konstrukte in der Länge des P1 Stamms unterscheiden. BP-4 weist einen kürzeren P1 Stamm als BP-1 auf, während BP-5 einen längeren P1 Stamm als BP-1 hat. BP-6 besitzt einen modifizierten L2-Loop. Diese Änderungen in der Länge des Aptamers wirken sich jedoch nicht auf das alternative Spleißen von Exon 2 aus. Eine Änderung der Aptamer Stabilität durch Änderung des L2 Loops (vergleiche BP-1 und BP-6) hat ebenfalls keinen Einfluss auf das Spleißverhalten.

Bei den Konstrukten BP-2 und BP-3 wird Exon 2 viel häufiger übersprungen als bei den anderen Konstrukten. Die Konstrukte BP-2 und BP-3 haben einen stabileren P1 Stamm. Es wurden hier keine Basenpaare hinzugefügt, sondern A-U- durch G-C-Basenpaare ersetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es mit den analysierten Konstrukten nicht möglich war, die Zugänglichkeit des BP durch das Tc-Aptamer zu regulieren.

3.1.2 Kontrolle der 3' SS durch das Tc-Aptamer

In einem weiteren Ansatz wurde das Tc-Aptamer so in das Exon 2 inseriert, dass die 3' SS von Intron 1 kontrolliert wurde (siehe Abbildung 3.5). Durch die Insertion stromaufwärts der 3' SS wurde der Abstand zwischen BP und 3' SS nicht verändert. Auch der Polypyrimidin-Trakt bleibt unverändert.



Abbildung 3.5 Schema des Konstrukts, bei welchem die 3' SS durch das Aptamer kontrolliert wurde

Bei dem dargestellten Konstrukt wird die 3' SS durch das Tc-Aptamer reguliert. Der BP ist grün, die 3' SS rot und die 5' SS blau dargestellt (nur im 1. Intron). E1, E2 und E3 stellen die Exons aus dem Minigen dar, die Striche dazwischen die Introns.

Es wurde eine Vielzahl an Konstrukten hergestellt, die in Abbildung 3.7 dargestellt sind. Hierbei wurde die Stabilität des P1 Stamms, die Stabilität des P2-Stamms, der L2-Loop sowie die Position der 3' SS im P1 Stamm variiert. Die verschiedenen Konstrukte wurden transient in HEK293-Zellen transfiziert und für 24 h mit bzw. ohne 50 μ M Tc inkubiert. Anschließend wurde RNA aus den Zellen präpariert und durch RT-PCR analysiert (siehe Abbildung 3.6).

Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen analysiert (Mock). Diese zeigen bei der RT-PCR kein Signal. Ein Minigenkonstrukt ohne Aptamer (K) zeigt hingegen ein deutliches Signal der beiden Spleiß-Isoformen. Somit sind die für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide spezifisch und weisen das gewünschte Minigen nach. Tc hat keinen Einfluss auf die RT-PCR. Das Verhältnis der beiden Spleiß-Isoformen ändert sich nicht. Durch diese Kontrolle konnte gezeigt werden, dass Tc alleine keinen Einfluss auf das Spleißen des verwendeten Minigens hat.

Bei dem Konstrukt M1 ist durch Zugabe von Tc eine minimale Änderung des Spleißmusters erkennbar. Das Signal der Spleiß-Isoform E1-E3 ist mit Tc etwas stärker als ohne Tc. Dies bedeutet, dass Exon 2 in Anwesenheit von Tc häufiger übersprungen wird. Bei den Konstrukten M2 und M3 ist der gleiche Effekt erkennbar und fällt deutlicher aus. Ohne Tc wird Exon 2 immer in die mRNA eingebaut, während es in Anwesenheit von Tc partiell nicht in die mRNA eingebaut wird.

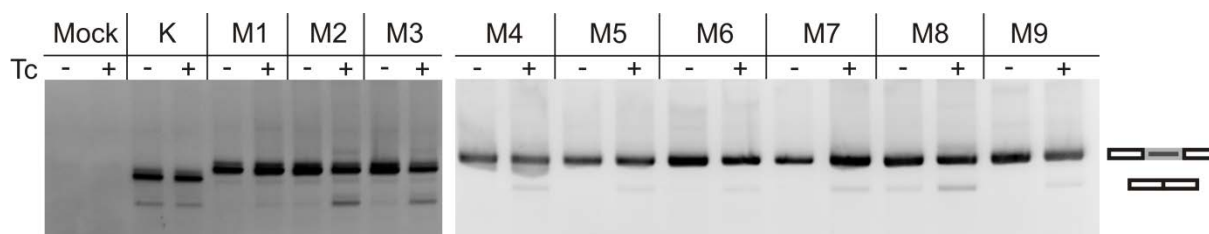


Abbildung 3.6 RT-PCR der Konstrukte bei welchen die 3' SS durch das Tc-Aptamer kontrolliert wurde

Die Konstrukte M1 bis M9 wurden in HEK293-Zellen transfiziert und mit bzw. ohne 50 μ M Tc für 24 h inkubiert. In der Abbildung entspricht Mock den untransfizierten Zellen und K ist die Kontrolle ohne das Tc-Aptamer. Das obere Signal entspricht jeweils der RNA mit Exon 2 und das untere Signal der RNA ohne Exon 2.

Ergebnisse

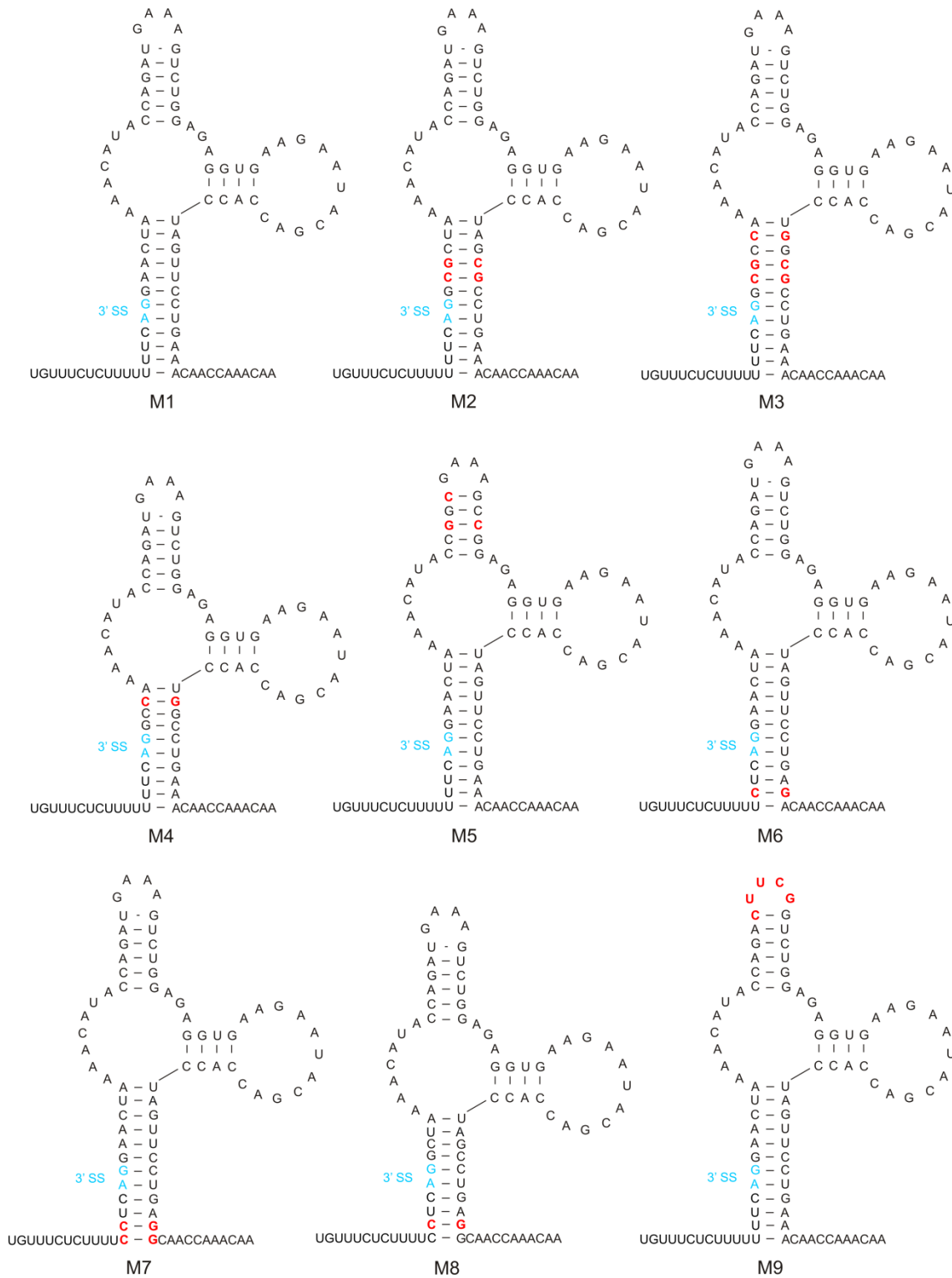


Abbildung 3.7 Konstrukte bei welchen die 3' SS durch das Tc-Aptamer kontrolliert wurde

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Konstrukte mit welchen die 3' SS durch das Tc-Aptamer reguliert wurde. Die 3' SS ist blau, Modifikationen im Vergleich zu dem Konstrukt M1 sind rot dargestellt.

Ergebnisse

Bei dem Konstrukt M2 und M3 wurden im Vergleich zu M1 zwei bzw. drei A-U- durch G-C-Basenpaare getauscht. Dies zeigt, dass eine erhöhte Stammstabilität den Schalteffekt verbessern kann.

Die Konstrukte M5, M6 und M9 zeigen keine Änderung des Spleißmusters durch Tc. Bei M5 wurde der P2 Stamm stabilisiert, bei M6 wurde das erste A-U-Basenpaar des P1 Stammes durch ein G-C-Basenpaar ersetzt und bei M9 wurde die Sequenz des L2-Loops geändert. Die Konstrukte M7 und M8 zeigen nur eine schwache Änderung des Spleißmusters durch Tc. Bei M7 wurden die ersten beiden A-U- durch G-C-Basenpaare ersetzt und bei M8 wurde der P1 Stamm verkürzt.

Die deutlichste Regulation wurde mit den Konstrukten M2 und M3 erzielt. Deshalb wurden ausgehend von Konstrukt M3 sukzessiv weitere G-C-Basenpaare in den P1 Stamm eingefügt. Dies resultierte in den Konstrukten M10, M11 und M12 (siehe Abbildung 3.8).

Ein Vergleich der RT-PCR der Konstrukte M1, M2, M3, M10, M11 und M12 ist in Abbildung 3.8 zu sehen. Die Kontrolle ohne Aptamer wird nicht durch Tc beeinflusst, während bei den Konstrukten M2 und M3, wie bereits in Abbildung 3.6 gezeigt, Exon 2 in Anwesenheit von Tc weniger häufig in die RNA eingebaut wird. Bei dem Konstrukt M10, welches ein zusätzliches G-C-Basenpaar besitzt, ist in Abwesenheit von Tc schon die Spleiß-Isoform E1-E3 vorhanden. In Anwesenheit von Tc nimmt die Menge der Spleiß-Isoform E1-E3 zu. Das Konstrukt M11, mit zwei zusätzlichen G-C-Basenpaaren baut Exon 2 in Abwesenheit von Tc kaum noch in die RNA ein. In Anwesenheit von Tc wird Exon 2 gar nicht mehr in die mRNA eingebaut. Bei dem Konstrukt M12, welches drei zusätzliche G-C-Basenpaare besitzt, lässt sich das alternative Spleißen gar nicht mehr durch Tc beeinflussen, da schon in Abwesenheit des Liganden kein Einbau von Exon 2 in die RNA erfolgt.

Die Versuche zeigen, dass sich durch eine Integration der 3' SS in den P1 Stamm des Tc-Aptamers das Spleißverhalten des Kassetten-Exons regulieren lässt. Hierbei ist die Stabilität des P1 Stamms von entscheidender Bedeutung, je stabiler der P1 Stamm ist, desto häufiger wird das Kassetten-Exon übersprungen.

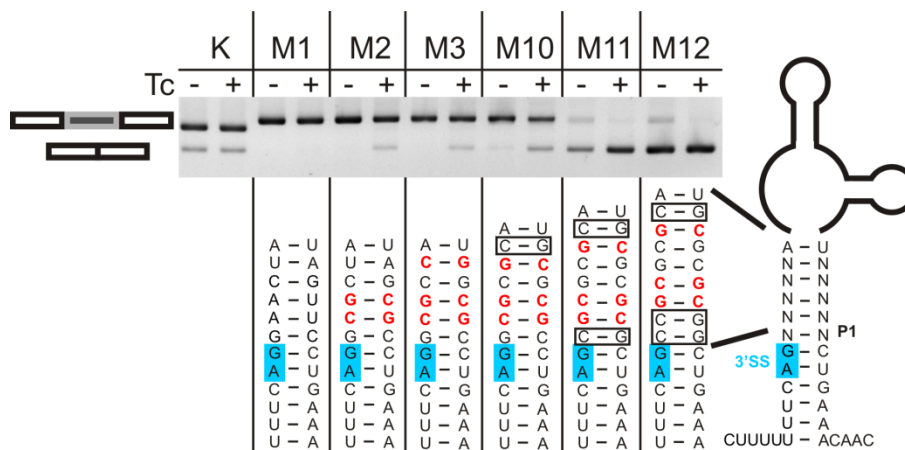


Abbildung 3.8 Stabilisierung des P1 Stamms

Der P1 Stamm der einzelnen Konstrukte unterscheidet sich in der Länge sowie der Anzahl an G-C-Basenpaaren. Die 3' SS ist in blau gezeigt, Änderungen von A-U- zu G-C-Basenpaaren sind in rot gezeigt, eingefügte G-C-Basenpaare sind durch einen Kasten markiert. K entspricht der Kontrolle ohne Aptamer. Die Konstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert und mit bzw. ohne 50 μ M Tc für 24 h inkubiert. Das Spleißen wurde durch eine RT-PCR untersucht. Das obere Signal entspricht jeweils der mRNA mit und das untere Signal ohne Exon 2.

3.2 Kontrolle des alternativen Spleißens in einem Luziferase-Reportergen

Die Analyse der Minigen-Konstrukte (siehe Abbildung 3.8) hatte gezeigt, dass es möglich ist, das alternative Spleißen eines Kassetten-Exons durch das Tc-Aptamer zu kontrollieren. Allerdings handelt es sich bei dem Minigen um ein nicht translatiertes System, weswegen der Effekt des Riboswitches nur auf RNA-Ebene untersucht werden konnte. In den folgenden Versuchen sollte analysiert werden, ob die auf RNA-Ebene beobachtete Spleiß-Regulation einen Effekt auf die Proteinexpression hat. Hierfür wurde ein in Abbildung 3.9 gezeigtes, intronhaltiges Luziferase-Reportergen konstruiert. Hierfür wurde zuerst das β -Globin-2-Intron (bgl2) in den Leserahmen des *luc+* Gens gesetzt (30 bp stromaufwärts des ATGs). Anschließend wurde das Exon 2 aus dem Minigen zusammen mit 150 bp der flankierenden Introns mittig in das bgl2-Intron kloniert. Hierdurch entstand ein Luziferase Reporter gen bestehend aus drei Exons, wobei es sich bei Exon 2 (aptamer-kontrollierte Exon) um ein alternativ gespleißtes Kassetten-Exon handelt. Nur bei Überspringen des aptamer-kontrollierten Exons kommt es zu einem vollständigen Leserahmen des Firefly-Luziferasegens, der zu einer aktiven Luziferase translatiert werden kann. Der Einbau von Exon 2 führt zu einem verfrühten Stopcodon, wodurch eine verkürzte Luziferase gebildet wird. Somit kann in diesem Fall keine Enzymaktivität gemessen werden.

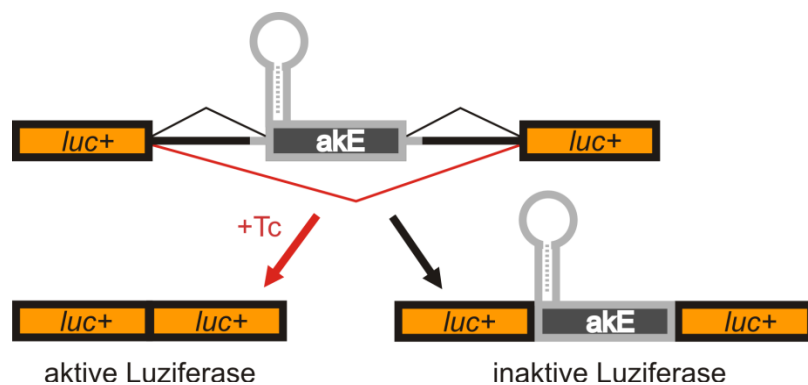


Abbildung 3.9 Übersicht des Luziferase-Reporter gens

Die beiden Exons E1 und E3 enthalten die codierende Sequenz der Firefly-Luziferase (*luc+*). Das aptamer-kontrollierte Exon 2 (akE) stammt zusammen mit 150 bp der flankierenden Introns (grau) aus dem Minigen und wird alternativ gespleißt. Wird E2 übersprungen, so entsteht die Isoform E1-E3 die für die aktive Firefly-Luziferase codiert. Wird E2 in die mRNA eingebaut, so entsteht die Isoform E1-E2-E3 und es wird eine inaktive Luziferase gebildet.

Die Konstrukte M1, M2, M3, M10 und M11 wurden in das Luziferase-Reporter gen übertragen und L1, L2, L3, L10 und L11 genannt. Die Luziferase-Reporter genkonstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert und 24 h mit bzw. ohne 50 μ M Tc inkubiert. Durch RNA-Präparation und eine anschließende RT-PCR wurden die Konstrukte auf RNA-Ebene untersucht.

Die in Abbildung 3.10 A dargestellte RT-PCR zeigt für das Konstrukt L1 in Abwesenheit von Tc fast ausschließlich ein Signal, welches der Spleiß-Isoform E1-E2-E3 entspricht. In Anwesenheit von Tc ist ein deutliches Signal der Spleiß-Isoform E1-E3 erkennbar. Bei dem Konstrukt L2, bei welchem zwei A-U- durch G-C-Basenpaare ausgetauscht wurden, ist in Abwesenheit von Tc die Spleiß-Isoform E1-E3 zu erkennen (siehe Abbildung 3.10 A). Somit wird Exon 2 teilweise schon in Abwesenheit von Tc übersprungen. Durch Tc steigt der Anteil der Spleiß-Isoform E1-E3. L3 (mit einem weiteren ausgetauschten A-U-Basenpaar) verhält sich ähnlich wie L2. Allerdings ist bei L3 schon in Abwesenheit von Tc mehr Spleiß-Isoform E1-E3 vorhanden. Bei den stabileren Konstrukten L10 und

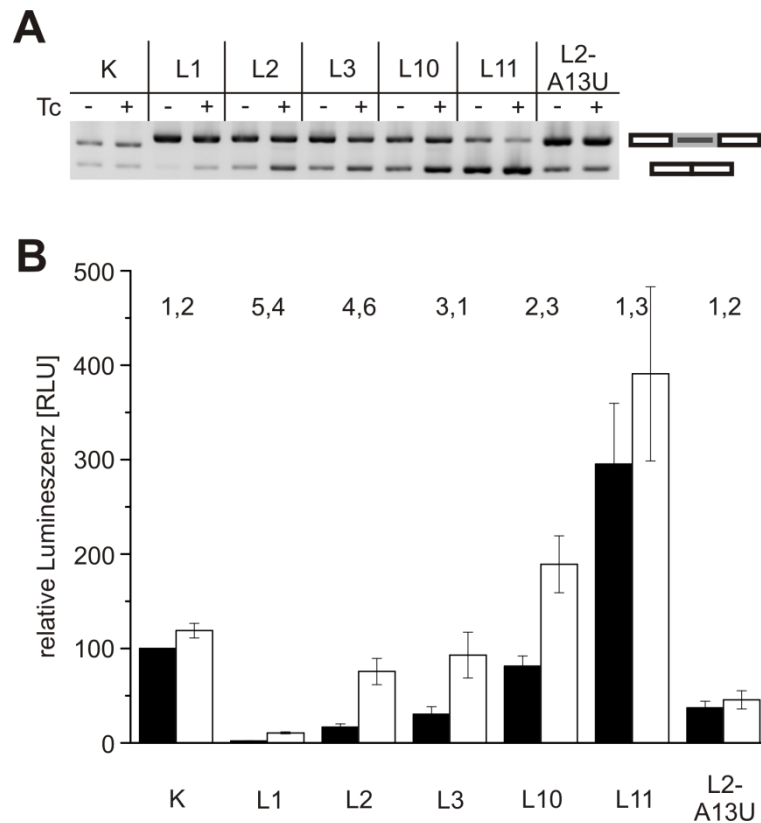


Abbildung 3.10 Test der Luziferase-Reportergerkonstrukte

(A) zeigt eine RT-PCR der Luziferase-Reportergerkonstrukte. K ist die Kontrolle ohne Aptamer. Die Konstrukte L1, L2, L3, L10 und L11 entsprechen den Konstrukten M1, M2, M3 M10 und M11 aus dem Minigen. Das Konstrukt L2-A13U trägt eine Mutation im Aptamer. Hier wurde das Adenin an Position 13 durch ein Uracil ersetzt, wodurch kein Tc mehr gebunden werden kann. Alle Konstrukte wurden mit und ohne 50 µM Tc getestet. (B) zeigt die relativen Lumineszenzwerte [RLU] ohne Tc (schwarz) und mit 50 µM Tc (weiß). Die Werte über den Balken zeigen den Regulationseffekt des jeweiligen Konstruktes. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Alle Experimente wurden in HEK293-Zellen durchgeführt, wobei die transfizierten Zellen für 24 h mit bzw. ohne 50 µM Tc inkubiert wurden. Der Wert von K ohne Tc wurde 100 gesetzt.

L11 wird Exon 2 in Abwesenheit von Tc oft übersprungen, wie das starke Signal der Isoform E1-E3 zeigt (siehe Abbildung 3.10 A). Durch Tc kommt es bei L10 noch zu einem schwachen Anstieg der Isoform E1-E3, während sich bei L11 keine Änderung mehr zeigt.

Bei dem Kontrollkonstrukt ohne Aptamer ändert sich das Spleißmuster durch Zugabe von Tc nicht. Eine weitere Kontrolle war das Konstrukt L2 mit der Mutation A13U. Dieses Konstrukt entspricht L2, wobei das Tc-Aptamer so mutiert ist, dass Tc nicht mehr an das Aptamer binden kann (Hanson et al., 2005). Bei diesem Konstrukt kann das Spleißen nicht durch Tc reguliert werden.

Anschließend wurde der Effekt auf Protein-Ebene analysiert. Hierfür wurde die Lumineszenz der Firefly-Luziferase gemessen. HEK293-Zellen wurden mit den Luziferase-Reportergerkonstrukten transfiziert und 24 h mit bzw. ohne 50 µM Tc inkubiert. Für die Normierung auf die Transfektionseffizienz wurde die *Renilla*-Luziferase kotransfiziert. Anschließend wurde eine duale Luziferase-Messung (siehe Abschnitt 5.2.2.6) durchgeführt und die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde auf die Aktivität der *Renilla*-Luziferase normalisiert. Die normierten Messwerte sind als relative Lichteinheiten (RLU, englisch: *relative light units*) angegeben.

Die gemessenen Luziferase-Aktivitäten sind in Abbildung 3.10 B dargestellt. Das Kontrollkonstrukt ohne Aptamer (K) sowie das L2-A13U-Konstrukt zeigen kaum eine Änderung der Luziferase-Aktivität

in Anwesenheit von Tc. Die Luziferase-Aktivität steigt bei K geringfügig von 100 RLU auf 120 RLU. Die Luziferase-Aktivität von Konstrukt L1 ist sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von Tc sehr gering. Allerdings ist zu erkennen, dass die Aktivität in Anwesenheit von Tc etwas ansteigt. Dies zeigt, dass Exon 2 in Anwesenheit von Tc häufiger übersprungen wird und hierdurch mehr der aktiven Spleiß-Isoform E1-E3 vorhanden ist. L2 zeigt eine deutliche Regulation. Ohne Tc ist die Luziferase-Aktivität mit 17 RLU relativ gering und steigt durch Zugabe von Tc mit einem Wert von 75 RLU fast auf die Aktivität von K an. Das Konstrukt L3 zeigt mit einem Wert von 30 RLU ohne Tc eine höhere Luziferase-Aktivität als L2, während die Luziferase-Aktivität von L3 mit Tc mit einem Wert von 93 RLU etwas höher als die von L2 ist. Bei den Konstrukten L10 und L11 ist die Luziferase-Aktivität in Abwesenheit von Tc bereits sehr hoch, welche aber durch Zugabe von Tc noch ansteigt. L10 hat ohne Tc eine Luziferase-Aktivität von 81 RLU, L11 von 300 RLU und somit 3-mal höher als die von K.

Den stärksten Regulationseffekt zeigt das Konstrukt L1 mit einem Regulationsfaktor von 5,4. Allerdings ist bei diesem Konstrukt die Genexpression sehr schwach. L2 hat mit 4,6 zwar einen etwas geringeren Regulationsfaktor, allerdings ist bei diesem Konstrukt die Luziferase-Expression deutlich höher. Die Kontrollkonstrukte bleiben von TC unbeeinflusst.

Durch die Luziferase-Reportergergenmessungen konnte gezeigt werden, dass die Konstrukte aus dem Minigen in einen neuen Kontext überführt werden können. Außerdem wurde deutlich, dass die auf RNA-Ebene beobachteten Effekte auch auf Protein-Ebene detektierbar sind.

3.3 Charakterisierung des Riboswitches

Mit dem Luziferase-Reportergergenkonstrukt L2 konnte eine erfolgreiche Regulation der Genexpression erzielt werden, die sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene detektierbar war. Deshalb wurde dieses Konstrukt für weitere Versuche verwendet, in denen die Robustheit des Riboswitches getestet werden sollte. Für alle folgenden Experimente wurden die humanen Zellen transient mit dem L2 Konstrukt transfiziert und für 24 h mit bzw. ohne 50 μM Tc inkubiert. Anschließend wurde eine duale Luziferase-Reportergergenmessung (siehe 5.2.2.6) durchgeführt.

3.3.1 Vergleich des L2-Riboswitches in verschiedenen Zelllinien

Die bisher gezeigten Versuche wurden in HEK293-Zellen durchgeführt. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob der L2-Riboswitch auch in anderen Zelllinien funktioniert. Hierzu wurde das Kontrollkonstrukt ohne Aptamer sowie das L2-Konstrukt auch in HeLa-Zellen getestet (siehe Abbildung 3.11). Die Luziferase-Reportergergenmessung zeigt, dass sich das L2-Konstrukt in beiden Zelllinien nahezu identisch verhält. In Anwesenheit von Tc steigt die Luziferase-Aktivität in HEK Zellen um den Faktor 4,5 und in HeLa-Zellen um den Faktor 5. Die Kontrollen zeigen in beiden Zelllinien keine Tc-abhängige Änderung der Luziferase-Aktivität.

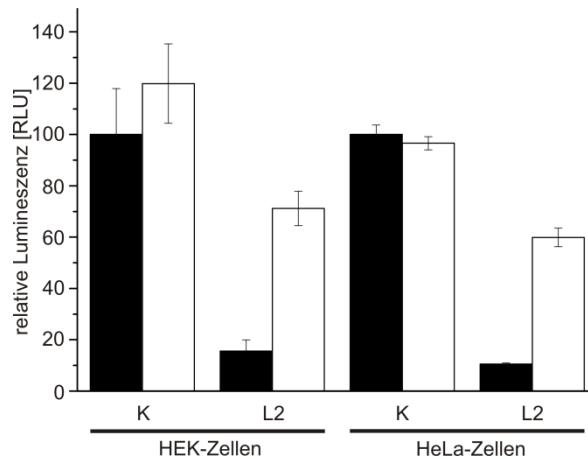


Abbildung 3.11 Vergleich des L2-Konstruktes in unterschiedlichen Zelllinien

Das L2-Konstrukt sowie das Kontrollkonstrukt (K) ohne Aptamer wurden in HEK293-Zellen und in HeLa-Zellen transfiziert und 24 h mit (weißer Balken) bzw. ohne (schwarzer Balken) 50 µM Tc inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung. Der Wert von K ohne Tc wurde auf jeweils 100 gesetzt.

3.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Regulation des Riboswitches

Zur weiteren Charakterisierung des Riboswitches wurde untersucht, ob die Spleiß-Regulation von der Tc-Konzentration abhängt. Um jedoch auszuschließen, dass Tc in höheren Konzentrationen die Viabilität der Zellen beeinflusst, wurde zuerst ein Toxizitätstest durchgeführt. Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit dem L2-Konstrukt transfiziert und mit Tc-Konzentrationen von 0 bis 500 µM behandelt. Nach 24 h wurde die Zellviabilität durch einen AlamarBlue-Assay überprüft. Tc-Konzentrationen über 500 µM wurden nicht untersucht, da Tc in höheren Konzentrationen präzipitiert. Die Ergebnisse des in Abbildung 3.12 dargestellten Toxizitätstests zeigen, dass sich die Zellviabilität bei keiner der getesteten Tc-Konzentrationen ändert. Somit konnte Tc bis zu einer Konzentration von 500 µM in HEK293-Zellen eingesetzt werden.

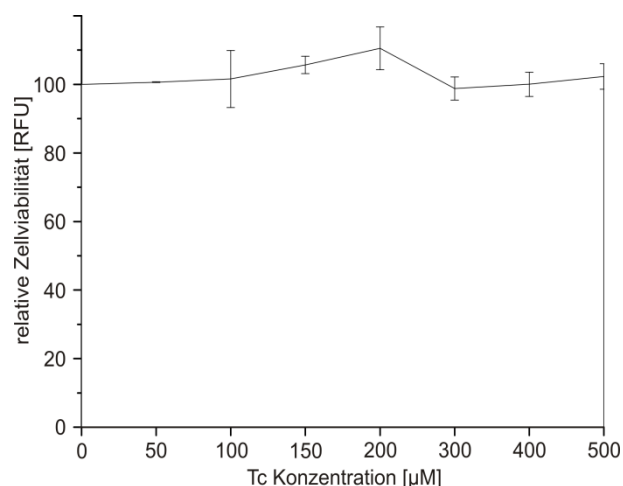


Abbildung 3.12 Zellviabilität von HEK293-Zellen bei unterschiedlichen Tc-Konzentrationen

HEK293-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Tc-Konzentrationen inkubiert und die Zellviabilität wurde durch einen AlamarBlue-Assay überprüft. Die gemessenen Werte für 0 µM Tc wurde 100 gesetzt und alle weiteren Werte wurden relativ hierzu gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

Ergebnisse

In einem weiteren Versuch sollte nun überprüft werden, wie sich die Regulation des Riboswitches bei höheren Tc-Konzentrationen ändert. Dieser Test wurde mit den Luziferase-Reportergerätenkonstrukten L2 und der Kontrolle L2-A13U in HEK293-Zellen durchgeführt. Abbildung 3.13 zeigt, dass sich die Luziferase-Aktivität durch eine steigende Tc-Konzentration erhöhen lässt. Wie in Abbildung 3.9 gezeigt, wird nur aktive Luziferase exprimiert, wenn Exon 2 durch alternatives Spleißen übersprungen wird. Folglich kommt es durch höhere Tc-Konzentrationen zu einem häufigeren Überspringen von Exon 2 und hierdurch zu einer höheren Expression der Firefly-Luziferase.

Das Kontrollkonstrukt L2-A13U zeigt keine Regulation bei steigenden Tc-Konzentrationen. Durch die Kontrolle kann ein unspezifischer Effekt auf das Spleißen durch eine höhere Tc-Konzentration ausgeschlossen werden.

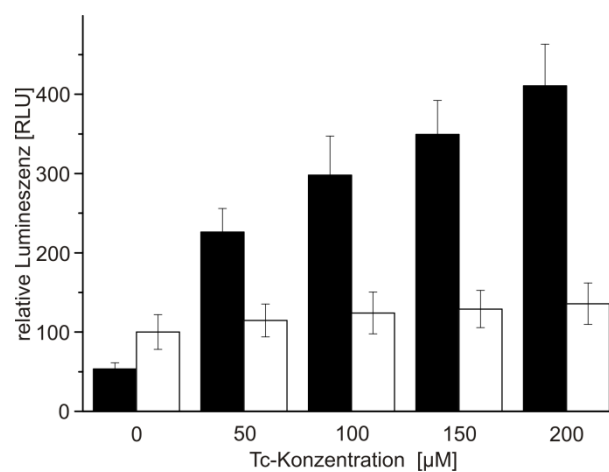


Abbildung 3.13 Konzentrationsabhängigkeit des Spleiß-Riboswitches

Das Konstrukt L2 (schwarzer Balken) wurde 24 h mit unterschiedlichen Tc-Konzentrationen (0 bis 200 µM) in HEK293-Zellen inkubiert. Als Kontrolle wurde das Konstrukt L2-A13U mitgeführt (weißer Balken), welches nicht in der Lage ist Tc zu binden. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Der Wert von L2-A13U ohne Tc wurde auf 100 gesetzt.

3.3.3 Einfluss der Expressionsstärke auf den Riboswitch

Der folgende Versuch sollte zeigen, ob die Expressionsstärke des Promotors einen Einfluss auf die Regulation des L2-Konstrukts hat. Neben dem CMV-Promotor wurde der SV40-Promotor, der in HEK293-Zellen deutlich schwächer exprimiert wird als der CMV-Promotor, verwendet (Qin et al., 2010).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Das L2-Konstrukt zeigt bei beiden Expressionsstärken einen Regulationsfaktor von ca. 4,7, während die Kontrollen von Tc unbeeinflusst sind. Der Versuch konnte zeigen, dass die Expressionsstärke keinen Einfluss auf die Spleißregulation hat.

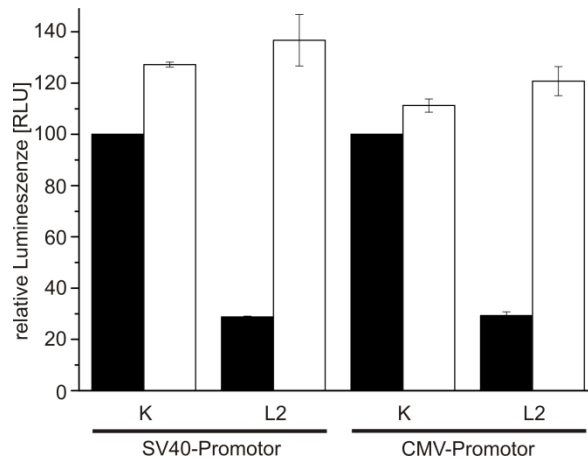


Abbildung 3.14 Unterschiedliche Promotoren

Das L2-Konstrukt wurde einmal durch den SV40- und einmal durch den CMV-Promotor exprimiert. Als Kontrolle (K) diente ein Konstrukt ohne Aptamer. Das Experiment wurde in HEK293-Zellen durchgeführt und die Zellen wurden mit Tc (weiße Balken) und ohne 50 μM Tc (schwarze Balken) für 24 h inkubiert. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Der Wert von K ohne Tc wurde jeweils 100 gesetzt.

3.4 Verbesserung der Basalexpression durch ein Aptazym

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass sich die Genexpression der Firefly-Luziferase effizient durch das L2-Konstrukt regulieren lässt. Allerdings kommt es bereits in Abwesenheit von Tc zu einer geringen Luziferase-Expression (siehe Abbildung 3.10). Zur Verringerung der Basalexpression sollte ein Aptazym in den 3' UTR des L2-Konstrukts inseriert werden. Das Aptazym besteht aus dem RNA-spaltende Hammerhead-Ribozym als katalytische Domäne und dem Tc-Aptamer als Sensor-Domäne. Durch diese kann die Aktivität des Hammerhead-Ribozym durch das Tc-Aptamer gesteuert werden. Das Aptazym ist als AN-Schalter konzipiert, somit spaltet das Hammerhead-Ribozym nur in Abwesenheit von Tc die RNA. Ist Tc vorhanden, ist das Hammerhead-Ribozym inaktiv (Beilstein et al., 2015).

Wie das Schema in Abbildung 3.15 zeigt, ist in Abwesenheit von Tc überwiegend die Spleiß-Isoform E1-E2-E3 vorhanden, welche zu einer inaktiven Luziferase führt. Allerdings entsteht zu einem geringen Teil auch die Spleiß-Isoform E1-E3. Mit dem Aptazym im 3' UTR wird in Abwesenheit von Tc die RNA geschnitten und degradiert. Hierdurch kommt es nicht zur Translation der aktiven Spleiß-Isoform E1-E3. In Anwesenheit von Tc ist das Aptazym inaktiv und es wird überwiegend die aktive Spleiß-Isoform E1-E3 gebildet. Hierdurch kommt es zu einer effizienten Expression der Firefly-Luziferase.

Die Fusion des Aptamers an das Hammerhead-Ribozym über verschiedene Linkersequenzen resultierte in Konstrukten, die sich in ihrer Regulation unterscheiden (Beilstein et al., 2015). K19 zeigt den besten Regulationsfaktor, jedoch auch eine starke Beeinträchtigung der Gesamtexpression. K4 und K5 zeigen eine höhere Expression, jedoch auch eine geringere Regulation. Alle drei Aptazym-Konstrukte wurden in den 3' UTR des L2-Konstruktes integriert. Hieraus resultieren die Konstrukte L2-K4, L2-K5 und L2-K19, welche in HEK293-Zellen transfiziert und für 24 h mit bzw. ohne 50 μM Tc inkubiert wurden. Anschließend wurde die Aktivität gemessen. Die in Abbildung 3.16 gezeigten Ergebnisse der Reporteranalyse zeigen, dass in allen drei Konstrukten (L2-K4, L2-K5 und L2-K19)

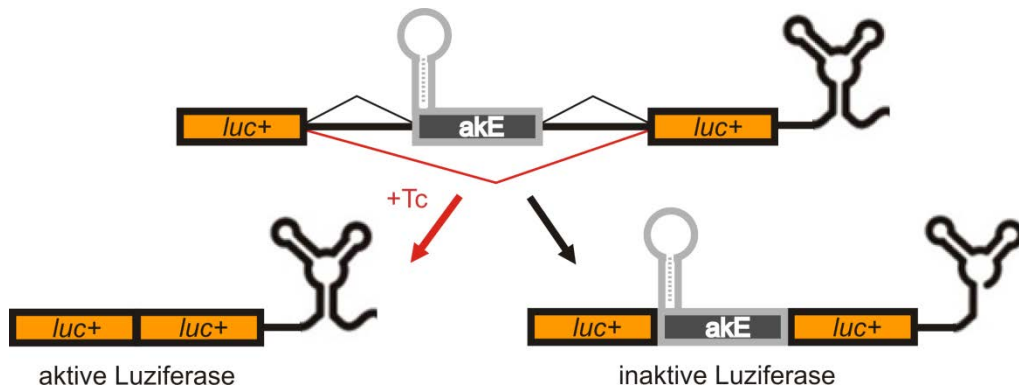


Abbildung 3.15 Schema der Kombination aus Spleiß-Riboswitch und Aptazym

Zur Minimierung der Basalexpression wurde ein Aptazym in den 3' UTR des Luziferase-Reportergens gesetzt. Bei diesem Aptazym handelt es sich um einen AN-Schalter, der in Abwesenheit von Tc die RNA schneidet, wodurch diese degradiert wird. Hierdurch kann in Abwesenheit von Tc das aptamer-kontrollierte Exon (akE) in die RNA eingebaut werden, das Aptazym schneidet jedoch im 3' UTR wodurch die RNA abgebaut wird. In Anwesenheit von Tc ist das Aptazym inhibiert und die 3' SS von Intron 1 ist durch das Aptamer blockiert. Hierdurch wird das aptamer-kontrollierte Exon übersprungen und es wird eine aktive Luziferase exprimiert.

die Luziferase-Aktivität in Abwesenheit von Tc deutlich geringer ist als in dem L2-Konstrukt. Somit konnte die Basalexpression des L2-Konstrukts durch das Aptazym verringert werden. In Anwesenheit von Tc steigt die Aktivität der Firefly-Luziferase wie erwartet an, jedoch nicht auf die Aktivität des L2-Konstrukts ohne Aptazym, sondern auf eine deutlich geringere Aktivität (ca. 50% verglichen mit L2). Der Schalfaktor der Konstrukte L2-K4 und L2-K5 verbessert sich durch das Aptazym etwas, er steigt von 4,6 auf 5,7 bzw. 5,8. Das Konstrukt L2-K19 hat mit 8,7 einen deutlich höheren Schalfaktor als L2, allerdings ist die Expression der Firefly-Luziferase in Anwesenheit von Tc geringer als bei den Konstrukten L2-K4 und L2-K5.

Die Versuche haben gezeigt, dass sich der Schalfaktor durch ein Aptazym im 3' UTR etwas verbessern lässt. Jedoch verringert sich hierdurch auch die Gesamtexpression um ca. 50%. Aus diesem Grund wurde mit diesen Konstrukten nicht weitergearbeitet.

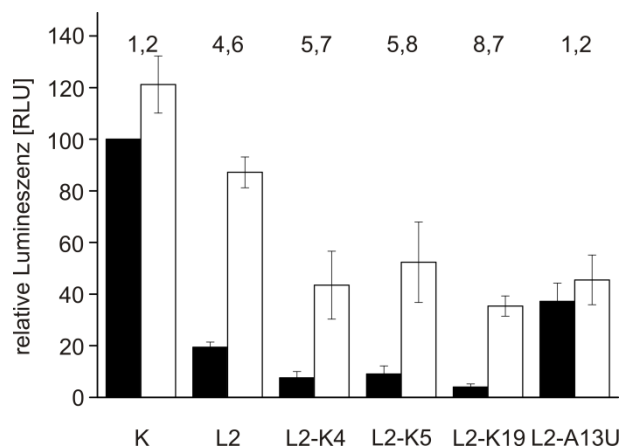


Abbildung 3.16 Luziferase-Reportergenmessung des L2-Konstrukts mit zusätzlichem Aptazym

Um den Schalfaktor des L2-Konstrukts zu verbessern wurden die Aptzyme K4, K5 und K19 in den 3' UTR des L2-Konstrukts integriert. Dies resultierte in den Konstrukten L2-K4, L2-K5 und L2-K19. Die Konstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert und mit (weißer Balken) und ohne (schwarzer Balken) 50 µM Tc für 24 h inkubiert. Der Wert über den Balken zeigt den Schalfaktor des jeweiligen Konstrukts. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Der Wert der Kontrolle ohne Tc wurde 100 gesetzt.

3.5 Kontrolle des Transkriptionsfaktors MAX durch den entwickelten Riboswitch

In allen bisherigen Versuchen wurde der Riboswitch nur in Reportergensystemen getestet. Im Folgenden sollte der Spleiß-Riboswitch in den Transkriptionsfaktor MAX (*MYC associated factor X*) integriert werden. MAX ist Teil des MYC-MAX-MXD-Netzwerks, welches unter anderem an der Regulation des Zelltods, der Differenzierung und der Proliferation beteiligt ist (Diolaiti et al., 2015).

Für die Regulation des MAX-Gens wurde das aptamer-kontrollierte Exon 2 in die codierende Sequenz des MAX-Gens integriert. Die codierende Sequenz der MAX-WT-Isoform besteht aus 4 Exons (Exon 1, 3, 4 und 5). Das aptamer-kontrollierte Exon aus den Luziferase-Reportergenkonstrukten wurde in das Intron zwischen den MAX-Exons 3 und 4 inseriert (siehe Abbildung 3.17). Hierbei wurden aus den Luziferase-Konstrukten die das Exon flankierenden Introns komplett mit übertragen. Die Konstrukte MAX1, MAX2, MAX3, MAX10 und MAX11 entsprechen den Konstrukten L1, L2, L3, L10 und L11. Die Konstrukte sind so designt, dass es durch alternatives Spleißen des aptamer-kontrollierten Exons zu zwei unterschiedlichen mRNA Isoformen kommt. Wird das Exon in die mRNA eingebaut, entsteht ein vorzeitiges Stopcodon, wodurch ein verkürztes Peptid translatiert wird. Wird das Exon jedoch übersprungen, entsteht das MAX-WT-Protein. Somit kann die Expression des MAX Proteins durch den Spleiß-Riboswitch reguliert werden. Für die Detektion mittels Westernblot wurde am N-Terminus das FLAG-Epitop angehängt.

Die Funktionalität des Riboswitches in den MAX-Konstrukten wurde zuerst durch eine RT-PCR überprüft. Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit den MAX-Konstrukten transfiziert und für 24 h mit bzw. ohne 50 µM Tc inkubiert. Aus den Zellen wurde RNA präpariert, und mittels RT-PCR analysiert. Die in Abbildung 3.18 A gezeigten Ergebnisse der MAX-Konstrukte sind nahezu identisch zu den RT-PCRs der vergleichbaren Minigen- (siehe Abbildung 3.8) und Luziferase-Reportergenkonstrukte (siehe Abbildung 3.10 A). Bei dem Konstrukt MAX1 wird in Abwesenheit von Tc das Exon 2 immer in die mRNA eingebaut. Durch Zugabe von Tc wird das Exon 2 hingegen auch übersprungen. Bei den Konstrukten MAX2 und MAX3, wo zwei bzw. drei A-U- durch G-C-Basenpaare ausgetauscht wurden, wird Exon 2 auch in Abwesenheit von Tc übersprungen. Abbildung 3.10 A zeigt, dass in Anwesenheit von Tc bei MAX2 und MAX3 das untere Signal deutlich stärker ist als in Abwesenheit von Tc. Folglich wird das aptamer-kontrollierte Exon in Anwesenheit von Tc deutlich häufiger übersprungen als in Abwesenheit von Tc. Bei MAX10 und MAX11 wird das aptamer-

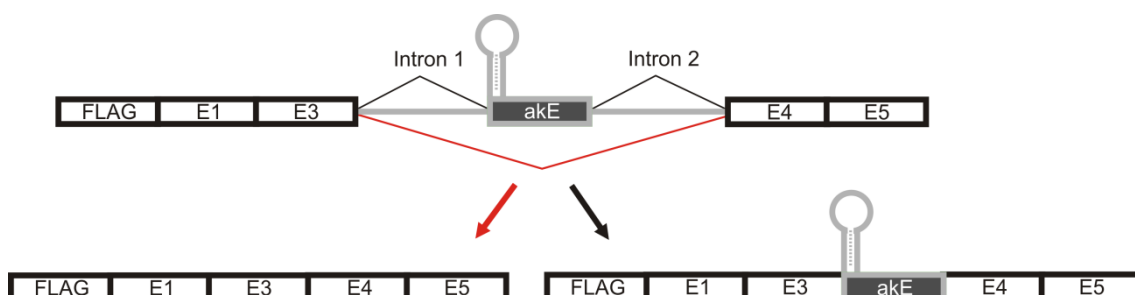


Abbildung 3.17 Schema der MAX-Konstrukte

Für die MAX-Konstrukte wurde das aptamer-kontrollierte Exon (akE) aus dem Luziferase-Reportergen zusammen mit den flankierenden Introns (grau) zwischen den codierenden Bereich von Exon 3 und 4 des MAX-Gens gesetzt. Hierdurch fungiert es als *poison Exon*, da es beim Einbau in die mRNA zu einem verfrühten Stopcodon kommt. Wird das Exon übersprungen entsteht die codierende Sequenz der MAX-WT-Isoform, bestehend aus den Exons 1, 3, 4 und 5 (E1, E3, E4 und E5). Damit das MAX-Protein durch einen Westernblot detektiert werden kann, wurde am N-Terminus das FLAG-Epitop angehängt.

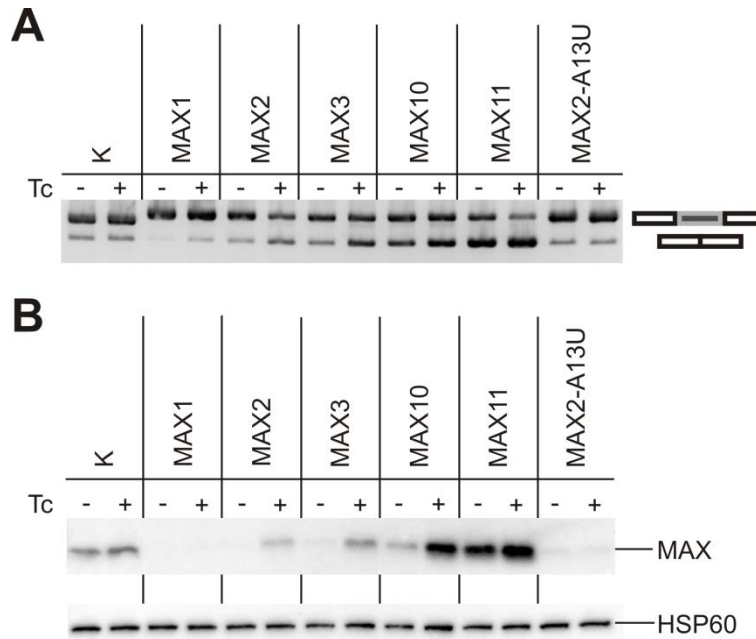


Abbildung 3.18 Kontrolle der MAX-Expression durch das aptamer-kontrollierte Exon

Die MAX-Konstrukte wurden durch eine RT-PCR (A) und einen Westernblot (B) untersucht. Die Kontrolle (K) enthält kein Aptamer, während MAX2-A13U ein mutiertes Aptamer enthält, das nicht mehr in der Lage ist Tc zu binden. Als Ladekontrolle für den Westernblot wurde das konstitutiv exprimierte Protein HSP60 verwendet. Die Versuche wurden in HEK293-Zellen durchgeführt und alle Konstrukte wurden mit 50 μ M Tc bzw. ohne Tc untersucht.

kontrollierte Exon in Abwesenheit von Tc relativ häufig übersprungen. Durch Tc ändert sich das Verhältnis der Spleiß-Isoformen nicht.

Bei der Kontrolle ohne Aptamer hat Tc keinen Einfluss auf das Spleißen. Das Spleißen des Konstrukts MAX2-A13U, welches nicht mehr in der Lage ist, Tc zu binden, wird ebenfalls nicht durch Tc beeinflusst. Somit verhalten sich die Kontrollen wie erwartet und bestätigen, dass die beobachteten Effekte durch die Aptamer-Ligand-Interaktion hervorgerufen werden.

Auf Proteinebene wurde die Expression des MAX-Gens durch einen Westernblot überprüft (siehe Abbildung 3.18 B). Im Westernblot ist für das Konstrukt MAX1 weder ohne noch mit Tc ein Signal zu erkennen. Bei MAX 2 und MAX 3 ist ohne Tc kein Signal erkennbar, während es mit Tc zu einer deutlichen MAX-Expression kommt. MAX10 zeigt ohne Tc eine schwache Expression von MAX, mit Tc steigt diese jedoch an. Bei MAX11 ist die MAX-Expression sowohl ohne Tc als auch mit Tc hoch. Bei der Kontrolle ohne Aptamer (K) sowie dem Konstrukt MAX2-A13U, welches nicht mehr in der Lage ist, Tc zu binden, ist die MAX-Expression nur sehr schwach.

Es kommt bei den Kontrollen zu keiner Änderung der Expression durch Tc. Die Signale der HSP60-Ladekontrolle sind überall gleich und werden auch nicht durch Tc beeinflusst. Somit wurde überall die gleiche Menge an Rohextrakt eingesetzt. Die Änderungen der MAX-Signale sind spezifisch und nicht aufgrund möglicher Fehler während des Westernblots entstanden.

Die Versuche zeigen, dass sich mit dem aptamer-kontrollierten Exon die Expression des Transkriptionsfaktors MAX regulieren lässt. Hierbei entsprechen die beobachteten Effekte auf RNA-Ebene denen auf Proteinebene.

3.6 Entwicklung eines Suizidgens durch die kontrollierte Expression von CD20

Wie die Abschnitte 3.2 und 3.5 gezeigt haben, lässt sich das aptamer-kontrollierte Exon in unterschiedliche Gene übertragen, ohne seine Funktionalität zu verlieren. Aufgrund dieser Eigenschaft sollte das aptamer-kontrollierte Exon nun verwendet werden, um ein Suizidsystem aufzubauen, welches auf der kontrollierten Expression von CD20 beruht.

CD20 ist ein in B-Zellen exprimierter Oberflächenrezeptor. Die genaue Funktion des CD20-Proteins ist nicht bekannt, allerdings wird vermutet, dass seine Funktion im Bereich der Kalziumaufnahme liegt (Cragg et al., 2005). Eine sehr wichtige Rolle spielt CD20 in der Bekämpfung von B-Zell-Lymphomen mit Hilfe des therapeutischen Antikörpers Rituximab (Cragg et al., 2005; Perez-Callejo et al., 2015). Rituximab bindet an CD20 und löst durch eine Signalkaskade den Zelltod aus. Hierbei kommt es zu einer Kombination verschiedener Mechanismen, wie z.B. der antikörperabhängigen, zellvermittelte Toxizität (ADCC), der komplementabhängigen Toxizität (CDC) sowie der Aktivierung apoptotischer und der Inhibierung anti-apoptotischer Signalwege (Perez-Callejo et al., 2015).

Für das Suizidsystem wurde CD20 heterolog in HeLa-Zellen exprimiert, die normalerweise CD20 nicht exprimieren. Hierdurch sollten sich die HeLa-Zellen durch Rituximab abtöten lassen, wobei die Expression von CD20 durch das aptamer-kontrollierte Exon reguliert wird. Der Aufbau des Suizidsystems ist schematisch in Abbildung 3.19 dargestellt. In Anwesenheit von Tc wird das aptamer-kontrollierte Exon übersprungen. Hierdurch entsteht das korrekte CD20-Protein, welches in die Zellmembran eingebaut wird. Der Antikörper Rituximab kann an das aktive CD20 binden und löst durch seine Interaktion mit dem Protein den Zelltod aus. In Abwesenheit von Tc wird das aptamer-kontrollierte Exon nicht übersprungen, wodurch es zu einer Leserasterverschiebung kommt. Hierdurch wird ein inaktives CD20 produziert und die Zelle kann in Anwesenheit von Rituximab überleben.

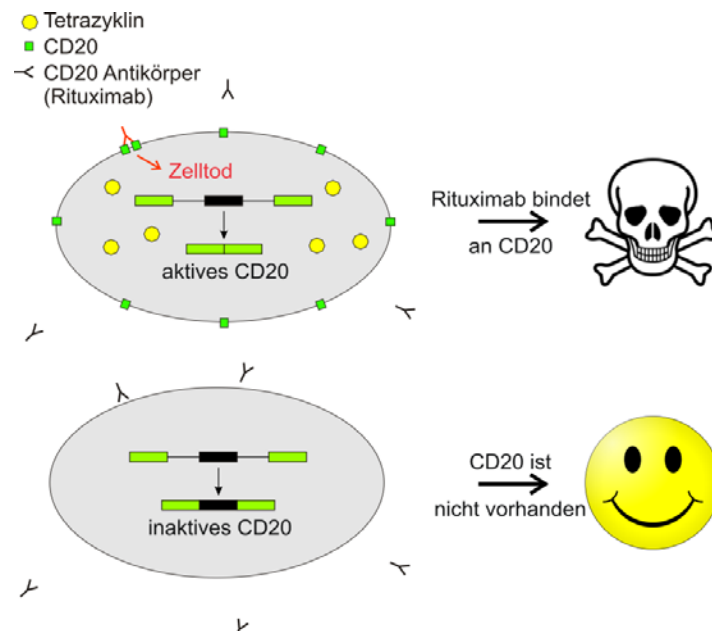


Abbildung 3.19 Schema des Suizidgens

In Anwesenheit von Tc (gelber Kreis) wird das aptamer-kontrollierte Exon (schwarzes Rechteck) übersprungen und es entsteht das aktive CD20-Protein (grünes Viereck). Der Antikörper Rituximab (schwarz) kann an CD20 binden, wodurch der Zelltod ausgelöst wird. In Abwesenheit von Tc wird das aptamer-kontrollierte Exon in die mRNA eingebaut, wodurch es zu einer Leserasterverschiebung kommt. CD20 wird nicht exprimiert, folglich können die Zellen in Anwesenheit von Rituximab überleben.

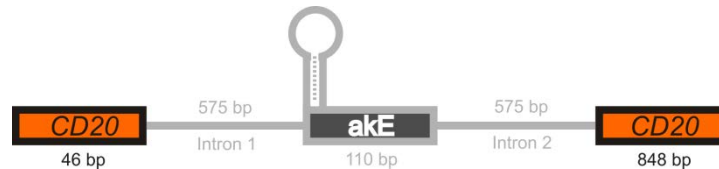


Abbildung 3.20 Aufbau des konditionalen Suizidgenbaus

Damit die Expression von CD20 durch den Riboswitch kontrolliert werden kann, wurde das aptamer-kontrollierte Exon aus den Luziferase-Reportergenkonstrukten zusammen mit den beiden flankierenden Introns (grau) in ein codonoptimiertes *CD20*-Gen gesetzt.

Das Suizidsystem sollte im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen, in einer HeLa-Zelllinie mit einer genomischen FRT-Stelle getestet werden. Diese Zelllinie trägt den Namen HF1-3 und kann mit dem Flp-In-System genetisch manipuliert werden. Für die kontrollierte Expression des *CD20*-Gens wurde das gleiche aptamer-kontrollierte Exon, welches bereits in MAX inseriert wurde, in die codierende Sequenz des *CD20*-Gens integriert (siehe Abbildung 3.20). Es wurden die Konstrukte L1 und L2 verwendet, die sich in ihrer Expressionsstärke unterscheiden. Das übertragene Insert bestand aus dem aptamer-kontrollierten Exon mit benachbarten Introns. Dieses Insert wurde 46 bp stromaufwärts des Startcodons in den Leserahmen eines codonoptimierten *CD20*-Gens inseriert. Diese Position wurde aus zwei Gründen ausgewählt. Einerseits entspricht hierdurch die Größe des Exon 1 mit 46 bp etwa der des Exon 1 aus dem Luziferase-Reportergen (30 bp). Andererseits sind an dieser Position die zwei zum Intron benachbarten Basenpaare identisch zu der Position in dem Luziferase-Reportergen. Durch die Insertion von L1 bzw. L2 in den Leserahmen von *CD20* entstanden die Konstrukte C1 und C2, welche mit Hilfe des Flp-In-Systems genomisch in die HF1-3 Zellen integriert wurden (siehe 5.2.2.5). Die Zelllinien wurden HF1-3C1 und HF1-3C2 genannt. Als Kontrolle wurde nur der Leserahmen von *CD20* ohne Intron ebenfalls in HF1-3-Zellen integriert. Diese Zelllinie trägt den Namen HF1-3CD20.

Nach der Integration in die HF1-3-Zellen wurden die Konstrukte durch RT-PCR und Westernblot auf ihre Funktionalität untersucht. Für die RT-PCR wurden die Zellen 24 h und für den Westernblot 48 h mit bzw. ohne 50 μ M Tc inkubiert. Abbildung 3.21 A zeigt die RT-PCR und in Abbildung 3.21 B ist der Westernblot dargestellt. *CD20* wird normalerweise in HeLa-Zellen nicht exprimiert, deshalb zeigen HF1-3-Zellen weder in der RT-PCR noch im Westernblot ein Signal für *CD20*. Die HF1-3CD20-Zellen mit integriertem *CD20* zeigen sowohl in der RT-PCR als auch im Westernblot ein deutliches *CD20*-Signal. Das *CD20*-Signal ändert sich durch Tc weder in der RT-PCR noch im Westernblot. Dies zeigt, dass die Expression von *CD20* nicht durch Tc beeinflusst wird. Bei den Zellen HF1-3C1 und HF1-3C2 ändert sich das Verhältnis der Spleiß-Isoformen durch Tc. Bei den Zellen HF1-3C1 wird in Abwesenheit von Tc das aptamer-kontrollierte Exon gespleißt, wodurch die Spleiß-Isoform für das inaktive *CD20* entsteht. Im Westernblot ist kein Signal für *CD20* erkennbar. Durch Tc wird das aptamer-kontrollierte Exon übersprungen und es entsteht ein wenig der aktiven Spleiß-Isoform. Hierdurch ist auch ein schwaches Signal im Westernblot zu sehen, das *CD20* entspricht. Bei HF1-3C2 ist die Spleiß-Isoform ohne das aptamer-kontrollierte Exon ohne Tc vorhanden, wobei sie durch Tc ansteigt. Dies stimmt mit den Daten aus dem Westernblot überein, ohne Tc ist nur ein schwaches Signal von *CD20* zu erkennen, das durch Tc deutlich stärker wird. Die beiden Zelllinien (HF1-3C2 und HF1-3C2) unterscheiden sich deutlich in ihrer *CD20*-Expression.

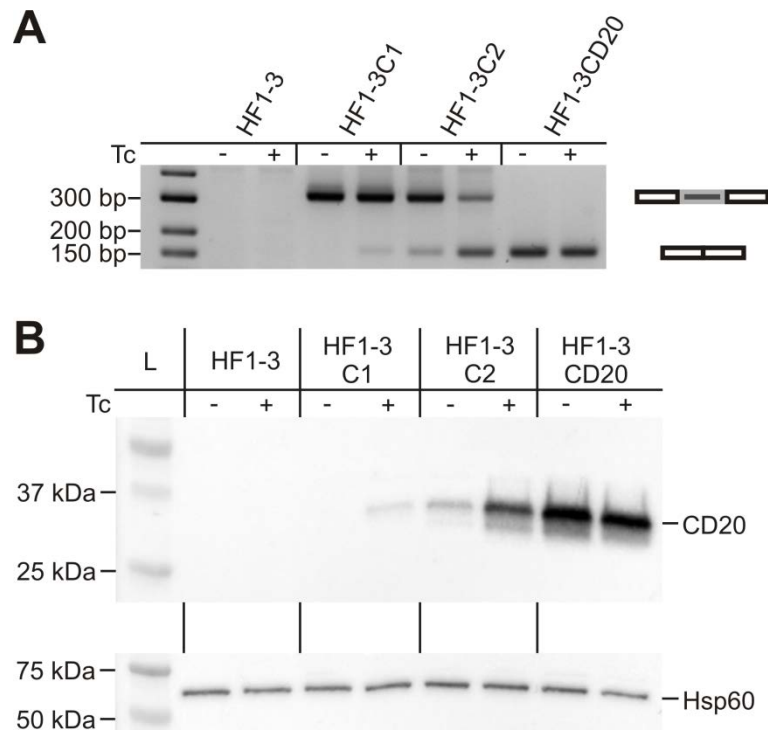


Abbildung 3.21 Analyse der stabil integrierten CD20-Konstrukte

Die Konstrukte C1 und C2 welche den Konstrukten L1 und L2 entsprechen wurden stabil in die HeLa-Zelllinie HF1-3 integriert. Hieraus resultieren die Stämme HF1-3C1 und HF1-3C2. Die Zelllinie HF1-3CD20 exprimiert CD20 konstitutiv. Die Zellen für die RT-PCR (A) wurden für 24 h mit bzw. ohne 50 μ M Tc behandelt. Für den Westernblot (B) wurden die Zellen 48 h mit bzw. ohne 50 μ M Tc behandelt. Als Ladekontrolle des Westernblots diente Hsp60 mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. CD20 hat ein Molekulargewicht von 33 kDa.

Als nächstes sollte getestet werden, ob sich die Zellen tatsächlich durch die Behandlung mit Rituximab abtöten lassen. Hierzu wurden die Zellen mit 10 μ g/ml Rituximab und 15% (v/v) Hasenserum inkubiert (Vogler et al., 2010). Das Hasenserum ist essentiell für die Wirkung von Rituximab, da es als Quelle für das Komplementsystem benötigt wird (Vogler et al., 2010). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, um das im Medium enthaltene Serum zu entfernen. Dieser Schritt ist ebenfalls essentiell, da das vorhandene Hasenserum den AlamarBlue-Assay durch Quenching der Fluoreszenz inhibiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese für 3 h mit AlamarBlue inkubiert und die Fluoreszenz gemessen.

Zunächst wurde überprüft, über welchen Zeitraum die Zellen mit Rituximab behandelt werden müssen, um einen Einfluss auf die Zellviabilität zu erzielen. Hierfür wurde die Viabilität der HF1-3C2 Zellen über drei Tage verfolgt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.22 dargestellt und zeigt, dass erst nach einer 3-tägigen Inkubation mit Rituximab und 50 μ M Tc die Zellen erfolgreich absterben. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit Rituximab leben noch 64% der Zellen, nach 2 Tagen sind es noch 37% und erst nach 3 Tagen sind nur noch 11% lebende Zellen vorhanden. Nur durch Rituximab (ohne Tc) kommt es nicht zum Absterben der Zellen. Bei dem Kontrollstamm HF1-3CD20 führt eine Behandlung mit Rituximab schon nach 24 Stunden zu einer Zellviabilität von 22%. Nach einer 2-tägigen Inkubation mit Rituximab sinkt die Zellviabilität auf 13% und ändert sich dann durch eine längere Inkubation mit Rituximab nicht mehr. Tc hat keinen Einfluss auf die Viabilität des Kontroll-Stamms HF1-3CD20.

Ergebnisse

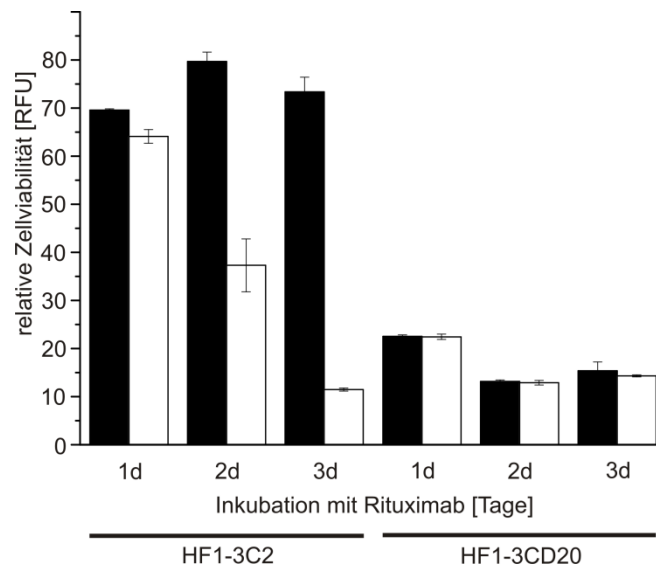


Abbildung 3.22 Analyse der Zellen in Gegenwart von Rituximab

Die Zellen HF1-3C2 und HF1-3CD20 wurden nur mit Rituximab (schwarzer Balken) und mit Rituximab und 50 µM Tc (weißer Balken) inkubiert. Nach 1, 2 und 3 Tagen wurde die Zellviabilität durch einen AlamarBlue-Test bestimmt. Hierbei wurde zur Normierung der Messwert von unbehandelten Zellen des jeweiligen Tages 100 gesetzt.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde ein erneuter Viabilitätstest durchgeführt, bei welchem die Zellen 3 Tage mit Tc und Rituximab oder zur Kontrolle mit Dox und Rituximab inkubiert wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.23 gezeigt. Bei den HF1-3 Zellen ohne Integration bleibt die Zellviabilität gleich, egal ob Rituximab oder Tc/Dox verwendet wurde. Die HF1-3CD20-Zellen, welche

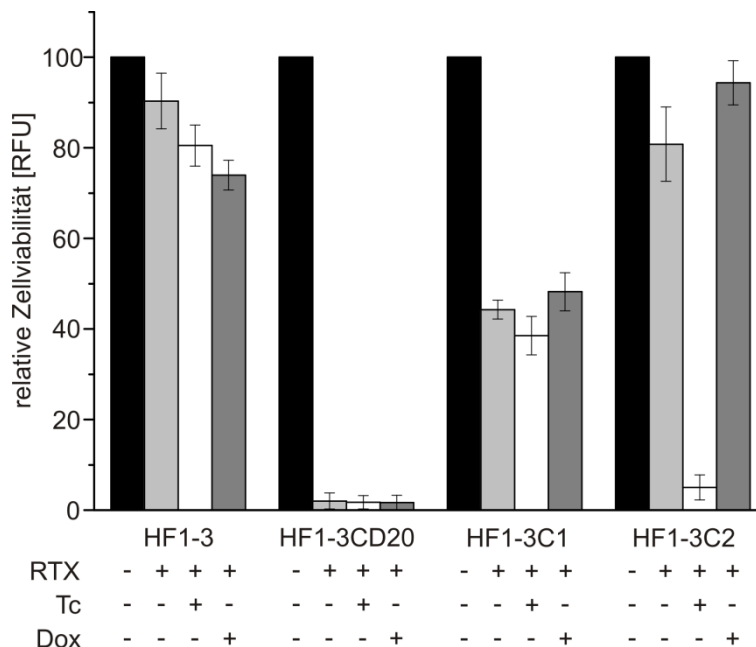


Abbildung 3.23 Test des Suizidsystems

Die Zellen wurden drei Tage mit Rituximab (RTX), RTX und Tetrazyklin (Tc) oder RTX und Doxyzyklin (Dox) inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls ohne Zusatz behandelt. Die Zellviabilität wurde durch einen AlamarBlue-Assay bestimmt. HF1-3 sind Zellen ohne Integration, bei HF1-3CD20 wird CD20 konstitutiv exprimiert, HF1-3C1 hat das C1-Konstrukt chromosomal integriert und HF1-3C2 hat das C2-Konstrukt chromosomal integriert. RTX = 10 µg/ml, Tc = 50 µM, Dox = 50 µM. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Viabilität von unbehandelten Zellen wurde jeweils 100 gesetzt.

CD20 konstitutiv exprimieren, sterben in Gegenwart von Rituximab ab. Ohne Rituximab können die Zellen überleben. Die Viabilität der HF1-3C1-Zellen sinkt durch Rituximab auf ca. 45% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Durch die Anwendung von Tc/Dox wird die Viabilität nicht weiter beeinflusst. Die HF1-3C2-Zellen hingegen, werden durch Rituximab nicht beeinflusst. Erst in Anwesenheit von Tc sinkt die Zellviabilität auf 2,62 RFU (relative Fluoreszenzeinheiten) im Gegensatz zu 75,71 RFU in Abwesenheit von Tc.

Somit verhalten sich die HF1-3C2-Zellen exakt wie es das Schema in Abbildung 3.19 zeigt. Ohne Tc wird Exon 2 in die mRNA eingebaut, wodurch inaktives CD20 hergestellt wird und die Zellen in Anwesenheit von Rituximab überleben können. In Anwesenheit von Tc wird Exon 2 aufgrund des Spleiß-Riboswitches übersprungen, wodurch es zur Expression des aktiven CD20 kommt. Somit kann Rituximab an CD20 binden, wodurch wiederum der Zelltod ausgelöst wird. Wird anstelle von Tc das strukturell ähnliche Dox zu den Zellen gegeben, können diese überleben, da Dox nicht von dem Tc-Aptamer gebunden wird (Muller et al., 2006). Somit zeigt diese Kontrolle, dass der beobachtete Effekt spezifisch durch die Interaktion des Aptamers mit seinem Liganden hervorgerufen wird.

3.7 Das Schalten zwischen zwei Spleiß-Isoformen ermöglicht die Expression zweier Proteine

Im Folgenden sollte versucht werden, durch den Riboswitch den Leserahmen einer mRNA so zu verschieben, dass zwei unterschiedliche Proteine exprimiert werden

Es sollte ein Reporter gen entwickelt werden, welches es ermöglicht, mit dem Riboswitch die Expression der Proteine eGFP und mCherry alternierend zu steuern. Hierzu wurde das Exon 3 des L2-Konstrukts durch die codierende Sequenz von *eGFP* und *mCherry* ausgetauscht (siehe Abbildung 3.24 A). Die beiden Gene befinden sich in unterschiedlichen Leserahmen, wobei durch Überspringen des aptamer-kontrollierten Exons der Leserahmen von *eGFP* und bei Integration des Exons der Leserahmen von *mCherry* verwendet wird. Das Startcodon befindet sich in Exon 1, wodurch an eGFP ein Peptid mit einer Länge von 16 Aminosäuren angehängt wird, an mCherry jedoch 311 Aminosäuren. Aufgrund dieser Anhänge musste zunächst überprüft werden, ob diese die Funktion der Proteine eGFP und mCherry beeinflussen. Hierzu wurden Kontrollkonstrukte angefertigt, die für eGFP mit N-terminalem Peptid bzw. für mCherry mit den 311 Aminosäuren codieren. Diese Kontrollkonstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert und die Funktionalität mit einem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Wie Abbildung 3.24 B zeigt, weisen alle Kontrollkonstrukte eine Fluoreszenz auf. Das eGFP-Kontrollkonstrukt zeigt ein spezifisches Signal für eGFP und kein Signal für mCherry, wohingegen das mCherry-Kontrollkonstrukt nur ein Signal für mCherry, keines jedoch für eGFP zeigt. Folglich stören die angehängten Aminosäuren die Funktionalität der Fluoreszenzproteine nicht.

Im nächsten Schritt wurde das eGFP-mCherry-Konstrukt mit dem aptamer-kontrollierten Exon untersucht. Zuerst wurde die Regulation auf RNA-Ebene durch eine RT-PCR analysiert. Hierfür wurde das eGFP-mCherry-Konstrukt in HEK293-Zellen transfiziert und die Zellen für 24 h mit bzw. ohne 50 µM Tc inkubiert. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert und zur Analyse der Spleiß-Isoformen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die in Abbildung 3.25 A dargestellte RT-PCR zeigt deutlich die beiden entstandenen Spleiß-Isoformen. Das untere Signal entspricht der mRNA ohne Exon 2, wodurch eGFP exprimiert wird und das obere Signal entspricht der mRNA mit Exon 2, von welcher

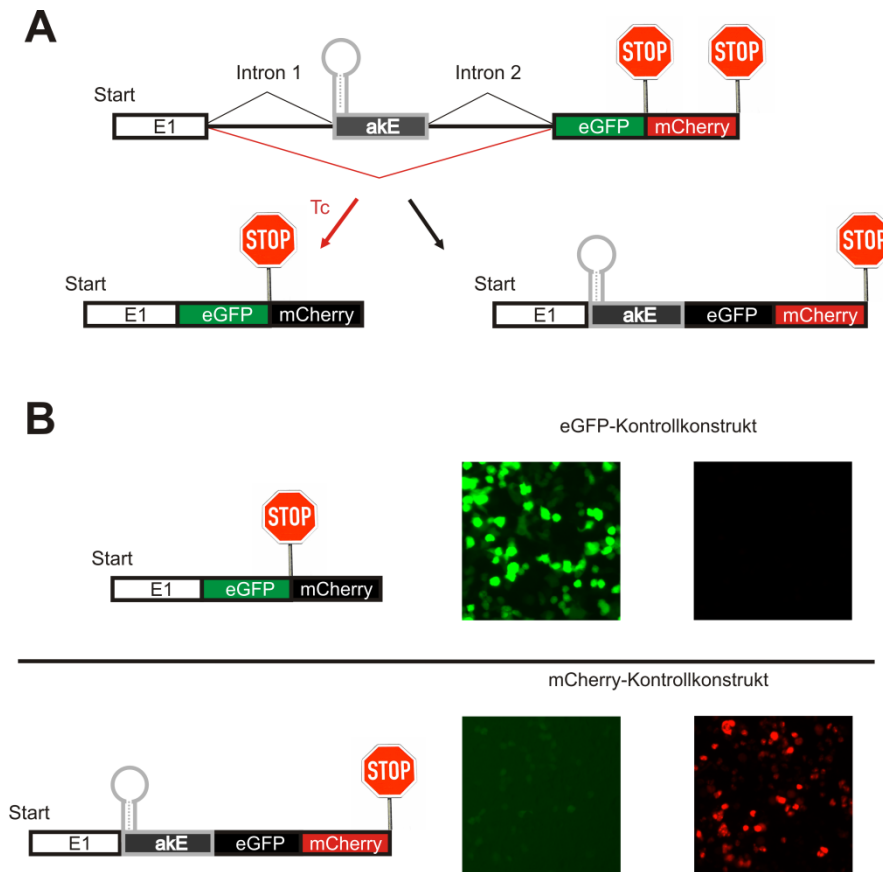


Abbildung 3.24 Schema des Reportergens zum Schalten zwischen zwei Proteinen

Durch den Riboswitch sollte die Expression der Gene *eGFP* und *mCherry* gesteuert werden. Hierzu wurde Exon 3 des L2-Konstrukts so modifiziert, dass es die codierende Sequenz der beiden Fluoreszenzproteine enthält. Beide Gene befinden sich in unterschiedlichen Leserahmen, so dass ohne das aptamer-kontrollierte Exon (akE) *eGFP* exprimiert wird, während mit akE *mCherry* exprimiert wird. Das alternative Spleißen des akE wird durch den Riboswitch L2 gesteuert, sodass Exon 2 in Anwesenheit von Tc übersprungen wird und ohne Tc wird es in die mRNA eingebaut.

(B) Die Kontrollkonstrukte, die nur für *eGFP* bzw. nur für *mCherry* mit dem angehängten Peptid am N-Terminus codieren, wurden durch Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Funktionalität überprüft.

mCherry exprimiert wird. Das Verhältnis der beiden Spleiß-Isoformen ändert sich durch Tc nur schwach. In Anwesenheit von Tc wird Exon 2 häufiger übersprungen, somit ist mehr der für *eGFP* codierenden Isoform vorhanden. Die RT-PCR konnte folglich die Funktionalität des Konstrukts nachweisen, jedoch ist das Ausmaß der Regulation nicht stark

Die RT-PCR zeigt noch ein drittes Signal, welches auch in untransfizierten Zellen (Mock) zu erkennen ist. Bei diesem Signal handelt es sich um ein unspezifisches Amplifikat. Dieses ist jedoch relativ schwach und überlagert sich nicht mit einer der Spleiß-Isoformen.

Als nächstes wurde die Fluoreszenz des *eGFP*-*mCherry*-Konstrukts mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierfür wurde das Konstrukt in HEK293-Zellen transfiziert und für 24 h mit bzw. ohne 50 μ M Tc inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert200) untersucht. Hierbei war jedoch sowohl ein Signal für *eGFP* als auch eines für *mCherry* zu erkennen. Allerdings waren keine Unterschiede in der Signalstärke der Fluoreszenzproteine erkennbar, egal ob Tc vorhanden war oder nicht. Zur Quantifizierung wurde das Konstrukt an einem Fluorimeter vermessen. HEK293-Zellen wurden transfiziert und 24 h mit bzw. ohne 50 μ M Tc inkubiert. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, gewaschen, in PBS aufgenommen und vermessen. Die Daten sind in Abbildung 3.25 B dargestellt. Die Messung zeigt, dass die *eGFP* Fluoreszenz in

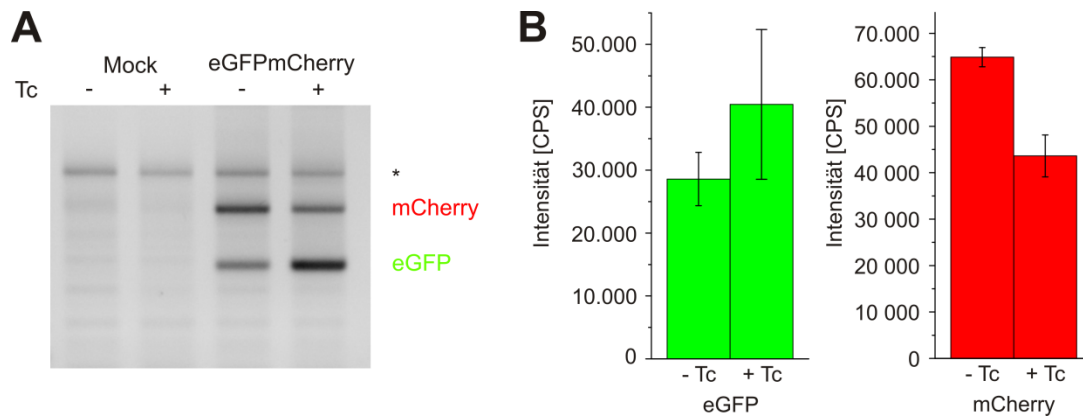


Abbildung 3.25 Analyse der eGFP-mCherry-Fusion

(A) Zeigt eine RT-PCR der eGFP-mCherry-Fusion mit bzw. ohne 50 μ M Tc. Als Kontrolle wurde ebenfalls eine RT-PCR mit RNA aus untransfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Das mit einem Stern gekennzeichnete Signal ist unspezifisch. Das untere Signal entspricht eGFP und das Signal darüber entspricht mCherry. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz der eGFP-mCherry-Fusion durch eine Fluorimetermessung analysiert **(B)**. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

Anwesenheit von Tc leicht steigt. Allerdings war der Anstieg nur sehr gering und der Messfehler relativ hoch, weswegen dieser Effekt nicht eindeutig ist. Auch bei mCherry ist zu erkennen, dass die Expression in Anwesenheit von Tc leicht absinkt. Der Regulationsfaktor beträgt jedoch nur 1,5 im Vergleich zu 4,6 im Luziferase-System.

Aufgrund der geringen Regulation des eGFP-mCherry-Konstrukts auf Proteinebene wurde die Strategie nicht weiter verfolgt.

4 Diskussion

4.1 Vor- und Nachteile unterschiedlicher Designs zur Kontrolle des Spleißens durch einen Riboswitch

Zur Kontrolle des Spleißens durch einen Riboswitch können verschiedene Strategien verfolgt werden. Einerseits kann das konstitutive Spleißen reguliert werden, welches besonders in niederen Eukaryoten vorkommt. Einen weiteren Ansatz in höheren Eukaryoten bietet die Kontrolle des alternativen Spleißens. Hierbei kann unter anderem die *Intron Retention* oder das Spleißen eines Kassetten-Exons durch einen Riboswitch kontrolliert werden. Bei einem für humane Zellen konzipierten Riboswitch, ist das Spleißen eines Kassetten-Exons zu bevorzugen, da es sich hierbei um die häufigste Form des alternativen Spleißens handelt. Die *Intron Retention* kommt hingegen in humanen Zellen kaum vor (<5%) (Kim et al., 2008b).

Für die Kontrolle des alternativen Spleißens eines Kassetten-Exons gibt es mehrere Möglichkeiten. Einerseits kann die Zugänglichkeit der Spleißstellen (5' SS, BP und 3' SS) durch einen Riboswitch kontrolliert werden. Hierbei wird die Spleißstelle in Anwesenheit des Liganden durch den Riboswitch so blockiert, dass sie nicht mehr durch das Spleißosom erkannt wird. In Abwesenheit des Liganden ist die Spleißstelle hingegen frei zugänglich. Prinzipiell ist es möglich, die Zugänglichkeit der 5' SS, des BP und auch der 3' SS durch einen synthetischen Riboswitch zu kontrollieren. In der Literatur gibt es hierzu bereits zwei Arbeiten. Mithilfe des Theophyllin-Aptamers konnte sowohl die 3' SS als auch der BP eines humanen Gens kontrolliert werden. Diese Arbeiten wurden jedoch nur *in vitro* durchgeführt (Kim et al., 2008a; Kim et al., 2005). Die Kontrolle der 5' SS gelang in dem eukaryotischen Modellorganismus *S. cerevisiae* durch das Tc-Aptamer (Weigand and Süss, 2007).

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation des alternativen Spleißens bietet die Kontrolle von *Enhancer*- oder *Silencer*-Bindestellen durch ein Aptamer. Hierdurch kann die Stärke einer Spleißstelle kontrolliert werden, wodurch diese in Abhängigkeit des Liganden besser oder schlechter erkannt wird.

Bei der Kontrolle einer Spleißstelle durch einen synthetischen Riboswitch ist die Kontrolle der 5' SS und des BP von Vorteil gegenüber der 3' SS, da hier das Aptamer vollständig im Intron platziert werden kann. Dadurch wird die Aptamersequenz komplett durch das Spleißen aus der prä-mRNA entfernt und kann keinen Einfluss auf die Proteinsequenz nehmen. Ein solches Design ist für die Kontrolle der 3' SS nicht möglich. In mehreren veröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl die Sequenz des Polypyrimidin-Trakts, als auch der Abstand zwischen BP und 3' SS entscheidend für den Spleißprozess sind (Chua and Reed, 2001; Kim et al., 2005). Deshalb muss zur Kontrolle der 3' SS das Aptamer in der Spleißstelle benachbarten Exon platziert werden. Hierdurch kommt es jedoch zur Veränderung der codierenden Sequenz und somit des Proteins. Im Falle eines Kassetten-Exons wird jedoch die Sequenz nur verändert, wenn das Exon auch Teil der RNA ist. Wird das Exon übersprungen ist auch das Aptamer nicht in der RNA enthalten. Dies kann ausgenutzt werden indem durch den Einbau des Exons die Genexpression gesteuert wird. Einerseits kann der Einbau des aptamer-kontrollierten Exons zu einem verfrühten Stopcodon führen, was dazu führt, dass ein verkürztes Protein translatiert wird. Je nachdem an welcher Stelle sich das verfrühte Stopcodon befindet, wird die mRNA außerdem durch den NMD-Mechanismus (englisch: *nonsense-mediated decay*) abgebaut (Brognia and Wen, 2009). Andererseits kann der Einbau des aptamer-kontrollierten

Exons zu einer Leserasterverschiebung führen. Hierdurch wird ein anderer Leserahmen translatiert und es entsteht ein fehlerhaftes Protein. Beide Strategien wurden in dieser Arbeit erfolgreich angewendet.

Eine weitere in dieser Arbeit nicht verwendete Strategie könnte darin bestehen, das aptamer-kontrollierte Exon in den UTR zu setzen. Hierdurch könnte im 3' UTR die mRNA Stabilität durch die Verwendung eines alternativen Poly-A-Signals beeinflusst werden. Wird das aptamer-kontrollierte Exon im 5' UTR platziert, könnte ein alternatives Startcodon verwendet werden. Diese beiden Mechanismen werden von den natürlichen Spleiß-Riboswitchen verwendet (Cheah et al., 2007; Wachter et al., 2007).

4.2 Der Einfluss des Aptamers auf das Spleißen

Durch die Insertion des Aptamers bringt man strukturierte Elemente in die Nähe der für das Spleißen wichtigen Stelle. Aus der Literatur ist bekannt, dass dies einen Einfluss auf den Spleißprozess haben kann (Warf and Berglund, 2010). Der Einfluss des Tc-Aptamers auf die Erkennung der Spleißstelle unterscheidet sich bei dem BP und der 3' SS. Der Einbau des Tc-Aptamers führt bei der Kontrolle des BP bei den Konstrukten BP-4, BP5 und BP6 zu keiner Veränderung des Spleißens (siehe Abbildung 3.3). Bei der Kontrolle der 3' SS ist dies anders. Hierbei ändert sich bei allen Konstrukten das Verhältnis der Spleiß-Isoformen durch das Aptamer. Vergleicht man in der RT-PCR die Signale der Spleiß-Isoform E1-E3 zwischen der Kontrolle und den einzelnen Konstrukten so fällt auf, dass in der Kontrolle ohne Aptamer mehr der Spleiß-Isoform E1-E3 vorhanden ist, als in den Konstrukten mit Aptamer (siehe Abbildung 3.6). Dies bedeutet, dass die 3' SS durch das Aptamer besser erkannt wird als ohne das Aptamer. Eine mögliche Erklärung kann sein, dass durch das Aptamer eine Bindestelle für einen Spleißregulator eingeführt wurde. Eine Suche nach möglichen Spleiß-*Enhancern* mit dem Programm SpliceAid2 (Piva et al., 2012) zeigte mögliche Bindestellen für ein SR-Protein. Hierbei handelt es sich um zwei Bindestellen von SRSF5 (SRp40) (Liu et al., 1998). Eine SRSF5-Bindestelle befindet sich in dem einzelsträngigen Bereich L2-3 und ist Teil der Tc-Bindetasche, weswegen sich eine Mutation der Sequenz auf die Aptamer-Ligand-Interaktion auswirken kann. Eine weitere mögliche SRSF5 Bindestelle ist im Stamm L2 lokalisiert. Diese hat vermutlich jedoch keinen Einfluss auf das Spleißen, da der Stamm bei dem Konstrukt M5 mutiert wurde und bei diesem Konstrukt ebenfalls Exon 2 besser gespleißt wird als ohne Aptamer.

Die Veränderung des Spleißens durch das Aptamer hat jedoch keinen Nachteil für das aptamer-kontrollierte Exon. Ganz im Gegenteil, der Einbau des aptamer-kontrollierten Exons in die RNA führt dazu, dass in Abwesenheit von Tc kein funktionsfähiges Protein translatiert wird. Somit wirkt sich die bessere Erkennung der 3' SS durchaus positiv auf das Verhalten des Riboswitches aus, indem es dazu führt, dass die Basalexpression gesenkt wird.

4.3 Der Einfluss des Liganden Tc auf das Regulationssystem

Tc ist ein Antibiotikum, welches die Translation reguliert, indem es an das Ribosom, speziell an die ribosomale RNA, bindet. Es ist also prinzipiell in der Lage, RNA zu binden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass einige Antibiotika die Reaktion der selbstspleißenden Introns, sowie die Aktivität

von Ribozymen inhibieren können (Rogers et al., 1996; Stage et al., 1995; von Ahsen and Schroeder, 1991). Von einer Gruppe um Manfred Müller wurde deshalb der Einfluss von einigen Antibiotika auf das Spleißen *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Tetrazyklin-Derivat Chlor-Tetrazyklin bei einer Konzentration von 500 μM das Spleißen zu 60% inhibiert. Bei Tc ist dies jedoch nicht der Fall, es kommt durch 500 μM Tc nur zu einer 10 prozentigen Inhibierung des Spleißens *in vitro*, was von den Autoren als vernachlässigbar eingestuft wurde (Hertweck et al., 2002). Die verwendete Tc-Konzentration von 500 μM liegt jedoch weit über den Konzentrationen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Kontrollen zeigen, dass es zu keinem signifikanten Einfluss von Tc auf das Spleißen kommt (siehe Abbildung 3.10 und Abbildung 3.13). Bei den Luziferase-Reportergenkonstrukten weist die Kontrolle ohne Aptamer sowie die L2-A13U Mutante lediglich eine Regulation von 10% auf. Diese geringe Regulation der Kontrolle kann als unspezifisch eingestuft werden. Auch durch höhere Tc-Konzentrationen von 200 μM kommt es in der L2-A13U Mutante nur zu einer Regulation von 10%. Aufgrund der publizierten Daten sowie der in dieser Arbeit durchgeführten Kontrollen, ist ein unspezifischer Effekt von Tc auf das Spleißen unwahrscheinlich. Folglich handelt es sich bei Tc um einen geeigneten Liganden um in humanen Zellen das Spleißen zu regulieren.

4.4 Möglicher Wirkmechanismus des Aptamers

Der genaue Wirkmechanismus des Tc-Aptamers auf das Spleißen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Der Fokus lag viel mehr auf der Entwicklung und der Anwendung eines aptamer-kontrollierbaren Exons. Dennoch lassen sich aufgrund publizierter Daten Vermutungen über einen möglichen Wirkmechanismus des Spleiß-Riboswitches anstellen (siehe Abbildung 4.1). Die 3' SS wurde in den P1 Stamm des Aptamers integriert, auf ähnliche Weise wie die 5' SS in den Konstrukten zur Kontrolle des Spleißens in Hefe. Für das Aptamer in den Hefe-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass der P1 Stamm in Abwesenheit von Tc eine gewisse Flexibilität aufweist und teilweise auch einzelsträngig vorliegt. Dies konnte über *in-line Probing* nachgewiesen werden. Nach Bindung von Tc liegt der P1 Stamm jedoch ausschließlich doppelsträngig vor (Weigand and Suess, 2007). Diese Beobachtung führt zu der Vermutung, dass ohne Tc die 5' SS von dem Spleißosom noch erkannt

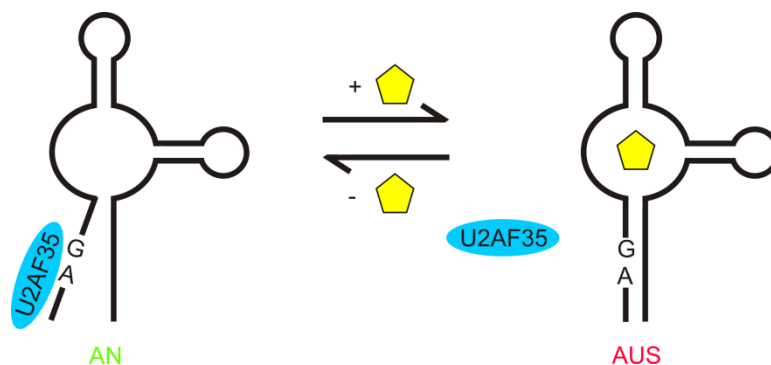


Abbildung 4.1 Vermuteter Wirkmechanismus des Riboswitches auf die 3' SS

Ohne Tc (gelbes Fünfeck) ist das AG der 3' SS für die U2AF35 Untereinheit des Spleißosoms zugänglich und die Spleißstelle wird erkannt. Durch Tc wird der P1 Stamm stabilisiert und das AG der 3' SS ist nicht mehr zugänglich.

werden kann und an die Spleißstelle bindet. Nach Tc-Zugabe ist die Spleißstelle aufgrund des stabilisierten P1 Stammes nicht mehr zugänglich. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Kontrolle der ribosomalen Bindestelle in Archaea durch das Tc Aptamer gemacht werden (Demolli et al., 2014). Aufgrund dieser Daten kann vermutet werden, dass bei den in dieser Arbeit untersuchten Konstrukten die U2AF35 Untereinheit des U2AF snRNP nicht mehr an die mRNA binden kann. Diese Untereinheit erkennt das AG der 3' SS. Die Bindung von U2AF an die mRNA ist wichtig für die Ausbildung des spleißosomalen E-Komplexes (Wahl et al., 2009). Hierdurch ist der Spleiß-Akzeptor nicht mehr vorhanden und eine alternative 3' SS wird verwendet, was dazu führt, dass das aptamer-kontrollierte Exon übersprungen wird.

Auch bei natürlichen Riboswitchen kann ein ähnlicher Mechanismus beobachtet werden. Bei der Kontrolle des *NMT1*-Gens durch den natürlichen TPP-Riboswitch führt die Bindung von TPP dazu, dass die 5' SS durch Umfaltung der RNA maskiert wird und eine alternative 5' SS verwendet wird (Cheah et al., 2007).

4.5 Analyse der unterschiedlichen Minigen-Konstrukte

Wie bereits diskutiert wird die Zugänglichkeit der Spleißstelle über das Ausmaß der Flexibilität des P1 Stammes reguliert (*breathing*). Dieses *breathing* kann über die Stabilität des Stammes (Länge, ΔG) beeinflusst werden und war aus früheren Arbeiten bekannt (Demolli et al., 2014; Weigand and Suess, 2007). Auch spielt die relative Lage der Spleißstelle eine wichtige Rolle. Deshalb wurden zur Kontrolle des BP und auch zur Kontrolle der 3' SS verschiedene Konstrukte hergestellt. Hierbei hat sich wieder gezeigt, dass die Sequenz des Stammes P1 die Funktionalität des Aptamers maßgeblich beeinflusst. Bei dem Konstrukt BP-1 ist in Abwesenheit von Tc fast ausschließlich die Spleiß-Isoform E1-E2-E3 vorhanden (siehe Abbildung 3.3). Das E2 trotz Aptamer gespleißt wird zeigt, dass der BP zugänglich ist und durch das Spleißosom erkannt werden kann. Außerdem verhält sich das Konstrukt BP-1 wie die Kontrolle ohne Aptamer, was zeigt, dass das Aptamer das Spleißen nicht per se beeinflusst. Werden jedoch zwei A-U-Basenpaare des BP-1 Konstrukts durch G-C-Basenpaare ausgetauscht, verschwindet die Spleiß-Isoform E1-E2-E3 und es ist hauptsächlich die Spleiß-Isoform E1-E3 vorhanden. Da die ausgetauschten A-U-Basenpaare nicht Teil der BP-Konsensussequenz sind, kommt die Änderung des Spleißverhaltens vermutlich durch die Stabilisierung des P1 Stammes. Wird der Stamm P1 jedoch wie bei dem Konstrukt BP-5, an seinem unteren Ende um zwei G-C-Basenpaare verlängert und die BP-Konsensussequenz näher in Richtung der Tc-Bindetasche verschoben, wirkt sich das nicht auf das alternative Spleißen aus. Dieses Konstrukt verhält sich identisch zu BP-1, obwohl die Stabilität des Stammes P1 bei BP-2 ($\Delta G = -14,1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) und BP-5 ($\Delta G = -14,4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) nahezu identisch ist (die ΔG -Werte der anderen Konstrukte sind im Anhang gezeigt). Auch eine Stabilisierung des L2-Loops durch die Sequenz UUCG wie bei dem Konstrukt BP-6 führt nicht zu einem schaltbaren Riboswitch.

Bei der Spleißregulation in Hefe konnte durch die Verwendung einer Minimer-Variante des L2-Loops der Schalfaktor um mehr als das Doppelte verbessert werden (Weigand and Suess, 2007). Allerdings wurde in dieser Arbeit für alle Konstrukte die Minimer-Variante des Loops verwendet. Das Austauschen der Tetraloopsequenz wirkt sich jedoch nicht auf die Regulation des BP aus. Generell ist der L2-Loop nicht an der Liganden Interaktion beteiligt und kann wie in der Aptamer-Variante die für

die Röntgenkristallographie verwendet wurde, auch komplett entfernt werden (Xiao et al., 2008). Die veröffentlichten Daten zeigen ebenfalls keine strukturellen Veränderungen durch Tc im Bereich des L2-Loops (Hanson et al., 2005; Weigand and Suess, 2007).

Die zur Kontrolle der 3' SS verwendeten Aptamerkonstrukte verhalten sich teilweise anders als die Konstrukte zur Kontrolle des BP. Das Konstrukt M1 zeigt nur eine sehr schwache Regulation des Spleißens (siehe Abbildung 3.8). Werden jedoch zwei bzw. drei A-U-Basenpaare in der Nähe der Bindetasche ausgetauscht, wie das bei M2 bzw. M3 der Fall ist, kommt es zu einer deutlichen Regulation des Kassetten-Exons. Bei dem Konstrukt M7 wurden ebenfalls zwei A-U Basenpaare durch G-C Basenpaare ausgetauscht. Diese befinden sich am Anfang des P1 Stamms und somit von der Bindetasche entfernt. Das Konstrukt M7 ist nicht in der Lage das Spleißen von E2 signifikant zu regulieren, obwohl die Stabilität des Stamms P1 mit einem ΔG -Wert von $-19,2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ zwischen der Stabilität der Konstrukte M2 ($-18,8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) und M3 ($-20,8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) liegt. Es scheint, als sei die Position, an welcher der Stamm P1 stabilisiert wird entscheidend für die Regulation des Aptamers. Eine Stabilisierung nahe der Bindetasche wirkt sich stärker auf die Regulation des Aptamers aus, als eine Stabilisierung am anderen Ende der Bindetasche.

Werden ausgehend von Konstrukt M3 sukzessiv G-C Basenpaare in den Stamm P1 oberhalb der 3' SS eingefügt, wirkt sich dies ebenfalls auf das Spleißen aus. Je stabiler der Stamm P1 wird, desto schlechter wird die 3' SS erkannt und desto häufiger ist die Spleiß-Isoform E1-E3 in Abwesenheit von Tc vorhanden. Der Unterschied in der Stamm-Stabilität zwischen M3 ($-20,8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) und M12 ($-29,8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) beträgt $9 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Dieser Stabilitätsunterschied führt dazu, dass bei M12 in Abwesenheit von Tc die 3' SS nicht mehr erkannt wird. Somit konnten die durchgeführten Experimente zeigen, dass der P1 Stamm essentiell für die Regulation ist. Der Stamm muss eine bestimmte Stabilität aufweisen, damit das Aptamer regulatorisch aktiv ist. Allerdings spielt die Position, an der der P1 Stamm stabilisiert wird eine entscheidende Rolle. Eine Stabilisierung nahe der Bindetasche wirkt sich auf die Regulation des Riboswitches aus, während eine Stabilisierung am unteren Ende des Stamms sich nicht auf die Regulation auswirkt.

Die Beobachtungen, dass die Sequenz des P1 Stamms und auch die Position der Spleißstelle innerhalb des P1 Stamms entscheidend für die Regulation sind, stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Daten überein. Bei der Spleißregulation in Hefe zeigte das Aptamer-Konstrukt mit dem stabilsten Stamm und einer komplett im P1 Stamm platzierten 5' SS den besten Regulationsfaktor (Weigand and Suess, 2007). Auch bei der Kontrolle der 3' SS durch das Theophyllin-Aptamer führte ein instabiler P1 Stamm des Aptamers zu einer schlechteren Regulation (Kim et al., 2005).

4.6 Das aptamer-kontrollierte Exon kann in einen anderen Kontext transferiert werden

Nachdem das aptamer-kontrollierte Exon erfolgreich in einem Minigen-System etabliert wurde, sollte überprüft werden, wie gut es sich in unterschiedliche Gene übertragen lässt. Dies konnte für drei unterschiedliche Gene gezeigt werden, wodurch die Robustheit des Systems verifiziert werden konnte. Im Folgenden soll der genetische Kontext, in den das aptamer-kontrollierte Exon jeweils übertragen wurde, näher erläutert werden.

Bei dem Transfer des Minigen-Systems in das Luziferase-Reportergensystem wurde das aptamer-kontrollierte Exon mit 150 bp der flankierenden Introns in ein neues Intron gesetzt. Hierbei wurde das

Insert willkürlich in die Mitte des *bgl2*-Introns kloniert, wodurch zwei chimäre Introns entstanden. Das Intron 1 (siehe Abbildung 3.9) besteht aus der 5' SS des *bgl2*-Introns, sowie dem BP und der 3' SS des Dihydrofolatreduktase-Gens des chinesischen Hamsters. Intron 2 besteht hingegen aus der 5' SS des Dihydrofolatreduktase-Gens des chinesischen Hamsters und dem BP sowie der 5' SS des *bgl2*-Introns. Obwohl nur ein Teil der flankierenden Intronsequenzen übertragen wurde (150 bp), ist das aptamer-kontrollierte Exon in dem Luziferase-Reporter gen aktiv und kann das Spleißen des Kassetten-Exons regulieren. Das Verhältnis der Spleiß-Isoformen ist darüber hinaus in beiden Genen relativ ähnlich (siehe Abbildung 3.8 und Abbildung 3.10 A).

Weiterhin wurde das aptamer-kontrollierte Exon in dem Leserahmen des natürlichen Transkriptionsfaktors *MAX* platziert. Hierbei wurden die kompletten Introns mit dem aptamer-kontrollierten Exon von dem Luziferase-Reporter gen in den Leserahmen von *MAX* übertragen. Das natürliche *MAX*-Gen besteht aus 5 Exons (E1, E2, E3, E4 und E5) und 4 Introns. Bei Exon 2 handelt es sich um ein alternativ gespleißtes Kassetten-Exon (Kemmerer and Weigand, 2014). Der Leserahmen des *MAX*-WT Proteins enthält nur die Sequenz der Exons E1, E3, E4 und E5. Genau dieser Leserahmen, ohne Introns, wurde für die Klonierung der *MAX*-Konstrukte verwendet. Das aptamer-kontrollierte Exon mit den flankierenden Introns wurde in die natürliche Exons-Grenze zwischen E3 und E4 inseriert. (siehe Abbildung 3.17). Hierbei unterscheidet sich die Sequenz der Exon-Grenzen in *MAX* deutlich von der Exon-Grenze in dem Luziferase-Reporter gen (siehe Abbildung 4.2). Die an die Introns angrenzenden Sequenzen ähneln etwas der aus dem Minigen, wobei die Übereinstimmung gering ist.

Für die Integration des aptamer-kontrollierten Exons in den Leserahmen von *CD20* wurde erneut das aptamer-kontrollierte Exon aus dem Luziferase-Reporter gen mit den kompletten benachbarten Introns verwendet. Dieses Insert wurde in den Leserahmen eines codonoptimierten *CD20*-Gens integriert. Diese codonoptimierte Variante des *CD20*-Gens wurde verwendet, da hierdurch die Expression von *CD20* deutlich gesteigert werden konnte (Vogler, 2009). Das natürliche *CD20*-Gen besteht aus 7 Exons und 6 Introns, wobei sich das Startcodon in Exon 2 befindet. Die erste natürliche Exon-Grenze befindet sich 158 bp hinter dem Startcodon. Die Sequenz dieser Exon-Grenze wurde durch die Codonoptimierung verändert, weswegen das Insert in diesem Fall nicht in eine natürliche Exon-Grenze gesetzt wurde. Für die Kontrolle von *CD20* wurde eine Sequenz gesucht, die relativ nahe am Startcodon liegt und den benachbarten Exonsequenzen des Luziferase-Reporter gens entspricht. Eine solche Sequenz befindet sich 46 bp hinter dem Startcodon, wodurch zwei Basenpaare der benachbarten Exon-Sequenz identisch zu der des Luziferase-Reporter gens sind (siehe Abbildung 4.2). Die durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass sich das aptamer-kontrollierte Exon zusammen mit den benachbarten Introns gut in einen relativ beliebigen Kontext setzen lässt, ohne

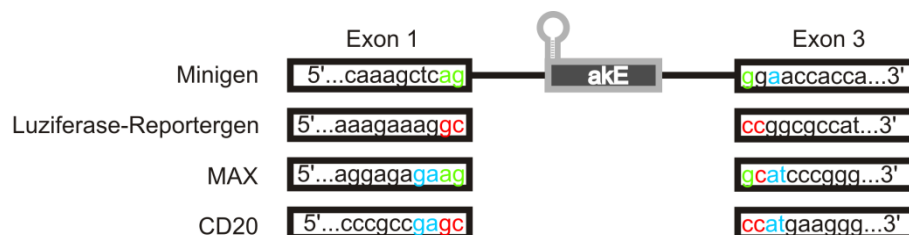


Abbildung 4.2 Übersicht über die verschiedenen Exon Sequenzen

In der Abbildung sind die Sequenzen der Exons 1 und 2 dargestellt, die an die Introns angrenzen. Zwischen den beiden Exons befindet sich das aptamer-kontrollierte Exon (akE). Es sind jeweils 10 nt der angrenzenden Sequenz gezeigt. Übereinstimmungen der ersten 4 nt sind farblich markiert.

seine Funktionalität zu verlieren. Diese Insertions-Kassette, bestehend aus dem aptamer-kontrollierten Exon und den benachbarten Introns, war in vier getesteten Systemen in der Lage die Genexpression zu regulieren. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Insertions-Kassette in ein beliebiges Gen übertragen werden kann, um dort die Genexpression zu kontrollieren. Es sollte auch möglich sein, ein Intron eines natürlichen Gens durch die Insertions-Kassette zu ersetzen und hierdurch die Expression des Gens zu kontrollieren. Theoretisch sollte es möglich sein jedes beliebige Intron zu ersetzen, allerdings wurde in dieser Arbeit immer mit einem sehr kurzen ersten Exon gearbeitet. Deshalb sollte eines der ersten Introns (Intron 1, 2 oder 3) gewählt werden. Soll die Insertions-Kassette nicht an die Position eines natürlichen Intron inseriert werden, sollte darauf geachtet werden, dass die Insertionsstelle einer der Sequenzen aus Abbildung 4.2 ähnelt. Da der Einfluss der Intronposition im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde und immer mit einem relativ kurzen ersten Exon (kleiner als 178 bp) gearbeitet wurde, sollte eine Position gewählt werden die im vorderen Bereich des zu kontrollierenden Gens liegt.

4.7 Das aptamer-kontrollierte Exon im Vergleich zu anderen synthetischen Spleiß-Riboswitchen

In der Literatur sind mehrere Systeme beschrieben, die in der Lage sind, das Spleißen humaner Gene zu regulieren. Ein System beruht auf dem Theophyllin-Aptamer und ist ähnlich zu dem in dieser Arbeit verwendeten System. Der BP, bzw. die 3' SS wurde in den Stamm des Theophyllin-Aptamers integriert, wodurch die Spleißstelle in Anwesenheit des Liganden nicht mehr zugänglich ist (Kim et al., 2008a; Kim et al., 2005). Bei der Kontrolle der 3' SS durch das Theophyllin-Aptamer wurde im Gegensatz zu dieser Arbeit nicht das Spleißen eines Kassetten-Exons, sondern die *Intron Retention* kontrolliert. Diese ist jedoch in humanen Zellen kaum vertreten. So konnte die Kontrolle der 3' SS auch nur *in vitro* gezeigt werden, wobei eine 5-fache Regulation bei einer Theophyllin-Konzentration von 2 mM erzielt wurde (Kim et al., 2005).

In einer weiteren Arbeit wurde das Spleißen eines Kassetten-Exons durch die Kontrolle des BP mit dem Theophyllin-Aptamer reguliert. Die Funktionalität des Spleiß-Riboswitches konnte in HeLa-Zellen nachgewiesen werden, wobei bei einer Konzentration von 1 mM Theophyllin auf RNA-Ebene eine Regulation von ca. 2-fach erzielt wurde (Kim et al., 2008a). Im Vergleich hierzu konnte in dieser Arbeit mit einer 5-fach geringeren Konzentration an Tc (50 µM) auf Proteinebene ein Schalfaktor von 4,6 erzielt werden. Durch eine Tc-Konzentration von 200 µM konnte der Schalfaktor auf 6,6 verbessert werden und ist somit bei einer geringeren Liganden-Konzentration höher als die der bereits publizierten Spleiß-Riboswitche.

Eine weitere Art der Spleiß-Regulation konnte durch ein Protein-bindendes Aptamer erzielt werden (Culler et al., 2010). Hierfür wurde ein Aptamer, welches das MS2-Hüllprotein bindet, so in einem Intron platziert, dass durch die Interaktion von MS2 mit dem Aptamer das Spleißen eines Kassetten-Exons reguliert werden konnte. Dies konnte sowohl für die 3' SS als auch für die 5' SS erreicht werden. Der Regulationsfaktor dieser Riboswitche lag zwischen 2- und 4-fach auf RNA-Ebene. Dies ist etwas schlechter als das in dieser Arbeit entwickelte aptamer-kontrollierte Exon. Darüber hinaus haben Protein-basierte Riboswitche den Nachteil, dass das für den Riboswitch benötigte Protein ebenfalls in der Zelle exprimiert werden muss. Hierbei ist es schwierig, die Proteinmenge genau zu

kontrollieren. Außerdem muss die Proteinexpression auch durch einen induzierbaren Promotor reguliert werden, da sonst der Riboswitch nicht gezielt kontrolliert werden kann. Bei dem hier entwickelten Schalter ist eine dosisabhängige Regulation möglich. Darüber hinaus kann der Schaltzeitpunkt durch Zugabe von Tc genau festgelegt werden. Die Regulation erfolgt schneller, da Tc sofort an das Aptamer bindet, während bei einem Protein basierten System das benötigte Protein erst exprimiert werden muss, um Schalten zu können. Somit stellt der in dieser Arbeit entwickelt Riboswitch einige Vorteile zu den bereits existierenden Schaltern dar.

4.8 Kritische Betrachtung des Suizidsystems

4.8.1 Vergleich der stabilen Integration mit der transienten Transfektion

Durch die Entwicklung des Suizidsystems, was auf der kontrollierten Expression von CD20 beruht, sollte gezeigt werden, dass das aptamer-kontrollierte Exon in der Lage ist, die Expression eines humanen Gens zu regulieren. Im Gegensatz zu den anderen Systemen wurden die CD20-Konstrukte nicht transient getestet. Dies hatte mehrere Gründe. Zum einen ist es bei einer transienten Transfektion nie möglich, alle Zellen mit DNA zu transfizieren (siehe Abbildung 6.1). Dies stellt für die meisten Anwendungen kein Problem dar, da die nicht transfizierten Zellen für den jeweiligen Assay keine Rolle spielen. In diesem Fall wären allerdings untransfizierte Zellen in der Lage, in Anwesenheit von Rituximab zu überleben, wodurch es zu einem falsch-negativen Ergebnis kommt. Ein weiteres Problem von transienten Transfektionen ist die Anzahl an aufgenommenen DNA-Molekülen. Die Zellen nehmen bei einer transienten Transfektion mit Lipofectamin2000 unterschiedliche Mengen an DNA auf, wodurch das transfizierte Konstrukt in jeder Zelle unterschiedlich stark exprimiert wird. Auch das spielt in den meisten Fällen keine Rolle. Allerdings könnte es in diesem Fall aufgrund der vorhandenen Basalexpression der Konstrukte dazu kommen, dass Zellen, die mehr DNA aufgenommen haben, eine CD20 Expression aufweisen die ausreicht, um durch Rituximab den Zelltod auszulösen. Hierdurch würde ebenfalls das Messergebnis verfälscht werden. Durch die stabile Integration wird sichergestellt, dass alle Zellen das Konstrukt gleichstark exprimieren und es hierdurch zu einem genauen Messergebnis kommt.

4.8.2 Die Antwort der Zelle auf Rituximab

Die als Kontrolle mitgeführten konstitutiv CD20 exprimierenden Zellen HF1-3CD20 reagieren relativ schnell auf die Gegenwart von Rituximab (siehe Abbildung 3.22). Innerhalb von 24 h sinkt die Zellviabilität in Gegenwart von Rituximab auf 22% und nach 48 h auf 13% ab. In den Zellen HF1-3C2 mit dem aptamer-kontrollierten Exon ist dies anders. Hier sinkt die Zellviabilität deutlich langsamer und beträgt nach 72 h 11%. Diese langsamere Antwort der Zellen auf Rituximab kommt vermutlich durch den Riboswitch, der als AN-Schalter konzipiert wurde. Aufgrund des Designs ist die CD20-Expression in Abwesenheit von Tc abgeschaltet und wird durch Tc induziert. Bis sich eine ausreichende Menge an CD20 in der Zelle akkumuliert, die es ermöglicht, durch Rituximab den Zelltod auszulösen, dauert es vermutlich etwas. Bei den Zellen HF1-3CD20 ist hingegen immer genug CD20 vorhanden, weswegen hier die Antwort der Zelle auf Rituximab schneller ist. Generell sollten die Zellen relativ

schnell auf Rituximab reagieren wie publizierte Daten zeigen. In einer humanen T-Zelllinie (HuT 78) konnte durch eine Analyse mittels Durchflusszytometrie nach einer 4-stündigen Behandlung eine 80% geringere Zellviabilität als bei unbehandelten Zellen beobachtet werden (Vogler et al., 2010).

4.8.3 Das CD20 basierte Suizidgen: Anwendungsbereiche und der Vergleich zu anderen Systemen

Suizidgene haben verschiedene Anwendungsbereiche und werden unter anderem als Sicherheitsschalter in der Gentherapie verwendet. Die Gentherapie ist ein vielversprechender Ansatz, durch den sich eventuell Krankheiten wie HIV oder auch Krebs heilen lassen (Cross and Burmester, 2006; Riddell et al., 1996). Für die Bekämpfung von Krebs können T-Zellen genetisch verändert werden, sodass sie Krebszellen erkennen und diese durch das Immunsystem beseitigt werden. Bei der Transplantation dieser T-Zellen kann es jedoch zu einer sogenannten Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD, englisch: *Graft-versus-Host Disease*) kommen, bei der die transplantierten Zellen eine Immunreaktion gegen den Wirt auslösen. In so einem Fall muss es möglich sein die transplantierten Zellen aus dem Wirtsorganismus zu entfernen, was durch die Verwendung von Suizidgenen ermöglicht wird (Bonini et al., 2007). Ein weiterer Einsatz von Suizidgenen findet in Forschungsansätzen der Krebstherapie statt. Diese Ansätze beruhen darauf, dass ein Protein gezielt in Krebszellen exprimiert wird, wo es den Zelltod auslöst (Karjoo et al., 2016). Die gezielte Expression des Proteins kann durch einen nur in Krebszellen aktiven Promotor realisiert werden. Hierbei hat sich der hTERT-Promotor als geeignet erwiesen, zu dem es eine klinische Studie der Phase I gibt (Nemunaitis et al., 2010).

Eines der bekanntesten Suizidgene beruht auf der Expression der Thymidinkinase aus dem Herpes-simplex-Virus. Diese Thymidinkinase phosphoryliert das Guanodin analoge Molekül Ganciclovir (GCV). Phosphoryliertes GCV führt durch Einzelstrangbrüche in der DNA zum Zelltod, während GCV nicht toxisch für die Zellen ist. Hierdurch lassen sich durch eine gezielte Expression der Thymidinkinase Zellen in Gegenwart von GCV abtöten (Beltinger et al., 1999; Nicholas et al., 2003). Basierend auf der Expression der Thymidinkinase konnte von dem Smolke-Labor ein Suizidgen konstruiert werden. Bei diesem Gen wird durch alternatives Spleißen mit einem Protein-bindenden Aptamer die Expression der Thymidinkinase in HEK293-Zellen kontrolliert (Culler et al., 2010). Das System ist ähnlich zu dem in dieser Arbeit entwickelten CD20 basierten System. Allerdings hat die Verwendung der Thymidinkinase einige Nachteile. Für die Anwendung muss GCV in relativ hoher Konzentration verabreicht werden (10 mg/kg/Tag), wodurch das Knochenmark sowie die Blutbildung im Knochenmark angegriffen werden (Biron, 2006; Caruso, 1996). Aufgrund des viralen Ursprungs der Thymidinkinase kann es auch zu einer Immunantwort gegen die Zellen kommen, welche die Thymidinkinase exprimieren, wodurch diese durch das Immunsystem zerstört werden und die Gentherapie unwirksam wird (Berger et al., 2006; Traversari et al., 2007). Dieses Problem stellt sich durch die Verwendung von CD20 nicht, da es sich um ein natürliches, menschliches Protein handelt, das nicht durch das Immunsystem erkannt wird (Serafini et al., 2004).

Folglich könnte das in dieser Arbeit entwickelte Suizidsystem sowohl zur Bekämpfung von Krebszellen als auch als Sicherheitsschalter für die Gentherapie verwendet werden. Hierbei kann einerseits die Expression von CD20 durch Tc gesteuert werden, wodurch CD20 nicht dauerhaft exprimiert wird und somit Probleme, die durch die heterologe Expression entstehen, vermieden werden. Andererseits

kann in Anwesenheit von Tc gezielt der Zelltod durch Rituximab ausgelöst werden. Sowohl bei Rituximab als auch bei Tc handelt es sich um bereits für den Menschen zugelassene Medikamente, was deren Nutzung vereinfacht.

4.9 Kritische Analyse des Designs zur Expression zweier Spleiß-Isoformen

Durch die Kontrolle des alternativen Spleißens bieten sich verschiedenste Anwendungsmöglichkeiten. So können durch den Wechsel zwischen zwei Spleiß-Isoformen zwei unterschiedliche Proteine exprimiert werden. Auch ist es vorstellbar, eine Signalsequenz an ein Protein zuhängen oder nicht. Ein Ansatz wurde in dieser Arbeit durch die sich ausschließende Expression von eGFP und mCherry verfolgt. Durch eine RT-PCR konnte auf RNA-Ebene beobachtet werden, dass das Spleißen des Kassetten-Exons durch Tc kontrolliert werden kann (siehe Abbildung 3.25 A). Auf Proteinebene konnte jedoch kein deutlicher Regulationseffekt beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte die Stabilität der Fluoreszenzproteine sein. Das Protein eGFP ist mit einer Halbwertszeit von 26 h recht stabil (Corish and Tyler-Smith, 1999). Die Firefly-Luziferase, deren Expression erfolgreich kontrolliert werden konnte, hat hingegen nur eine Halbwertszeit von 3 bis 4 h (Leclerc et al., 2000). Der auf RNA-Ebene beobachtete Effekt könnte zu gering sein, um mit einem stabilen Protein wie eGFP eine Regulation auf Proteinebene zu erzielen. Um dies zu überprüfen sollte eine Degradationssequenz wie die PEST-Sequenz, an eGFP angehängt werden, um die Halbwertszeit zu verringern (Li et al., 1998). Allerdings konnte diese Idee aufgrund des Designs nicht weiter verfolgt werden, da die PEST-Sequenz in beiden nicht codierenden Leserahmen ein Stopcodon enthält. Hierdurch würde die Translation immer in der PEST-Sequenz stoppen und mCherry könnte nicht translatiert werden. Des Weiteren war auch das Design des Reportergens nicht ideal. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die angehängten Aminosäuren nicht zu einem funktionslosen Fluoreszenzprotein führen, allerdings wäre es besser, wenn nur das Fluoreszenzprotein ohne zusätzliche Aminosäuren exprimiert werden würde. Dies wäre durch ein alternatives Design ermöglicht worden, das in Abbildung 4.3 gezeigt ist. Das verwendete Gen besteht aus drei Exons und zwei Introns, wobei es sich bei Exon 2 um ein Kassetten-Exon handelt. Die Exons 1 und 2 codieren für keine Proteinsequenz, während Exon 3 die codierende Sequenz von *eGFP* und *mCherry* enthält. Beide Gene haben ein eigenes Start- und ein eigenes Stopcodon, allerdings besitzt *eGFP* nur ein Startcodon, wenn Exon 2 übersprungen wurde. Wird Exon 2 in die mRNA eingebaut hat das *eGFP*-Gen kein Startcodon wodurch mCherry exprimiert wird. Dieses Konstrukt wurde ursprünglich entwickelt um in einem Hochdurchsatzverfahren

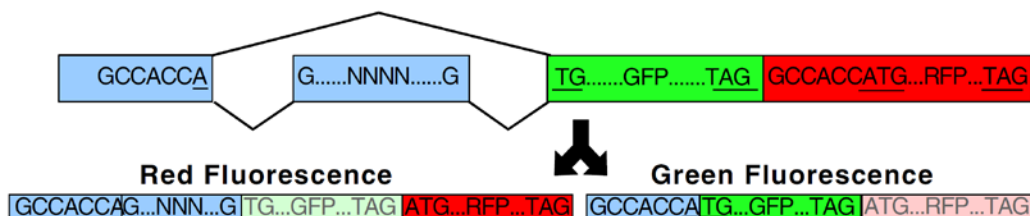


Abbildung 4.3 Alternatives Design zur Expression von eGFP und mCherry

Das Gen besteht aus drei Exons wobei Exon 1 und Exon 2 keine für ein Protein codierende Sequenz enthalten. In Exon 3 befindet sich die codierende Sequenz von eGFP und mCherry, wobei beide ein eigenes Start- und Stopcodon besitzen. Das Startcodon für eGFP bildet sich nur wenn Exon 2 übersprungen wird. Wird Exon 2 gespleißt hat eGFP kein Startcodon und es wird das Startcodon von mCherry verwendet (entnommen aus (Stoilov et al., 2008)).

das alternative Spleißen natürlicher Exons zu analysieren (Stoilov et al., 2008). Allerdings könnte es auch dazu verwendet werden zwei beliebige Proteine durch die Kontrolle des alternativen Spleißens zu exprimieren. Dieser Ansatz konnte jedoch aus Zeitgründen nicht realisiert werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

Tabelle 5.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
0,5% Trypsin-EDTA	Life Technologies, USA
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	Roth, Karlsruhe
Agar	Oxoid, Heidelberg
Agarose peqGold Universal	Peqlab, Erlangen
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)	Peqlab, Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Life Technologies, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Life Technologies, USA
ECL Prime Blocking Reagent	Amersham, USA
Essigsäure (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt	VWR, Darmstadt
Ethidumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hasenserum	Sigma-Aldrich, USA
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
Hygromycin	Invivogen, Frankreich
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, USA
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Life Technologies, USA
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	Life Technologies, USA
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Opti-MEM	Life Technologies, USA
Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol, 25:24:1 (PCI)	Roth, Karlsruhe
Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 40, 19:1)	Roth, Karlsruhe
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich, USA
Roti Aqua Phenol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SDS-Pellets	Roth, Karlsruhe

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Spermidin	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin Hydrochlorid (Tc)	Sigma-Aldrich, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	Life Technologies, USA
Trypton	Oxoid, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zeocin	Invivogen, Frankreich

Tabelle 5.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Biofuge (Fresco17, Pico17, PrimoR)	Heraeus Christ, Osterode
Brutschrank	Heraeus Christ, Osterode
Feinwaage	Acculab, USA
Fluorolog-3 Spectrofluorometer	Horiba Jobin Yvon
Geldokumentation mit UV Schirm (254 nm und 312 nm)	INTAS, Göttingen
Heizblock	VWR, Darmstadt
Infinite M200 Fluoreszenz Plattenleser	Tecan Trading AG, Schweiz
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen
iTC200 Microcalorimeter	MicroCal, UK
Magnetrührer IKA RET basic	IKA, Staufen
Milli-Q Wasserentsalzung mit RNase Filter	Millipore, Frankreich
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	peqLab, Erlangen
NU-6 KL UV-Handlampe	Benda, Wiesloch
PAGE-Systeme	C.B.S. Scientific, Del Mar
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
TC-10 Automated Cell Counter	Biorad, München
Thermocycler Peqstar Universal 96	peqLab, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 5.3 Kits und kommerziell erhältliche Systeme

Kits und kommerzielle Systeme	Hersteller
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega, USA
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher, USA
MaxTract High Density (1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße)	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Mega Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Giga Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
ECL Plus western blotting detection reagents	GE Healthcare, England
Clarity Western Blotting Substrate	BioRad, München
GlycoBlue	Invitrogen, USA
Trizol	Life Technologies, USA
Mini-Protean TGX Precast Gel any Kd	BioRad, München
TransBlot TurboTransfer Pack Mini 0,2 μ m PVDF	BioRad, München

Tabelle 5.4 Verwendete Enzyme

Enzym / Proteine	Hersteller
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase [2 U/μl]	New England Biolabs, USA
SuperScript II Reverse Transcriptase [200 U/μl]	Life Technologies, USA
MuLV Reverse Transkriptase [50 U/μl]	Applied Biosystems, USA
Taq DNA-Polymerase [5 U/μl]	New England Biolabs, USA
T7 RNA-Polymerase	Im Labor aufgereinigt
EcoRI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
NcoI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
SmaI [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
HindIII [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
EcoRI [20U/μl]	New England Biolabs, USA
NotI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
NheI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
KasI [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
Clal [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
BamHI [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
KasI [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
T4 DNA Ligase [400 U/μl]	New England Biolabs, USA
T4 Polynukleotidkinase [10 U/μl]	New England Biolabs, USA
TURBO DNase [2 U/μl]	Life Technologies, USA

Tabelle 5.5 Verwendete Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
peqGold Ultra Low Range DNA-Leiter II	PeqLab, Erlangen
peqGold 1 kB DNA-Leiter	PeqLab, Erlangen
Low range ssRNA ladder	New England Biolabs, USA
Precision Plus Protein All Blue Standards	BioRad, München

Tabelle 5.6 Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-CD20	ThermoFisher, PA5-16701, 1:500
Anti-HSP60	Abcam, ab6530, 1:2.000
Anti-Hase-HRP-Konjugat	Jackson, 111-035-003, 1:7.000
Anti-FLAG	Sigma, A8592-1MG, 1:5.000

Tabelle 5.7 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'→3'
BP-A437C-NheI-r	ctggccagctagcaccaacc
BP-A437C-NotI-f	gcacacgcgccgctgttaccgcag
BP-AA436CC-NotI-f	gcacacgcgccgctgttcccgcagtg
CD20_rev	aggccgttcatgatctgcag
CD20_rev	aggccgttcatgatctgcag
CD20-spleiss-f	gtgaacggcaccttcccc
CD20-TC3_f1	cacacaggatccatgaccacccccggaacagcgtgaacggcaccttccccgcccagcgtgagtctatg ggacccttg
CD20-TC3_f3	ctcttatcttctcccacagccatgaaggccccatcgcca

Material und Methoden

Name	Sequenz 5'→3'
CD20-TC3_r2	tggcgatggggccctcatggctgtgggaggaagataagag
eGFP-spleiss-rev	aagctgtgctgcttcatgtg
hhi_fwd	aattctaatacgaactactatagggcgctctggattccacggtacatccagctgatgagtcccaataggacg agacgccccggga
hhi_rev	agctccccggcgctctgctctatttgggactcatcagctggatgtaccgtggaatccaggacgcctatagtg agtcgtattag
Intr1TC-10_f	aggaactaaaacataccagacttcggtctggagaggtgaagaatacaccacc
Intr1TC-11_f	aaagtctggagaggtgaagaatacaccacctgcgcgctgaaacaaccaaacaacc
Intr1TC-11_r	tcttcacctctccagactttcatctggtatgtttgvcgvcgctgaaaaaagagaaactgvcg
Intr1TC-12_f	aaagtctggagaggtgaagaatacaccacctgcgcgctgaaacaaccaaacaacc
Intr1TC-12_r	tcttcacctctccagactttcatctggtatgtttgvcgvcgctgaaaaaagagaaactgvcg
Intr1TC-13_f	aaagtctggagaggtgaagaatacaccacctgcgcgctgaaacaaccaaacaacc
Intr1TC-13_r	tcttcacctctccagactttcatctggtatgtttgvcgvcgctgaaaaaagagaaactgvcg
Intr1TC-3_f	aagctctggagaggtgaagaatacaccacctgcgcctgaaacaaccaaacaacc
Intr1TC-3_r	ttcttcacctctccagactttcatctggtatgtttgvcgvcctgaaaaaagagaaactgvcg
Intr1TC-4_f	aagctctggagaggtgaagaatacaccacctggcgcctgaaacaaccaaacaacc
Intr1TC-4_r	ttcttcacctctccagactttcatctggtatgtttggcgcctgaaaaaagagaaactgvcg
Intr1TC-5_f	gtctggagaggtgaagaatacaccacctggcctgaaacaaccaaacaacc
Intr1TC-5_r	tattcttcacctctccagactttcatctggtatgtttggcctgaaaaaagagaaactgvcg
Intr1TC-6_f	tttcaggaactaaaacataccggcgaaagccggagaggtgaagaatacaccacc
Intr1TC-7_f	gtctggagaggtgaagaatacaccacctagtctctgagacaaccaaacaacc
Intr1TC-7_r	ttcttcacctctccagactttcatctggtatgttttagtctctgagaaaagagaaactgvcg
Intr1TC-8_f	aagctctggagaggtgaagaatacaccacctagtctctgaggcaaccaaacaacc
Intr1TC-8_r	ttcttcacctctccagactttcatctggtatgttttagtctctgaggaaaagagaaactgvcg
Intr1TC-9_f	gtctggagaggtgaagaatacaccacctagcctgaggcaaccaaacaaccaaacaacc
Intr1TC-9_r	tattcttcacctctccagactttcatctggtatgttttagcctgaggaaaagagaaactgvcg
Intr1TCPB-3_f	cacacgcgccgctaacagcctaataacataccagatgaaagtctggagaggtgaagaatacaccacc taggctgttaacgcagtgtttctc
Intr1TCPB-4_f	cacacgcgccgctaacagcctgaaacataccagatgaaagtctggagaggtgaagaatacaccacc ctcggctgttaacgcagtgtttctc
Intr1TCPB-5_f	cacacgcgccgctaacactaaaacataccagatgaaagtctggagaggtgaagaatacaccaccta gtgttaacgcagtgtttctc
Intr1TCPB-6_f	cacacgcgccgcttaacaaactaaaacataccagatgaaagtctggagaggtgaagaatacaccac acctagttgttaacgcagtgtttctc
Intr1TCPB-7_f	gcacacgcgccgctaacaaactaaaacataccagacttcggtctggagaggtgaagaatacaccacc ctagttgttaacgcagtgtttctc
KanR_1_r	gtgccagctcatagccgaat

Name	Sequenz 5'→3'
KeGFP-f1	ggccccgaattcaccatggaagacgccaaaaacataaagaaagggcccggcgccattggcagcgtgag caagggcgaggagctg
KeGFP-f4	gtaggtagcggcagcggtagcgtgagcaagggcgaggagga
KeGFP-r3	cacgctaccgctgccgctacctactgtacagctcgtcca
KeGFP-r5	cccgactctagattactgtacagctcgtcca
MAX-E3-4-f1	aagctcaagcttagcgataacg
MAX-E3-4-f3	cccatcactccaaggagagaaggtgagtctatgggaccttg
MAX-E3-4-f5	cctcttatcttctcccacaggcacccgggcccacaaatcc
MAX-E3-4-r2	caagggccccatagactcaccttctccttgaggatgagg
MAX-E3-4-r4	ggattgggcccgggatgcctgtgggaggaagataagagg
MAX-E3-4-r6	ttatctatcgatttagctggcc
MAX-spleiβ1-f	agacgatgacgacaagctcaa
MAX-spleiβ1-r	tccagaagagcattctgccg
pMA_exl-exIII_f	tgtcccagaataagggcatc
pMA_NheI-univers_r	gatctcactggccagctagc
pMA_NotI-f	gcacacgcgccgctgtaacgc
pWHE-Ex1-Ex2-f	gacgccaaaaacataaagaaagg
pWHE-Ex1-Ex2-r2	gaaacgaacaccacggtagg
TC3-hh-2r	gctcgaagcggccgcttgtttgtttgagcgcgttctcgtcctattgg
TC3-hh-3f	ccaaataggacgaaacgcgctcaaacaacaaagccggccgcttcgagc
TC3-hh-PstI-4r	tccttctgcagtttaccacatt
TC3-hh-XbaI-1f	gtaattctagagtcggggcgcaacaacaaagcgcgctcctggattcgt
TCIN1-BP1-f	gcacacgcgccgcttaacaactaaaacataccagatgaaagtctggagaggtgaagaatacgcacca cctagtttgtaacgcagtgtttctc
TCIN1-BP2-f	gcacacgcgccgcaacaactaaaacataccagatgaaagtctggagaggtgaagaatacgcaccacc tagtttgtaacgcagtgtttctctt

Tabelle 5.8 Verwendete Plasmide

Plasmidname	Beschreibung	Herkunft
pcDNA5/FRT	Integrationsplasmid für das Flp-In-System	Thermo Fisher, USA
pFLAG_MAX1	L1 Konstrukt in pFLG-MAX	Diese Arbeit
pFLAG_MAX2	L2 Konstrukt in pFLG-MAX	Diese Arbeit
pFLAG_MAX3	L2 Konstrukt in pFLG-MAX	Diese Arbeit
pFLAG_MAX10	L10 Konstrukt in pFLG-MAX	Diese Arbeit
pFLAG_MAX11	L11 Konstrukt in pFLG-MAX	Diese Arbeit
pFLAG_MAX2-A13U	L2 mit A13U Mutation in pFLG-MAX	Diese Arbeit

Material und Methoden

Plasmidname	Beschreibung	Herkunft
pFLAG_MAX-WT	Konstrukt ohne Aptamer in pFLG-MAX	Diese Arbeit
pFLAG-WT	Enthält die codierende Sequenz des MAX WT Proteins mit einem FLAG Tag am N-Terminus.	(Kemmerer and Weigand, 2014)
pFRT-CD20	Integrationsplasmid für das Flp-In-System mit codonoptimiertem <i>CD20</i> unter Kontrolle des CMV Promotors	M. Grez, GSH Frankfurt am Main
pFRT-CD20-C1	L1 Konstrukt im Leserahmen der codierenden Sequenz von CD20	Diese Arbeit
pFRT-CD20-C2	L2 Konstrukt im Leserahmen der codierenden Sequenz von CD20	Diese Arbeit
pJET	Vektor des Kits Clone JET PCR Cloning Kit, wurde für Subclonierung von DNA-Fragmenten verwendet	Thermo Fisher (USA)
pMA_cmv_i6u555*WT	Hamster Dehydrofolatreduktase Minigen (Zhang and Chasin, 2004)	A. Wittmann, TU Darmstadt
pMA-CMV-i6u555_BP1	Derivat von pMA-CMV-i6u555-KanR-WT, Tc-Aptamer kontrollier BP von Intron I	Diese Arbeit
pMA-CMV-i6u555_BP2	Derivat von pMA-CMV-i6u555_BP1, zwei AU-Basenpaare durch GC ersetzt	Diese Arbeit
pMA-CMV-i6u555_BP3	Derivat von pMA-CMV-i6u555_BP1, drei AU-Basenpaare durch GC ersetzt	Diese Arbeit
pMA-CMV-i6u555_BP4	Derivat von pMA-CMV-i6u555_BP1, kürzerer P1 Stamm	Diese Arbeit
pMA-CMV-i6u555_BP5	Derivat von pMA-CMV-i6u555_BP1, verlängerter P1 Stamm	Diese Arbeit
pMA-CMV-i6u555_BP6	Derivat von pMA-CMV-i6u555_BP1, L2 zu UUCG mutiert	Diese Arbeit
pMA-CMV-i6u555_BP-A437C	Derivat von pMA-CMV-i6u555-KanR-WT, mit mutiertem BP Adenosin	Diese Arbeit
pMA-CMV-i6u555_BP-AA436CC	Derivat von pMA-CMV-i6u555-KanR-WT, mit zwei mutierten BP Adenosinen	Diese Arbeit
pMA-CMV-i6u555-KanR-WT	pMA_cmv_i6u555*WT Derivat mit <i>KanR</i> Fragment in Exon 3	A. Wittmann, TU Darmstadt
pOG44	Flp Rekombinase Expressionsvektor	Thermo Fisher, USA
pRL-SV40	<i>Renilla</i> -Luziferase unter Kontrolle des SV40 Promotors	Promega, USA

Plasmidname	Beschreibung	Herkunft
psiCHECK2-3'K19	<i>Renilla</i> -Luziferase mit K19 Hammerhead im 3' UTR	(Beilstein et al., 2015)
psiCHECK2-3'K4	<i>Renilla</i> -Luziferase mit K4 Hammerhead im 3' UTR	(Beilstein et al., 2015)
psiCHECK2-3'K5	<i>Renilla</i> -Luziferase mit K5 Hammerhead im 3' UTR	(Beilstein et al., 2015)
pWHE200-bg	<i>luc+</i> Gen mit <i>bgl2</i> Intron unter SV40 Promotor	J. Weigand, FAU Erlangen- Nürnberg
pWHE237-bg	<i>luc+</i> Gen mit <i>bgl2</i> Intron unter CMV Promotor	J. Weigand, FAU Erlangen- Nürnberg
pWHE237mod	Modifikation des Vektors pWHE237- bg, die Schnittstellen <i>NotI</i> und <i>NheI</i> wurden entfernt	Diese Arbeit
pWHE237mod-L1	M1 Konstrukt in pWHE237mod	Diese Arbeit
pWHE237mod-L2	M2 Konstrukt in pWHE237mod	Diese Arbeit
pWHE237mod-L3	M3 Konstrukt in pWHE237mod	Diese Arbeit
pWHE237mod-L10	M10 Konstrukt in pWHE237mod	Diese Arbeit
pWHE237mod-L11	M11 Konstrukt in pWHE237mod	Diese Arbeit
pWHE237mod-L12	M12 Konstrukt in pWHE237mod	Diese Arbeit
pWHE237mod-L2A13U	M2 mit A13U Mutation	Diese Arbeit
pWHE237mod-WT	Konstrukt ohne Aptamer in pWHE237mod	Diese Arbeit
pWHE237mod-L2-K19	L2-Konstrukt mit K19 im 3' UTR	Diese Arbeit
pWHE237mod-L2-K4	L2-Konstrukt mit K4 im 3' UTR	Diese Arbeit
pWHE237mod-L2-K5	L2-Konstrukt mit K5 im 3' UTR	Diese Arbeit
pWHE237mod-eGFP	eGFP Kontroll-Konstrukt	Diese Arbeit
pWHE237mod-mCherry	mCherry Kontroll-Konstrukt	Diese Arbeit
pWHE237mod-eGFPmCherry	Konstrukt mit eGFP und mCherry in unterschiedlichen Leserahmen	Diese Arbeit

Tabelle 5.9 Verwendete prokaryotische Stämme

Stammname	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F-</i> ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1</i> <i>endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 thiλ- gyrA96 relAI λ-</i>	(Hanahan, 1983)

Tabelle 5.10 Verwendete eukaryotische Stämme

Stammname	Genotyp	Herkunft
HeLa Zellen	Humane Gebärmutterhalskrebszellen	DSMZ, Braunschweig
HEK293 Zellen	Humane embryonale Nierenzellen	DSMZ, Braunschweig
HF1-3 Zellen	HeLa-Zelllinie mit einer genomischen FRT-Stelle	(Berens et al., 2006)
HF1-3CD20	HF1-3 Zellen mit integriertem CD20	Diese Arbeit
HF1-3C1	HF1-3 Zellen mit integriertem C1 Konstrukt	Diese Arbeit
HF1-3C3	HF1-3 Zellen mit integriertem C3 Konstrukt	Diese Arbeit

Tabelle 5.11 Puffer und Lösungen

Puffer	Bestandteil	Konzentration
10x TBE	Tris	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA	10 mM
50x TAE	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	1 mM
	pH 8,3	
6x DNA-Ladepuffer	Tris-HCl, pH 7,6	10 mM
	EDTA	60 mM
	Glycerin	60% (v/v)
	Bromphenolblau	0,03% (w/v)
	Xylencyanol	0,03% (w/v)
2x RNA-Ladepuffer	Formamid	
	EDTA	25 mM
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)
10x TBST	Tris-HCl, pH 7,6	200 mM
	NaCl	1,5 M
	Tween20	0,1% (v/v)
10x Laufpuffer (Proteingel)	Tris	250 mM
	Glycin	1,9 M
	SDS	1% (w/v)
	pH 8,3	
4x Protein-Ladepuffer	2-Mercaptoethanol	15% (v/v)
	20% SDS-Lösung	20% (v/v)
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)
	Glycerin	50% (v/v)
TE	Trypsin	0,05% (w/v)
	EDTA	0,022% (w/v)
	in 1x PBS pH 7,4	
Lyse-Puffer	Tris-Cl, pH 8,0	20 mM
	EDTA	2 mM

Puffer	Bestandteil	Konzentration
	NaCl	137 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	IGEPAL CA-630	1% (v/v)
	Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC)	0,5% (v/v)

5.1.1 Verwendete Basisvektoren

pMA_cmV_i6u555_KanR-WT

Der Vektor pMA_cmV_i6u555_KanR-WT enthält ein Minigen, welches aus drei Exons und zwei Introns besteht und durch den CMV-Promotor kontrolliert wird (siehe Abbildung 5.2). Exon 1 und Exon 3 sowie beide Introns stammen aus dem Hamster Dihydrofolatreduktase-Gen (Zhang and Chasin, 2004). Exon 2 ist ein synthetisches Exon, welches aus Wiederholungen der Sequenz CCAAACAA besteht und keine bekannten Spleiß-*Enhancer* oder -*Silencer* enthält. Zur Modifikation von Exon 2 wurden die Schnittstellen *NotI* und *NheI* verwendet. Um eine spezifische Bindesequenz für die reverse



Abbildung 5.2 Übersicht über das verwendete Minigen

Das verwendete Minigen besteht aus drei Exons (E1, E2 und E3) und zwei Introns. E1 und E3 sowie beide Introns stammen aus dem Hamster Dihydrofolatreduktase-Gen (Zhang and Chasin, 2004). Exon 2 ist synthetisch und besteht aus mehreren Wiederholungen der Sequenz CCAAACAA.

Transkription (RT) sowie die anschließende PCR zu erhalten, wurde ein Teil des *KanR*-Gens (36 nt lang) von A. Wittmann in Exon 3 kloniert. Die Plasmidkarte ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

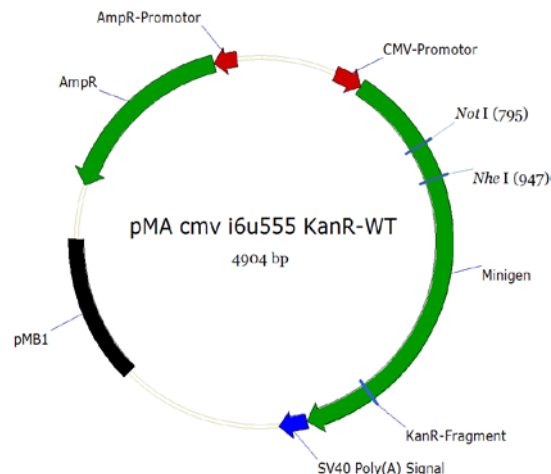


Abbildung 5.1 Plasmidkarte von pMA_cmV_i6u555_KanR-WT

Gezeigt ist der CMV-Promotor, das Minigen mit einem Teil des Kanamycin-Gens (KanR-Fragment), die SV40 Polyadenylierungssequenz (SV40-Poly(A) Signal), ein Replikationsursprung für *E. coli* (pMB1) sowie ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*). Für Klonierungen wurden die Restriktionsendonukleasen *NheI* und *NotI* verwendet.

pRL-SV40

Das Plasmid pRL-SV40 (siehe Abbildung 5.3) wurde als Kontrollplasmid für alle Luziferase-Reporter-Gen-Messungen verwendet. Das Plasmid enthält die codierende Sequenz der *Renilla*-Luziferase (*Rluc*) unter Kontrolle des SV40-Promotors (mit SV40 Enhancer). Zur Termination der Transkription dient das SV40 Poly-A Signal. Das Plasmid wurde bei allen Luziferase-Reporter-Gen-Messungen kotransfiziert. Die gemessene Aktivität der *Renilla*-Luziferase diente der Normierung.

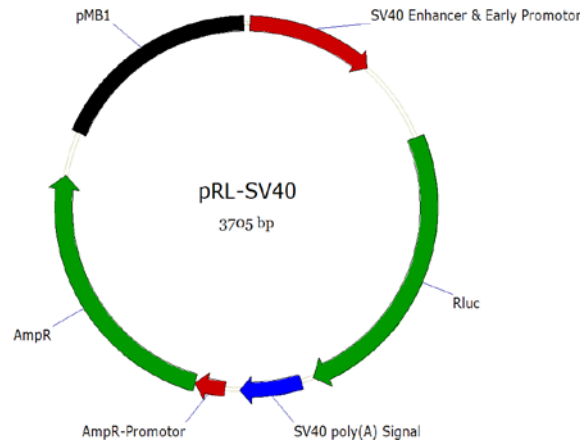


Abbildung 5.3 Plasmidkarte von pRL-SV40

Das Plasmid enthält die codierende Sequenz der *Renilla*-Luziferase (*Rluc*), den SV40-Promotor mit Enhancer, das SV40 Poly(A)-Signal, ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) und den pMB1 Replikationsursprung für *E. coli*.

pWHE200-bg und pWHE237-bg

Die Plasmide pWHE200-bg und pWHE237-bg (siehe Abbildung 5.4) wurden als Ausgangsplasmide für alle Luziferase-Reporter-Genkonstrukte verwendet. Beide Plasmide codieren für die Firefly-Luziferase (*luc+*), wobei der codierende Bereich des *luc+*-Gens durch das konstitutiv gespleißte *bgl2*-Intron unterbrochen wird. Auf dem Plasmid pWHE200-bg wird das *luc+*-Gen durch den SV40-Promotor kontrolliert, während es auf dem Plasmid pWHE237-bg durch den CMV-Promotor kontrolliert wird.

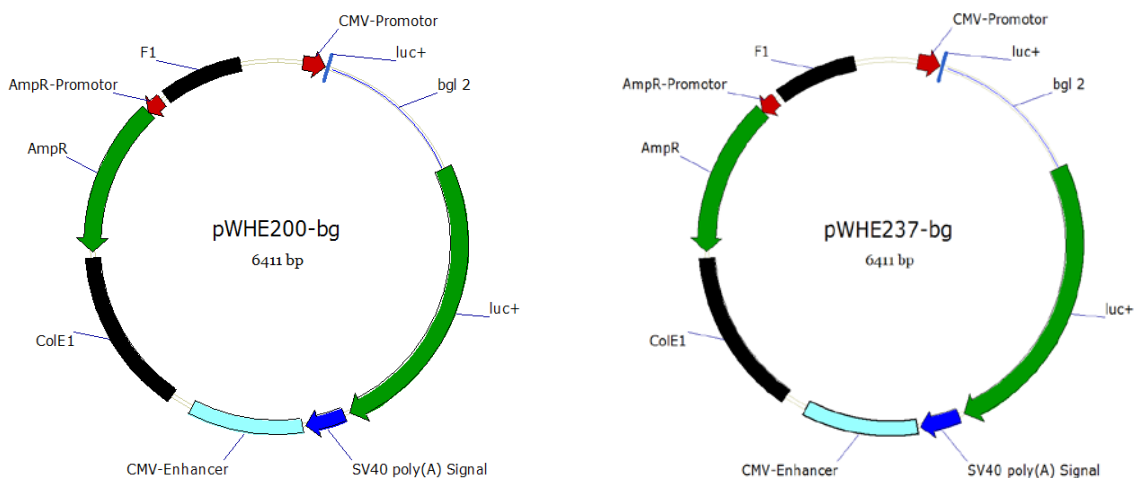


Abbildung 5.4 Plasmidkarte von pWHE200-bg und pWHE237-bg

Beide Plasmide enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*), den ColE1 Replikationsursprung für *E. coli*, das β -Globin-2-Intron (*bgl2*), den offenen Leserahmen der Firefly-Luziferase (*luc+*) sowie das SV40 poly(A) Signal zur Termination der Transkription. pWHE200-bg enthält den SV40-Promotor sowie einen SV40-Enhancer, während pWHE237-bg einen CMV-Promotor mit CMV-Enhancer enthält

pFRT-CD20

Der Vektor pFRT-CD20 (siehe Abbildung 5.5) wurde für chromosomale Integrationen mit dem Flp-In-System verwendet. Er codiert für ein codonoptimiertes *CD20*-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors (Vogler, 2009). Zum Klonieren der verschiedenen Konstrukte wurden die Restriktionsendonukleasen BamHI und KasI verwendet. Für die Integration durch die Flp Rekombinase enthält das Plasmid eine FRT Stelle. Zur Selektion auf eine erfolgreiche Integration enthält das Plasmid ein Hygromycin-Resistenzgen (*HygR*) ohne Promotor. Der Promotor befindet sich im Genom der Ziel-Zelllinie, so dass die Resistenz nur bei erfolgreicher Integration ausgebildet wird.

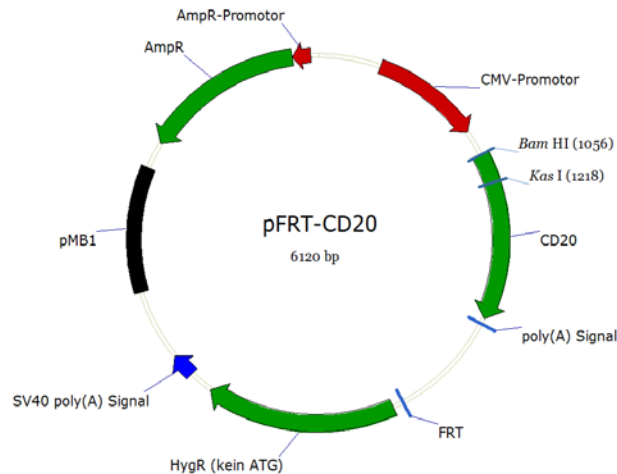


Abbildung 5.5 Plasmidkarte von pFRT-CD20

Das Plasmid pFRT-CD20 enthält zur Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*), einen pMB1 Replikationsursprung für *E. coli*, eine Bindestelle für die Flp Rekombinase (FRT), ein Hygromycin-Resistenzgen ohne Startcodon [*HygR* kein ATG] mit SV40 poly(A) Signal, ein codonoptimiertes *CD20*-Gen mit CMV-Promotor und poly(A) Signal sowie eine Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen BamHI und KasI.

pFLAG-WT

Das Plasmid codiert für die Wildtyp-Isoform des Transkriptionsfaktors MAX mit einem FLAG-Epitop am N-Terminus (Kemmerer and Weigand, 2014). Die Expression wird durch den CMV-Promotor kontrolliert. Zur Klonierung der einzelnen Konstrukte wurden die Restriktionsendonukleasen HindIII und ClaI verwendet. Die vollständige Sequenz des Plasmids ist nicht bekannt, eine Teilsequenz ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Das Plasmid hat eine Größe von ca. 5 kpb und trägt für die Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen.

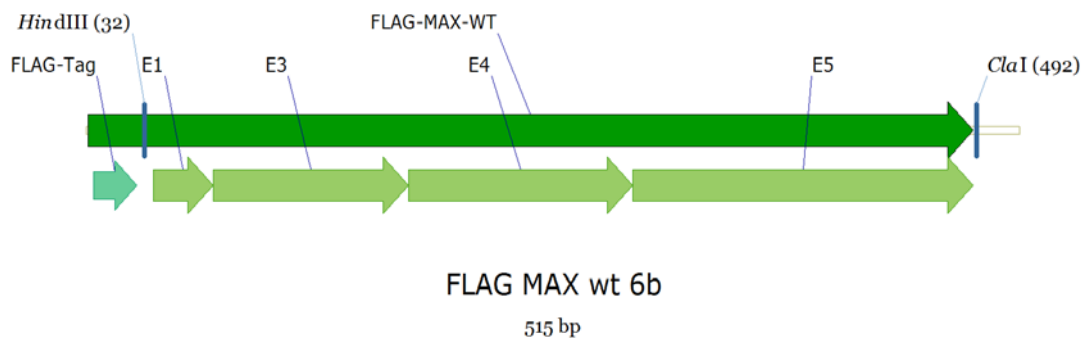


Abbildung 5.6 Plasmidkarte von pFLAG-WT

Das Plasmid enthält die codierende Sequenz des Transkriptionsfaktors MAX, welche aus den Exons 1, 3, 4 und 5 besteht (E1, E3, E4 und E5). Im gleichen Leserahmen befindet sich stromaufwärts die codierende Sequenz für das FLAG-Epitop (FLAG-Tag). Zusätzlich sind die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen HindIII und ClaI dargestellt.

pHDV

Das Plasmid pHDV wurde als Matrize für *in vitro* Transkriptionen verwendet (siehe Abbildung 5.7).

Es hat eine Größe von 3025 bp und trägt für die Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen. Für die Replikation in *E. coli* dient der pMB1 Replikationsursprung.

Die zu transkribierende RNA wurde zusammen mit dem T7-Promotor zwischen die Schnittstellen EcoRI und NaeI kloniert. Damit die transkribierten RNAs definierte 3'-Enden erhalten, wurde das Ribozym aus dem Hepatitis Delta Virus (HDV) verwendet. Zur Linearisierung des Plasmids für die *run-off* Transkription wurde die Restriktionsendonuklease HindIII verwendet.

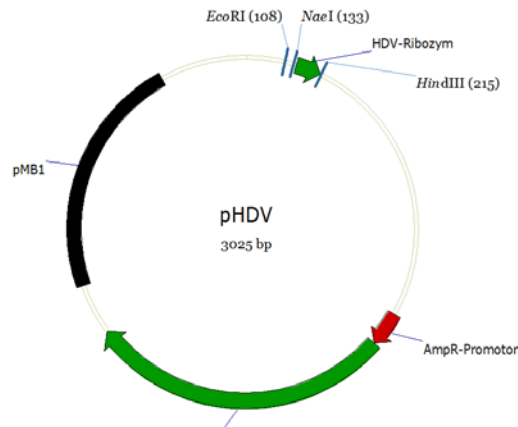


Abbildung 5.7 Plasmidkarte von pHDV

Das Plasmid enthält für *E. coli* den pMB1 Replikationsursprung, eine Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*), das HDV-Ribozym sowie die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen EcoRI, NaeI und HindIII

pJET

Der pJET Vektor (siehe Abbildung 5.8) ist ein kommerziell erhältlicher Vektor der Firma Thermo Fisher (USA). Er wurde für Klonierungen mit dem CloneJET PCR Cloning Kit verwendet. Hierbei wird das gewünschte Fragment *blunt* in die EcoRV Schnittstelle kloniert, wodurch der Leserahmen des *eco47R* Gens zerstört wird. Dieses Gen codiert für ein Toxin, sodass auf Zellen selektiert wird, bei denen das *eco47R*-Gen durch Aufnahme eines DNA-Fragments unterbrochen wurde.

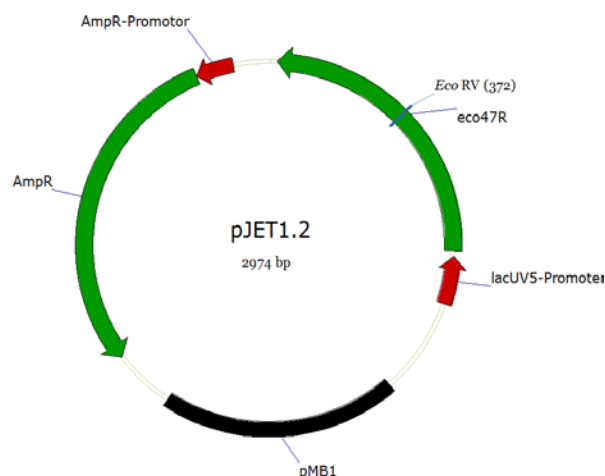


Abbildung 5.8 Plasmidkarte von pJET1.2

Das Plasmid enthält für die Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*), einen *E. coli* Replikationsursprung (repMB1), das für ein Toxin codierende Gen *eco47R*, den lacUV5-Promotor, den Promotor für die T7-RNA-Polymerase (T7-Promotor) sowie eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRV.

5.1.2 Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide

5.1.2.1 Minigen-Konstrukte

Kontrolle des BP durch das Tc-Aptamer

Bei diesen Konstrukten befindet sich der BP von Intron 1 im P1 Stamm des Tc-Aptamers. Die Konstrukte wurden durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 5.12 amplifiziert. Für die Konstrukte pMA-CMV-i6u555_BP-A437C, pMA-CMV-i6u555_BP-AA436CC und pMA-CMV-i6u555_BP1 diente das Ausgangsplasmid pMA_cmv_i6u555*WT als Matrize. Für alle weiteren Konstrukte wurde das Plasmid pMA-CMV-i6u555_BP1 als Matrize verwendet. Die Oligonukleotide für die PVR-Reaktion waren so konstruiert, dass eines eine NotI-Schnittstelle und das Aptamer enthielt. Das zweite Oligonukleotid enthielt die NheI-Schnittstelle, wodurch das erhaltene Amplifikat nach einem Restriktionsverdau mit NotI und NheI in den ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen verdauten Vektor pMA-CMV-i6u555-KanR-WT kloniert werden konnte.

Tabelle 5.12 Übersicht über die Konstrukte, bei welchen der BP durch das Tc-Aptamer kontrolliert wird

Konstrukname	Oligonukleotide	Matrize
pMA-CMV-i6u555_BP-A437C	BP-A437C-NotI-f und BP-A437C-NheI-r	pMA_cmv_i6u555*WT
pMA-CMV-i6u555_BP-AA436CC	BP-AA436CC-NotI-f und BP-A437C-NheI-r	pMA_cmv_i6u555*WT
pMA-CMV-i6u555_BP1	TCIN1-BP1-f und BP-A437C-NheI-r	pMA_cmv_i6u555*WT
pMA-CMV-i6u555_BP2	TCIN1-BP2-f und BP-A437C-NheI-r	pMA_cmv_i6u555*WT
pMA-CMV-i6u555_BP3	Intr1TCPB-3_f und BP-A437C-NheI-r	pMA-CMV-i6u555_BP1
pMA-CMV-i6u555_BP4	Intr1TCPB-4_f und BP-A437C-NheI-r	pMA-CMV-i6u555_BP1
pMA-CMV-i6u555_BP5	Intr1TCPB-5_f und BP-A437C-NheI-r	pMA-CMV-i6u555_BP1
pMA-CMV-i6u555_BP6	Intr1TCPB-6_f und BP-A437C-NheI-r	pMA-CMV-i6u555_BP1

Kontrolle der 3' Spleißstelle durch das Tc-Aptamer

Bei diesen Konstrukten wurde die 3' SS von Intron 1 durch das Tc-Aptamer kontrolliert. Alle Konstrukte mit Ausnahme der Konstrukte TC6 und TC10 wurden durch *overlap extension* PCR mit zwei Fragmenten kloniert. Bei der PCR-Reaktion zur Erzeugung des ersten Fragments, enthielt eines der verwendeten Oligonukleotide eine NotI-Schnittstelle und das zweite Oligonukleotid enthielt einen Teil des Aptamers. Bei der PCR Reaktion zur Erzeugung des zweiten Fragments, enthielt das eine Oligonukleotid den zweiten Teil des Aptamers und das zweite Oligonukleotid enthielt eine NheI-Schnittstelle (siehe Tabelle 5.13). Für beide PCR-Reaktionen wurde das Plasmid pMA-CMV-i6u555-KanR-WT als Matrize verwendet. Im Anschluss wurde mit beiden Amplifikaten eine *overlap extension* PCR mit den Oligonukleotiden pMA_NotI-f und BP-A437C-NheI-r durchgeführt. Das erhaltene Amplifikat wurde über die Schnittstellen NotI und NheI in den Vektor pMA-CMV-i6u555-KanR-WT kloniert.

Die Konstrukte M5 und M9 wurden durch eine zweistufige PCR-Reaktion erzeugt. Für die 1. PCR-Reaktion wurde das spezifische erste Oligonukleotid (siehe Tabelle 5.13) mit dem Oligonukleotid BP-A437C-NheI-r, welches eine NheI Schnittstelle enthält, verwendet. Als Matrize wurde das Plasmid pMA-CMV-i6u555_M1 benutzt. Das erhaltene Amplifikat wurde für eine zweite PCR-Reaktion mit dem Oligonukleotid pMA_NotI-f und der Matrize pMA-CMV-i6u555_M1 verwendet. Das Amplifikat der 2. PCR-Reaktion wurde über die Schnittstellen NotI und NheI in den Vektor pMA-CMV-i6u555-KanR-WT kloniert.

Tabelle 5.13 Übersicht über die Konstrukte, bei welchen die 3' SS durch das Tc-Aptamer kontrolliert wird

Name	Oligonukleotide
pMA-CMV-i6u555_M1	PCR1: TPIIn2-NotI-f+TCIn2-over-r PCR2: TCIn2-over-f + BP-A437C-NheI-r
pMA-CMV-i6u555_M2	PCR1: Intr1TC-3_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: pMA_NotI-f + Intr1TC-3_r
pMA-CMV-i6u555_M3	PCR1: Intr1TC-4_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: pMA_NotI-f + Intr1TC-4_r
pMA-CMV-i6u555_M4	PCR1: Intr1TC-5_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: pMA_NotI-f + Intr1TC-5_r
pMA-CMV-i6u555_M5	PCR1: Intr1TC6_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: Produkt aus PCR1 + pMA_NotI-f
pMA-CMV-i6u555_M6	PCR1: Intr1TC-7_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: pMA_NotI-f + Intr1TC-7_r
pMA-CMV-i6u555_M7	PCR1: Intr1TC-8_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: pMA_NotI-f + Intr1TC-8_r
pMA-CMV-i6u555_M8	PCR1: Intr1TC-9_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: pMA_NotI-f + Intr1TC-9_r
pMA-CMV-i6u555_M9	PCR1: Intr1TC10_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: Produkt aus PCR1 + pMA_NotI-f
pMA-CMV-i6u555_M10	PCR1: Intr1TC-11_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: pMA_NotI-f + Intr1TC-11_r
pMA-CMV-i6u555_M11	PCR1: Intr1TC-12_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: pMA_NotI-f + Intr1TC-12_r
pMA-CMV-i6u555_M12	PCR1: Intr1TC-13_f + BP-A437C-NheI-r PCR2: pMA_NotI-f + Intr1TC-13_r

5.1.2.2 Klonierung des Luziferase-Reportergens

Zur Klonierung des Luziferase-Reportergens wurden die Vektoren pWHE200-bg und pWHE237-bg als Basisvektoren verwendet. Die beiden Vektoren unterscheiden sich lediglich durch den Promotor, der das *luc+*-Gen kontrolliert (siehe Abbildung 5.4). Auf dem Plasmidrückgrat beider Vektoren befindet sich je eine NotI- und eine NheI-Schnittstelle. Das Insert enthält ebenfalls je eine NotI- und eine NheI-Schnittstelle die für weitere Klonierungen verwendet werden sollen. Um dies zu ermöglichen mussten zuerst die beiden Schnittstellen aus dem Plasmidrückgrat entfernt werden. Hierzu wurden beide Vektoren mit den Enzymen NotI und NheI geschnitten, die hinterlassenen klebrigen Enden der Restriktionsendonukleasen wurden mit dem CloneJET PCR Cloning Kit geglättet. Anschließend wurden die Vektoren durch Ligation beider Enden wieder zirkularisiert. Hieraus resultieren die Vektoren pWHE200mod und pWHE237mod welche 190 bp kürzer sind als deren Ausgangsvektor. Die deletierte Sequenz befindet sich in einem nicht codierenden Bereich des Plasmids.

Als nächstes wurde das Exon II aus dem Minigen zusammen mit 150 bp der flankierenden Introns in das *bgl2*-Intron kloniert (siehe Abbildung 5.9)

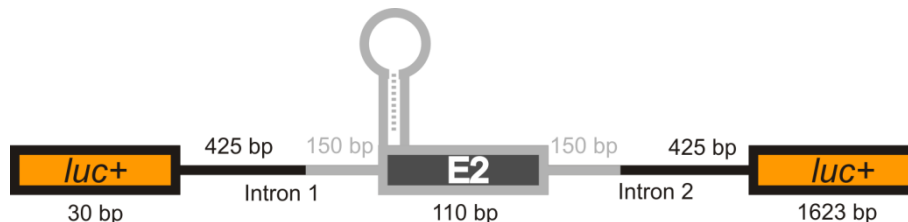


Abbildung 5.9 Übersicht über das Luziferase-Reportergen

Das Gen der Firefly-Luziferase (*luc+*, orange) wird durch zwei Introns sowie ein alternativ gespleißtes Exon (E2) unterbrochen. Ein Teil der Introns stammt aus dem β -Globin-2-Intron (schwarz), der restliche Teil sowie E2 stammen aus dem Minigen-System (grau). Die genaue Sequenz befindet sich im Anhang (siehe Abschnitt 6.5).

Bei der Klonierung wurde das Konstrukt TC3 und das Kontrollkonstrukt ohne Aptamer (WT) aus dem Minigen-System wurden durch eine *overlap extension* PCR mit drei Fragmenten in das Luziferase-System kloniert. Die drei Einzelfragmente wurden mit den in Tabelle 5.14 aufgelisteten Matrizen und Oligonukleotiden durch eine PCR-Reaktion erzeugt. Für die anschließende *overlap extension* PCR wurden die Oligonukleotide pWHE200-1f und pWHE200-6r verwendet, welche eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen NcoI und KasI enthalten. Dadurch konnte das geschnittene Amplifikat in den Vektor kloniert werden.

Zum Klonieren des Amplifikats in den Vektor pWHE237mod wurde das Oligonukleotid pWHE237-1f für die *overlap extension* PCR verwendet, welches eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI enthält. Als zweites Oligonukleotid wurde pWHE200-6r verwendet. Hierdurch konnte das Amplifikat durch einen Verdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und KasI in den Vektor pWHE237mod kloniert werden.

Tabelle 5.14 Klonierung der Luziferase Konstrukte

Konstrukt	Matrize	Verwendetes Oligonukleotid
pWHE200mod-WT	PCR1: pWHE200-bg	PCR1: pWHE200-1f + pWHE200-2r
	PCR2: pMA-CMV-i6u555-KanR-WT	PCR2: pWHE200-3f + pWHE200-4r
	PCR3: pWHE200-bg	PCR3: pWHE200-5f + pWHE200-6r
	PCR4: Fragmente aus PCR1 bis 3	PCR4: pWHE200-1f + pWHE200-6r
pWHE200mod-TC3	PCR1: pWHE200-bg	PCR1: pWHE200-1f + pWHE200-2r
	PCR2: pMA-CMV-i6u555-KanR-WT	PCR2: pWHE200-3f + pWHE200-4r
	PCR3: pWHE200-bg	PCR3: pWHE200-5f + pWHE200-6r
	PCR4: Fragmente aus PCR1 bis 3	PCR4: pWHE200-1f + pWHE200-6r
pWHE237mod-WT	PCR1: pWHE237-bg	PCR1: pWHE237-1f + pWHE200-2r
	PCR2: pMA-CMV-i6u555-KanR-WT	PCR2: pWHE200-3f + pWHE200-4r
	PCR3: pWHE237-bg	PCR3: pWHE200-5f + pWHE200-6r
	PCR4: Fragmente aus PCR1 bis 3	PCR4: pWHE237-1f + pWHE200-6r
pWHE237mod-L2	PCR1: pWHE237-bg	PCR1: pWHE237-1f + pWHE200-2r
	PCR2: pMA-CMV-i6u555-KanR-WT	PCR2: pWHE200-3f + pWHE200-4r
	PCR3: pWHE237-bg	PCR3: pWHE200-5f + pWHE200-6r
	PCR4: Fragmente aus PCR1 bis 3	PCR4: pWHE237-1f + pWHE200-6r
pWHE200mod-L1	pMA-CMV-i6u555_M1	pMA_NotI-f und pMA_NheI-univers_r
pWHE200mod-L3	pMA-CMV-i6u555_M3	pMA_NotI-f und pMA_NheI-univers_r
pWHE200mod-L10	pMA-CMV-i6u555_M10	pMA_NotI-f und pMA_NheI-univers_r
pWHE200mod-L11	pMA-CMV-i6u555_M11	pMA_NotI-f und pMA_NheI-univers_r
pWHE200mod-L12	pMA-CMV-i6u555_M12	pMA_NotI-f und pMA_NheI-univers_r
pWHE237mod-L2A13U	pMA-CMV-i6u555_M2	pMA_NotI-f und pMA_NheI-univers_r

Alle weiteren Luziferase-Konstrukte wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden pMA_NotI-f und pMA_NheI-univers_r amplifiziert. Als Matrize diente hierfür das Konstrukt aus dem Minigensystem (siehe Tabelle 5.14). Für die Klonierung in den Vektor pWHE237mod wurden die in den Oligonukleotiden enthaltenen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen NotI und NheI verwendet.

5.1.2.3 Klonierung der Luziferase-Reportergenkonstrukte mit Hammerhead-Ribozym im 3' UTR

Die Konstrukte wurden durch *overlap extension* PCR mit zwei Fragmenten erzeugt und über die Schnittstellen XbaI und PstI in den Vektor pWHE237mod-L2 kloniert. Fragment 1 enthielt das Hammerhead-Ribozym und wurde mit den Oligonukleotiden TC3-hh-XbaI-1f und TC3-hh-2r von den jeweiligen Plasmiden psiCHECK2-3'K4, psiCHECK2-3'K5 bzw. psiCHECK2-3'K19 amplifiziert. Das zweite Fragment wurde mit den Oligonukleotiden TC3-hh-3f und TC3-hh-PstI-4r von dem Plasmid pWHE237mod-L2 amplifiziert. Für die *overlap extension* PCR wurden die Oligonukleotide TC3-hh-

XbaI-1f und TC3-hh-PstI-4r verwendet, welche die Schnittstellen XbaI und PstI zur Klonierung des Amplifikats in den Vektor pWHE237mod-L2 enthalten.

5.1.2.4 Klonierung der eGFP-mCherry-Konstrukte

Für das eGFP-mCherry Konstrukt pWHE237mod-eGFPmCherry wurde das Plasmid pWHE237mod-L2 als Basisvektor verwendet. Exon 3 wurde durch die Gene *eGFP* und *mCherry* ausgetauscht, während Exon 1 und 2 nicht verändert wurden (siehe Abbildung 5.10). Hierbei befinden sich *eGFP* und *mCherry* in unterschiedlichen Leserahmen. Wird das aptamer-kontrollierte Exon in die mRNA eingebaut wird der Leserahmen von mCherry exprimiert. Wird das Exon hingegen übersprungen wird der Leserahmen von *eGFP* exprimiert.



Abbildung 5.10 Übersicht über das eGFP-mCherry-Konstrukt

Das Konstrukt besteht aus 3 Exons. Das Startcodon befindet sich in Exon 1 (E1). Bei Exon 2 handelt es sich um das aptamer-kontrollierte Exon (akE). Je nachdem, ob das akE vorhanden ist oder nicht wird ein anderer Leserahmen verwendet. Hierdurch wird in Exon drei entweder eGFP oder mCherry exprimiert, da sich beide codierenden Bereiche in unterschiedlichen Leserahmen befinden. Die Sequenz des Konstrukts befindet sich im Anhang (siehe Abschnitt 6.5)

Es wurden ebenfalls die zwei Plasmide pWHE237mod-eGFP und pWHE237mod-mCherry kloniert, welche nur eGFP bzw. mCherry exprimieren und keine Introns enthalten.

Die Konstrukte pWHE237mod-eGFP und pWHE237mod-mCherry wurden durch *overlap extension* PCR mit zwei Fragmenten kloniert. Die einzelnen Fragmente wurden durch PCR mit den in Tabelle 5.15 aufgelisteten Matrizen und Oligonukleotiden erzeugt. Für die *overlap extension* PCR wurden die beiden Amplifikate sowie die Oligonukleotide KeGFP-f1 und KeGFP-r5 für das Konstrukt pWHE237mod-eGFP bzw. die Oligonukleotide KmCherry-1f + mCherry-3rev für das Konstrukt pWHE237mod-mCherry verwendet. Die Oligonukleotide enthalten Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen EcoRI und XbaI, wodurch das Amplifikat in den Vektor pWHE237mod-WT kloniert werden kann.

Das Konstrukt pWHE237mod-eGFPmCherry wurde ebenfalls durch *overlap extension* PCR kloniert, hierfür wurden drei Einzelfragmente verwendet. Die Einzelfragmente wurden durch PCR mit den in Tabelle 5.15 aufgelisteten Matrizen und Oligonukleotiden erzeugt. Für die *overlap extension* PCR wurden die drei Einzelfragmente sowie die Oligonukleotide eGFPmCherry-1f und mCherry-3rev verwendet, welche eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen EcoRI und XbaI tragen. Hierdurch kann das geschnittene Amplifikat in den Vektor pWHE237mod-WT kloniert werden.

Tabelle 5.15 Klonierung der eGFP-mCherry Konstrukte

Plasmid	Matrize	Verwendetes Oligonukleotid
pWHE237mod-eGFP	PCR1: pEGFP-N1	PCR1: KeGFP-f1 + KeGFP-r3
	PCR2: pEGFP-N1	PCR2: KeGFP-f4 + KeGFP-r5
	PCR3: Fragment aus PCR 1 und 2	PCR3: KeGFP-f1 + KeGFP-r5

Plasmid	Matrize	Verwendetes Oligonukleotid
pWHE237mod-mCherry	PCR1: pWHE237mod-L2	PCR1: KmCherry-f2 + KmCherry-r3
	PCR2: pWHE237mod-eGFP	PCR2: KmCherry-f4 + mCherry-3rev
	PCR3: Fragment aus PCR 1 und 2	PCR3: KmCherry-1f + mCherry-3rev
pWHE237mod-eGFPmCherry	PCR1: pWHE237mod-L2	PCR1: eGFPmCherry-1f + eGFPmCherry-2r
	PCR2: pWHE237mod-L2	PCR2: eGFPmCherry-3f + eGFPmCherry-4r
	PCR3: pWHE237mod-eGFP	PCR3: eGFPmCherry-5f + mCherry-3rev
	PCR4: Fragmente aus PCR1 bis 3	PCR4: eGFPmCherry-1f + mCherry-3rev

5.1.2.5 Klonierung der MAX-Konstrukte

Als Ausgangsvektor für die MAX-Konstrukte wurde das Plasmid pFLAG-WT verwendet (Kemmerer and Weigand, 2014). Das aptamer-kontrollierte Exon wurde zusammen mit den beiden flankierenden Introns in den Leserahmen des *MAX*-Gens kloniert. Hierbei wurde das Insert in die natürliche Exon-Exon-Grenze zwischen Exon 3 und Exon 4 des *MAX*-Gens kloniert (siehe Abbildung 5.11). Die einzelnen Konstrukte wurden durch *overlap extension* PCR mit drei Fragmenten erzeugt. Die für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide und Matrizen sind in Tabelle 5.16 aufgelistet. Für die Klonierung wurden die Schnittstellen HindIII und ClaI verwendet.



Abbildung 5.11 Übersicht über das MAX-Konstrukt

Das aptamer-kontrollierte Exon (akE) wurde mit den flankierenden Introns aus dem Luziferase-Reporter gen in den Leserahmen von *MAX* übertragen. Hierbei wurde das Insert zwischen die natürliche Exon-Exon-Grenze zwischen Exon 3 (E3) und Exon 4 (E4) kloniert. Für die Detektion durch einen Westernblot wurde N-Terminal das FLAG-Epitop angehängt.

Tabelle 5.16 Klonierung der MAX-Konstrukte

Konstrukt	Matrize	Verwendetes Oligonukleotid
FLAG_MAX-WT	PCR1: pFLAG-WT	PCR1: MAX-E3-4-f1 + MAX-E3-4-f1
	PCR2: pWHE237mod-WT	PCR2: MAX-E3-4-f3 + MAX-E3-4-f4
	PCR3: pFLAG-WT	PCR3: MAX-E3-4-f5 + MAX-E3-4-f6
FLAG_MAX1	PCR1: pFLAG-WT	PCR1: MAX-E3-4-f1 + MAX-E3-4-f1
	PCR2: pWHE237mod-L1	PCR2: MAX-E3-4-f3 + MAX-E3-4-f4
	PCR3: pFLAG-WT	PCR3: MAX-E3-4-f5 + MAX-E3-4-f6
FLAG_MAX2	PCR1: pFLAG-WT	PCR1: MAX-E3-4-f1 + MAX-E3-4-f1
	PCR2: pWHE237mod-L2	PCR2: MAX-E3-4-f3 + MAX-E3-4-f4
	PCR3: pFLAG-WT	PCR3: MAX-E3-4-f5 + MAX-E3-4-f6
FLAG_MAX3	PCR1: pFLAG-WT	PCR1: MAX-E3-4-f1 + MAX-E3-4-f1
	PCR2: pWHE237mod-L3	PCR2: MAX-E3-4-f3 + MAX-E3-4-f4
	PCR3: pFLAG-WT	PCR3: MAX-E3-4-f5 + MAX-E3-4-f6

Konstrukt	Matrize	Verwendetes Oligonukleotid
FLAG_MAX10	PCR1: pFLAG-WT	PCR1: MAX-E3-4-f1 + MAX-E3-4-f1
	PCR2: pWHE237mod-L10	PCR2: MAX-E3-4-f3 + MAX-E3-4-f4
	PCR3: pFLAG-WT	PCR3: MAX-E3-4-f5 + MAX-E3-4-f6
FLAG_MAX11	PCR1: pFLAG-WT	PCR1: MAX-E3-4-f1 + MAX-E3-4-f1
	PCR2: pWHE237mod-L11	PCR2: MAX-E3-4-f3 + MAX-E3-4-f4
	PCR3: pFLAG-WT	PCR3: MAX-E3-4-f5 + MAX-E3-4-f6
FLAG_MAX2-A13U	PCR1: pFLAG-WT	PCR1: MAX-E3-4-f1 + MAX-E3-4-f1
	PCR2: pWHE237mod-L2A13U	PCR2: MAX-E3-4-f3 + MAX-E3-4-f4
	PCR3: pFLAG-WT	PCR3: MAX-E3-4-f5 + MAX-E3-4-f6

5.1.2.6 Klonierung der CD20 Konstrukte

Die CD20 Konstrukte wurden in den Vektor pFRTCD20 kloniert. Der Vektor enthält eine FRT-Stelle, damit die Konstrukte chromosomal in HF1-3 Zellen integriert werden können. Die Klonierung wurde durch *overlap extension* PCR mit zwei Fragmenten durchgeführt. Fragment 1 wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden CD20-TC3_f1 und CD20-TC3_r2 amplifiziert. Als Matrize für Konstrukt C1 diente pWHE237mod-L1 und für Konstrukt C2 wurde pWHE237mod-L2 verwendet. Das zweite Fragment wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden CD20-TC3_f3 und CD20_rev von der Matrize pFRT/CD20 amplifiziert. Für die *overlap extension* PCR mit beiden Amplifikaten wurden die Oligonukleotide CD20_fwd und CD20_rev verwendet, welche eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen BamHI und KasI tragen. Hierdurch konnte das geschnittene Amplifikat durch Ligation in den Vektor pFRT/CD20 kloniert werden.

5.2 Methoden

5.2.1 Methoden mit *E. coli*

5.2.1.1 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde sowohl in Flüssigkulturen als auch auf Festmedium bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 150 rpm geschüttelt. Für die Selektion auf Plasmide wurde Medium mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert.

Gelagert wurden die Zellen für maximal 14 Tage auf Agarplatten bei 4°C. Längerfristig wurden die Zellen in 15% (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert.

5.2.1.2 Herstellung CaCl₂ kompetenter *E. coli* Zellen

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem *E. coli* Stamm DH5α gearbeitet. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 4 ml LB mit einer frischen Kolonie DH5α-Zellen beimpft und für 16 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 300 ml frisches LB mit 1 ml der Vorkultur beimpft und bis zu einer OD_{600} zwischen 0,35 und 0,4 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation geerntet (10 min, 2700 xg, 4°C). Das Sediment wurde vorsichtig in 90 ml Waschpuffer (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂) resuspendiert, erneut unter den gleichen

Bedingungen zentrifugiert und in 15% (v/v) Glycerin mit 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Zellen wurden für 2 h auf Eis inkubiert, zu je 330 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Vor Verwendung der Zellen wurde die Sensitivität der Zellen gegen die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin überprüft. Die Transformationseffizienz der Zellen wurde mit Hilfe des Plasmids pUC19 bestimmt.

5.2.1.3 Transformation von CaCl₂ kompetenter *E. coli* Zellen

Retransformationen sowie Transformationen von Ligationsansätzen wurden nach einem geänderten Protokoll von (Sambrook and Russell, 2001) durchgeführt. 100 µl kompetente Zellen wurden mit 20 µl Ligationsansatz oder 100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 1 h auf Eis inkubiert. Danach kamen die Zellen für 90 s in den Hitzeschock (42°C) und anschließend erneut für 10 min auf Eis. Zur Regeneration wurde 1 ml LB-Medium auf den Transformationsansatz gegeben und die Zellen wurden 1 h lang bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach der Regeneration wurden die Zellen sedimentiert (1 min, 17.000 xg) und auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert.

5.2.1.4 Präparation von Plasmiden aus *E. coli*

Für die Präparation von kleinen Mengen Plasmid wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid wurde entsprechend der benötigten Plasmidmenge das QIAfilter Plasmid Mega Kit oder das QIAfilter Plasmid Giga Kit verwendet. Die Kits wurden wie vom Hersteller empfohlen verwendet.

5.2.2 Methoden mit humanen Zellen

5.2.2.1 Anzucht von humanen Zellen

Humane Zellen wurden in einer T75 Flasche mit 10 ml DMEM supplementiert mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei HF1-3 Zellen ohne Integration wurde das Medium zusätzlich mit 100 µg/ml Streptomycin supplementiert. Nach der Integration wurde das Medium mit 200 µg/ml Hygromycin supplementiert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert und es wurden keine Zellen verwendet die Passage 25 überschritten hatten.

5.2.2.2 Passagieren von humanen Zellen

Die Zellen aus eine T75-Flasche wurden zum Entfernen von Mediumsresten mit 3 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhären Zellen wurden diese mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 7 ml DMEM gestoppt und die Zellzahl wurde mit Hilfe des TC10 Automated Cell Counter (BioRad) bestimmt. Anschließend wurde eine gewünschte Zellzahl in eine Well-Platte überführt (siehe Tabelle 5.17).

Tabelle 5.17 Menge an ausgesäten Zellen in unterschiedlichen Platten

Zellen	Platte	Anzahl Zellen	Menge Medium [ml]
HEK293	12-Well	240.000	2 ml
	24-Well	120.000	1 ml

HeLa	12-Well	100.000	2 ml
	24-Well	50.000	1 ml
HF1-3	12-Well	100.000	2 ml
	96-Well	2.000	0,1 ml

5.2.2.3 Langzeitlagerung von humanen Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in 1 ml DMEM mit 10% (v/v) DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden *CryoVials* verwendet.

5.2.2.4 Transfektion von humanen Zellen mit Lipofectamin2000

Um humane Zellen transient mit DNA zu transfizieren wurde Lipofectamin2000 verwendet (Felgner et al., 1987). 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen, je nach Anwendung, in einer 12- oder einer 24-Well Platte ausgesät (siehe Tabelle 5.18). Für die Transfektion wurde ein DNA-Mix hergestellt. Hierfür wurde die DNA mit 50 µl Opti-MEM versehen. Die benötigte Menge Lipofectamin2000 wurde mit Opti-MEM auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt (Lipofectamin-Mix). Beides wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend wurde der Lipofectamin-Mix mit dem DNA-Mix gemischt. Der so erhaltene Transfektions-Mix wurde 15 min bei RT inkubiert. Das Medium der Zellen wurde abgenommen und durch 500 µl Opti-MEM (24-Well Platte) bzw. 1 ml Opti-MEM (12-Well Platte) ersetzt. Anschließend wurde der Transfektions-Mix in das Well pipettiert und die Zellen wurden für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 2 h wurde ein Mediumswechsel durchgeführt.

Tabelle 5.18 Übersicht über die Transfektionen

Alle Angaben beziehen sich auf ein Well

Anwendung	Plasmidmenge	Lipofectamin [µl]	Verwendete Platte
RNA-Isolation	100 ng	2 µl	12-Well
Präparation Gesamtprotein	400 ng	2 µl	12-Well
Luziferase-Assay	100 ng Firefly 100 ng <i>Renilla</i>	1 µl	24-Well
Genomische Integration	100 ng pFRT 900 ng pOG44	2 µl	24-Well

5.2.2.5 Stabile Integration von DNA in HF1-3 Zellen

Zur stabilen Integration von DNA in das Genom von humanen Zellen wurde das Flp-In System (Thermo Fisher, USA) verwendet. Als Integrationsstamm wurde die HeLa-Zelllinie HF1-3, mit einer genomischen FRT-Stelle, benutzt (Beilstein et al., 2015; Berens et al., 2006). Hierfür wurde die gewünschte DNA in den Vektor pcDNA5/FRT kloniert, welcher ebenfalls eine FRT-Stelle besitzt. Die HF1-3 Zellen wurden mit 100 ng des Plasmids pcDNA5/FRT sowie 900 ng des Plasmids pOG44, welches für die Rekombinase Flippase codiert, in einer 24-Well Platte, transfiziert (siehe 5.2.2.4). 24 h nach der Transfektion wurde ein Mediumswechsel durchgeführt und die Zellen wurden zur Selektion auf die genomische Integration mit Hygromycin (200 µg/ml) inkubiert. Nach zwei Wochen Inkubation

mit Hygromycin wurden durch das Verdünnen der Zellen Einzelzellen isoliert und anschließend durch analytische PCR, sowie mittels Westernblot, auf die Integration der DNA überprüft.

5.2.2.6 Dualer Luziferase Assay

Die Zellen wurden in einer 24-Well Platte mit 100 ng des Plasmids pWHE237mod, welches für die Firefly-Luziferase codiert und 100 ng des Plasmids pRL-SV40, welches für die *Renilla*-Luziferase codiert, transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität mit dem Dual-Glo-System der Firma Promega gemessen. Hierfür wurde das Medium abgenommen und 100 µl DMEM (ohne Phenolrot) sowie 100 µl Dual-Glo Luziferase Assay Lösung in jedes Well gegeben. Die Zellen wurden für 10 min bei RT inkubiert und anschließend in eine 96-Well Platte (flacher Boden) überführt. Die Lumineszenz der Firefly-Luziferase wurde mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M200, Tecan) bestimmt. Zum Messen der *Renilla*-Aktivität wurden 100 µl Dual-Glo Stop and Glo Lösung in jedes Well gegeben, es wurde 10 min bei RT inkubiert und die Lumineszenz wurde erneut an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M200, Tecan) gemessen. Jedes Konstrukt wurde stets in Triplikaten gemessen. Zur Auswertung wurde der Quotient zwischen dem gemessenen Firefly- und dem *Renilla*-Wert gebildet. Alle Messungen wurden in drei biologisch unabhängigen Experimenten wiederholt.

5.2.2.7 Präparation von RNA aus humanen Zellen

Hierfür wurden die Zellen in einer 12-Well Platte mit 100 ng Plasmid-DNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 400 µl PBS gewaschen und mit 400 µl Trizol lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 80 µl Chloroform versehen und 15 sek intensiv gemischt. Nach einer 3-minütigen Inkubation bei RT wurde zentrifugiert (5 min, 17.000 xg, 4°C) und die wässrige Phase wurde in eine neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mit 200 µl Chloroform versehen, 15 sek intensiv gemischt und erneut zentrifugiert (5 min, 17.000 xg, 4°C). Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden mit 200 µl Isopropanol und 0,75 µl GlycoBlue für 10 min bei RT gefällt und anschließend durch Zentrifugation (30 min, 17.000 xg, 4°C) sedimentiert. Es folgten ein Waschschriff mit 70% (v/v) Ethanol und ein erneuter Zentrifugationsschritt (15 min, 17.000 xg, 4°C). Der Überstand wurde komplett abgenommen, das Sediment wurde 5 min bei RT getrocknet und anschließend in 33 µl MQ gelöst. Um die enthaltene DNA zu entfernen, wurde die Probe mit 4 µl TURBO-DNase Puffer und 3 µl TURBO-DNase versehen und 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Entfernen des Enzyms wurde der Ansatz mit Ethanol (100 µl technischer Ethanol, 4 µl 3 M NaAc pH 6,5) für 30 min bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 17.000 xg, 4°C) sedimentiert. Das Sediment wurde mit 500 µl 70% (v/v) gewaschen und anschließend für 5 min bei RT getrocknet. Die RNA wurde in 20 µl MQ aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, mit MQ auf 100 ng/µl eingestellt und 500 ng wurden zur Qualitätskontrolle auf einem 1% (w/v) Agarosegel analysiert. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

5.2.2.8 Isolation von Proteinextrakt aus humanen Zellen

Die Zellen wurden in einer 12-Well Platte ausgesät und mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit Lyse-Puffer (137 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 20 mM Tris-HCl

pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0, 1% (v/v) Igepal and 5 µl Protease Inhibitor (Sigma)) bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min, 17.000 xg, 4°C) sedimentiert und der saubere Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Verwendung wurde der Proteinextrakt bei -20°C gelagert.

5.2.2.9 AlamarBlue Viabilitäts-Test

Zum Bestimmen der Zellviabilität wurde das Reagenz AlamarBlue (Thermo Fisher, USA) verwendet. Hierfür wurden die Zellen in einer 96 Well Platte (schwarz, flacher Boden) in einem Gesamtvolumen von 100 µl ausgesät. In jedes Well wurde 10 µl AlamarBlue-Reagenz gegeben und die Zellen wurden für 3 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M200, Tecan) gemessen. Es wurden immer Triplikate gemessen.

Tabelle 5.19 Geräteeinstellung für die AlamarBlue-Messung

Modus	Fluoreszenz Messung von oben
Mehrfachmessungen pro Well (Kreis (voll))	4 x 4
Mehrfachmessungen pro Well (Rahmen)	750 µm
Exzitationswellenlänge	560 nm
Emissionswellenlänge	600 nm
Exzitationsbandbreite	9 nm
Emissionsbandbreite	20 nm
Verstärkung	75 (Manuell)
Anzahl der Blitze	10
Integrationszeit	20 µs
Verzögerungszeit	0 µs
Ruhezeit	0 ms
Z-Position (Manuell)	17.000 µm

5.2.2.10 Rituximab-Assay

Die HF1-3, HF1-3CD20, HF1-3C1 und HF1-3C3 Zellen wurden in einer 96 Well Platte in einem Gesamtvolumen von 100 µl ausgesät (2.000 Zellen/Well). Das Medium wurde mit 10 µg/ml Rituximab (RTX) und 15% (v/v) Hasenserum supplementiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit bzw. ohne 50 µM Tc inkubiert. Alle Zusätze wurden sofort nach dem Aussäen der Zellen in das Medium gegeben. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zum Überprüfen der Zellviabilität wurde ein AlamarBlue-Assay (siehe 5.2.2.9) durchgeführt.

5.2.2.11 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden HEK293-Zellen in einer 24-Well Platte ausgesät (120.000 Zellen pro Well). 24 h später wurden die Zellen mit Lipofectamin2000 transfiziert (2 µl Lipofectamin2000 pro Well, 1 µg Plasmid-DNA). Nach 2 h wurde ein Mediumwechsel zu DMEM (ohne Phenolrot) mit bzw. ohne 50 µM Tc gemacht und die Zellen wurden weitere 24 h inkubiert

(37°C, 5% CO₂). Anschließend wurde die Fluoreszenz mit einem Axiovert2000-Mikroskop (Carl Zeiss, Deutschland) analysiert.

5.2.2.12 Fluoreszenzmessung von humanen Zellen

HEK293-Zellen wurden in einer 6-Well Platte ausgesät und nach 24 h mit Lipofectamin2000 transfiziert. Hierfür wurden pro Well 1.000 ng Plasmid-DNA und 5 µl Lipofectamin2000 verwendet. Nach 2 h wurde das Medium zu DMEM mit bzw. ohne 50 µM Tc gewechselt und die Zellen wurden 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde durch 1 ml DMEM (ohne Phenolrot) gestoppt und die Zellen wurden sedimentiert (5 min, 500 xg). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert. Die Fluoreszenz wurde an einem Fluorolog-3 Spektrofluorometer (Horiba) gemessen.

5.3 Biochemische Standardmethoden

5.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Test bestimmt (Bradford, 1976). Hierfür wurde das Bradford-Reagenz der Firma BioRad verwendet.

Für die Proteinbestimmung wurde eine geeignete Menge Rohextrakt verwendet und das Volumen wurde mit MQ auf 20 µl aufgefüllt. Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit MQ verdünnt und 980 µl der Verdünnung wurden auf jede Probe gegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Jede Probe wurde in einer Doppelbestimmung gemessen.

Zum Bestimmen der Proteinkonzentration wurde für jede Messung eine Kalibriergerade mit 0 µg, 2 µg, 6 µg, 10 µg, 15 µg und 20 µg BSA verwendet.

5.3.2 SDS-PAGE und Westernblot

Proteine wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Proben wurden vor dem Gellauf für 5 min bei 95°C gekocht, anschließend wurde 10 µg Protein auf ein anyKD Gel (BioRad) aufgeladen und bei 180 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden mit dem Trans-Blot Turbo System (BioRad) auf eine PVDF-Membran übertragen und zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran für 1 h mit 2% (w/v) ECL Prime blocking Agent (GE) in TBST inkubiert. Nach dem Blockieren wurde die Membran für 1 h mit dem Primäantikörper (Übersicht der verwendeten Antikörper siehe Tabelle 5.6) bei RT inkubiert und dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 h mit dem Zweitantikörper (HRP-Konjugat) bei RT inkubiert und erneut dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Zur Detektion wurde das Clarity Western Blotting Substrate (Bio-Rad) verwendet. Das Signal wurde mit dem ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) detektiert.

5.4 Molekularbiologische Standardmethoden

5.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messen der Absorption bei 260 nm ermittelt. Hierfür wurde ein ND-1000 Photometer (Thermo Fisher, USA) verwendet.

5.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Qualität bzw. die Größe von Nukleinsäuren wurde durch die elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel und die anschließende Färbung mittels Ethidiumbromid überprüft. Für Fragmente kleiner als 600 bp wurde 3% (w/v) Agarose verwendet. Größere Fragmente wurden in Gelen mit 1% (w/v) Agarose aufgetrennt. Die Agarose wurde durch Autoklavieren in 1xTAE gelöst und flüssig auf eine Glasplatte mit Kamm gegossen. Nach dem Abkühlen wurde der Kamm entfernt und die Glasplatte wurde mit der Agarose in eine Elektrophoresekammer gefüllt mit 1xTAE überführt. Die Proben wurden mit 6xLadepuffer versehen und in die Taschen des Gels pipettiert. Für RNA wurde 2xRNA-Ladepuffer verwendet und die Proben wurden vor dem Gellauf 5 min bei 96°C gekocht. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde eine Spannung von 1 bis 5 V/cm angelegt. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde das Agarose-Gel 15 min in Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt und durch Bestrahlen mit UV-Licht (254 nm) visualisiert.

Präparative-Gele wurden zum Vermeiden von DNA-Schäden unter längerwelligem UV-Licht (366 nm) visualisiert.

5.4.3 Fällen von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden mit 2,5 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 6,5) für 30 min bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation sedimentiert und mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Sediment für 5 min bei RT getrocknet und anschließen in MQ resuspendiert.

5.4.4 Phenolisierung von Nukleinsäuren

Zum Aufreinigen von Nukleinsäurelösungen wurde 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gemischt und in ein MaxTract-Röhrchen geeigneter Größe überführt. Es wurde nach den Herstellerangaben zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues MaxTract-Röhrchen überführt, 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Die Probe wurde erneut zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren wurden mit 1 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 6,5) für 30 min bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (30 min, 10.000 xg, 4°C) sedimentiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen bei RT (5 min) in MQ resuspendiert.

5.4.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren für Klonierungen

5.4.5.1 Aus Lösungen

Zum Aufreinigen von Nukleinsäuren aus Lösungen, um unerwünschte Salze oder Enzyme zu entfernen, wurde das Qiagen PCR-Purification Kit verwendet. Es wurde nach den Herstellerangaben verwendet.

5.4.5.2 Aus Gelen

Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurde das Qiagen Gel Extraction Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

5.4.6 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Durch Festphasensynthese hergestellte Oligonukleotide enthalten kein Phosphat am 5'-Ende. Dieses Phosphat wird jedoch für eine Ligation benötigt und kann mit dem Enzym T4-Polynukleotidkinase an ein Oligonukleotid angehängt werden. Hierfür verwendet man 1 nmol Oligonukleotid, 1 mM ATP, T4-Polynukleotidkinase-Puffer, 10 U T4-Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Der Reaktionsansatz wird für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend wird das Enzym hitzeinaktiviert (5 min, 65°C).

5.4.7 Hybridisieren von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden in einem Gesamtvolumen von 40 µl mit 400 pmol je Oligonukleotid hybridisiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei 95°C aufgekocht und mit einer Kühlrate von 1 °C/min bis auf eine Temperatur von 24°C abgekühlt.

5.4.8 Restriktionsverdau

Alle Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen und wie vom Hersteller angegeben verwendet. Für Ligationen wurde der jeweilige Vektor sowie das jeweilige Insert in einem Gesamtvolumen von 50 µl verdaut.

Tabelle 5.20 Beispiel Restriktionsverdau

2 µg	Plasmid
5 µl	CutSmart Puffer
2 µl	Enzym1
2 µl	Enzym2
Ad MQ	50 µl

Testverdaus wurden in einem Volumen von 10 µl mit 0,5 µl je Enzym durchgeführt.

5.4.9 Ligation

Für die Ligation wurden Insert und Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut und mit dem Qiagen PCR Purification Kit aufgereinigt. Es wurden stets 25 ng geschnittener Vektor mit dem 5-fachen molaren Überschuss an Insert mit 1 mM ATP, 400 U T4-DNA-Ligase, 1x T4-DNA-Ligase-Puffer in einem Endvolumen von 20 µl ligiert. Inkubiert wurde der Ansatz 1 h bei RT. Der komplette Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert (siehe 5.2.1.3).

5.4.10 Polymerase-Kettenreaktion

DNA wurde *in vitro* mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt (Saiki et al., 1988). Für Klonierungszwecke wurde die Q5 Polymerase, welche eine Korrekturlesefunktion besitzt, verwendet. Bei analytischen PCRs, die lediglich zum Nachweis eines bestimmten DNA-Fragments dienten, wurde mit einer selbst hergestellten *Taq*-Polymerase gearbeitet.

Material und Methoden

Die Elongationszeit richtete sich nach der jeweiligen Polymerase bzw. nach der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Fragments. Die Q5 Polymerase hat eine Syntheserate von 30 sek pro kbp. Bei der *Taq* Polymerase liegt die Syntheserate bei 1 min pro kbp. Die Annealing-Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 5.21 Beispiel PCR-Ansatz für Klonierungen

PCR Ansatz:		PCR-Programm:		
1-100 ng	Matrize	Initiale Denaturierung	2 min	98°C
20 µl	Q5-Puffer	Denaturierung	10 sek	98°C
20 nmol	dNTPs	Annealing	20 sek	54°C
30 pmol	Oligonukleotid 1	Elongation	30 sek pro kbp	72°C
30 pmol	Oligonukleotid 2	Finale Elongation	2 min	72°C
2 U	Q5-Polymerase			
ad MQ	100 µl			

} 35x

Bei analytischen PCR-Reaktionen wurden ganze *E. coli* Zellen durch Aufkochen im PCR-Ansatz lysiert und die hierdurch freigewordene DNA diente als Matrize für die PCR-Reaktion.

Tabelle 5.22 Beispielansatz für eine analytische PCR

PCR Ansatz:		PCR-Programm:		
<i>E.coli</i> Zellen als Matrize		Initiale Denaturierung	2 min	96°C
2,5 µl	Thermopol Puffer	Denaturierung	30 sek	96°C
500 pmol	dNTPs	Annealing	30 sek	54°C
750 fmol	Oligonukleotid 1	Elongation	1 min pro kbp	72°C
750 fmol	Oligonukleotid 2	Finale Elongation	2 min	72°C
0,25 µl	<i>Taq</i> -Polymerase			
ad MQ	25 µl			

} 35x

5.4.11 RT-PCR

Aufgereinigte RNA (siehe 5.2.2.7) wurde mit der *SuperScriptII* (SSII) Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das vom Hersteller empfohlene Protokoll für *Random Hexamere* verwendet.

1 µg RNA wurde mit 10 nmol dNTPs und 0,2 µg *Random Hexameren* für 5 min bei 65°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Eis gestellt und es wurden 4 µl FS-Puffer und 2 µl DTT (0,1 M) zugegeben. Der Ansatz wurde 2 min bei 25°C inkubiert, erneut auf Eis gestellt und 1 µl SSII wurde zugegeben. Es wurde 10 min bei 25°C und 50 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde durch 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde ein Thermocycler verwendet.

Die synthetisierte cDNA wurde als Matrize für eine PCR-Reaktion verwendet (siehe Tabelle 5.23).

Tabelle 5.23 Beispielansatz einer RT-PCR

PCR Ansatz:		PCR-Programm:		
2 µl	cDNA	Initiale Denaturierung	2 min	96°C
5 µl	Thermopol Puffer	Denaturierung	30 sek	96°C
10 nmol	dNTPs	Annealing	30 sek	54°C
15 pmol	Oligonukleotid 1	Elongation	1 min pro kbp	72°C
15 pmol	Oligonukleotid 2	Finale Elongation	2 min	72°C
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (NEB)			
ad MQ	50 µl			

} 35x

Von der RT-PCR wurden 10 µl auf einem 3% (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung visualisiert.

Tabelle 5.24 Verwendete Oligonukleotide für RT-PCRs

Konstrukt	Oligonukleotidpaar
Minigen	pMA_exI-exIII_f und KanR_1_r
Luziferase	pWHE-Ex1-Ex2-f und pWHE-Ex1-Ex2-r2
eGFPmCherry	pWHE-Ex1-Ex2-f und eGFP-spleiss-rev
MAX	MAX-spleiß1-f und MAX-spleiß1-r
CD20	CD20-spleiss-f und CD20_rev

5.5 Verwendete Software

Tabelle 5.25 Verwendete Software

Software und Version	Verwendungszweck
Vector NTI Version 11	Visualisierung und Bearbeitung von Plasmidkarten
SeqMan Version 7.1.0	Analyse von Sequenzierungen
Microsoft Word 2010	Textverarbeitung
Microsoft Exel 2010	Erstellen und Bearbeiten von Tabellen
Microsoft PowerPoint 2010	Präsentationen
CorelDRAW Version 14	Erstellen von Abbildungen
Imag Lab Version 4.1	Auswertung von Westernblots

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

Abkürzungen		Abkürzungen (Fortsetzung)	
3' SS	3'-Spleißstelle	nt	Nukleotid
5' SS	5'-Spleißstelle	ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
Amp	Ampicillin		
asRNA	Gegensinn-RNA (<i>antisense RNA</i>)	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
		PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ATP	Adenosintriphosphat	PoI II	RNA-Polymerase II
BP	Verzweigungspunkt (<i>branch point</i>)	prä-mRNA	pre-mRNA (<i>precursor messenger RNA</i>)
bp	Basenpaar	RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten (<i>relative fluorescence units</i>)
BSA	Rinder-Serum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)		
CDS	Proteincodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)	RISC	RNA induzierter Stilllegungsprozess (<i>RNA-induced silencing komplex</i>)
		RLU	Relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
CMV	Cytomegalievirus	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNAi	RNA-Interferenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Dox	Doxycyclin	SD	Standardabweichung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
ESE	<i>exonic splicing silencer</i>	SDS	Natriumlaurylsulfat
ESS	<i>exonic splicin enhancer</i>	SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)		
EtOH	Ethanol	siRNA	kleine Interferenz-RNA (<i>small interfering RNA</i>)
Exon	<i>expressed region</i>		
GCV	Ganciclovir	snRNA	kleine nukleäre RNA (<i>small nuclear RNA</i>)
gDNA	genomische DNA		
hnRNP	<i>heterogenous nuclear ribonucleoproteins</i>	snRNP	kleines Kernribonukleoprotein (<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>)
Intron	<i>intervening region</i>	SR	Serin-Arginin
ISE	<i>intronic splicing enhancer</i>		
ISS	<i>intronic splicing silencer</i>	sRNA	kleine RNA (<i>small RNA</i>)
K_D	Dissoziationskonstante		
LB	Nährmedium (<i>lysogeny broth</i>)	ss	einzelsträngig
MCS	<i>Multiple cloning site</i>	Tc	Tetracyclin
miRNA	microRNA	TK	Thymidinkinase
MQ	Milli-Q®-Wasser	TPP	Thiaminpyrophosphat
mRNA	<i>messenger RNA</i>	UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
ncRNA	nicht codierende RNA (<i>non coding RNA</i>)		
		vs.	im Vergleich zu (<i>Versus</i>)

6.2 Einheiten

Einheiten	
% (v/v)	% (Volumen/Volumen)
% (w/v)	% (Gewicht/Volumen)
°C	Grad Celsius
bp	Basenpaare
CPS	Zählimpulse / sec
Da	Dalton
g	Gravitationskraft oder Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	molar
min	Minute
nt	Nukleotide
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
sek	Sekunde
U	Einheit (unit)
V	Volt
ΔG	Gibbs-Energie
oD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm

6.3 Dimensionen

Vorsätze für Maßeinheiten	
k	kilo (10 ³)
m	milli (10 ⁻³)
μ	micro (10 ⁻⁶)
n	nano (10 ⁻⁹)
p	pico (10 ⁻¹²)
f	femto (10 ⁻¹⁵)

6.4 Nukleobasen

Nukleobasen	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Sequenz des Luziferase-Reportergenkonstrukts pWHE237mod-eGFPmCherry

Die Exons sind in Groß- und die Introns sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Sequenz von Exon 1 ist in orange gezeigt. Exon 2 ist in grau dargestellt und das Aptamer ist in fetten Buchstaben gezeigt. Das *eGFP*-Gen ist in grün und das *mCherry*-Gen in rot dargestellt.

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGGCgtgagtctatgggaccctgatgtttcttcccctctttctatggttaagttcatgcatagga
 aggggagaagtaacaggttacagtttagaatgggaacagacgaatgattgatcagtggtgaagctcaggatcgttttagttctttattgtgttcataaca
 ttgtttctttgttaattctgtcttctttttctctccgcaattttactattatactaatgcctaacattgtgtatacaaaaaggaaatatctctgagatacattaagtaac
 ttaaaaaaaaaactttacacagctgccttagtactatttggaaatatgtgtgctatttgcataatcataatctcccactttattttcttttaattgatacataatc
 attatacattgctgtgccagcctttgccagaggcgtctagctgggagcaaagtcggctcactgggcagcaccacccccggactgcatgggtagccgctga
 gatggagcctgagcacacgcggccgctgtaacgcagtgttctctttttcagGCGCTAAAACATACCAGATGAAAGTCTGGAGAGG
 TGAAGAATACGACCACCTAGCGCCTGAAACAACCAAAACAACCAAAACAACCAAAACAACCAAAACAACCAAAACAACCAAAACA
 CCAAAACAACCAAAACAACCAAAACAACCAAAACAACCAAAACAACCAACACAGgttggtgctagctggccagtgagatccaaga
 atcttctgtctctgctgatccactgataggattacaagtacatgccaccaagcccagcttctctaccaggtgctggggaccaacttaggcctcattctacac
 agtgaatactatttatgggttaaagtgaatgttttaatatgtgtacacataattgaccaaactcagggtaatttgcattgtaattttaaaaaatgcttctcttttaataact
 ttttgtttatctatttcaataactttcccaatctcttcttccagggcaataatgatacaatgtatcatgcctcttgcaccattctaaagaataacagtgataattctgggtt
 aaggcaatagcaatatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttta
 tttatggttgggataaggctggattattctgagccaagctaggccctttgctaactcatgttcataccttattctctcccacagCCGGCGCCATTGTGA
 GCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA
 CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA
 CCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAG
 CCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGC
 GCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG
 GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTA
 CAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGAT
 CCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGAC
 GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA
 GCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA
 AGTAGGTAGCGGCAGCGGTAGCGTAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATG
 CGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCC
 GCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGA
 CATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCGACATCCCCGACTACTT
 GAAGCTGTCCCTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACC
 GTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCC
 CTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAG
 GACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAG
 GTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGA
 CATCACCTCCACAACGAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCGCACTCCACCG
 GCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

6.6 Zusätzliche Tabellen

Tabelle 6.1 Länge und Stabilität des Stammes P1 der Konstrukte bei welchen der BP kontrolliert wurde

Konstrukt	Stammlänge [bp]	ΔG [kcal*mol ⁻¹]
BP1	11	-9,3
BP2	11	-14,1
BP3	11	-15,5
BP4	9	-7,5
BP5	13	-14,4
BP6	11	-9,3

Tabelle 6.2 Länge und Stabilität des Stammes P1 der Konstrukte bei welchen die 3' SS kontrolliert wurde

Konstrukt	Stammlänge [bp]	ΔG [kcal*mol ⁻¹]
M1	12	-15,1
M2	12	-18,8
M3	12	-20,8
M4	10	-15
M5	12	-15,1
M6	12	-17,8
M7	12	-19,2
M8	10	-17,1
M9	12	-15,1
M10	13	-24
M11	14	-26,5
M12	15	-29,8

6.7 Zusätzliche Abbildungen

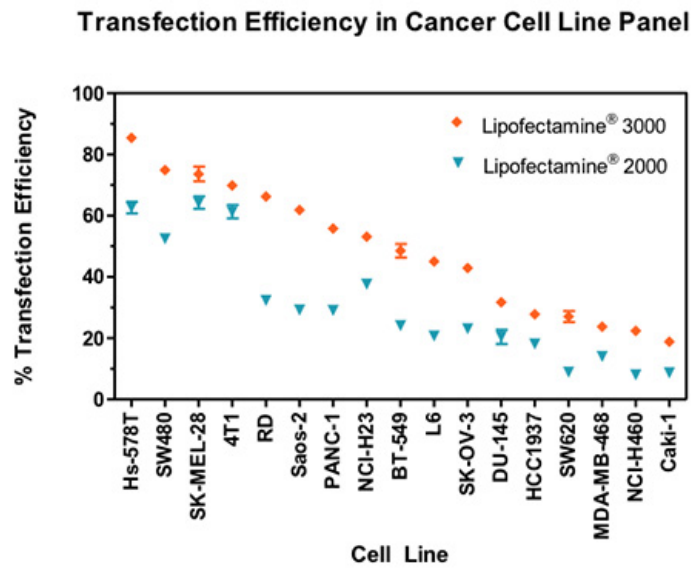


Abbildung 6.1 Transfektionseffizienz verschiedener Zelllinien

Die Abbildung zeigt die Transfektionseffizienz verschiedener Zelllinien mit Lipofectamin2000 und 3000. Für die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde ein GFP-Plasmid transfiziert und die Fluoreszenz wurde gemessen. (entnommen aus: (ThermoFisher))

7 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., 2015. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, NY, 1 volume (various pagings) pp.
- Alekseyenko, A.V., Kim, N., Lee, C.J., 2007. Global analysis of exon creation versus loss and the role of alternative splicing in 17 vertebrate genomes. *RNA*, 13(5): 661-70.
- Arning, S., Gruter, P., Bilbe, G., Kramer, A., 1996. Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA. *RNA*, 2(8): 794-810.
- Barash, Y. et al., 2010. Deciphering the splicing code. *Nature*, 465(7294): 53-9.
- Batey, R.T., 2014. Structural biology: Lariat lessons. *Nature*, 514(7521): 173-4.
- Beilstein, K., Wittmann, A., Grez, M., Suess, B., 2015. Conditional control of Mammalian gene expression by tetracycline-dependent hammerhead ribozymes. *ACS Synth Biol*, 4(5): 526-34.
- Beltinger, C. et al., 1999. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15): 8699-704.
- Bentley, D.L., 2005. Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3): 251-6.
- Berens, C., Groher, F., Suess, B., 2015. RNA aptamers as genetic control devices: the potential of riboswitches as synthetic elements for regulating gene expression. *Biotechnol J*, 10(2): 246-57.
- Berens, C. et al., 2006. Subtype selective tetracycline agonists and their application for a two-stage regulatory system. *Chembiochem*, 7(9): 1320-4.
- Berens, C., Thain, A., Schroeder, R., 2001. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem*, 9(10): 2549-56.
- Berger, C., Flowers, M.E., Warren, E.H., Riddell, S.R., 2006. Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 107(6): 2294-302.
- Berget, S.M., 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem*, 270(6): 2411-4.
- Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A., 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(8): 3171-5.
- Biron, K.K., 2006. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res*, 71(2-3): 154-63.
- Boeger, H. et al., 2005. Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Lett*, 579(4): 899-903.
- Bonini, C. et al., 2007. The suicide gene therapy challenge: how to improve a successful gene therapy approach. *Mol Ther*, 15(7): 1248-52.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Breaker, R.R., 2012. Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(2).
- Brody, E., Abelson, J., 1985. The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science*, 228(4702): 963-7.
- Brogna, S., Wen, J., 2009. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol*, 16(2): 107-13.
- Brow, D.A., 2002. Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet*, 36: 333-60.

- Caruso, M., 1996. Gene therapy against cancer and HIV infection using the gene encoding herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Med Today*, 2(5): 212-7.
- Cech, T.R., 1990. Nobel lecture. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena. *Biosci Rep*, 10(3): 239-61.
- Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N., Breaker, R.R., 2007. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature*, 447(7143): 497-500.
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R., Roberts, R.J., 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, 12(1): 1-8.
- Chua, K., Reed, R., 2001. An upstream AG determines whether a downstream AG is selected during catalytic step II of splicing. *Mol Cell Biol*, 21(5): 1509-14.
- Corish, P., Tyler-Smith, C., 1999. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng*, 12(12): 1035-40.
- Cragg, M.S., Walshe, C.A., Ivanov, A.O., Glennie, M.J., 2005. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*, 8: 140-74.
- Cross, D., Burmester, J.K., 2006. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res*, 4(3): 218-27.
- Culler, S.J., Hoff, K.G., Smolke, C.D., 2010. Reprogramming cellular behavior with RNA controllers responsive to endogenous proteins. *Science*, 330(6008): 1251-5.
- Das, R., Zhou, Z., Reed, R., 2000. Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. *Mol Cell*, 5(5): 779-87.
- De Conti, L., Baralle, M., Buratti, E., 2013. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 4(1): 49-60.
- Demolli, S. et al., 2014. Development of β -lactamase as a tool for monitoring conditional gene expression by a tetracycline-riboswitch in *Methanosarcina acetivorans*. *Archaea*, 2014: 725610.
- Diolaiti, D., McFerrin, L., Carroll, P.A., Eisenman, R.N., 2015. Functional interactions among members of the MAX and MLX transcriptional network during oncogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1849(5): 484-500.
- Ellington, A.D., Szostak, J.W., 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287): 818-22.
- Epe, B., Woolley, P., Hornig, H., 1987. Competition between tetracycline and tRNA at both P and A sites of the ribosome of Escherichia coli. *FEBS Lett*, 213(2): 443-7.
- Felgner, P.L. et al., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21): 7413-7.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806-11.
- Forster, U., Weigand, J.E., Trojanowski, P., Suess, B., Wachtveitl, J., 2012. Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer. *Nucleic Acids Res*, 40(4): 1807-17.
- Friendewey, D., Keller, W., 1985. Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences. *Cell*, 42(1): 355-67.
- Gao, K., Masuda, A., Matsuura, T., Ohno, K., 2008. Human branch point consensus sequence is yUnAy. *Nucleic Acids Res*, 36(7): 2257-67.
- Gardina, P.J. et al., 2006. Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array. *BMC Genomics*, 7: 325.

- Georg, J., Hess, W.R., 2011. cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(2): 286-300.
- Ghigna, C. et al., 2005. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Mol Cell*, 20(6): 881-90.
- Grabowski, P.J., Seiler, S.R., Sharp, P.A., 1985. A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell*, 42(1): 345-53.
- Grate, D., Wilson, C., 1999. Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11): 6131-6.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4): 557-80.
- Hanson, S., Bauer, G., Fink, B., Suess, B., 2005. Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *RNA*, 11(4): 503-11.
- Hanson, S., Berthelot, K., Fink, B., McCarthy, J.E., Suess, B., 2003. Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. *Mol Microbiol*, 49(6): 1627-37.
- He, L., Hannon, G.J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5(7): 522-31.
- Hertweck, M., Hiller, R., Mueller, M.W., 2002. Inhibition of nuclear pre-mRNA splicing by antibiotics in vitro. *Eur J Biochem*, 269(1): 175-83.
- Izaurralde, E. et al., 1994. A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell*, 78(4): 657-68.
- Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A., Polisky, B., 1994. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 263(5152): 1425-9.
- Jin, J. et al., 2005. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci*, 30(12): 680-7.
- Johnston, W.K., Unrau, P.J., Lawrence, M.S., Glasner, M.E., Bartel, D.P., 2001. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science*, 292(5520): 1319-25.
- Joyce, G.F., Orgel, L.E., 1993. 1 Prospects for Understanding the Origin of the RNA World. 1993.
- Karjoo, Z., Chen, X., Hatefi, A., 2016. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 99(Pt A): 113-28.
- Kemmerer, K., Weigand, J.E., 2014. Hypoxia reduces MAX expression in endothelial cells by unproductive splicing. *FEBS Lett*, 588(24): 4784-90.
- Keren, H., Lev-Maor, G., Ast, G., 2010. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet*, 11(5): 345-55.
- Kim, D.S., Gusti, V., Dery, K.J., Gaur, R.K., 2008a. Ligand-induced sequestering of branchpoint sequence allows conditional control of splicing. *BMC Mol Biol*, 9: 23.
- Kim, D.S., Gusti, V., Pillai, S.G., Gaur, R.K., 2005. An artificial riboswitch for controlling pre-mRNA splicing. *RNA*, 11(11): 1667-77.
- Kim, E., Goren, A., Ast, G., 2008b. Alternative splicing: current perspectives. *Bioessays*, 30(1): 38-47.
- Kornblihtt, A.R. et al., 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(3): 153-65.
- Kötter, P., Weigand, J.E., Meyer, B., Entian, K.D., Suess, B., 2009. A fast and efficient translational control system for conditional expression of yeast genes. *Nucleic Acids Res*, 37(18): e120.
- Kruger, K. et al., 1982. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 31(1): 147-57.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-5.
- Leclerc, G.M., Boockfor, F.R., Faught, W.J., Frawley, L.S., 2000. Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression. *Biotechniques*, 29(3): 590-1, 594-6, 598 passim.
- Li, X. et al., 1998. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*, 273(52): 34970-5.
- Liu, H.X., Zhang, M., Krainer, A.R., 1998. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev*, 12(13): 1998-2012.
- Lopez-Bigas, N., Audit, B., Ouzounis, C., Parra, G., Guigo, R., 2005. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett*, 579(9): 1900-3.
- McNamara, J.O., 2nd et al., 2006. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol*, 24(8): 1005-15.
- Muller, M., Weigand, J.E., Weichenrieder, O., Suess, B., 2006. Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch. *Nucleic Acids Res*, 34(9): 2607-17.
- Nemunaitis, J. et al., 2010. A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Mol Ther*, 18(2): 429-34.
- Newman, A., 2001. Molecular biology. RNA enzymes for RNA splicing. *Nature*, 413(6857): 695-6.
- Nicholas, T.W., Read, S.B., Burrows, F.J., Kruse, C.A., 2003. Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects. *Histol Histopathol*, 18(2): 495-507.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., Blencowe, B.J., 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*, 40(12): 1413-5.
- Parenteau, J. et al., 2008. Deletion of many yeast introns reveals a minority of genes that require splicing for function. *Mol Biol Cell*, 19(5): 1932-41.
- Perez-Callejo, D., Gonzalez-Rincon, J., Sanchez, A., Provencio, M., Sanchez-Beato, M., 2015. Action and resistance of monoclonal CD20 antibodies therapy in B-cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancer Treat Rev*.
- Piva, F., Giulietti, M., Burini, A.B., Principato, G., 2012. SpliceAid 2: a database of human splicing factors expression data and RNA target motifs. *Hum Mutat*, 33(1): 81-5.
- Qin, J.Y. et al., 2010. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One*, 5(5): e10611.
- Ramakrishnan, V., 2010. Unraveling the structure of the ribosome (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 49(26): 4355-80.
- Religio, A. et al., 2005. Alternative splicing microarrays reveal functional expression of neuron-specific regulators in Hodgkin lymphoma cells. *J Biol Chem*, 280(6): 4779-84.
- Riddell, S.R. et al., 1996. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med*, 2(2): 216-23.
- Robberson, B.L., Cote, G.J., Berget, S.M., 1990. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol*, 10(1): 84-94.

- Rogers, J., Chang, A.H., von Ahsen, U., Schroeder, R., Davies, J., 1996. Inhibition of the self-cleavage reaction of the human hepatitis delta virus ribozyme by antibiotics. *J Mol Biol*, 259(5): 916-25.
- Rosbash, M., Seraphin, B., 1991. Who's on first? The U1 snRNP-5' splice site interaction and splicing. *Trends Biochem Sci*, 16(5): 187-90.
- Rosenberg, J.E. et al., 2014. A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*, 32(1): 178-87.
- Ruby, S.W., Abelson, J., 1988. An early hierarchic role of U1 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *Science*, 242(4881): 1028-35.
- Saiki, R.K. et al., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839): 487-91.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schnappinger, D., Hillen, W., 1996. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol*, 165(6): 359-69.
- Schwarz, J., 2011. Diplomarbeit: Entwicklung eines Tetrazyklin-Aptamer-regulierten Spleißsystems in höheren Eukaryoten, Goethe Universität Frankfurt am Main.
- Serafini, M. et al., 2004. Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease. *Hum Gene Ther*, 15(1): 63-76.
- Soundararajan, S., Chen, W., Spicer, E.K., Courtenay-Luck, N., Fernandes, D.J., 2008. The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 68(7): 2358-65.
- Spahn, C.M., Prescott, C.D., 1996. Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J Mol Med (Berl)*, 74(8): 423-39.
- Stage, T.K., Hertel, K.J., Uhlenbeck, O.C., 1995. Inhibition of the hammerhead ribozyme by neomycin. *RNA*, 1(1): 95-101.
- Stoilov, P., Lin, C.H., Damoiseaux, R., Nikolic, J., Black, D.L., 2008. A high-throughput screening strategy identifies cardiotoxic steroids as alternative splicing modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(32): 11218-23.
- Storz, G., Vogel, J., Wassarman, K.M., 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell*, 43(6): 880-91.
- Suess, B. et al., 2003. Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res*, 31(7): 1853-8.
- Sugnet, C.W., Kent, W.J., Ares, M., Jr., Haussler, D., 2004. Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. *Pac Symp Biocomput*: 66-77.
- Sun, H. et al., 2014. Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*, 3: e182.
- Tazi, J., Bakkour, N., Stamm, S., 2009. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1792(1): 14-26.
- ThermoFisher,
http://images.google.de/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.thermofisher.com%2Fcontent%2Fdam%2FLifeTech%2Fglobal%2Flife-sciences%2Fcellanalysis%2FImages%2F1213%2Flipo-3000_fig-1.gif&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.thermofisher.com%2Fus%2Fen%2Fhome%2Fbrands%2Fproduct-brand%2Flipofectamine%2Flipofectamine-3000.html&h=200&w=740&tbnid=aTXK6e1GF49YFM%3A&docid=MDmXPv932muDGM&ei=iM58V5v3BovvUK7BsBg&tbn=isch&client=firefox-

- b&iact=rc&uact=3&dur=415&page=1&start=0&ndsp=36&ved=0ahUKEwib27Gzwt7NAhWLNxQKH4gDAMQMwgmKAQwBA&bih=945&biw=1920.
- Traversari, C. et al., 2007. The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies. *Blood*, 109(11): 4708-15.
- Tuerk, C., Gold, L., 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968): 505-10.
- Vogler, I., 2009. Doktorarbeit: Gene-Modified T Cells for Adoptive Immunotherapy, Goethe Universität Frankfurt am Main.
- Vogler, I. et al., 2010. An improved bicistronic CD20/tCD34 vector for efficient purification and in vivo depletion of gene-modified T cells for adoptive immunotherapy. *Mol Ther*, 18(7): 1330-8.
- von Ahsen, U., Schroeder, R., 1991. Streptomycin inhibits splicing of group I introns by competition with the guanosine substrate. *Nucleic Acids Res*, 19(9): 2261-5.
- Wachter, A. et al., 2007. Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell*, 19(11): 3437-50.
- Wahl, M.C., Will, C.L., Luhrmann, R., 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136(4): 701-18.
- Wang, G.S., Cooper, T.A., 2007. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*, 8(10): 749-61.
- Warf, M.B., Berglund, J.A., 2010. Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem Sci*, 35(3): 169-78.
- Weigand, J.E. et al., 2008. Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA*, 14(1): 89-97.
- Weigand, J.E. et al., 2011. Mechanistic insights into an engineered riboswitch: a switching element which confers riboswitch activity. *Nucleic Acids Res*, 39(8): 3363-72.
- Weigand, J.E., Suess, B., 2007. Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucleic Acids Res*, 35(12): 4179-85.
- Weigand, J.E., Suess, B., 2009. Konditionale Genregulation Synthetische Riboswitche. *BIOspektrum*, 1: 42-44.
- Weigand, J.E., Wittmann, A., Suess, B., 2012. RNA-based networks: using RNA aptamers and ribozymes as synthetic genetic devices. *Methods Mol Biol*, 813: 157-68.
- Will, C.L., Luhrmann, R., 2011. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(7).
- Wittmann, A., Suess, B., 2012. Engineered riboswitches: Expanding researchers' toolbox with synthetic RNA regulators. *FEBS Lett*, 586(15): 2076-83.
- Woodson, S.A., 1998. Ironing out the kinks: splicing and translation in bacteria. *Genes Dev*, 12(9): 1243-7.
- Xiao, H., Edwards, T.E., Ferre-D'Amare, A.R., 2008. Structural basis for specific, high-affinity tetracycline binding by an in vitro evolved aptamer and artificial riboswitch. *Chem Biol*, 15(10): 1125-37.
- Zamore, P.D., Green, M.R., 1989. Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23): 9243-7.
- Zhang, X.H., Chasin, L.A., 2004. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev*, 18(11): 1241-50.

8 Vorträge und Posterpräsentationen

2013

Winterschule des SFB902, Obergurgel, Österreich

Vortrag: Control of pre-mRNA splicing by engineered riboswitches

2014

Winterschule des SFB902, Obergurgel, Österreich

Vortrag: Control of pre-mRNA splicing by engineered riboswitches

32. Rabensteiner Kolleg, Pottenstein, Deutschland

Vortrag: Kontrolle des prä-mRNA Spleißens durch das Tetrazyklin-Aptamer

Tagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Bonn, Deutschland

Poster: Control of pre-mRNA splicing by the tetracycline binding aptamer

2015

Winterschule des SFB902, Obergurgel, Österreich

Vortrag: Control of pre-mRNA splicing by the tetracycline aptamer

33. Rabensteiner Kolleg, Pottenstein, Deutschland

Vortrag: Kontrolle des prä-mRNA Spleißens durch das Tetrazyklin-Aptamer

Doktorandensymposium, TU-Darmstadt, Darmstadt

Vortrag: Control of pre-mRNA splicing by the tetracycline aptamer

RNA-Club, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Vortrag: Control of pre-mRNA splicing by the tetracycline aptamer

2016

APTAMERS, Bordeaux, Frankreich

Poster: Control of pre-mRNA splicing by the tetracycline aptamer

Gewinner des Posterpreises

9 Publikationen

Reuss AJ, Vogel M, Weigand JE, Suess B and Wachtveitl J.: **Tetracycline Determines the Conformation of its Aptamer at Physiological Magnesium Concentrations.** *Biophysical Journal* 107(12):2953-2962.

Wenk P, Kaushik M, Richter D, Vogel M, Suess B and Corzilius B: **Dynamic Nuclear Polarization of Nucleic Acid with Endogenously Bound Manganese** *JNMR* 63(1):97-109.

Vogel M, Suess B: **Label-Free Determination of the Dissociation Constant of Small Molecule-Aptamer Interaction by Isothermal Titration Calorimetry.** *Methods Mol Biol* 1380:113-25.

10 Curriculum vitae

Name Marc Vogel
Geburtsdatum 02.08.1986 in Heidelberg
Adresse Schillerstraße 2
68526 Ladenburg
E-Mail marc-vogel@gmx.net

HOCHSCHULAUSBILDUNG

2012-2016 TU-Darmstadt
Doktorand im Labor von Frau Prof. Dr. B. Süß
Angestrebter Abschluss: *Doctor rerum naturalium*

2010-2012 **Masterstudium**
Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
Masterarbeit: Genetische und physikalische Interaktionen der Rrp8-Methyltransferase
Abschluss: M.Sc. in Molekulare Biowissenschaften

2007-2010 **Bachelorstudium**
Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
Bachelorarbeit: Regulation der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase Expression in Hefe durch Tetrazyklin-Aptamere
Abschluss: B.Sc. in Bioinformatik

ZIVILDIENTST

2006-2007 Freiwilliges Soziales Jahr als Ersatz für den Zivildienst
Canterbury, England
Betreuung eines 30. jährigen Mannes

SCHULBILDUNG

1997-2006 Carl-Benz-Gymnasium, Ladenburg
1993-1997 Dalberg-Grundschule, Ladenburg

Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 19.07.2016

.....

(Marc Vogel)