

Die Bedeutung intragenischer CpG Dinukleotide für die *in vitro* Expression von Immunmodulatoren

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Aslı Bauer aus Deuerling
April 2008

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen November 2003 und April 2008 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 23. April 2008

Promotionskolloquium am: 2. Juli 2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Ralf Wagner

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. C. Förster

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. S. Schneuwly

Prof. Dr. R. Wagner

Prof. Dr. G. Längst

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Aslı Bauer

Meinen Eltern

Ein kurzer Augenblick der Seelenruhe ist wertvoller als alles,
was du sonst erstreben magst
(aus Persien)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zytokine	1
1.1.1 Entdeckungsgeschichte der Zytokine	1
1.1.2 Klassifizierung der Zytokine	1
1.1.3 Funktion der Zytokine	2
1.1.4 Rekombinante Expression von Zytokinen	4
1.2 Regulation der Genexpression und epigenetische Kontrollmechanismen	5
1.2.1 Transkription	5
1.2.1.1 Einfluss der Promotorsequenz	7
1.2.1.2 Einfluss von Cytosin-Guanin Dinukleotiden	8
1.2.1.2.1 Methylierung von Cytosin-Guanin Dinukleotiden	8
1.2.1.2.2 5-Methyl-Cytosin-Guanin Dinukleotid-bindende Proteine	11
1.2.1.2.3 Cytosin-Guanin-Dinukleotid-bindende Proteine	12
1.2.1.3 Einfluss der Chromatinstruktur	13
1.2.2 Translation	15
1.2.2.1 Regulation der Translation	17
1.2.2.1.1 3' Nicht-translatierter Bereich und PolyA-Schwanz	17
1.2.2.1.2 mRNA-Export	17
1.2.2.1.3 mRNA-Stabilität	19
1.2.2.1.4 Kodonverwendung	19
1.2.3 Strategien zur Expressionssteigerung	20
1.2.4 Zielsetzung	22
2. Ergebnisse	23
2.1 Generation von Zytokingenen mit differierendem CpG Gehalt	23
2.2 Transiente Analysen	25
2.2.1 Transiente Expression der Zytokingenvarianten	25
2.2.2 Eingrenzung des expressionssteigernden Mechanismus	28
2.2.3 Einfluss methylierter intragenischer CpG Dinukleotide	30
2.3 Untersuchungen an stabilen Zelllinien	31
2.3.1 Stabile Expression der Zytokingenvarianten	31
2.3.2 Methylierungsstatus der stabil integrierten Zytokinvarianten	33
2.3.3 Einfluss des CpG Gehaltes auf die Translationseffizienz	34
2.3.4 Einfluss der CpG Dinukleotide auf Spleißen und RNA-Export	36
2.3.5 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die Menge der „steady-state“ RNA	38
2.3.6 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die mRNA-Stabilität	40
2.3.7 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die <i>de novo</i> Transkription	41

3. Diskussion	43
3.1 Rekombinante Expression therapeutischer Proteine	43
3.1.1 Strategien zur Verbesserung der rekombinanten Expression.....	43
3.1.2 Einfluss von CpG Dinukleotiden auf die rekombinante Expression	44
3.1.3 Relevanz intragenischer CpGs für die rekombinante Expression	45
3.2 Analysen im transienten System.....	45
3.2.1 Transiente Expression der Zytokine	45
3.2.2 Transfektionseffizienz	47
3.2.3 <i>Cis</i> -aktive Elemente der Zytokingene	47
3.2.4 <i>In vitro</i> Methylierung intragenischer CpG Dinukleotide	48
3.3 Analysen in stabilen Zelllinien.....	48
3.3.1 Zytokinexpression stabiler Zelllinien	48
3.3.2 Methylierungsstatus der Zytokine in stabilen Zelllinien	49
3.3.3 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die Translation	50
3.3.4 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die Transkription	50
3.3.5 Veränderung der <i>de novo</i> Transkription durch CpG Dinukleotide	52
3.4 Beteiligung des CFP1 an der <i>de novo</i> RNA-Synthese.....	53
3.4.1 Rekombinante Expression der CFP1-Zinkfinger-Domäne	54
3.4.2 CFP1-Bindung an die MIP-1 α Nukleinsäuresequenz	54
3.4.3 Identifizierung eines CFP1-Homologs in CHO-Zellen.....	56
3.4.4 Stilllegung der CFP1-Expression in CHO-Zellen	57
3.5 Perspektiven	59
4. Zusammenfassung	62
5. Material	64
5.1 Organismen	64
5.1.1 Zelllinien	64
5.1.2 Bakterienstämme.....	64
5.2 Medien	64
5.3 Kitsysteme	65
5.4 Puffer und Lösungen	65
5.5 Plasmide	68
5.6 Oligonukleotide	69
5.7 Chemikalien, Enzyme und Materialien.....	70
5.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien	70
6. Methoden.....	71
6.1 Kulturhaltung	71
6.1.1 Eukaryontische Zellen	71
6.1.1.1 Kultivierung.....	71
6.1.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	71

6.1.1.3	Transiente Transfektion	71
6.1.1.4	Herstellung stabiler Zelllinien	72
6.1.1.5	X-Gal-Färbung	72
6.1.2	Prokaryontische Zellen	73
6.2	Molekularbiologische Methoden	73
6.2.1	RNA-Methoden	73
6.2.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA	74
6.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	74
6.2.1.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	74
6.2.1.4	Herstellung von RNA-Sonden für den Northern Blot	75
6.2.1.5	Northern Blot Analyse	75
6.2.1.6	RNA-Stabilität	76
6.2.1.7	„Nuclear run-on“	77
6.2.2	DNA-Methoden	77
6.2.2.1	Isolierung genomischer DNA	77
6.2.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	77
6.2.2.3	Restriktionsverdau von DNA	78
6.2.2.4	Gelelektrophorese von DNA	78
6.2.2.5	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	78
6.2.2.6	Bisulfitkonversion von DNA	78
6.2.3	Herstellung der Plasmide	78
6.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	79
6.2.4.1	Amplifikation von DNA	79
6.2.4.2	Kolonie-PCR mit <i>Escherichia coli</i>	80
6.2.4.3	Amplifikation von DNA nach Bisulfitkonversion	80
6.2.4.4	„real-time“ PCR	81
6.2.5	Klonierung von DNA	83
6.2.5.1	Ligation	83
6.2.5.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	83
6.2.6	Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i>	83
6.3	Proteinbiochemische Methoden	84
6.3.1	Rekombinante Expression	84
6.3.2	Affinitätschromatographie	84
6.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	85
6.3.4	SDS-PA nach Laemmli	85
6.3.5	Coomassie-Färbung von SDS-PA Gelen	85
6.3.6	Western Blotting und Immunodetektion	85
6.3.7	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	86
6.3.8	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)	86

7. Literaturverzeichnis.....	88
8. Anhang	100
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	100
8.2 Sequenzen	104
8.2.1 Zytokine	104
8.2.1.1 humanes GM-CSF.....	104
humanes GM-CSF wt (10CpG)	104
humanes GM-CSF 0CpG	104
humanes GM-CSF 12CpG (kodonoptimiert)	104
humanes GM-CSF 63CpG	104
8.2.1.2 murines GM-CSF.....	105
murines GM-CSF wt (11CpG)	105
murines GM-CSF 0CpG	105
murines GM-CSF 21CpG (kodonoptimiert)	105
murines GM-CSF 61CpG	105
8.2.1.3 humanes MIP-1 α	106
humanes MIP-1 α wt (8CpG).....	106
humanes MIP-1 α 0CpG	106
humanes MIP-1 α 11CpG (kodonoptimiert).....	106
humanes MIP-1 α 43CpG	106
8.2.1.4 murines MIP-1 α	107
murines MIP-1 α wt (7CpG).....	107
murines MIP-1 α 0CpG	107
murines MIP-1 α 13CpG (kodonoptimiert).....	107
murines MIP-1 α 42CpG	107
8.2.2 CFP1	108
8.2.2.1 CFP1 <i>Homo sapiens</i>	108
8.2.2.2 CFP1 <i>Cricetulus griseus</i>	109
8.2.2.3 Nukleinsäurealignment des CFP1	110
Publikationen	111
Posterpräsentationen.....	111
Vortrag.....	112
Danksagung	113

1. Einleitung

1.1 Zytokine

1.1.1 Entdeckungsgeschichte der Zytokine

Die ersten Zytokine wurden in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts beschrieben. 1951 beobachteten Levi-Montalcini und Hamburger die wachstumsstimulierenden Eigenschaften von Maus-Sarkomen auf Nervengewebe. Die verantwortliche Substanz bezeichneten sie als Nerven-Wachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) (1). 1953 folgte die Entdeckung des endogenen Pyrogens durch Bennett und Beeson (2). Diese Fieber verursachende, von Leukozyten produzierte und in sterilen Körperflüssigkeiten enthaltene Substanz ist heute bekannt als Interleukin. Der Brite Isaacs und der Schweizer Lindenmann entdeckten 1957 bei der Untersuchung der Auswirkungen von Virusinfektionen auf Zellkulturen, dass die Zellen für die Dauer einer Virusinfektion weitestgehend resistent gegenüber einer zweiten Infektion durch ein anderes Virus waren. Sie isolierten aus den infizierten Zellkulturen ein Protein, das sie Interferon (IFN) nannten (3). Von Lymphozyten produzierte lösliche Moleküle, die viele Funktionen des Immunsystems wie beispielsweise die Expression der Haupthistokompatibilitätsantigene (major histocompatibility antigens) oder die Regulation des Th1-Th2 Paradigmas beeinflussen, wurden in den 60er Jahren entdeckt und aufgrund ihrer Herkunft Lymphokine genannt (4). Einen ersten Durchbruch in der Therapie von Tumoren ermöglichte der in den 70er Jahren identifizierte Tumor Nekrose Faktor (tumor necrosis factor, TNF), welcher die Lipopolysaccharid induzierte Nekrose von Tumoren vermittelt (5). In den folgenden Jahren wurden zahlreiche Substanzen mit ähnlicher Beschaffenheit gefunden und unter dem Namen Zytokine zusammengefasst.

1.1.2 Klassifizierung der Zytokine

Die Nomenklatur der Zytokine folgte zunächst primär ihrer Herkunft und diente der Unterscheidung dieser Immunmodulatoren von anderen Wachstumsfaktoren oder regulatorischen Proteinen, die die Proliferation und biochemische Aktivität von nicht-immun Zellen regulieren. Grundlage dieser ersten Nomenklatur war die Hypothese, dass ein Zytokin nur von einer bestimmten Zelle produziert wird und nur eine Zielzelle hat. Mit zunehmender Anzahl bekannter Zytokine und Kenntnis ihrer redundanten und pleiotropen Funktionen erwies sich diese Nomenklatur als ungeeignet, ebenso wie Bezeichnungen aufgrund biologischer oder biochemischer Eigenschaften. Insbesondere oberflächliche und noch heute gebräuchliche Definitionen, wie z.B. BCDF (B-cell differentiation factors), BCGF (B-cell growth factors), mitogene Zytokine, chemotaktische Zytokine (chemokines),

CSF (colony stimulating factors), Angiogenese-Faktoren oder TRF (T-cell replacing factors), werden der Mannigfaltigkeit Zytokin vermittelter Vorgänge nicht gerecht. Gegenwärtig wird der Begriff Zytokin mit kleinen löslichen Proteinen und Peptiden assoziiert, die auf humoralem Weg in nano- bis picomolaren Konzentrationen die Aktivitäten individueller Zellen oder Gewebe beeinflussen. Da auch ihre Nukleotid- und Aminosäuresequenzen keine einfache Klassifikation zulassen, werden Zytokine aufgrund von Sekundär- und Tertiärstrukturen in verschiedene Kategorien unterteilt. Prinzipiell unterscheidet man heute zwei Arten von Zytokinen, abhängig von der induzierten Immunantwort. Typ 1 Zytokine werden von Th1 T-Helferzellen initiiert, Typ2 Zytokine hingegen von Th2 T-Helferzellen. Der Begriff Zytokin umfasst heute die Familien der Interleukine, Lymphokine, Monokine, Interferone, colony stimulating factors (CSF) und der Chemokine (6).

1.1.3 Funktion der Zytokine

Die biologischen Aktivitäten von Zytokinen ähneln im Wesentlichen denen der klassischen Hormone. Sie beeinflussen Entzündungen, das systemische inflammatorische „Response-Syndrom“ sowie akute Reaktionen, die Wundheilung und das neuroimmun-endokrine Netzwerk. Meist handelt es sich bei Zytokinen um Glykoproteine, die auf klassischen sekretorischen Wegen aus der Zelle exportiert werden. Im Unterschied zu Hormonen werden Zytokine jedoch nicht von spezialisierten Geweben produziert und haben meist ein breiteres Spektrum an Zielzellen. Die Produktion von Zytokinen ist dabei streng reguliert und wird durch spezifische Stimuli, wie z.B. bakterielle Substanzen, ausgelöst. In vielen Fällen ist die Produktion und Sekretion von Zytokinen abhängig vom jeweiligen Status der Zelle. Die Expression wird hierbei von einem individuellen Signal aber auch von der Gesamtheit und dem Gleichgewicht der über einen oder mehrere Rezeptoren empfangenen Signale der Zelle beeinflusst. Ferner wird die Expression eines Zytokines abhängig vom Zelltyp und Entwicklungsstadium differentiell reguliert.

Zytokine sind verantwortlich für die Generation, Stimulation und Differenzierung verschiedener Zelltypen, sowie für die Kontrolle der Produktion anderer Zytokine, die dann die Synthese von Proteinen und/oder biologische Effekte in anderen Zelltypen beeinflussen können (7). Annähernd alle Zytokine sind pleiotrope Effektoren mit mehreren biologischen Funktionen, und verschiedene Zytokine wiederum haben oft überlappende Wirkungsspektren. In Kombination können Zytokine synergistische oder antagonistische Eigenschaften entwickeln. Das Zusammenspiel von Zytokinen im Körper stellt somit ein hochkomplexes und streng reguliertes Netzwerk dar. Die Art, Dauer und das Ausmaß einer Zytokin-induzierten Reaktion wird zudem stark vom Umfeld der betroffenen Zelle geprägt. Entscheidende Faktoren sind Zelldichte, Art der benachbarten Zellen und lokale

wie temporäre Unterschiede in Zytokinkonzentrationen und -kombinationen. Zusammen mit zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren bieten Zytokine ein enormes Spektrum an Regulationsmöglichkeiten. Die Vielzahl möglicher Zielzellen und Wirkungsmechanismen der Zytokine übersteigen den Informationsgehalt von reinen Zell-Zell-Kontakten bei Weitem (Tab. 1).

Zytokin	Quelle	Funktion
IL-1	Makrophagen viele Zellen	Fieber, induziert andere Zytokine, T-Zell-Stimulierung, induziert Metalloproteinasen und Prostaglandine, erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen
IL-2	T-Zellen	erhöht die T-Zell-Proliferation, aktiviert B-Zellen
IL-4	T-Zellen	Signal für Immunoglobulin-switch, erhöht IgE, verringert die Expression proinflammatorischer Zytokine, unterdrückt verspätete Hypersensitivität (T-Zellen)
IL-6	viele Zellen	B- und T-Zell-Proliferation, Akute-Phase-Reaktion, induziert natürliche Protease-Inhibitoren (TIMP)
IL-12	Makrophagen	fördert die IFN- α -Produktion und Th1-Zell-Differenzierung
IL-13	T-Zellen	ähnlich IL-4
IL-15	T-Zellen Makrophagen	induziert die Freisetzung von TNF- β aus synovialen Makrophagen, induziert die Mitogenese, inhibiert die Apoptose
TNF- α	T-Zellen Makrophagen	induziert andere Zytokine, T-Zell-Stimulation, induziert Metalloproteinasen und Prostaglandine, erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen
IFN- α	T-Zellen	Adhäsionsmoleküle, HLA-DR-Expression, Aktivierung von T-Zellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen
<u>Kolonie-stimulierende Faktoren</u>		
GM-CSF	Makrophagen T-Zellen	Myeloid-Differenzierung, Makrophagen-Aktivierung
G-CSF	Makrophagen	Granulozyten-Differenzierung und -Aktivierung
M-CSF	Makrophagen	Myeloid-Differenzierung, Makrophagen-Aktivierung
<u>Chemokine</u>		
C-X-C Familie	viele Zellen	aktiviert Neutrophile, chemotaktisch für Neutrophile und T-Zellen
C-C Familie	viele Zellen	chemotaktisch für Monozyten und T-Zellen
<u>Wachstumsfaktoren</u>		
TGF- β	viele Zellen	Fibroblasten-Proliferation, Kollagen- und TIMP-Synthese, verringert Metalloproteinasen, T-Zell-Proliferation und proinflammatorische Zytokine, Angiogenese,
FGF, VEGF	viele Zellen	Fibroblasten-Proliferation, Angiogenese
PDGF	viele Zellen	Fibroblasten-Proliferation

Tab. 1: Überblick über die bekanntesten Zytokine sowie ihrer Quellen und Funktionen.

CSF, colony stimulating factor; FGF, fibroblast growth factor; HLA, human leukocyte antigen; IFN, interferon; IgG, Immunglobulin G; IL, Interleukin; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF, transforming growth factor; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. Modifiziert nach (8).

Aufgrund dieser Eigenschaften spielen Zytokine eine wichtige Rolle während der Embryogenese und der Organentwicklung sowie für neuroimmunologische,

neuroendokrine und neuroregulatorische Prozesse. Die Fähigkeit oder Unfähigkeit gewisse Zytokine oder Zytokinmuster zu generieren bestimmt maßgebend den klinischen Verlauf einer Infektion (9;10). Unter Umständen kann eine fehlregulierte Zytokinproduktion zu Schock, Multiorganversagen und zum Tod führen (11). Um einem so leistungsfähigem Immunsystem zu entgehen, sind einige Viren in der Lage zytokininhibierende Proteine zu kodieren. Diese Inhibition kann die Synthese und Sekretion von Zytokinen, die Zytokin-Interaktionen mit dem jeweiligen Rezeptor oder die nachfolgenden Signaltransduktionswege betreffen. Weiterhin kann eine antagonistische Wirkung durch viruskodierte Zytokine hervorgerufen werden (12). Ein ähnliches Phänomen wurde auch für Bakterien beobachtet (13). Trotz der Fortschritte im Verständnis der Immunantworten auf mikrobiologische, Tumor-, Selbst- und Alloantigene stellen erbliche oder erworbene Immundefizienzen, Malignome, Infektionen wie HIV, Allotransplantate (Organgewebe und hematopoietische Stammzellen) oder Autoimmunerkrankungen ein schwerwiegendes klinisches Problem mit hoher Morbidität und Mortalität mangels immunotherapeutischer Strategien dar. Eine Stärkung oder Steuerung der Immunantwort ist für die erfolgreiche Therapie und auch Prävention zahlreicher Krankheitsbilder von entscheidender Bedeutung (14).

Bei einem detaillierten Wissen über die induzierten Prozesse würden sich Zytokine sowohl als Therapeutika (15), Adjuvantien für Impfungen (16) wie auch für gentherapeutische Ansätze eignen (17). Hinzu kommt neuerdings der Einsatz von Zytokinen in kosmetischen Mitteln (18). Auch wenn letztere Anwendung weniger von klinischer sondern mehr von wirtschaftlicher Bedeutung ist, steigert sie zusätzlich die Nachfrage nach Zytokinen.

1.1.4 Rekombinante Expression von Zytokinen

Der steigende Bedarf an Zytokinen veranlasst pharmazeutische und biotechnologische Unternehmen zunehmend in die Entwicklung wirtschaftlich arbeitender Produktionsplattformen für diese Proteine zu investieren, um dem Absatzmarkt adäquate Mengen an reinem Produkt zur Verfügung stellen zu können. Die rekombinante Expression von Zytokinen wird bislang durch mehrere Faktoren erschwert. In prokaryontischen Systemen neigen diese dazu, nur schwer löslich zu sein und so genannte „inclusion bodies“ zu bilden (19). Die Expression als Fusionsprotein erhöht zwar die Löslichkeit vieler Zytokine (20), doch kann eine Veränderung der biologischen Eigenschaften nicht immer ausgeschlossen werden. Eine Verbesserung von Isolierungs- und Aufreinigungstechnologien wäre zwar eine mögliche Lösung dieses Problems, es bleiben aber weitere Nachteile einer prokaryontischen Expression für die industrielle Herstellung bestehen. Neben nur schwer vermeidbaren bakteriellen Kontaminationen in

den so hergestellten Zytokinpräparationen haben auch die fehlenden posttranslationalen Modifikationen ungünstige Konsequenzen. Obgleich diese nicht immer für die therapeutische Aktivität von Zytokinen notwendig sind (21), stimulieren Modifikationen wie die Glykosylierung, die Löslichkeit von Zytokinen und erhöhen die Aktivität und die Halbwertszeit dieser Proteine (22). Den Vorteilen einer eukaryontischen Expression mit entsprechendem Potential einer posttranslationalen Modifikation stehen die immensen Kosten für die eukaryontische Zellkultur entgegen. Um die Vorteile der eukaryontischen Expression wirtschaftlich nutzen zu können muss deren Expressionskapazität maximal ausgeschöpft werden. Eine Optimierung der Transkriptions- oder Translationsraten von Zytokinen durch Modifikation des Expressionsvektorsystems oder des Zytokingens selbst wird den Ansprüchen einer ökonomischen oder gentherapeutischen Produktion gerecht, da beide von einer stabilen und starken Transgenexpression abhängig sind. Voraussetzung für eine Erhöhung der Transkriptions- oder Translationsrate ist das Wissen um die zellulären Vorgänge, die die Genexpression der Zytokine steuern.

1.2 Regulation der Genexpression und epigenetische Kontrollmechanismen

1.2.1 Transkription

Morphologie und Funktion einer Zelle werden von den jeweils exprimierten Proteinen determiniert. Entscheidend für die Expression sind zelltypspezifische Transkriptionsfaktoren, welche durch ihre Bindung an Promotoren zur Aktivierung oder Inhibition der Transkription von Genen führen.

Die Transkriptionsmechanismen von Prokaryonten und Eukaryonten folgen im wesentlichen dem gleichen Muster (23;24), unterscheiden sich aber in der Anzahl und Komplexität der Prozesse und der interagierenden Proteine. Abweichungen gibt es bei der Steuerung der RNA-Synthese und der anschließenden Modifikation der RNA. Bei Prokaryonten erfolgt die Steuerung meist ausschließlich über einen Operator, während bei den Eukaryonten auch die Dichte der Chromatinstruktur und die Exposition von Promotorsequenzen geregelt werden kann. Essentiell für die eukaryontische Transkription sind allgemeine Transkriptionsfaktoren (TF), da die Schlüsselenzyme der eukaryontischen Transkription, die RNA-Polymerasen II, ihre Zielsequenz nicht selbständig erkennen können und auf diese akzessorischen Proteine angewiesen sind (Abb. 1; (25)). Adaptorkomplexe wie SAGA (26) binden zunächst an Aktivatorsequenzen „upstream“ des Kernpromotors inklusive der TATA-Box und erleichtern die Anlagerung von weiteren Transkriptionsfaktoren (27). Diese dirigieren anschließend im Falle der Synthese von mRNAs und snRNAs die RNA-Polymerase II zum Transkriptionsstart. Die genaue

Positionierung der RNA-Polymerase II wird von den Proteinen TFIID, TFIIA und TFIIB gesteuert, aus denen sich der Präinitiationskomplex (PIC) zusammensetzt. TFIID selbst besteht aus zwölf Proteinen, darunter das TATA-Box bindende Protein (TBP). Anschließend werden 11-15 Basenpaare des DNA-Doppelstranges durch die DNA-Helikase TFIIH aufgeschmolzen, um den abzulesenden Einzelstrang in der Grube der RNA-Polymerase II zu positionieren. Die carboxyterminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II wird während der ersten 30 Basenpaare der Transkription von TFIIH phosphoryliert, wodurch die Polymerase den Kontakt zu allen Transkriptionsfaktoren verliert und zur Elongation fortschreitet. Im weiteren Verlauf rekrutiert der phosphorylierte Carboxyterminus Faktoren für die Elongation und Prozessierung der RNA (28). Die erste Modifikation besteht im Anfügen eines an der Position N7 methylierten Guanins an das 5'-Ende der neu gebildeten RNA nach etwa 20-30 Nukleotiden Elongation, dem 5'-Cap (29). Das Spleißen der RNA erfolgt in den Spleißosomen, die aus den small nuclear Ribonukleoproteinen (snRNPs) und meist Proteinen der Serin/Arginin-reichen Proteinfamilie (SR-Proteine) bestehen (30).

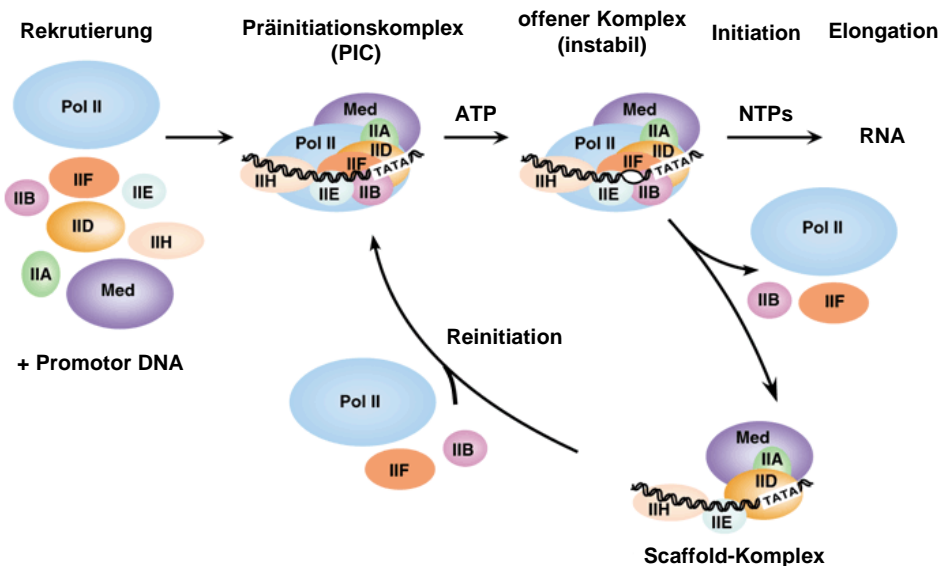


Abb. 1: Transkriptionsinitiation und Reinitiation der RNA-Polymerase II in Eukaryoten.

Dargestellt ist der grundlegende Mechanismus der Initiation der RNA-Polymerase II an eine Promotersequenz. Während der Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) werden nacheinander verschiedene Transkriptionsfaktoren an die DNA dirigiert (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF, TFIIH, TBP), mit der TATA-Box als zentrales Sequenzelement. Einflüsse weiter entfernt liegender *cis*-aktiver Sequenzen werden durch den Mediator-Komplex (Med) vermittelt. TFIIH besitzt Kinase- und Helikaseaktivität und überführt den PIC nach Phosphorylierung der RNA-Polymerase II in seine offene Form, die sofort mit der eigentlichen Initiation und Elongation der RNA-Synthese beginnt. Dabei bleibt an der TATA-Box der so genannte „scaffold“-Komplex zurück, der als Ausgangspunkt für eine weitere Rekrutierung (Reinitiation) der RNA-Polymerase II dienen kann. Der SAGA-Komplex ist der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt; Med: Mediator, PIC: Präinitiationskomplex, Pol II: RNA-Polymerase II, TBP: TATA-Box bindendes Protein, TF: Transkriptionsfaktor. Modifiziert nach (23).

Entgegen früherer Annahmen erfolgen die einzelnen Schritte der RNA-Prozessierung nicht nacheinander sondern zeitgleich zur Elongation. So gibt es eine Verbindung zwischen der Promoterstruktur und dem Phänomen des alternativen Spleißens (31). Das

Vorhandensein des Exons EDI in der Fibronectin-mRNA hängt z.B. von *cis*-aktiven Sequenzen in diesem Exon ab, die SR-Proteine binden (32). Die Menge der EDI-enthaltenden mRNA wird jedoch maßgeblich von der Struktur des Promoters beeinflusst (31). Wie genau die Promoterstruktur das alternative Spleißen steuert ist noch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung bietet die explizite Zusammensetzung des Präinitiationskomplexes, der einen Einfluss auf die Phosphorylierung des Carboxyterminus der RNA-Polymerase II nehmen könnte. Dieser wiederum moduliert die Rekrutierung von SR-Proteinen an die *cis*-aktiven Sequenzen. Auch promoterspezifische Protein-Faktoren die direkt mit der carboxyterminalen Domäne der RNA-Polymerase II interagieren sind denkbar (33).

Am Ende der Elongation steht die Polyadenylierung der mRNA. Diese findet in zwei Schritten statt. Zunächst wird die synthetisierte „precursor“-RNA an einer bestimmten Stelle endonukleolytisch gespalten und anschließend an das 3'-Ende der kodierenden RNA ein PolyA-Schwanz angehängt. Die Polyadenylierung erfordert mehrere Proteine, darunter cleavage und polyadenylierungsspezifische Faktoren (CPSF), cleavage stimulierende Faktoren (CstF), zwei allgemeine cleavage Faktoren (CFI und CFII) und die PolyA-Polymerase (34). Auch hier ist die phosphorylierte carboxyterminale Domäne der RNA-Polymerase II maßgeblich an der korrekten Termination der Transkription und der Polyadenylierung der mRNA beteiligt.

1.2.1.1 Einfluss der Promotorsequenz

Erst die Regulation der Genexpression ermöglicht die strukturelle und funktionelle Differenzierung von Zellen und Geweben, da, mit Ausnahme der B- und T-Zellen der Säuger, jede aus einer Zygote hervorgehende Zelle dasselbe Genom besitzt und verschiedenartige Zellen sich nur in ihrem Expressionsmuster unterscheiden. Eine wichtige Funktion während der Expressionsregulierung übernimmt der Promotor, welcher seinerseits die Initiation der Transkription, und somit die Rate an neu synthetisierten mRNA-Transkripten streng kontrolliert. Die Transkriptionsinitiation wird nicht nur vom Kernpromotor alleine gesteuert, auch *cis*-aktive Enhancer-Sequenzen haben Einfluss auf die Transkription. Diese Kontrollelemente können je nach Zelltyp die Transkription aktivieren oder inhibieren, indem zelltypspezifische Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Doch obwohl 5% aller Gene Transkriptionsfaktoren kodieren erfordert die Fülle der Gene eukaryontischer Organismen zusätzliche Regulationsmechanismen (35). Aktivatoren wie auch Repressoren der Transkription sind meist modular aufgebaute Proteine mit einer DNA-Bindedomäne und einer bis wenigen Aktivator- bzw. Repressordomänen. Die Transkription kann hier durch Menge und Aktivität mehrerer Aktivatoren und Inhibitoren exakt gesteuert werden.

Generell gibt es kein allgemeingültiges Muster, nach dem eine Transkription verläuft. Verschiedene Klassen von Genen werden auf unterschiedliche Weise reguliert. So besitzt der Promoter nicht immer eine TATA-Box, dafür aber andere Sequenzen, die die Aufgabe der TATA-Box übernehmen (36).

Neben der direkten Interaktion der Aktivatoren und Inhibitoren mit der Formation des Initiationskomplexes der Transkription dient die Veränderung des Chromatins im Promotorbereich durch Modifizierung der Histone oder Methylierung der DNA als weitere Möglichkeit der Genregulation.

Während der Prozesse, die vom Gen zum Protein führen, nehmen all diese Mechanismen ihre Aufgabe nicht isoliert sondern funktionell und oft auch strukturell verknüpft wahr.

1.2.1.2 Einfluss von Cytosin-Guanin Dinukleotiden

Erste Hinweise bezüglich der Bedeutung von Cytosin-Guanin Dinukleotiden (CpGs) für die Genexpression resultierten aus bioinformatischen Analysen prokaryontischer und eukaryontischer Genome. Demnach folgt die Verteilung von Cytosin-Guanin Dinukleotiden in Prokaryonten der statistischen Erwartung von 1:16, wobei die CpGs hier meist unmethyliert vorliegen. In Säugern hingegen sind die Cytosine innerhalb der CpG Dinukleotide zu 60-90% an der C5 Position des Cytosins methyliert (^{m5}C). Ferner sind CpG Dinukleotide in Säugern statistisch unterrepräsentiert. Sie machen nur 1-2% des Genoms aus, kommen also nur mit einer Häufigkeit von 20%, gemessen an der statistischen Erwartung von 1/16, vor. Der Grund hierfür liegt in ihrer Eigenschaft methyliert zu werden und in dieser Form einer überdurchschnittlich hohen Mutationsrate zu unterliegen (37).

Die spontane Deaminierung von Cytosinen resultiert in der Bildung eines Uracils. Diese Mutation wird von Uracil-Glykosylasen erkannt und revertiert. Die Deaminierung eines 5-Methyl-Cytosins hingegen führt zu einer Transition von Cytosin zu Thymin, welches konventionellen DNA-Reperaturenzymen entgeht und sich als Mutation im Genom manifestiert. In der Konsequenz ist die menschliche Mutationsrate des ^{m5}C zu T gegenüber anderen Transitionen um ein Zehn- bis Fünfzigfaches erhöht (38). Mehr als ein Drittel aller Punktmutationen der Keimbahn, die zu genetisch bedingten Krankheiten (39) und viele der somatischen Mutationen, die zu Krebs (40) führen, werden durch CpG Hypermethylierung verursacht.

1.2.1.2.1 Methylierung von Cytosin-Guanin Dinukleotiden

Die DNA-Methylierung ist sowohl bei Eukaryonten als auch bei Prokaryonten zu finden. Im Gegensatz zu eukaryontischen Zellen kann die Methylierung der Prokaryonten an der Position N6 des Adenins oder an den Positionen N4 oder C5 des Cytosins erfolgen. Die einzig bekannte Methylierung der Säuger ist die Methylierung an der Position C5 des

Cytosins innerhalb eines Cytosin-Guanin Dinukleotides (CpG). Das Ergebnis ist das 5-Methylcytosin (m^5C), die „fünfte Base“ der DNA (41). Das Spektrum der Methylierungsmuster und Methylierungsgrade unter den Eukaryonten reicht von extrem geringer Methylierung wie in *Caenorhabditis elegans*, dessen Genom keine methylierten Cytosine enthält, über *Drosophila melanogaster* mit wenigen methylierten Cytosinen im Cytosin-Thymin-Kontext bis zur starken Cytosin-Methylierung der Vertebraten. In humanen somatischen Zellen sind 1% aller Basen methylierte Cytosine. Dieser Durchschnittswert unterliegt jedoch enormen zeitlichen und lokalen Schwankungen. Während der frühen Entwicklung der Maus nimmt der Methylierungsgrad drastisch auf 30% der typischen Methylierung ab (42), um dann durch *de novo* Methylierung wieder auf einen normalen Grad zuzunehmen. Weniger ausgeprägt zeigt sich dieser Effekt in *Xenopus laevis* (43) und gar nicht im Zebrafisch *Danio rerio* (44).

DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysieren die Addition der Methylgruppe vom universellen Donor S-Adenosyl-Methionin an das C5-Atom des Cytosins. Bisher sind die eukaryontische DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT2, DNMT3A und 3B bekannt, die sich entweder der Kategorie der Erhaltungs- oder der Kategorie der *de novo* Methyltransferasen zuordnen lassen (Abb. 2).

DNMT	schematische Struktur	knock-out Mäuse	Methyltransferase-Aktivität
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> regulatorische Domäne katalytische Domäne </div>		
DNMT1		<ul style="list-style-type: none"> - embryonale Letalität (E8.5) - globale Hypomethylierung - Verlust des Imprinting 	<ul style="list-style-type: none"> - Ja - maintenance DNMT - <i>de novo</i> Aktivität: gering
DNMT2		<ul style="list-style-type: none"> - lebensfähig - fruchtbar mit geringen Defekten 	<ul style="list-style-type: none"> - Ja (gering) - Präferenz für zentromere Strukturen
DNMT3A		<ul style="list-style-type: none"> - postnatale Letalität (4 Wochen) - Verlust der <i>de novo</i> Methylierung - Defekte der Spermatogenese 	<ul style="list-style-type: none"> - Ja - <i>de novo</i> Aktivität
DNMT3B		<ul style="list-style-type: none"> - embryonale Letalität (E14.5-E18.5) - Verlust der <i>de novo</i> Methylierung - Demethylierung von Zentromeren 	<ul style="list-style-type: none"> - Ja - <i>de novo</i> Aktivität
DNMT3L		<ul style="list-style-type: none"> - lebensfähig (Männchen steril) - Verlust maternalen und paternalen Imprints in Gameten 	<ul style="list-style-type: none"> - Nein - Kofaktor von DNMT3A - (erhöht <i>de novo</i> Aktivität)

Abb. 2: Grundlegende Struktur der Familie der DNA-Methyltransferasen der Säuger.

Säuger-DNA-Methyltransferasen (DNMTs) enthalten im wesentlichen zwei strukturelle Regionen, die regulatorische N-terminale Domäne für die Lokalisation der DNMTs im Nukleus und die Bindung an die DNA, und die katalytische C-terminale Domäne mit zehn charakteristischen Sequenzmotiven, von denen sechs evolutiv konserviert sind. PCNA: proliferating cell nuclear antigen-binding domain; NLS: nukleäres Lokalisationssignal; RFT: replication foci targeting; CXXC: Cysteinreiches Zink-Finger-Motiv; PBHD: Poly-Bromo Homologie Domäne; PHD: Pflanzenhomeodomäne; PWWP: Tetrapeptid Chromatinbindedomäne. Modifiziert nach (45).

Die Erhaltungs-DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) bevorzugt als Substrat bereits hemimethylierte doppelsträngige DNA. Während der G1- und G2-Phase des Zellzyklus zeigt DNMT1 eine diffuse nukleoplasmatische Verteilung, assoziiert aber während der S-Phase

mit den Replikationsfoci (46). Diese Beobachtung veranlasste zu der Annahme, dass DNMT1 für die Erhaltung epigenetischer Informationen verantwortlich ist, da die semikonservative Replikation zur Entstehung nur einseitig methylierter DNA-Doppelstränge führt. Expressionsstudien zeigten aber, dass DNMT1 nicht nur in proliferierenden Zellen aktiv ist (47). Alternative Spleißvarianten von DNMT1 lassen weitere Funktionen dieses Enzyms vermuten (48-50). DNMT2 zeigt nur sehr schwache Methylierungsaktivität und „knock-out“ Mäuse weisen keine Veränderungen in ihrem Methylierungsmuster auf (51). Die *de novo* Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b übernehmen die Methylierung an CpG Dinukleotiden während der Embryogenese (52). Der Methylierungsstatus regulatorischer DNA-Sequenzen korreliert direkt mit der Transkriptionsaktivität der regulierten Gene (53). Aktive Gene sind hypomethyliert, inaktive Gene dagegen hypermethyliert. Als transkriptionshemmende Strukturen sind CpG Dinukleotide daher hauptsächlich in nichtkodierenden Elementen wie SINEs (short interspersed nuclear elements), LINEs (long interspersed nuclear elements) und endogenen Retroviren zu finden (54-56). Das Vorkommen eines methylierten CpGs innerhalb des ersten Exons eines Gens kann die Transkription direkt oder indirekt beeinflussen, abhängig davon ob die Methylierung unmittelbar mit Transkriptionsfaktoren interferiert oder Histon modifizierende Enzyme rekrutiert, die die Chromatinstruktur verändern ((57); s. 1.2.1.2.2). Obwohl CpGs intensiver Methylierung und somit einem Abschalten der Expression, dem „gene silencing“, ausgesetzt sind, gibt es diskrete Anhäufungen von CpGs (CpG-Inseln), hauptsächlich in Promoterregionen, die aber nicht methyliert werden (58). Ob diese Regionen zu keinem Zeitpunkt im Verlauf der Zellentwicklung methyliert waren oder ob kurz nach der Methylierung eine Demethylierung stattfindet ist nicht bekannt (59). Des Weiteren beeinflussen nicht nur Methylierungen der Promotoren die Transkription, auch die intragenische Methylierung spielt eine Rolle (60). Diese hat eine ebenfalls deutliche Expressionsabnahme zur Folge, verursacht durch die Änderung der Chromatinstruktur, welche die Prozessivität der RNA-Polymerase II verringert (61). Ein *in vivo* Versuch in Mäusen zeigte, dass ein CpG-haltiges Reporter-gen die Methylierung des EF1 α -Promoters und somit seine Abschaltung induzierte, während ein CpG-freies Reporter-gen dies nicht vermochte (62). CpG-haltige Transgene können im Gegensatz zu CpG-freien Genen sogar die transiente Expression benachbarter Reporter-gene auf dem gleichen Plasmid beeinflussen (63). Desgleichen hat der CpG-Gehalt des Plasmidrückgrates einen analogen Einfluss auf die Expression (64). Diese Ergebnisse veranlassten zu der gängigen Meinung, CpG Dinukleotide sollten bei der Konzeption optimierter Expressionsvektoren vermieden werden.

1.2.1.2.2 5-Methyl-Cytosin-Guanin Dinukleotid-bindende Proteine

Die transkriptionshemmenden Eigenschaften methylierter CpG Dinukleotide beruhen jedoch nicht alleinig auf einer sterischen Interferenz zwischen Methylgruppe und Transkriptionsfaktoren. Darüber hinaus ermöglicht die Existenz von Proteinen, die mit Hilfe so genannter methyl-CpG-Binde-Domänen (MBD) spezifisch methylierte Cytosine (^{m5}C) erkennen, die Rekrutierung weiterer Proteinkomplexe, die u. a. aus Histon-Deacetylasen bestehen (65). In Vertebraten sind bisher die konservierten MBD-Proteine MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 und MeCP2 bekannt (Abb. 3; (66)). In *Drosophila melanogaster* wurde das MBD-Protein dMBD2/3 beschrieben, das eine signifikante Homologie zu MBD2 und MBD3 aus Säugern aufweist (67).

Unter den MBD-Proteinen ist MBD1 einzigartig, da es im Gegensatz zu anderen Vertretern dieser Familie *in vitro* in der Lage ist, die Transkription von methylierten wie auch von unmethylierten Promotoren zu verhindern (68). Eine weitere Besonderheit ist die Präsenz von zwei oder drei Cystein reichen Motiven (CXXC), die auch in DNA- und Histon-Methyltransferasen vorkommen (69). Ein Teil der repressiven Aktivität scheint von der Rekrutierung von Histon-Deacetylasen abhängig zu sein (70).


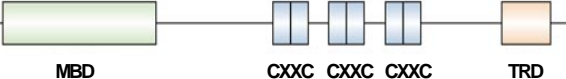



Name	Struktur	Funktion
MeCP2		- bindet methylierte CpGs
MBD1		- bindet unmethylierte und methylierte CpGs - inhibiert die Transkription
MBD2		- bindet methylierte CpGs - inhibiert die Transkription
MBD3		- kann nicht an methylierte DNA binden - Untereinheit des NuRD-Komplex
MBD4		- bindet methylierte CpGs - korrigiert ^{m5} CpG/TpG Misspaarungen

Abb. 3: Schematische Struktur der wichtigsten Vertreter der Proteine mit Methyl-Bindedomäne (MBD). MBD1 bindet an methylierte CpG Dinukleotide und interagiert mit HDACs und DNMTs. MBD2 ist eine Komponente des NuRD-Komplexes, der an methylierte CpGs bindet und die Transkription beeinträchtigt. MBD3 kann nicht direkt an CpGs binden und ist ebenfalls Bestandteil des NuRD-Komplexes, wobei MBD2 und MBD3 nicht im selben Komplex vorkommen. MBD4 besitzt eine DNA-Glykosylierungsdomäne und dient der Reparatur von Mutationen und Misspaarungen, die nach spontaner Deamination entstehen. MeCP2 bindet an einen Repressorkomplex, der durch Rekrutierung von HDACs die Chromatinstruktur verändert. BTB/POZ: "broad complex, tramtrack, bric a brac/pox" Virus Zinkfinger; CXXC, Zink-Finger-Domäne, DNMT, DNA-Methyltransferase, GR: Glycin-Arginin Wiederholungen; HDAC, Histondeacetylase, MBD: Methyl-Bindedomäne; MeCP2: Methyl-CpG-Bindeprotein 2; NuRD, Histon-Deacetylierungs-Ko-Repressor-Komplex, TRD: Transkriptions-Repressionsdomäne. Modifiziert nach (71).

Die Gene Mbd2 und Mbd3 haben eine fast identische genomische Struktur und unterscheiden sich nur in der Größe ihrer Introns. Die kodierten Proteine weisen eine Homologie von 70% auf. Während MBD2 ein Bestandteil des methyl-CpG-Binde-Proteins MeCP1 ist, gehört MBD3 zum „nucleosom remodeling“ und Histon-Deacetylierungs-Ko-Repressor-Komplex (NuRD). Das Mbd3 Gen kodiert zwei Isoformen des Proteins, eine mit intakter und eine mit unvollständiger MBD (66). Interessanterweise findet man im NuRD-Komplex hauptsächlich die Isoform ohne funktionelle MBD, so dass für MBD3 alleine im Gegensatz zu MBD2 keine reprimierende Aktivität durch Bindung methylierter CpG Dinukleotide festgestellt werden konnte (72). Ohne funktionellen NuRD-Komplex ist jedoch keine oder nur eine abnormale embryonale Entwicklung möglich (73). Als einziges Mitglied der MBD-Familie ist MBD4 nicht in die transkriptionelle Repression involviert, sondern vermindert die Mutabilität der ^{m5}CpGs durch gezielte Bindung und Korrektur von ^{m5}CpG/TpG Misspaarungen (74).

1.2.1.2.3 Cytosin-Guanin-Dinukleotid-bindende Proteine

Neben den MBD-Proteinen mit Spezifität für methylierte Cytosine im CpG-Kontext existieren Proteine, die mit erhöhter Affinität an unmethylierte Cytosine binden, wie das kernlokalisierte CpG Binde-Protein (CGBP) aus Tabakpflanzen (75). Eine gesteigerte Selektivität zeigt das in Säugern vorkommende und ebenfalls kernlokalisierte Protein CFP1 (CXXC finger protein 1; ursprünglich human CpG binding protein (hCGBP)), das spezifisch und ausschließlich unmethylierte CpGs bindet und daraufhin die Transkription *trans*-aktiviert (76;77). Bisher wurde neben dem humanen CFP1 ein weiteres Homolog in Mäusen untersucht (78) und durch Computeranalysen in Ratten vorhergesagt (GeneBank-Eintrag NW_047516).

Wie viele DNA-bindende Proteine weist CFP1 eine hochkonservierte CXXC-Domäne auf. Zu einer Zink-Finger-Struktur komplexiert ist diese Domäne essentiell für die Bindung an CpG-haltige doppelsträngige DNA (Abb. 4). Bereits ein CpG Dinukleotid ist für die Protein-DNA-Interaktion ausreichend, mit zunehmender Anzahl an CpGs nimmt auch die Anzahl gebundener Proteine weiter zu (79). CFP1 enthält weiterhin zwei pflanzliche Homeodomänen (PHD), welche hauptsächlich in Proteinen auftreten, die in Chromatin-assoziierte und genregulatorische Prozesse involviert sind (80).

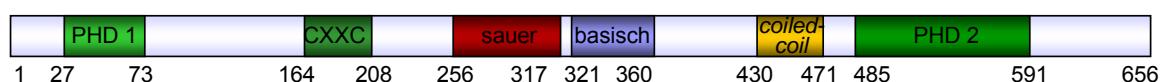


Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur von humanem CFP1 (CXXC finger protein).

Das 88 kDa große und ubiquitär exprimierte CFP1 enthält drei cysteinreiche Domänen (grün), davon zwei Pflanzenhomeodomänen (PHD) und eine CXXC-Domäne. Es erkennt und bindet spezifisch unmethylierte CpG Dinukleotide und aktiviert die Transkription von CpG-haltigen Promotoren; PHD: plant homeodomain. Modifiziert nach (77).

Die Bindung einiger PHDs an modifizierte Histone impliziert ihre Teilnahme an transkriptionsregulatorischen Vorgängen (81;82). Auch CFP1 assoziiert mit Euchromatin (76) und wirkt als Bestandteil des mammalian Set1-(H3-Lys4)-Methyltransferase-Komplexes an Chromatin-„remodeling“ Prozessen mit (83). Die Letalität von CFP1^{-/-} „knock-out“ Mausembryonen hebt den Einfluss auf ontogenetische Mechanismen hervor (84).

1.2.1.3 Einfluss der Chromatinstruktur

Inaktive Gene, also Gene die nicht transkribiert werden, befinden sich meist im so genannten Heterochromatin. Dieses zeichnet sich im Gegensatz zum Euchromatin durch eine besonders hohe Dichte an Nukleosomen aus und verhindert die Anlagerung von Transkriptionsaktivatoren an die Zielsequenzen. Zusätzlich wird der Zugang von Proteinen zu Promotoren und Enhancer-Elementen durch Komplexe aus DNA und Histonmultimeren, den Nukleosomen, selbst behindert. Viele Transkriptionsfaktoren wie der Nuclear Factor 1 (NF1) sind jedoch auf die Bindung des DNA Doppelstrangs angewiesen. Sie können ihre Aktivität erst entfalten, wenn das Chromatin durch Modifikationen der Histone wie Acetylierung oder Phosphorylierung in der so genannten offenen Form vorliegt, also beide DNA-Stränge zugänglich sind. Diese Modifikation vermitteln bestimmte Proteine, die kurze DNA-Sequenzen trotz hoher Nukleosomendichte erkennen, und nur auf einer Seite der Doppelhelix an die große Furche binden, wie z.B. der Glukokortikoidrezeptor. Im Folgenden rekrutieren diese Proteine weitere chromatinmodifizierende Faktoren und öffnen das Chromatin, woraufhin die Bindung von NF 1 ermöglicht wird (35). Wird die Transkription indirekt durch Veränderungen der Chromatinstruktur geregelt, handelt es sich meist um Acetylierung oder Methylierung von Histon-Proteinen der Nukleosomen. Die Acetylierung verursacht eine Ladungsveränderung der zunächst positiv geladenen Histone zu einer negativen Ladung, welche die Affinität der Histone zur DNA verringert und eine Destabilisierung der Chromatinstruktur bedingt. Die Acetylierung findet ausschließlich an Lysinresten statt und wird von Histon Acetyltransferasen (HATs) durchgeführt, die sich in drei Hauptfamilien gliedern lassen: GNAT (guanin nucleotide binding protein, alpha transducing activity polypeptide), MYST (benannt nach den Mitgliedern MOZ, YBF2, SAS2 und TIP60) und CBP/p300 (CREB binding protein) (85). Diese Art von Modifikation ist meist an den leichter erreichbaren, N-terminalen Resten der Histone zu finden (Tab. 2). Der Grad der Acetylierung steht in direktem Zusammenhang mit der Transkriptionsrate (86). Die Umkehrung der Acetylierung, die Deacetylierung wird von Histon Deacetylasen (HDACs) vermittelt und mit der Inaktivierung von Genen in Zusammenhang gebracht. Auch hier gibt es drei verschiedene Klassen von Histon Deacetylasen. Die Klasse I bis Klasse III NAD-

abhängigen Enzyme der Sir-Familie (silent information regulator) sind an vielen Signalwegen beteiligt, zeigen in den meisten Fällen aber keine große Spezifität für eine bestimmte Acetylgruppe (87).

Eine komplexere Form der Histonmodifikation ist die Methylierung an Lysinresten (Tab. 2). Diese können sich positiv oder negativ auf die Transkription auswirken, abhängig vom betroffenen Lysinrest. Die verantwortlichen Lysin-Methyltransferasen zeigen, gemessen an den Acetyltransferasen, eine weitaus höhere Spezifität. Für gewöhnlich wird nur ein bestimmter Lysinrest eines spezifischen Histons methyliert (88). Transkriptionsaktivierend wirken sich nach bisherigen Erkenntnissen Methylierungen an den Lysinen 4, 36 und 79 des Histon H3 aus, reprimierend sind Methylierungen an den Lysinen 9 und 27 des Histons H3 und am Lysin 20 des Histons H4. Zusätzlich zur Methylierung eines Lysinrestes an sich ist auch der Grad der Methylierung von Bedeutung, da Lysine mono-, di- oder trimethyliert vorliegen können.

<u>Modifikation</u>	<u>Relevante Position</u>	<u>Wirkung auf die Transkription</u>
<u>DNA Methylierung</u>		
Methyliertes Cytosin (^m C)	CpG Inseln	Repression
<u>Histon-Modifikationen</u>		
Acetyliertes Lysin (Kac)	H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5, 8, 13, 16), H2A, H2B	Aktivierung
Phosphoryliertes Serin/Threonin (S/Tph)	H3 (3, 10, 28), H2A, H2B	Aktivierung
Methyliertes Arginin (Rme)	H3 (17, 23), H4 (3)	Aktivierung
Methyliertes Lysin (Kme)	H3 (4, 36, 79)	Aktivierung
	H3 (9, 27), H4 (20)	Repression
Ubiquitiniertes Lysin (Kub)	H2B (123 ¹ /120 ²)	Aktivierung
	H2A (119 ²)	Repression
Sumoyliertes Lysin (Ksu)	H2B (6/7), H2A (126)	Repression
Isomerisiertes Prolin (Pisom)	H3 (30-38)	Aktivierung/Repression

¹⁾ Hefe ²⁾ Säuger

Tab. 2: Bekannte DNA- und Histonmodifikationen und ihre Auswirkung auf die Transkription. Die einzig bekannte DNA-Methylierung der Eukaryonten erfolgt am Cytosin eines CpG Dinukleotides; Histone unterliegen mannigfachen posttranslationalen Modifikationen, welche ihre Interaktion mit der DNA modulieren; am häufigsten sind kovalente Modifikationen an den Aminosäureresten der Histone H3 und H4, da deren Reste frei zugänglich aus dem Nukleosom herausragen. Modifiziert nach (89).

Die erste Lysin-Demethylase, LSD1, wurde erst vor kurzem entdeckt (90). LSD1 demethyliert das Lysin 4 am Histon 3 und unterdrückt die Transkription. Liegt LSD1 aber in einem Komplex mit dem Androgenrezeptor vor, wird das Lysin 9 des Histon 3

demethyliert und die Transkription aktiviert (91). Außer an einem Lysin kann die Methylierung auch an einem Arginin erfolgen. Bisher sind jedoch noch keine Proteine bekannt, die spezifisch an methylierte Arginine binden oder die Methylierung rückgängig machen können. Eine Methylierung kann allerdings durch die so genannte Deimination unterbunden werden. Hierbei werden Arginine der Histone 3 und 4 durch das Enzym PADI4 in Citrulline konvertiert (92).

Neben der Acetylierung und der Methylierung gibt es mindestens sechs weitere Modifikationen der Histone die an mehr als 60 verschiedenen Aminosäureresten stattfinden können, z. B die Ubiquitinierung an Lysinresten oder die Isomerisierung von Prolinen. Über die Phosphorylierung von Histonen ist bisher nur wenig bekannt, doch scheint die Phosphorylierung von Proteinen zytoplasmatischer Signaltransduktionskaskaden über die Phosphorylierung von Histonen auch einen direkten Einfluss auf die Genexpression zu haben (93).

Letztendlich sind Histonmodifikationen unter anderem dafür verantwortlich, dass Zellen, die das gleiche Genom besitzen, unterschiedliche Genexpressionsmuster und Phänotypen ausbilden und gemäß ihrer Determination differenzierte Funktionen wahrnehmen können.

1.2.2 Translation

Nach der Transkription der Gene in kodierende mRNA, der Prozessierung und dem Export der mRNA ins Zytoplasma (Kap. 1.2.2.1.2) ist die Translation der mRNA der nächste wichtige Schritt der Genexpression. Die Regulation der Translationsrate ist neben der transkriptionellen Regulation essentiell für viele biologische Prozesse wie Wachstum, Entwicklung und Anpassung. Auch wenn zwei Transkripte in gleicher Kopienzahl vorliegen werden sie mit unterschiedlicher Frequenz translatiert, da die Ribosomen nicht selbständig an die mRNA binden sondern erst von einer Vielzahl von eukaryontischen Translations-Initiationsfaktoren (eIFs) rekrutiert werden müssen (94). Während dieser Initiationsphase erfolgt die Positionierung der Methionin-tRNA an einem Ribosom erst, wenn sich das Ribosom am richtigen Initiationskodon (AUG) befindet. Die Initiation der Translation erfolgt hierbei nach einem „scanning“ Modell und beginnt mit der Erkennung der 5'-Cap-Struktur durch den eIF4F Komplex, bestehend aus den drei Untereinheiten eIF4E, eIF4A und eIF4G. Der Initiationsfaktor eIF4B stimuliert die eIF4A Helikase-Aktivität und interagiert mit der 18S ribosomalen RNA, um die 40S Untereinheit an die mRNA zu führen. eIF4G vermittelt die Bindung des 5'-Caps an die 40S ribosomalen Untereinheit über die gebundenen Faktoren eIF4E und eIF3 (95). Weiterhin interagiert eIF4G mit den PolyA bindenden Proteinen (PABPs) des PolyA-Schwanzes. Diese Interaktion führt zu

einer Zirkularisierung der mRNA („closed loop“), die essentiell für eine effektive Translation ist (96;97).

Durch die Bindung des Schlüsselenzyms eIF4F an das 5'-Cap wird die Translation dieser mRNA festgelegt und der 43S Initiationskomplex gebildet (98). Die Faktoren eIF4A und eIF1 ermöglichen daraufhin die Migration des 43S Komplexes in 5'-3' Richtung zum Initiationskodon. Dort stoppt das Ribosom aufgrund spezifischer mRNA-rRNA Interaktionen, um den 48S Komplex zu bilden. Nach Erkennung des Initiationskodons dissoziieren die an die 40S ribosomale Untereinheit gebundenen Initiationsfaktoren und der Faktor eIF5B vermittelt die Rekrutierung der ribosomalen 60S Untereinheit um ein synthesekompetentes Ribosom zu formen (99).

Neben diesem klassischen Translationsmechanismus gibt es weitere 5'-Cap-abhängige Mechanismen. Wird das erste Startkodon wegen einer ungünstigen mRNA-rRNA Bindung überlesen, kann die 40S Untereinheit bei der „leaky scanning“ Translation ein AUG Kodon weiter „downstream“ nutzen (100). Viele Viren können so ihre Kodierungskapazität effizienter nutzen. Das Env-Protein des HI-Virus wird z.B. von einer mRNA translatiert, die „upstream“ in einem anderen Leserahmen auch das Vpu-Gen kodiert. Um daneben die Env-Synthese zu ermöglichen steht das AUG Kodon des Vpu-Gens in einem schwachen Initiationskontext (101). Ähnliche Beispiele findet man bei Hepatitis B Viren (HBV; (102)), dem humanen Papillomavirus (HPV; (103)), dem Rabiesvirus (104) und dem Simian Virus 40 (SV40; (105)). Trifft die 40S ribosomale Untereinheit auf eine starke Sekundärstruktur in der mRNA („hairpin-loop“), sollte diese eigentlich nicht übergangen sondern entwunden werden. Dennoch gibt es Fälle in denen eine solche Struktur das scanning nicht blockiert sondern überbrückt wird. Zuerst wurde dieses Rangieren („shunting“) im Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) beschrieben (106). Der Reinitiationsmechanismus bietet die Möglichkeit einen zweiten Leserahmen auf derselben mRNA ohne die 40S ribosomale Untereinheit zu translatieren. Folgt bei Säugern ein kurzer Leserahmen auf das Startkodon, scannen einige Ribosomen weiterhin die mRNA und initiieren an einem zweiten AUG „downstream“ erneut die Proteinsynthese. Im Falle der GCN4-mRNA der Hefe erfolgt die Translation nach solch einer Reinitiation. Ribosomen, die den ersten von vier „upstream“ gelegenen Leserahmen translatieren, können die Synthese „downstream“ reinitiiieren (107).

Picornaviren bedienen sich einer 5'- Cap unabhängigen Translation. Stattdessen besitzt ihre genomische RNA ein internal ribosome entry segment (IRES), an das die Ribosomen direkt binden und die Proteinsynthese beginnen können (108).

1.2.2.1 Regulation der Translation

1.2.2.1.1 3' Nicht-translatierter Bereich und PolyA-Schwanz

Ein wichtiger Bestandteil des 3' nicht-translatierten Bereiches (UTR) von mRNAs ist das Hexanukleotid-Polyadenylierungssignal, welches die meist nukläre Polyadenylierung der mRNA vermittelt. Der resultierende PolyA-Schwanz unterstützt nach der Zirkularisierung der mRNA die Translation synergistisch mit dem 5'-Cap. Diese Konformation dient vermutlich dazu, die Assoziation Cap-bindender Initiationsfaktoren zu stabilisieren und die Wiederverwendung von Ribosomen nach Abschluss einer Translation zu erleichtern (109).

Bei Säugern kommen 3' UTRs von ungefähr 60 bis zu 4000 Nukleotiden vor, die durchschnittliche Länge menschlicher 3' UTRs beträgt ca. 740 Nukleotide und ist damit etwa dreimal so lang wie die durchschnittliche 5' UTR. Die Länge der 3' UTR inklusive des PolyA-Schwanzes korreliert stark mit der Translation der jeweiligen mRNA. Lange PolyA-Schwänze werden mit translatierten mRNAs in Verbindung gebracht, kurze PolyA-Schwänze bedingen eine Repression der Translation. Zu Beginn der Oogenese des Krallenfrosches *Xenopus laevis* finden sich z.B. im Zytoplasma große Mengen inaktiver maternaler mRNAs, deren Polyadenylierung durch das zytoplasmatische Polyadenylierungs Element (CPE) im weiteren Verlauf der Eizellreifung mit einer Translationsaktivierung einhergeht. Ein Großteil dieser maternalen mRNAs kodiert Regulatoren des Zellzyklus (110).

In den meisten somatischen Zellen leitet die Abspaltung des PolyA-Schwanzes einer mRNA, die so genannte Deadenylierung, deren Degradation durch Entfernen des 5' Cap und/oder Exosomenaktivierung ein (111). Je länger ein PolyA-Schwanz ist, desto länger dauert es bis zur vollständigen Degradation. In den Oozyten und frühen Embryos von Vertebraten hingegen können inaktive mRNAs trotz ihres kurzen PolyA-Schwanzes bestehen, da hier zusätzlich spezielle Faktoren für die Deadenylierung erforderlich sind (112).

1.2.2.1.2 mRNA-Export

Ähnlich den Signalpeptiden von Proteinen besitzen auch mRNAs Signale, die ihre intrazelluläre Lokalisation determinieren, wenngleich strukturelle und funktionelle Eigenschaften weit vielfältiger und weniger gut untersucht und verstanden sind. Die Lokalisierung von mRNAs ist eine weit verbreitete Erscheinung, die von einzelligen Organismen wie der Hefe bis hin zu komplexen Säugerzellen wie den Neuronen beobachtet werden kann. Die Voraussetzung für eine gezielte Lokalisierung einer mRNA ist die Erkennung von *cis*-aktiven Elementen der mRNA durch *trans*-aktive RNA-bindende

Faktoren. *Cis*-aktive Elemente befinden sich hauptsächlich in der 3' UTR, vermutlich um nicht mit der Translation zu interferieren, können aber auch in der 5' UTR oder im offenen Leserahmen auftreten. Die Interaktion von *cis*- und *trans*-aktiven Elementen resultiert in der Formation eines Ribonukleotid-Protein Komplexes (RNP), der durch die Kernporen und entlang des Zytoskelettes an sein Ziel transportiert wird. *Cis*-aktive Elemente, die das Ziel einer mRNA bestimmen, wurden in mehreren Transkripten höherer Eukaryonten gefunden. Die MBP-(myelin-basisches Protein)-mRNA enthält ein 11 Nukleotide langes, so genanntes A2RE Element (A2 response element), welches notwendig für den Transport zu oligodendrozytischen Prozessen ist und von hnRNPA2 (heterogenes nucleäres Ribonukleoprotein A2) erkannt wird (113). A2RE ist allerdings nicht hinreichend für alle Schritte der MBP-mRNA-Lokalisierung. Diese benötigt eine zweite Signalsequenz, die RLR (RNA-Lokalisierungsregion) (114).

In *Xenopus laevis* Oozyten werden mehr als zwanzig mRNAs auf drei verschiedenen Wegen entweder an den vegetativen oder den animalen Pol transportiert (115). Die vegetative Lokalisierung erfolgt in einer frühen und einer späten Phase der Oogenese. Transkripte des späten Weges, wie Vg1 (116) oder VegT (117), werden während der späten Phase III und der frühen Phase IV transportiert und bleiben im vegetativen Kortex bis zum Ende der Oogenese verankert. Im Fall der Vg1 mRNAs vermittelt ein 340 Nukleotide langes Motiv, das Vg1 Lokalisationselement (VLE), die Vorgabe für die vegetative Lokalisierung (118). Das VLE und die *cis*-aktiven Elemente nahezu aller anderen, vegetativ lokalisierten Transkripte enthalten Ansammlungen von kurzen CAC-haltigen Motiven (119). Kleinere Abweichungen dieser Motive scheinen mit den unterschiedlichen Lokalisationsfunktionen zu korrelieren (120). Zusätzlich zu Motiven auf Nukleotidebene können auch die Sekundärstrukturen das „targeting“ eines Transkriptes steuern. Xvelo1 Transkripte des späten vegetativen Weges nutzen ein 75 Nukleotide umfassendes Haarnadelstruktur-Element (121).

Der Export ungespleißter zellulärer mRNAs aus dem Zellkern ist mit nur wenigen Ausnahmen ein seltenes Ereignis (122). Im Gegensatz hierzu bildet der Export ungespleißter, Intron-haltiger mRNAs die Überlebensgrundlage von Retroviren, deren Genom aus einem einzigen Transkript besteht. Die individuellen viralen mRNAs werden durch alternatives Spleißen dieses Transkriptes gebildet, darunter auch die mRNA für die *gag* und *gagpol* Genprodukte (123). Für die Verpackung des viralen Genoms in Partikel muss jedoch auch die ungespleißte RNA aus dem Kern exportiert werden. Komplexere Retroviren, wie z.B. HIV-1, nutzen für den Kernexport das virale Protein Rev, welches an das „Rev-responsive element“ (RRE) bindet, und den Export Intron-haltiger mRNA unterstützt (124). Einfachere Retroviren wie das Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV) oder der Simian Retrovirus Typ1 kodieren keine regulatorischen Protein wie Rev. Sie besitzen

ein konstitutives Transport-Element (CTE), das den Export ungespleißter mRNAs ermöglicht (125).

1.2.2.1.3 mRNA-Stabilität

Die Stabilität einer mRNA spielt keine passive Rolle, vielmehr ist sie streng reguliert und variiert abhängig von Umwelteinflüssen oder dem Stadium der Ontogenese (126-128). Diese Regulation des mRNA Verfalls steuern Adenin-Uridin-reiche Elemente (AREs) in der 3'UTR der mRNA (129). Die Kernsequenz eines AREs bildet ein Nukleotidpentamer mit dem Motiv AUUUA. Dieses Motiv ist oft umgeben von einer Uridin-reichen Sequenz oder überlappt mit weiteren AREs (130). Darüber hinaus gibt es jedoch auch AREs ohne dieses Kernmotiv. Die AREs interagieren mit sequenzspezifischen RNA-Bindeproteinen, die Instabilität oder erhöhte Stabilität der mRNA koordinieren (131). Zu den bestuntersuchtesten dieser Proteine zählen Tristetraprolin (TTP) und der ARE/poly(U)-Bindungs-/Degradationsfaktor 1 (AUF-1).

Die mRNA von TNF- α enthält z.B. sowohl AREs, die ihr Instabilität verleihen, aber auch die Fähigkeit der stimulierbaren Stabilisierung und der stimulierungsabhängigen Kontrolle der Translationseffizienz. Mäuse, die ein TNF- α Gen exprimieren, dessen ARE Motive deletiert wurden, zeigen postnatal ein systemisches Entzündungssyndrom, gekennzeichnet durch erhöhte TNF- α Konzentrationen mit Autoimmunreaktionen und sterben nach vier bis sechs Wochen. Den gleichen Phänotyp zeigen Mäuse mit einer Defizienz für TTP, das bekanntermaßen an das ARE von TNF- α bindet und dieses destabilisiert (132-134).

1.2.2.1.4 Kodonverwendung

Die degenerierte Beschaffenheit des genetischen Kodes hält für alle Aminosäuren außer Methionin und Tryptophan mehrere Kodons bereit (135). Die Wahl synonymen Kodons hat hierbei keinen Einfluss auf die Natur des kodierten Proteins. Während Francis Crick 1968 diese Besonderheit auf einen evolutiv „eingefrorenen Zufall“ zurückführte (136), verdichteten sich 2004 die Hinweise, dass der genetische Code das Resultat einer strengen Optimierung hinsichtlich der Fehlertoleranz darstellt (137). Die Anzahl an Kodons für eine bestimmte Aminosäure korreliert mit der Häufigkeit dieser Aminosäure im Proteom. Oft benötigte Aminosäuren tolerieren also eine höhere Anzahl an Mutationen der mRNA. Schon 1981 zeigten Analysen zahlreicher Transkripte jedoch eine auffallend unausgewogene Verteilung synonymen Kodons vieler Spezies (138). Entgegen der statistischen Erwartung sind abhängig vom Organismus einige Kodons, und somit auch tRNAs, deutlich unterrepräsentiert, unterdessen andere im Übermaß vorkommen. Die Wahl der Kodons steht in proportionaler Beziehung zum Expressionsniveau eines

Genproduktes und bestimmt maßgeblich die Geschwindigkeit der Translation (139). Lange Zeit wurde dieses Ungleichgewicht genutzter Kodons als Hindernis für eine erfolgreiche Expression heterologer Gene angesehen, da ein unzureichendes Reservoir an tRNAs zu einer Verzögerung der Translation sowie zu einer Rasterverschiebung oder vorzeitigen Termination der Translation führen könnte (140). Zahlreiche seltene Kodons in der Nähe des N-Terminus einer kodierenden Sequenz führten z.B. zu einer deutlichen Minderung der Expression dieses Gens (141). Eine plasmidvermittelte Ergänzung der endogenen tRNAs von *E.coli* verursachte eine deutlich Expressionssteigerung des humanen Gewebe-Plasminogen-Aktivators (PLAT (142)).

Aktuelle Kenntnisse der Kodon-Präferenzen zahlreicher Organismen hält die Kazusa Datenbank bereit (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

1.2.3 Strategien zur Expressionssteigerung

Das ständig wachsende Wissen über die Vorgänge während der Transkription und Translation bietet immer mehr Möglichkeiten, die Genexpression gezielt zu manipulieren. Veränderungen der Nukleotidsequenz wirken sich dabei auf die Ebenen der Transkription und der Translation, und somit auf die Regulation eines Gens, aus. Daher versprechen Strategien, die sich an natürlichen Beispielen starker Expression orientieren, die Gelegenheit nukleotidbasierte Mechanismen der Regulation nutzen und zugleich unerwünschte Konsequenzen vermeiden zu können.

	Element	Konsequenz
Transkription	starke und/oder zellspezifische Promotoren	steigern die Transkriptionsrate
	intronische Sequenzen am 5'-Ende einer kodierenden Region	steigern die Transkriptionsrate
	CpG Dinukleotide	^{m5} CpGs inhibieren die Transkription; CpGs steigern die Transkription
	Chromatin	Euchromatin steigert die Transkription, Heterochromatin inhibiert sie
Translation	lange 3'UTR inkl. PolyA Schwanz	Stabilisierung der mRNA und Translationssteigerung
	Adenin-Uridin reiche Elemente (AREs)	je nach Kontext Stabilisierung oder Destabilisierung der RNA
	Optimierung des Kodongebrauchs	verbesserte Expression

Tab. 3: Übersicht über regulierender Elemente der Expression und ihre Auswirkungen.

Veränderungen in den verschiedenen Elementen einer transgenen Expressionskassette lassen sich im Allgemeinen auf ihre Auswirkungen auf Transkription oder Translation unterteilen.

Die Fusion intronischer Sequenzen an das 5'-Ende einer kodierenden Region, wie sie in den meisten eukaryontischen Genen zu finden ist, hat einen positiven Einfluss auf die Expression (143). Weiterhin verstärkte der Einsatz von starken Hybridpromotoren (144), oder, wie im Fall der Gentherapie, von starken zellspezifischen Promotoren (145) eine hohe und stabile Transgenexpression.

Der Vorteil einer plasmidvermittelten transienten Expression gegenüber einer stabilen Expression, hervorgerufen durch virale Vektoren, ist zugleich ein Nachteil. Plasmide integrieren nicht in das Zellgenom, unterliegen damit DNA-Abbaumechanismen und werden bei einer Zellteilung nicht repliziert. Da eine zufällige Integration von Viren in das Genom aber Gefahren wie die Aktivierung von Proto-Onkogenen oder die Zerstörung von Tumorsuppressorgenen birgt, entlehnen sich Forscher der Eigenschaft von Chromosomen. Der Einsatz episomal replizierender Vektoren bedeutet eine viel versprechende Verbesserung hinsichtlich hoher und stabiler Transgenexpression (146;147). Derartige Vektoren enthalten entweder die Epstein-Barr Virus Elemente oriP oder EBNA1 (148), "scaffold/matrix attachment regions" (S/MARs, (147)) oder basieren auf natürlichen Chromosomen (149;150). Auf der Suche nach weiteren Wegen der Expressionssteigerung zeigten Translationsanalysen deutliche Unterschiede in der Häufigkeiten verwendeter tRNAs für eine Aminosäure zwischen stark und schwach exprimierten Genen. Das Wissen um diesen Zusammenhang wird seither für die Expression rekombinanter Proteine genutzt, indem die Kodonverwendung des Transgens an diejenige des Expressionswirtes angepasst wird. Wie erwartet führte diese Anpassung zu einer effektiven Steigerung der Transgenexpression (151;152).

Die Rolle von CpG Dinukleotiden für die Expression wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. CpG Dinukleotide sind nicht nur Gegenstand intensiver Methylierung die charakteristisch für inaktive Gene ist (153), sie unterliegen auch einer überdurchschnittlich hohen Mutationsrate (37). Diese negativen Attribute führten zu Entwürfen von weitgehend CpG reduzierten Expressionskonstrukten für gentherapeutische Anwendungen oder im Bereich der Impfstoffentwicklung (64;154;155). Dennoch existieren besonders in Promotornähe Anhäufungen von CpG Dinukleotiden, die in engem Zusammenhang mit aktiven Genen stehen, und nicht methyliert werden, so genannte CpG-Inseln (156). Untersuchungen zweier effizient exprimierter humaner Gene, dem TATA-Box binding protein (TBP) und dem heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRPA2B1), wiesen auf die Bedeutung von CpG-Insel für die Expression hin. Der Einbau dieser CpG-Inseln in Transgenpromotoren steigerte die Expression nachgelagerter Gene und verhinderte auf lange Sicht ein Abschalten der Expression (157). Weiterhin werden CpG Dinukleotide innerhalb eines offenen Leserahmens für eine verbesserte RNA-Stabilität

verantwortlich gemacht, wenn sie TpA Dinukleotide, beziehungsweise UpA Dinukleotide in der RNA ersetzen, da diese Ziel RNA-abbauender Endonukleasen sind (158).

Im Zusammenhang mit der Konzeption von Strategien, die zu besseren Erfolgen im Rahmen einer Gentherapie oder DNA-Vakzinierung führen sollten, konnte in der Arbeitsgruppe um Prof. Wagner (Regensburg) für die Proteine p24 (HIV-1 Kapsidprotein), Grünfluoreszierendes Protein (GFP) und Erythropoietin bereits ein positiver Einfluss intragenischer CpG Dinukleotide auf die Expression des jeweiligen Proteins nachgewiesen werden (159;160). Die Identifizierung und Charakterisierung des spezifisch an unmethylierte CpGs bindenden Proteins CFP1, Bestandteil des Set1-(H3-Lys4)-Methyltransferasekomplexes und Aktivator der Transkription, untermauert die Vorstellung eines CpG vermittelten Nutzens für die Expression eines Gens (77;79;83).

1.2.4 Zielsetzung

Der Bedarf an leistungsfähigen Expressionskonstrukten für die Herstellung rekombinanter Proteine und die Widersprüchlichkeit CpG-assoziiierter Expressionsmuster in der Literatur bilden im Folgenden die Grundlage für detaillierter Untersuchungen zur Rolle von CpG Dinukleotiden. Ausgehend von verschiedenen optimierten Genvarianten für Zytokine sollten dabei sowohl Unterschiede in der Expressionsmenge analysiert, als auch die dafür möglicherweise verantwortlichen molekularen Mechanismen.

2. Ergebnisse

Nach den ersten Erkenntnissen über die Bedeutung von CpG Dinukleotiden und deren Methylierung auf dem Gebiet der Epigenetik (161), folgten zahlreiche Untersuchungen über Vor- und Nachteile von CpG Dinukleotiden innerhalb von transgenen Expressionskassetten. Das Vorkommen methylierter CpG Dinukleotide im Promotor oder im ersten Exon eines Gens hatte in früheren Studien meist negative Auswirkungen auf dessen Expression (162). Aufgrund der Neigung von CpG Dinukleotiden methyliert zu werden und daher Mechanismen der Genstilllegung zu unterliegen, wurde in den meisten Studien zur Transgenexpression auf den Einsatz von CpG Dinukleotiden verzichtet und CpG-depletierte Transgene und Plasmide wurden bevorzugt (163). Nichtsdestoweniger wurden CpG Dinukleotiden auch positive Eigenschaften zugesprochen, wenn sie zum Beispiel in Form von CpG-Inseln auftreten. Die meisten Studien befassten sich jedoch mit CpG-Inseln innerhalb der Promotorregion. Einflüsse von CpG Dinukleotiden im offenen Leserahmen wurden bisher nur schlecht untersucht. Eine genauere Betrachtung der Effekte intragenischer CpG Dinukleotide auf die Regulation der Genexpression und die zugrunde liegenden Mechanismen standen im Zentrum dieser Arbeit. Um die Notwendigkeit effektiver Expressionskonstrukte für Immunmodulatoren mit Analysen zum Einfluss von CpG Dinukleotiden innerhalb des offenen Leserahmens auf die Translation und Transkription zu verbinden, wurden ausgewählte Zytokine mit variierendem CpG-Gehalt synthetisiert und auf ihre Expression hin getestet.

2.1 Generation von Zytokingenen mit differierendem CpG Gehalt

Für die Herstellung der Expressionskonstrukte wurden zunächst jeweils die humanen und murinen Gene der beiden Zytokine Macrophage Inflammatory Protein 1 α (MIP-1 α) und Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) ausgewählt. Auf Basis der Wildtyp-Sequenz wurden zu jedem der vier Zytokingene jeweils drei weitere Genvarianten synthetisiert (Tab. 4). Zunächst wurde eine optimierte Version der wildtypischen Sequenz mit optimaler Kodonqualität generiert. Dazu wurde für diese Varianten der Gene ausgehend von der Aminosäuresequenz, die am häufigsten verwendeten Kodons des jeweiligen Organismus (humane oder murine Kodonverwendung) gewählt. Die Qualität dieser Optimierung wurde nach dem „Codon Adaptation Index“ (CAI; (164)) bewertet. Für die Berechnung des CAI wurde zunächst eine Referenzliste herangezogen, die für den jeweiligen Organismus die Kodonwahl stark exprimierter Gene sowie einen relativen Wert für diese Kodons angibt. Anhand dieser Liste kann für jedes Gen eine Auswertung erstellt werden, die alle in diesem Gen genutzten Kodons berücksichtigt. Die ideale Kodonkomposition eines Gens ist durch einen CAI von eins gekennzeichnet ist (vgl. Tab.

4). Aufbauend auf dieser Optimierung, die mit einer leichten Zunahme von CpG Dinukleotiden einherging, wurde die Nukleinsäuresequenz weiter verändert, um zum einen intragenische CpG Dinukleotide quantitativ zu depletieren, und zum anderen die Anzahl der CpG Dinukleotide im offenen Leserahmen zu maximieren. Für das murine MIP-1 α Gen entstanden so neben dem Wildtyp synthetische Genvarianten mit 13 CpGs (kodonoptimiert), 0 CpG (CpG-depletiert), und 42 CpGs (CpG-maximiert; Abb. 5)). Dabei wurde durch die Wahl alternativer Kodons die Aminosäuresequenz in keinem Fall verändert. *Cis*-aktive Sequenzmotive wie z.B. kryptische oder aktive Spleißstellen, TATA-Boxen und interne Polyadenylierungssignale wurden strikt vermieden.

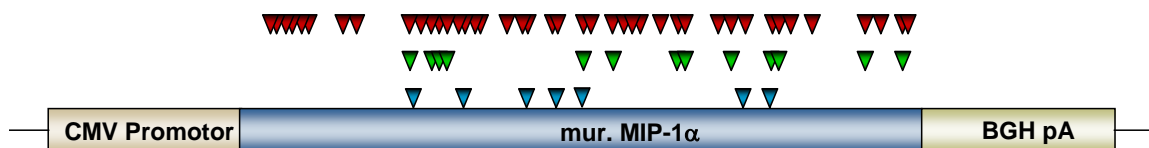


Abb. 5. Schematische Darstellung der murinen MIP-1 α Genvarianten.

Anzahl und Verteilung der CpG Dinukleotide innerhalb des offenen Leserahmens („sense“-Strang) werden maßstabgetreu durch Pfeile wiedergegeben (blau: Wildtyp; grün: kodonoptimiert; rot: CpG-maximiert; keine Pfeile für CpG-depletiert). Die Genvarianten des murinen MIP-1 α stehen unter Kontrolle des Cytomegalievirus Promotors (CMV) und des Polyadenylierungssignales des bovinen Wachstumshormons (BGH pA).

Auch der intragenische GC-Gehalt und die Anzahl an TpA Dinukleotiden wurden, soweit möglich, nicht signifikant beeinflusst (Tab. 4), um einen möglichen Einfluss auf die Stabilität und Halbwertszeit der Transkripte zu vermeiden. Die Synthese und Klonierung der Gene in den Vektor pcDNA3.1 wurde von der Firma Geneart AG durchgeführt.

	Strategie	CpG	%GC	TpA	CAI
mur. MIP-1 α	Wildtyp (wt)	7	51	7	0.77
	Optimierung (13CpG)	13	58	7	0.96
	Depletion (0CpG)	0	53	8	0.92
	Maximierung (42CpG)	42	63	5	0.73
hum. MIP-1 α	Wildtyp (wt)	8	57	6	0.77
	Optimierung (11CpG)	11	56	10	0.93
	Depletion (0CpG)	0	57	7	0.90
	Maximierung (43CpG)	43	63	4	0.72
mur. GM-CSF	Wildtyp (wt)	11	50	17	0.75
	Optimierung (21CpG)	21	61	6	0.99
	Depletion (0CpG)	0	53	11	0.94
	Maximierung (61CpG)	61	61	6	0.75
hum. GM-CSF	Wildtyp (wt)	10	57	7	0.82
	Optimierung (12CpG)	12	59	10	0.96
	Depletion (0CpG)	0	53	9	0.92
	Maximierung (63CpG)	63	63	5	0.70

Tab. 4: Auflistung der Zytokine, Genvarianten und Sequenzcharakteristika.

Für jedes Zytokin sind die jeweiligen Varianten, die den Modifikationen zugrunde liegenden Strategien, der jeweilige CpG-, GC- und TpA-Gehalt sowie der „Codon Adaptation Index“ (CAI) aufgeführt.

Für nachfolgende transiente Transfektionen und die Etablierung stabiler Zelllinien wurden die Gene innerhalb der eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNA3.1 bzw. pcDNA5/FRT (Invitrogen) verwendet.

2.2 Transiente Analysen

2.2.1 Transiente Expression der Zytokingenvarianten

Für erste Expressionsanalysen der wildtypischen Zytokingene und ihrer Genvarianten wurden diese in den kommerziellen Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen) integriert und anschließend humane Lungenkarzinomzellen (H1299) mit den jeweiligen Expressionskonstrukten transient transfiziert. Die Evaluierung der Proteinsekretion erfolgte nach 48 Stunden durch Messung des Zytokingehaltes in den Überständen und Lysaten der Zellen mittels kommerziell erhältlichem ELISA (humanes und murines MIP-1 α : R&D Systems; humanes und murines GM-CSF: BD). Für alle getesteten Zytokine ergaben die Auswertungen, dass nur 1% der gesamten Proteinmenge in den Zelllysaten detektierbar ist, und die Sekretion somit als nahezu vollständig und gleichbedeutend der Gesamtexpression betrachtet werden kann (nicht gezeigt). Weiterhin konnte für drei der vier getesteten Zytokine ein klarer Zusammenhang zwischen CpG-Gehalt und Expression nachgewiesen werden (Abb. 6). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich eine Steigerung der gemessenen Proteinmenge für kodonoptimierte Genvarianten von 110% für das humane MIP-1 α bis zu 300% für das murine GM-CSF. Die Verringerung der Zahl der CpG Dinukleotide hatte im Allgemeinen einen negativen Einfluss und verminderte die Zytokinmenge in den Überständen. Diese Verringerung war am wenigsten ausgeprägt für das humane GM-CSF, wo sie nur etwa 10% betrug. Deutlicher reagierte das humane MIP-1 α auf die vollständige CpG Depletion mit einer Reduktion der Expression um 50%. Die stärksten Konsequenzen hatte diese Genmodifikation für das murine MIP-1 α mit Einbußen der Expression von 95% gegenüber dem Wildtyp. Eine Ausnahme bildete das CpG-depletierte murine GM-CSF, dessen Expression durch die Genmodifikation begünstigt wurde. Gemeinsam war allen Zytokingenen, dass mit einem gesteigerten CpG-Gehalt gegenüber dem Wildtyp auch die Expressionsleistung zunahm. Da die Optimierung der Kodonqualität bei allen Zytokinen einen Zuwachs intragenischer CpG Dinukleotide verursachte, kann dieser Effekt jedoch nicht klar den intragenischen CpG Dinukleotiden zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich um eine CpG-unabhängige Steigerung der Translationsaktivität, da die kodonoptimierten Gene neben einer erhöhten Anzahl an CpGs auch einen verbesserten CAI besitzen. Nach Maximierung der intragenischen CpG Dinukleotide konnte die bereits verstärkte Expression der kodonoptimierten Gene weiter gesteigert werden. Dabei betrug der

Anstieg der Proteinmenge 180% für das murine MIP-1 α , während die Zellen im Falle des humanen GM-CSF und MIP-1 α um 350% mehr Zytokin exprimierten. Für das murine GM-CSF konnte eine Erhöhung der Proteinmenge von 400% erzielt werden. Die Steigerung des CpG-Gehaltes war hierbei von größerer Bedeutung als die konventionelle Optimierung mit Fokus auf den Codon Adaptation Index, haben doch alle CpG-maximierten Gene einen deutlich schlechteren CAI als die kodonoptimierten Varianten (Tab. 4).

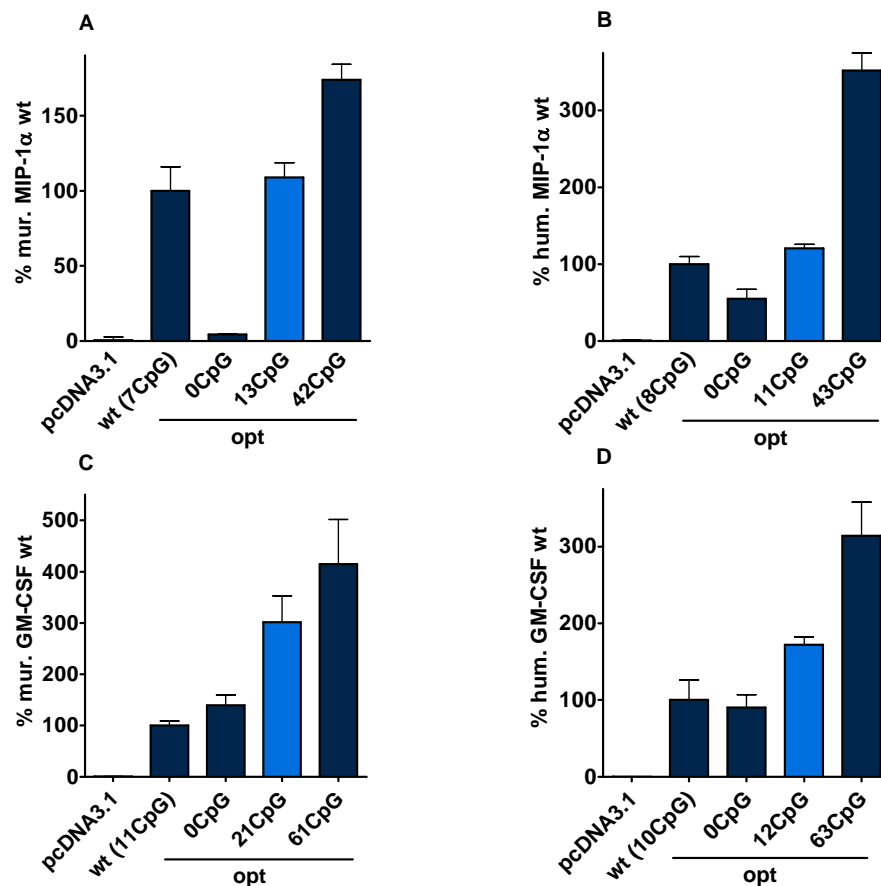


Abb. 6: Transiente Expression der Zytokingenvarianten.

Die Kulturüberstände transient transfizierter H1299 Zellen wurden mittels ELISA hinsichtlich der produzierten Zytokinmenge analysiert. Die Werte wurden auf das jeweils wildtypische Gen bezogen und in Prozent Wildtypexpression angegeben (y-Achse). Für jedes Zytokin wurden neben dem Wildtyp (wt) drei Genvarianten mit variierendem CpG Gehalt (x-Achse) getestet. Expressionsdaten des kodonoptimierten Konstruktes sind hellblau hervorgehoben. Fehlerbalken beziehen sich auf Abweichungen zwischen vier unabhängigen Transfektionen. Die Abbildung zeigt die Expression der Genvarianten des (A) humanen MIP-1 α , (B) murinen MIP-1 α , (C) murinen GM-CSF und (D) humanen GM-CSF im Kontext des Vektors pcDNA3.1.

Da im transienten System eine ungleiche Transfektionseffizienz der H1299 Zellen aufgrund der divergierenden Nukleinsäuresequenzen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden exemplarisch die murinen MIP-1 α Genvarianten 0CpG und 42CpG zusammen mit dem wildtypischen Gen im Kontext des pIRES-EGFP2 Plasmides (Clontech) transient transfiziert. Auf die Transfektion des murinen MIP-1 α 13CpG wurde verzichtet, da in den vorherigen Versuchen keine signifikante Expressionsveränderung durch die Kodonoptimierung zu beobachten war.

Aufgrund einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) des Encephalomyokarditis Virus zwischen den zwei Protein kodierenden Sequenzen für das murine MIP-1 α und das Grünfluoreszierende Protein (GFP) werden bei dem Plasmid pIRES-MIP-1 α -GFP von einer mRNA, die das Zytokin und das GFP umfasst, zwei separate Proteine translatiert. In erfolgreich transfizierten Zellen sollten somit beide Genprodukte nachweisbar sein. Auf diese Weise wird eine zeitgleiche Evaluierung der Transfektionseffizienz mittels GFP-Messung in einem Durchflusszytometer und der Zytokinmenge im Zellüberstand mittels ELISA ermöglicht. Die ermittelte Proteinmenge kann durch die Anzahl positiv transfizierter Zellen normalisiert werden.

Auch nach Transfektion im Kontext des pIRES2-EGFP-Vektors und Normierung der Expressionsdaten präsentierten sich für das murine MIP-1 α ähnliche Resultate wie bereits bei der transienten Transfektion der pcDNA3.1-Konstrukte (Abb. 7A). Bezogen auf das wildtypische Gen (100%) verminderte die CpG Depletion des Zytokingens die Expression auf 5%, die CpG Maximierung erhöhte die Proteinmenge um ca. 300%.

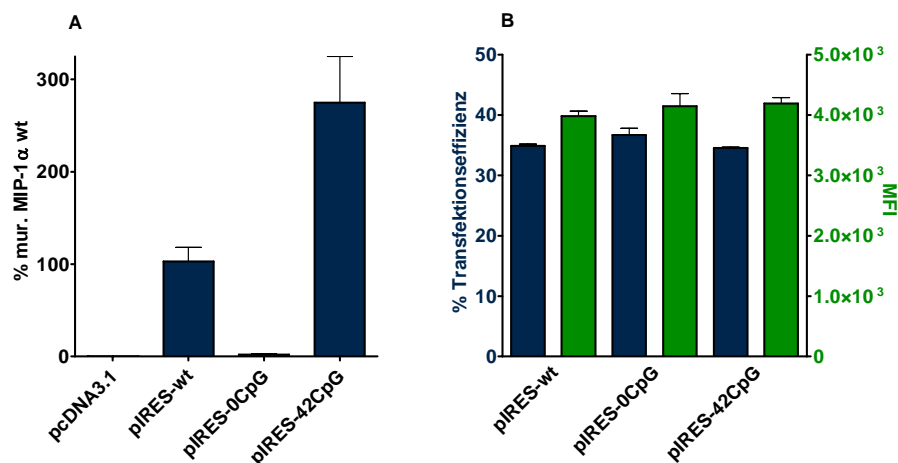


Abb. 7: Transiente Expression der Zytokingenvarianten unter Berücksichtigung der Transfektionseffizienz.

Nach transienter Transfektion von H1299 Zellen mit den pIRES-Konstrukten wurden die Kulturüberstände mittels ELISA auf Zytokinexpression getestet (A), und zeitgleich durch GFP Detektion die Anzahl transfizierter Zellen und deren Reporterexpression bestimmt (B). (A) Die Expressionsdaten der Varianten innerhalb des Plasmides pcDNA3.1 wurden auf die Transfektionseffizienz normiert und auf die wildtypische Expression bezogen (100%, y-Achse). Fehlerbalken geben Abweichungen zweier unabhängiger Experimente an. (B) Bestimmung der Transfektionseffizienz (blaue Balken) und der durchschnittlichen GFP-Leuchtintensität („mean fluorescence intensity“ (MFI); grüne Balken) mittels Durchflusszytometrie. Fehlerbalken indizieren zwei unabhängige Experimente.

Die Messungen ließen darüber hinaus erkennen, dass die Sequenzmodifikationen die Transfektionseffizienz im Vergleich zur wildtypischen Sequenz nicht signifikant verändern ($p > 0.25$, Abb. 7B). Die drei getesteten Genvarianten wurden unabhängig von ihrer Sequenz mit derselben Effizienz von ca. 35% in die Zellen aufgenommen. Die Durchflusszytometrie legte weiterhin für alle GFP positiven Zellen eine vergleichbare „mean fluorescence intensity“ (MFI) von ca. 4000 relativen Einheiten offen, wobei die MFI ein Maß für die Menge an synthetisiertem GFP pro positiv transfizierter Zelle ist. Die

nahezu identische Transfektionseffizienzen und MFI-Werte bestätigen die Irrelevanz der Nukleinsäuresequenz für diese beiden Parameter, da zum einen vergleichbare Mengen an Zellen transfiziert wurden, und zum anderen die Expression des Reportergens durch die Expression der verschiedenen MIP-1 α Gene nicht bzw. in vergleichbarem Umfang beeinflusst wurde.

Die beobachteten Effekte der Expressionssteigerung können somit unabhängig vom Vektorkontext direkt auf Veränderungen des offenen Leserahmens, und insbesondere des CpG Gehaltes des offenen Leserahmens, zurückgeführt werden. Es besteht also ein direkter und positiver Zusammenhang zwischen intragenischen CpGs und Expression.

Die unvermutete Wirkung von Veränderungen des intragenischen CpG-Gehaltes auf die Expression von Zytokingenen veranlassten zu weiteren ausführlichen Analysen des zugrunde liegenden Mechanismus der CpG-vermittelten Expressionssteigerung.

2.2.2 Eingrenzung des expressionssteigernden Mechanismus

Die vier Transfektionskonstrukte des murinen MIP-1 α mit divergenten Expressionsraten unterschieden sich ausschließlich in der das Zytokin kodierenden Region, während alle anderen Vektorelemente vollkommen identisch waren. Auf dieser Basis deuteten die klaren Unterschiede der Expressionsleistung nach Transfektion auf eine Aktivierung von *trans*-aktiven, expressionssteigernden Faktoren durch *cis*-aktive Elemente im offenen Leserahmen der CpG-reichen Gene hin. Folglich sollte eine Ko-Transfektion zusammen mit einem Reportergen und denselben hypothetisch *cis*-aktiven Strukturen zur Abnahme der Reporteraktivität führen. Der Grund hierfür wäre eine Konkurrenz der *cis*-aktiven Elemente des Reporter- und des Zytokingens um die *trans*-aktiven Transkriptions- oder Translationsfaktoren. Anhand geeigneter Konkurrenzexperimente wurde dieser Sachverhalt näher betrachtet. Als Reporter wurde das für die Transfektion eukaryontischer Zellen etablierte Luziferasegen aus *Photinus pyralis* („firefly“-Luziferase) gewählt. Der Vektor pGL2-Basic (Promega) beinhaltet dieses Gen ohne Promotor und Enhancer Elemente, jedoch mit dem SV40 Polyadenylierungssignal. Eine multiple Klonierungsstelle „upstream“ des Luziferasegens ermöglichte den einfachen Einsatz verschiedener Promotorsequenzen. Um die Gültigkeit des beobachteten Phänomens für mehrere Promotoren zu analysieren, wurden die Promotoren CMV (Cytomegalievirus), SV40 (simianes Virus 40) und MCK1350 (minimaler 1350bp Promotor des murinen Kreatininkinasegens) in diesen Vektor eingebracht. Wichtig für die Aussagekraft des Konkurrenzexperimentes war auch die Entfernung des Promotors aus der Expressionskassette der Zytokingene und aus dem Vektor pcDNA3.1, der ohne Transgen als Negativkontrolle diente. Dies war erforderlich, da eine Ko-Transfektion zweier funktioneller Expressionseinheiten auch in der Expression der beiden Gene resultieren

würde, und angesichts der Konkurrenz der beiden Promotoren um die gleichen, transkriptionsrelevanten Faktoren keine eindeutige Aussage über den Einfluss der intragenischen, *cis*-aktiven Elemente getroffen werden könnte. Ohne Promotor hingegen stellen die Zytokingene nur die vorhandenen *cis*-aktive Sequenzen bereit ohne von diesen im Sinne einer Expression profitieren zu können. Da auch der Vektorkontext der verschiedenen Zytokingene identisch ist, können Änderungen der Luziferaseaktivität direkt auf den offenen Leserahmen der Zytokine zurückgeführt werden. Für die Analyse wurden H1299 Zellen mit äquimolaren Mengen der jeweiligen Plasmide transfiziert. Nach zwei Tagen erfolgte die Lyse der transfizierten Zellen, und die Menge der darin enthaltenen Luziferase wurde durch Messung ihrer Aktivität in einem Photoassay bestimmt (Abb. 8).

Für alle verwendeten Promotoren konnte eine Korrelation der Luziferaseexpression und dem ko-transfizierten Zytokingen gezeigt werden. Unter Kontrolle der jeweiligen Promotoren unterschied sich die Expression der Luziferase nach Ko-Transfektion des leeren Kontrollvektors pcDNA3.1 oder des Plasmides mit dem CpG-freien Zytokingen (0CpG) nur unwesentlich. Die Ko-Transfektion mit der CpG-reichen Genvariante (42CpG) hingegen zeigte für alle Promotoren einen statistisch signifikanten Verlust an Luziferaseaktivität ($p < 0.015$).

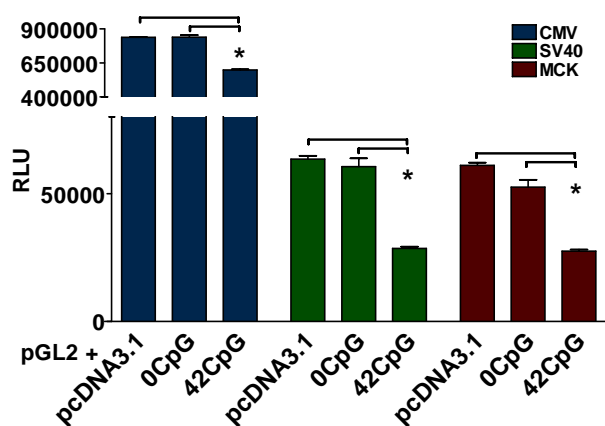


Abb. 8: Luziferase-Expression nach Ko-Transfektion mit Zytokingenvarianten.

Der Vektor pGL2 mit Luziferasegen wurde mit den promotorlosen Zytokinplasmiden ko-transfiziert. Dabei stand das Luziferasegen unter Kontrolle des CMV (blaue Balken), SV40 (grüne Balken) oder MCK1350 (MCK; rote Balken) Promotors. Die Luziferase-Expression wurde durch Messung ihrer Aktivität nach Substratzugabe gemessen und in relativen Luziferase-Einheiten (RLU) angegeben (y-Achse). Alle dargestellten Aktivitätswerte wurden bereits um den Wert des Hintergrundsignals ohne Luziferasegen (im Mittel 398 RLU) bereinigt. Die Reduktion der Luziferaseaktivität nach Ko-Transfektion mit der Zytokingenvariante 42CpG ist mit $p < 0.015$ (*) statistisch signifikant.

Verglichen mit der CMV gesteuerten Luziferase-Expression war dieser Rückgang an Reporteraktivität mit ca. 50% unter Kontrolle der SV40 und MCK1350 Promotoren stärker ausgeprägt.

Eine Erklärung für diesen Effekt können nur *cis*-aktive Sequenzen innerhalb des CpG-reichen Gens bieten, da alle anderen Sequenzen und Elemente für die ko-transfizierten

Konstrukte identisch sind. Demzufolge scheinen die intragenischen CpG Dinukleotide einen Anzugspunkt für CpG-bindende, expressionsstimulierende Faktoren darzustellen.

2.2.3 Einfluss methylierter intragenischer CpG Dinukleotide

Um den Einfluss von CpG Dinukleotiden in der kodierenden Region genauer zu erfassen, wurden die Genvarianten unter die Kontrolle einer CpG-freien CMV Promotorvariante innerhalb eines CpG-reduzierten Plasmides gesetzt (pS; 54 CpG Dinukleotide, hergestellt und zur Verfügung gestellt von Dr. Doris Leikam (159)) und dann mithilfe der CpG-spezifischen Methylase *M.SssI* (NEB) *in vitro* methyliert. Die Funktionalität dieses Vektors und insbesondere des CpG-freien CMV Promotors war im Vorfeld bereits getestet und beschrieben worden (159). Weiterhin wurde die Vollständigkeit der Methylierung durch Restriktionsanalysen mit dem ^{m5}CpG-sensitiven Enzym *AvaI* überprüft (Abb. 9).

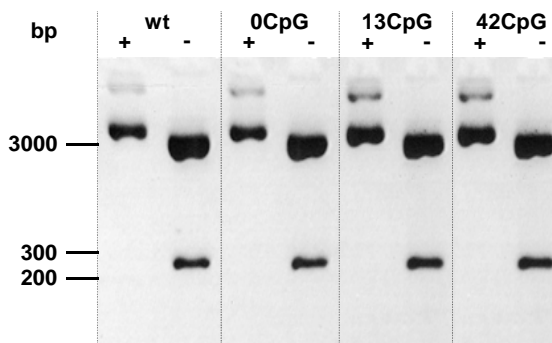


Abb. 9: Analyse des Methylierungsstatus von *in vitro* methylierten pS-Vektorkonstrukten.

(+) Je 500 ng eines mit *M.SssI* methylierten pS-Vektors mit entsprechender Zytokingenvariante wurde mit dem Methylcytosin-sensitiven Restriktionsenzym *AvaI* inkubiert und auf einem Agarosegel aufgetrennt (inverse Darstellung). Aufgrund der Methylierung der beiden Erkennungssequenzen von *AvaI* (CYCGRG) wurden die Plasmide nicht geschnitten und liefen in ihrer supercoiled Konformation als Doppelbande. (-) Ohne vorangehende Methylasebehandlung entstand dagegen ein 251bp und ein 3051bp Fragment.

Die Messung der Menge an murinem MIP-1 α in den Kulturüberständen mit methyliertem Plasmid transient transfizierter H1299 Zellen ergab einen vollständigen Rückgang der Proteinexpression, während die Transfektion mit unmethylierten Plasmiden zu den bereits beobachteten Expressionslevels führte (Abb. 10).

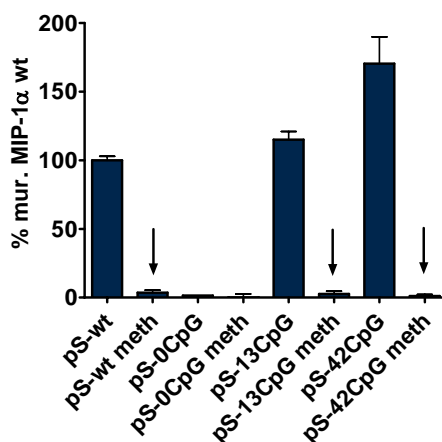


Abb. 10: Transiente Expression methylierter und unmethylierter Zytokingenvarianten.

Alle Konstrukte im Vektor pS wurden in einem Ansatz quantitativ *in vitro* methyliert und anschließend H1299 Zellen mit den methylierten oder unmethylierten Plasmiden transient transfiziert. Die Expression des unmethylierten Wildtyps ist der Bezugswert für die Werte der Genvarianten (methyliert und unmethyliert) und ist mit 100% angegeben. Die Abweichungen zweier unabhängiger Experimente werden angezeigt.

Zu beachten ist, dass es sich hierbei nicht um eine Blockierung des Promotors handeln kann, da dieser keine CpGs enthält und somit kein Substrat der Methylase darstellt.

Folglich wirken sich nicht nur Methylierungen des Promotors sondern auch intragenische Modifikationen auf die Expression aus, wie bereits beschrieben wurde.

Soweit es den offenen Leserahmen betrifft, sind also nur unmethylierte CpG Dinukleotide in der Lage, eine Expressionssteigerung hervorzurufen.

2.3 Untersuchungen an stabilen Zelllinien

2.3.1 Stabile Expression der Zytokingenvarianten

Die Basis für eingehende Untersuchungen zu CpG-bedingten zellspezifischen Effekten und Auswirkungen auf die Langzeitexpression sollte Zellen bilden, die die Genvarianten des murinen MIP-1 α stabil exprimieren. Die Generierung der stabilen Zellen erfolgte mit Hilfe des Flp-In Systems (Invitrogen). Dieses vermittelt die gerichtete Integration einer einzigen Kopie des Transgens an einen definierten genetischen Locus im Genom der Zelle und sollte damit die Grundlage für quantitative Analysen und Vergleiche der Genvarianten bezüglich ihrer Expression bilden. Dieses System erlaubte die direkte Gegenüberstellung mehrerer Genvarianten im selben genomischen Kontext. Verschiedene Integrationsloci, wie sie bei einer Zufallsintegration auftreten, und Fehlerquellen der transienten Transfektion werden so vermieden, und minimale Expressionsunterschiede können auf transkriptioneller sowie translationaler Ebene erfasst werden.

Neben dem wildtypischen murinen MIP-1 α wurden die Genvarianten 0CpG, 13CpG und 42CpG in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA5/FRT integriert, und anschließend „Chinese hamster ovary“ (CHO) Flp-In Zellen (Invitrogen) mit dem die Flippase-Rekombinase kodierenden Plasmid pOG44 (Invitrogen) und den resultierenden pcDNA5/FRT-Expressionsvektoren mit der jeweiligen Transgenversion im Verhältnis 13:1 transfiziert. Das Plasmid pcDNA5/FRT trug neben den verschiedenen Zytokingenvarianten die für die Rekombination erforderlichen Flippase-Rekombinase Target (FRT) Stellen sowie ein Hygromycin B-Resistenzgen (*hph*) zur Selektion unter der Kontrolle des Simianen Virus 40 Promotors und Polyadenylierungssignales. Erst nach erfolgreicher Integration des Expressionsplasmides erhält das Resistenzgen sein im CHO-Genom liegendes Startkodon. Die Selektion der Zelllinien auf erfolgreiche Integration erfolgte schrittweise mit steigenden Mengen an Hygromycin B bis zu einer maximalen Konzentration von 500 μ g/ml. Nach insgesamt acht Wochen entstanden so CHO-Zelllinien, die unter Kontrolle des CMV Promotors und der BGH 3' nicht-translatierten Region je eine Kopie des murinen MIP-1 α wt (7 CpG)-, MIP-1 α 0CpG-, MIP-1 α 13CpG- oder MIP-1 α 42CpG-Gens in einem ansonsten genetisch identischen Hintergrund trugen. Im Vorfeld der Expressionsanalysen wurden die Hygromycin B

resistenten Zellen durch spezifische RT-PCR auf Expression der Zytokingene getestet (nicht gezeigt). Weiterhin wurde durch eine X-Gal-Färbung die ortsspezifische Integration der Expressionskassette am vordefinierten Locus getestet, da bei korrekter Integration das vorgelegte genomische *lacZ* Gen seine Funktionalität einbüßt. Wie erwartet konnte in keiner Zelllinie β -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden. Die Detektion des murinen MIP-1 α erfolgte aus den Kulturüberständen der Zelllinien mittels spezifischem ELISA (R&D; Abb. 11). In Übereinstimmung mit den Daten der transienten Transfektion zeigten auch die stabilen Zelllinien ein CpG-abhängiges Zytokin-Expressionsmuster. Mit zunehmender Anzahl von CpG Dinukleotiden im Zytokingen war ein deutlicher Anstieg der Proteinmenge in den Kulturüberständen nachzuweisen. Die Reduktion der CpG Anzahl hingegen führte zu einem deutlichen Einbruch der Expressionsleistung. Die Folgen der CpG Modifikationen waren sogar um ein Vielfaches ausgeprägter, als dies in transienten Studien der Fall war (Abb. 6A). Verglichen mit dem wildtypischen Gen zeigten Zellen, die die CpG-maximierte Version des Zytokingens trugen, eine mehr als zehnfache Steigerung (1180%) der Expression. Bei gleichem Promotor und 3' nicht-translatiertem Bereich betrug die Steigerung für diese Variante in transienten Transfektionen 200%. Die konventionelle Optimierungsstrategie, bei der das Gen aus den am häufigsten genutzten Kodons besteht, und das hier durch murines MIP-1 α 13CpG repräsentiert wurde, führte nur zu einer dreifachen Zunahme (310%) an Zytokin in den Kulturüberständen. In transienten Analysen entsprach diese Variante mit 110% in etwa dem Wildtyp. Die CpG Depletion hatte für die Expression negative Folgen. Diese sank ähnlich wie in den transienten Studien auf nur 2% der wildtypischen Expression.

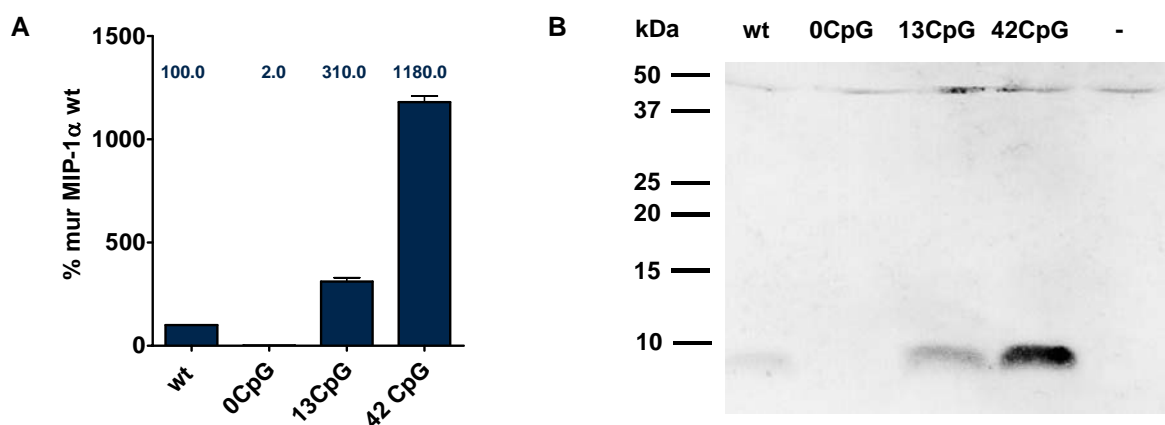


Abb. 11: Stabile Expression der murinen MIP-1 α -Varianten in CHO-Zellen.

Nach Etablierung der stabil murines MIP-1 α exprimierenden Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen wurde die Zytokinmenge in den Kulturüberständen mittels ELISA und Immunoblot-Assay bestimmt. **(A)** Die ELISA-Daten der einzelnen Gene wurden auf die Expressionsleistung des Wildtyps (100%; y-Achse) bezogen. Angegeben sind Fehler von zwei unabhängigen Experimenten. **(B)** Aus dem Kulturüberstand wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein durch Elektrophorese eines 15%igen SDS-Polyacrylamidgels separiert und auf eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0.2 μ m) transferiert. Die Detektion des murinen MIP-1 α erfolgte mit einem polyklonalen Primärantikörper (PeproTech) und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Pierce).

Eine vorzeitige bzw. verzögerte Proteindegradation als Erklärung für die Unterschiede unter den Genvarianten kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da alle Gene die gleiche Aminosäuresequenz kodieren. Dies wurde auch durch Immunoblot-Assays der exprimierten Zytokine bestätigt, da keine Abbauprodukte des murinen MIP-1 α detektiert werden konnten (Abb. 7B). Ferner konnte für jede Zytokin exprimierende Zelllinie nur ein MIP-1 α -Signal gleichen Molekulargewichts nachgewiesen werden, mit Ausnahme der Zelllinie, die die CpG-freie Zytokingenvariante trägt. Für einen erfolgreichen Nachweis war der MIP-1 α -Gehalt in den Kulturüberständen dieser Zellen zu gering. Somit rufen die verschiedenen Optimierungsstrategien und Expressionsniveaus keine Veränderungen der posttranslationalen Modifikation hervor.

Unter ständigem Selektionsdruck wurden die Zelllinien über einen Zeitraum von zwei Jahren im Abstand von sechs Monaten auf ihre Zytokinexpression hin untersucht (Abb. 12). In diesem Zeitraum veränderte sich weder die Expressionsstärke noch das Expressionsmuster, ausgenommen gewöhnliche Schwankungen von ca. 20%. Unter diesen Bedingungen wurden keine Genesstilllegungseffekte beobachtet.

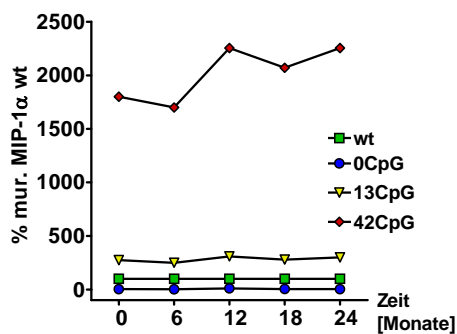


Abb. 12: Verlauf der Zytokinexpression der stabilen CHO-Zelllinien.

Im Abstand von sechs Monaten wurde über zwei Jahre die Expression der stabil murines MIP-1 α exprimierenden Zellen verfolgt. Die Daten wurden zu jedem Zeitpunkt in Prozent der wildtypischen Expression angegeben. Auch die absoluten Werte blieben konstant. Aus Gründen der Klarheit wurde eine prozentuale Darstellung gewählt.

2.3.2 Methylierungsstatus der stabil integrierten Zytokinvarianten

Bereits in transienten Analysen konnte der methylierungsfreie Status der intragenischen CpG Dinukleotide für die beobachteten Unterschiede der Expression verantwortlich gemacht werden, da aus *E. coli* gewonnene Expressionsplasmide keine für Eukaryonten relevante, und insbesondere keine CpG Methylierung, verursachen. Zwar ist der für die Plasmidamplifikation herangezogene *E.coli*-Stamm DH5 α sowohl für die *dam*- als auch für die *dcm*-Methylase positiv, doch bilden nicht Cytosine innerhalb von CpG Dinukleotiden das Ziel dieser Methylasen, sondern Cytosine im Kontext CC[AT]GG (*dcm*, (165)) und GATC (*dam*, (166)). Aufgrund dieser Ergebnisse sollten die Transgene der stabilen Zelllinien ebenfalls keine Methylierung an den CpG Dinukleotiden erfahren haben. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde nach zweijähriger Kultur der Methylierungsstatus der generierten Zelllinien mit den MIP-1 α Genvarianten wt, 0CpG, 13CpG und 42CpG analysiert. Die genomische DNA dieser Zellen wurde einer so genannten Bisulfitkonversion mit anschließender PCR unterzogen. Die Bisulfitkonversion führt zur

Deaminierung aller unmethylierten Cytosine zu Uracilen, die in einer folgenden PCR durch Thymin ersetzt werden. Methylierte Cytosine bleiben von einer Deaminierung verschont. Eine Sequenzierung des PCR-Produktes gibt daher Auskunft über den Methylierungsstatus jedes einzelnen Cytosines. Die quantitative *in vitro* Methylierung des Plasmides pcDNA5/FRT mit der CpG-maximierten MIP-1 α Variante (42CpG) vor der Bisulfidkonversion diente der Validierung des Versuchsansatzes (nicht gezeigt).

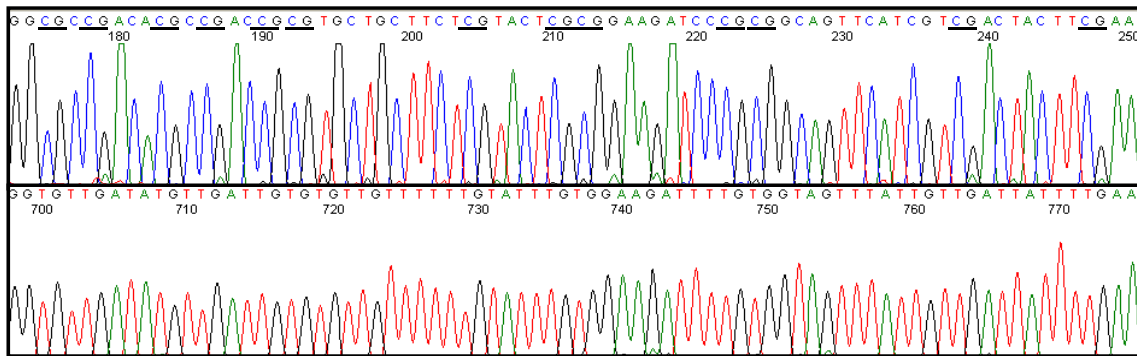


Abb. 13: Chromatogramm der genomischen MIP-1 α 42CpG DNA vor und nach der Bisulfidkonversion. Die genomische DNA der stabilen Zelllinien wurde einer Bisulfidkonversion unterzogen, der kodierende Bereich des Zytokins durch PCR amplifiziert und das PCR-Produkt anschließend sequenziert. Die erhaltenen Chromatogramme (unten) wurden mit den Chromatogrammen der Sequenzierung unbehandelter genomischer DNA (oben) verglichen. Da keines der intragenischen CpG Dinukleotide methyliert wurde, finden sich nach der Bisulfidkonversion keine Cytosine mehr im Chromatogramm.

Die Chromatogramme der Sequenzierung wurden mit der „CpGViewer“ Software (167) analysiert und zeigten eine vollständige Konversion aller Cytosine zu Uracilen und bestätigten damit den unmethylierten Status im offenen Leserahmen in allen vier Zelllinien. Speziell die zahlreichen CpGs der 42CpG Variante erfuhren unter ständigem Selektionsdruck keine Methylierung über einen Zeitraum von zwei Jahren (Abb. 13)

2.3.3 Einfluss des CpG Gehaltes auf die Translationseffizienz

Nachdem sowohl für die transiente als auch für die stabile Expression verschiedener Zytokingenvarianten gezeigt werden konnte, dass für die beobachteten Unterschiede der Expressionsmenge im Wesentlichen die unmethylierten, integrierten CpG Dinukleotide verantwortlich gemacht werden können, sollte im Folgenden ermittelt werden, an welchem Schritt der Genexpression sich der Einfluss der CpG Dinukleotide manifestiert.

Im Gegensatz zur Aminosäuresequenz der Zytokine waren die DNA-Sequenzen der verschiedenen Genvarianten und somit auch die Sequenzen der mRNA wesentlichen Veränderungen unterworfen. Die Modifikationen der Nukleotidsequenzen, die sich zum Teil auch in ungleichen CAI-Werten ausdrückten (vgl. Tab. 3), könnten im Einzelfall die Translation nachhaltig beeinflussen und auf dieser Ebene die divergenten Proteinmengen verursachen. Für die genaue Untersuchung der verantwortlichen Mechanismen ist eine

Trennung der nukleären Transkription von der zytoplasmatischen Translation notwendig. Ein transgener, modifizierter Vaccinia Virus Typ Ankara (MVA), welcher die T7 Polymerase exprimiert (MVA-T7), führt zu einer zytoplasmatischen Transkription von T7-regulierten Genen bei zeitgleicher Unterbindung aller nukleären Transkriptionsprozesse. Für die Beurteilung der Translationseffizienz wurden daher permissive 293T Zellen zunächst mit einer MOI (multiplicity of infection) von zehn des rekombinanten MVA-T7 Virus infiziert und nach einer Inkubation von 30 Minuten mit den murinen MIP-1 α Genvarianten unter Kontrolle des T7 Promotors, integriert in dem Vektor pPCR-Script (pT7; Stratagene), transient transfiziert. Der Zytokingehalt der Kulturüberstände wurde 24 Stunden nach Transfektion der MVA-T7 infizierten Zellen mittels Zytokin-ELISA bestimmt. In diesem artifiziellen System wurden alle Zytokine mit in etwa gleich bleibender Effizienz exprimiert, wobei die Kodonoptimierung (13CpG) erwartungsgemäß eine leicht verbesserte Translation zeigte (Abb. 14). Als Negativkontrolle dienten Überstände von transfizierten 293T Zellen, die zuvor nicht infiziert worden waren (-MVA-T7).

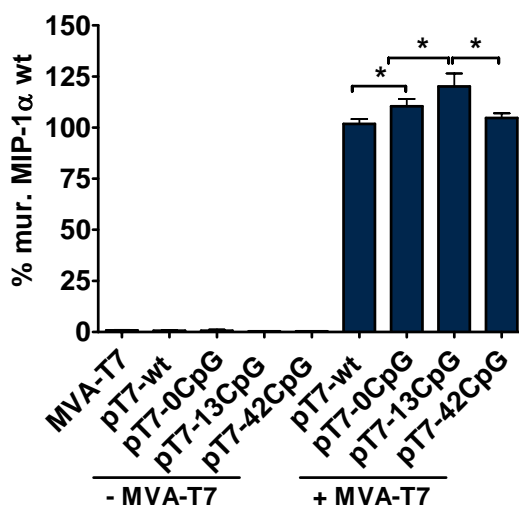


Abb. 14: Analyse der Translationseffizienz.

Um die CpG Abhängigkeit der Translation zu überprüfen wurden 293T Zellen zunächst mit dem die T7-Polymerase kodierenden MVA infiziert und anschließend mit den Zytokingenen unter Kontrolle des T7-Promotors transfiziert (+MVA-T7). Nicht infizierte aber transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle (-MVA-T7). Die Angaben der Expression beziehen sich auf den in infizierte Zellen transfizierten Wildtyp (100%). Die Steigerung der Translationseffizienz ist mit $p < 0.05$ statistische Signifikant (*). Fehlerbalken spiegeln zwei unabhängige Experimente wieder.

Die Messwerte dieser Überstände bestätigten, dass unter Kontrolle des T7 Promotors keine Zytokinexpression erfolgte und folglich dieser Promotor von nukleären RNA-Polymerasen nicht erkannt wird. Besonders zu beachten ist, dass auch die Genvariante ohne CpG Dinukleotide im offenen Leserahmen zu einer beachtlichen Expression des Proteins führte, wohingegen dieses Gen sich in transienten und stabilen Transfektionen unter Kontrolle des CMV Promotors kaum nachweisen ließ. Das CpG-maximierte Gen zeigte im Gegenzug keinen Expressionsvorteil gegenüber den anderen Genen in diesem System.

Die aus diesem Experiment erworbenen Daten deuten darauf hin, dass der veränderte CpG Gehalt die Translationseffizienz nicht verändert. Unterschiedliche Translationseffizienzen als Ursache der ungleichen Zytokinmengen konnten somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

2.3.4 Einfluss der CpG Dinukleotide auf Spleißen und RNA-Export

Auch wenn die Optimierungsstrategien die Translationseffizienz nicht wesentlich veränderten, kann keineswegs auf einen rein transkriptionellen Effekt der beobachteten Expressionsunterschiede geschlossen werden. Der Translation vorgelagerte Ereignisse wie zum Beispiel das Spleißen der prä-mRNA oder der Export der mRNA können ebenso die auf Proteinebene beobachteten Phänomene hervorrufen. Beide Möglichkeiten können mit einem Northern Blot überprüft werden, der bei der Verwendung einer geeigneten Sonde die Darstellung sämtlicher nukleärer und zytoplasmatischer Transkripte der Zytokingenvarianten zulässt. In diesem Fall wurde die Sonde gegen das BGH Polyadenylierungssignal gerichtet, da nur diese Sequenz allen Transkripten gemeinsam war, und unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Sonde aufgrund variierender Sequenzen und daher GC-Gehalte so ausgeschlossen werden konnten. Ferner sollten alle potentiell funktionellen Transkripte der vier Genvarianten diese Sequenz einschließen. Die generierten stabilen CHO-Zelllinien dienten der getrennten Isolierung nukleärer und zytoplasmatischer Gesamt-RNA und der Visualisierung entsprechender Signale mittels einer DIG-markierter BGH-Sonde. In diesem Versuch wurde die β -Aktin mRNA als Kontrolle für den Einsatz gleicher Mengen RNA gewählt. Die Detektion spezifischer Transkripte zeigte für das murine MIP-1 α und β -Aktin je ein einziges distinktes Signal entsprechend der erwarteten Größe für die im Falle des murinen MIP-1 α ungespleißte mRNA (Abb. 15).

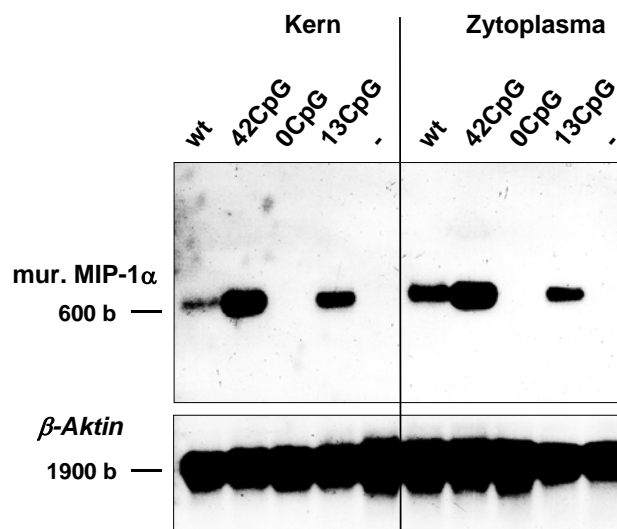


Abb. 15: Northern Blot Analyse der stabilen CHO-Zelllinien.

Je zwei Mikrogramm der aus den stabilen CHO-Zellen isolierten nukleären (links) und zytoplasmatischen (rechts) Zytokin-RNA wurden nach denaturierender Gelelektrophorese und Kapillarblot mit einer DIG-markierten Sonde gegen das allen Konstrukten gemeinsame BGH Polyadenylierungssignal detektiert (oben). Die Erfassung der RNA-Menge erfolgte durch eine β -Aktin Sonde als Ladekontrolle (unten). Für jede Spur ist der CpG Gehalt des integrierten Zytokingens angegeben.

Somit lag kein Hinweis für fehlerhafte Spleißereignisse oder die Degradierung der mRNA, verursacht durch die vorgenommenen Sequenzmodifikationen, vor. Auch der korrekte mRNA-Export der Zytokingenvarianten war gemäß den Ergebnissen des Northern Blots nicht von den Veränderungen betroffen, da unter Einbeziehung der Ladekontrolle β -Aktin das Detektionsmuster und die Intensität der Signale der nukleären und zytoplasmatischen Proben, unabhängig von der Nukleotidsequenz, vergleichbar waren. Weiterhin wurden die bereits im ELISA gemessenen Unterschiede der Proteinmengen von den hier beobachteten „steady-state“ RNA-Mengen weitestgehend wiedergespiegelt (vgl. Abb. 11). In wiederholten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die größten Zytokin-Transkriptmengen aus Zellen stammten, die das CpG-maximierten Transgen tragen, während die Zytokintranskripte aus Zellen mit dem CpG-depletierten Gen kaum nachzuweisen waren.

Für eine etwas präzisere Wiedergabe der Northern Blot Resultate wurden die Signale densitometrisch vermessen und die Intensitätswerte der murinen MIP-1 α Signale auf die Werte der entsprechenden β -Aktin Kontrolle bezogen (Abb. 16).

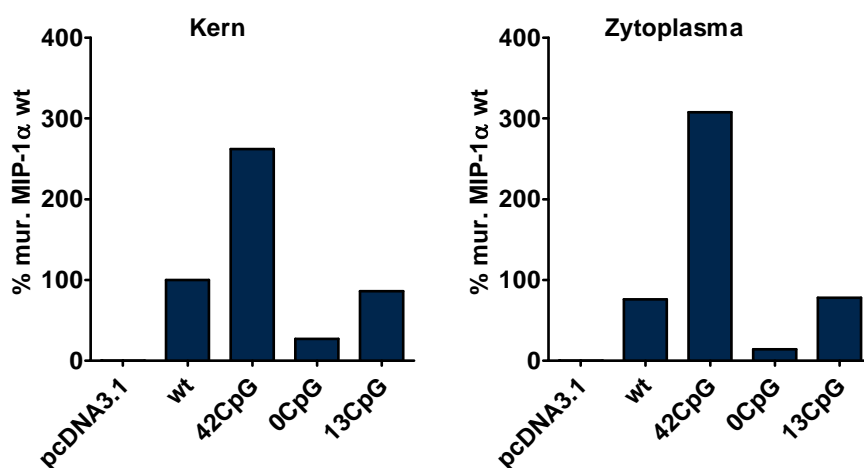


Abb. 16: Densitometrische Auswertung von Ergebnissen des Northern Blots.

Durch Integration der Northern Blot Signale (Abb. 15) können diese in Zahlen umgesetzt werden. Die Graphik zeigt keine ausgeprägten Unterschiede der RNA-Menge des Zellkernes und des Zytoplasmas, ein Indiz für einen korrekten RNA-Export.

Auf die Transkriptmenge des Wildtyps bezogen, befindet sich im Kern und im Zytoplasma etwa dreimal mehr „steady-state“ RNA der CpG-maximierten MIP-1 α Variante. Die Depletion von CpG Dinukleotiden reduziert die Rate der RNA um den Faktor drei bis vier, die Kodonoptimierung führt zu RNA-Mengen vergleichbar denen des Wildtyps. Die bisherigen Daten der Zytokinexpression verweisen damit auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Menge an „steady-state“ RNA- und Proteinmenge, ohne dass durch die Sequenzmodifikationen das Spleißen oder der RNA-Export manipuliert wurde.

2.3.5 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die Menge der „steady-state“ RNA

Die eingehende Überprüfung posttranskriptioneller Ereignisse lieferte keinen Anhaltspunkten für etwaige CpG-bedingte Veränderungen dieser Prozesse. Der Grund für die differentiell regulierte Genexpression muss daher in einer früheren Phase der Genexpression, der Transkription, gesucht werden. Die Darstellung der für β -Aktin und murines MIP-1 α spezifischen Transkripte im Northern Blot und deren visuelle Bewertung wies unter Berücksichtigung der Ladekontrolle auf deutliche Mengenunterschiede der Zytokin-RNA im Zellkern der Zelllinien hin. Eine genauere Quantifizierung dieser „steady-state“ RNA-Mengen ermöglichte die Methode der quantitativen „real-time“ PCR nach reverser Transkription (RT) der RNA. Da sowohl der Zellkern wie auch das Zytoplasma auf spezifische Transkripte hin untersucht werden sollten, wurde die RNA beider Kompartimente aus den stabilen Zelllinien isoliert, photometrisch Vermessen, und nach sorgfältiger Überprüfung und Ausschluss von DNA Kontaminationen (nicht gezeigt) in gleichen Mengen in eine unspezifische RT-Reaktion eingesetzt. Die erhaltene cDNA wurde im Anschluss mittels SYBR Green basierter „real-time“ PCR und spezifischen Primern für die jeweilige murine MIP-1 α -Genvariante und das Hygromycin-Phosphotransferase-Gen (*hph*) amplifiziert (Abb. 17A). Die relative Quantifizierung der Mengenunterschiede basierte auf den unterschiedlichen „Crossing points“ (Cp) der Genvarianten, wobei der „Crossing point“ den PCR-Zyklus mit erstmalig signifikanter Erhöhung des Fluoreszenzsignales interpoliert und in kausalem Zusammenhang mit der eingesetzten DNA-Menge steht. Da das „real-time“ PCR System um ein Vielfaches sensitiver auf kleinste Veränderungen der cDNA-Mengen reagiert, wurde das Hygromycin B-Resistenzgen *hph* als interne Kontrolle gewählt, da ausschließlich transgenhaltige Zellen auch dieses Gen besitzen. Für die graphische Auswertung wurde die Menge der cDNA für das murine MIP-1 α jeder Zelllinie auf die jeweilige Menge an *hph*-cDNA normiert und als Vielfaches der Wildtyp-cDNA-Menge angegeben (Abb. 17B). Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Northern Blot Resultate und geben dabei detailliertere Informationen über die Verhältnisse der „steady-state“ RNA. Die Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der PCR-Zyklen zeigt deutlich variierende Cps. Der geringste Cp, und somit die meisten Transkripte, liegen für die Zellen mit der CpG-maximierten Genvariante vor. Entsprechend wenige Transkripte und einen hohen Cp bedingt das CpG-freie MIP-1 α -Gen. (Abb. 17A). Unterschiede zwischen dem wildtypischen und dem kodonoptimierten Gen können aus dem jeweiligen Kurvenverlauf nicht entnommen werden. Die Auswertung der Ergebnisse unter Einbeziehung der *hph*-Kontrolle, der Cp-Werte und der jeweiligen PCR-Effizienzen ermöglichte exaktere Aussagen zur vorliegenden Transkriptmenge. Die CpG-freie Genvariante zeigte eine

Reduktion der spezifischen mRNA Transkripte um 80% im Zytoplasma wie auch im Zellkern, die CpG-maximierte Version hingegen eine Steigerung der Transkriptmenge um ein Vierfaches. Die Spezifität der während der „real-time“ PCR generierten Produkte wurde durch Sequenzierungen (nicht gezeigt) und Analysen der Schmelzkurven überprüft (Abb. 17A). Weiterhin bestätigen diese Daten, dass weder der RNA-Export, noch fehlerhaftes Spleißen sichtbar von der veränderten Primärsequenz beeinträchtigt wurden und somit nicht für die unterschiedliche Expressionsrate ausschlaggebend waren (Abb. 17B).

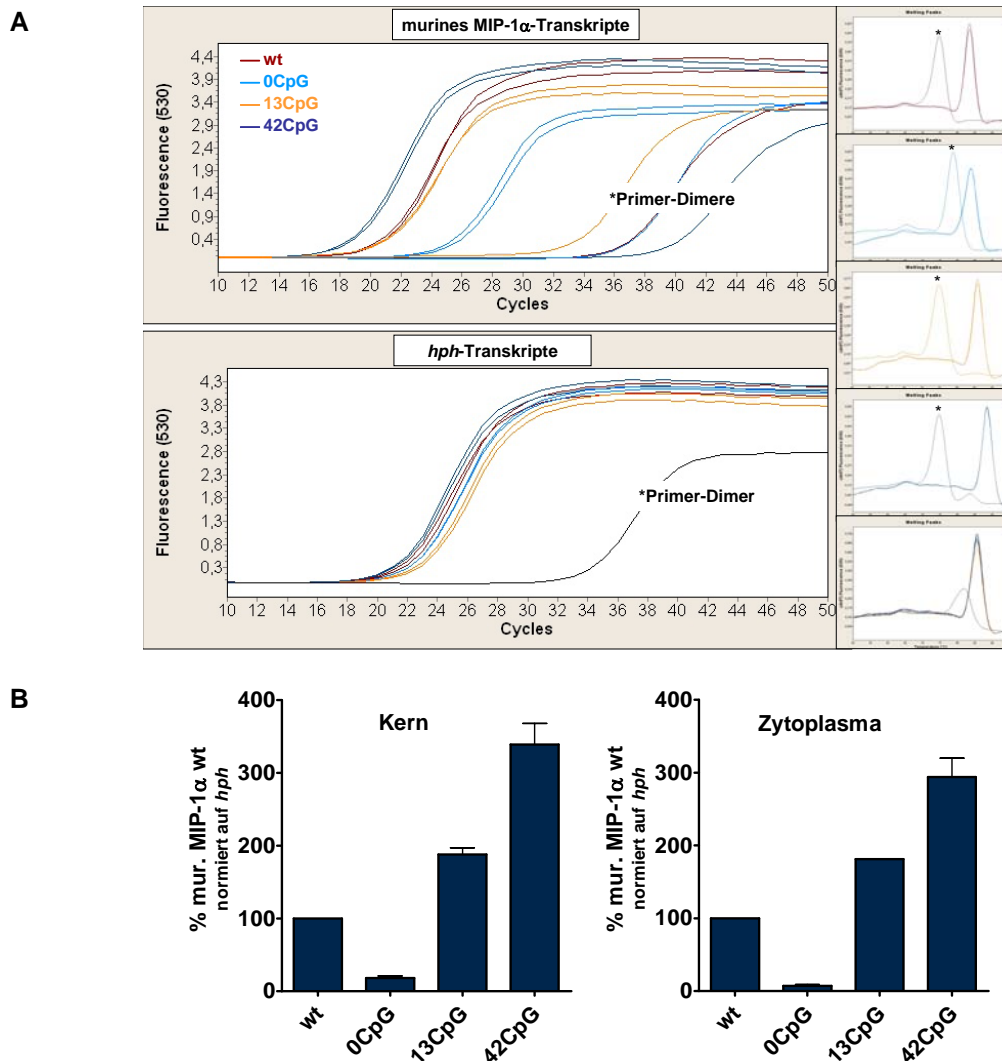


Abb. 17: Quantifizierung nukleärer und zytoplasmatischer „steady-state“ RNA durch „real-time“ RT-PCR.

RNA aus rekombinanten CHO-Zellen wurde mit poly(dT)₁₅ unspezifisch revers transkribiert, und die resultierende cDNA mittels „real-time“ PCR und Einsatz spezifischer Primer für die Zytokine und das *hph*-Gen quantifiziert. **(A)** Die Daten des LightCyclers geben die Fluoreszenzentwicklung (y-Achse) in Abhängigkeit der Zyklenzahl (x-Achse) wieder. Die Zyklenzahl, zu der erstmalig eine signifikante Erhöhung des Fluoreszenzsignals detektiert wird, wird als „Crossing point“ (Cp) bezeichnet und ist ein indirektes Maß für die Anzahl zugrunde liegender cDNA-Moleküle bzw. RNA-Transkripte. In der oberen Abbildung ist der Kurvenverlauf für die verschiedenen MIP-1α-Transkripte dargestellt (rot: wt; hellblau: 0CpG; orange: 13CpG; dunkelblau: 42CpG), während die untere Abbildung die zugehörigen *hph*-Transkripte zeigt. Fluoreszenzsignale mit einem Cp von 30 Zyklen und mehr kennzeichnen artifizielle Primer-Dimere, wie Schmelzpunktanalysen für jedes Primer-Paar zeigen (rechte Seite). **(B)** Die aus den Kurven gewonnenen Daten wurden mittel relativer Quantifizierung ausgewertet, auf die jeweiligen Werte des *hph*-Gens bezogen und anschließend auf das Wildtyp-Gen (100%) normiert. Fehlerbalken geben Abweichungen von vier unabhängigen Versuchen wieder.

2.3.6 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die mRNA-Stabilität

Die in Northern Blot und „real-time“ RT-PCR bestimmten Unterschiede in der Anzahl vorhandener mRNA-Transkripte im Zellkern kann auf einer verstärkten Transkriptionsaktivität der jeweiligen Zytokingenvarianten, aber auch auf einer Veränderung der mRNA-Stabilität beruhen. Das Antibiotikum Actinomycin D hemmt die RNA-Synthese, indem es in den Doppelstrang der DNA interkaliert und die RNA-Polymerase II an der Transkription hindert. Nach Inhibition der RNA-Neusynthese kann dann durch kontinuierliche Messung der in der Zelle verbliebenen Transkripte die RNA-Halbwertszeit, das Maß für die RNA-Stabilität, bestimmt werden. Für die Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit der Zytokintranskripte wurden die vier stabil MIP-1 α exprimierenden CHO-Zellen für 0, 1.5, 3, 6, 12 und 24 Stunden mit 2.4 μ M Actinomycin D kultiviert. Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus diesen Zellen erfolgte eine unspezifische reverse Transkription der RNA und eine MIP-1 α - und *hph*-spezifische „real-time“ PCR der cDNA. Die *hph*-Transkripte dienten als Kontrolle dieses Versuches, da diese Transkripte in allen Proben die gleiche Halbwertszeit aufweisen sollten. Die Berechnung der Halbwertszeit erfolgte gemäß der Formel:

$$\frac{N(t)}{N(0)} = e^{-\lambda t} \quad \Rightarrow \quad t = -\frac{1}{\lambda} \ln \frac{N(t)}{N(0)}$$

Bei logarithmischer Auftragung der Transkriptmenge auf der y-Achse und linearer Darstellung der Zeit auf der x-Achse sollten die gemessenen Daten im Idealfall einer Geradengleichung folgen. Die Zerfallskonstante λ entspricht dabei der Steigung dieser Gerade. Die Genvarianten zeigten unter diesen Bedingungen mit $p > 0.3$ keine signifikant veränderte RNA-Stabilität (Abb. 18).

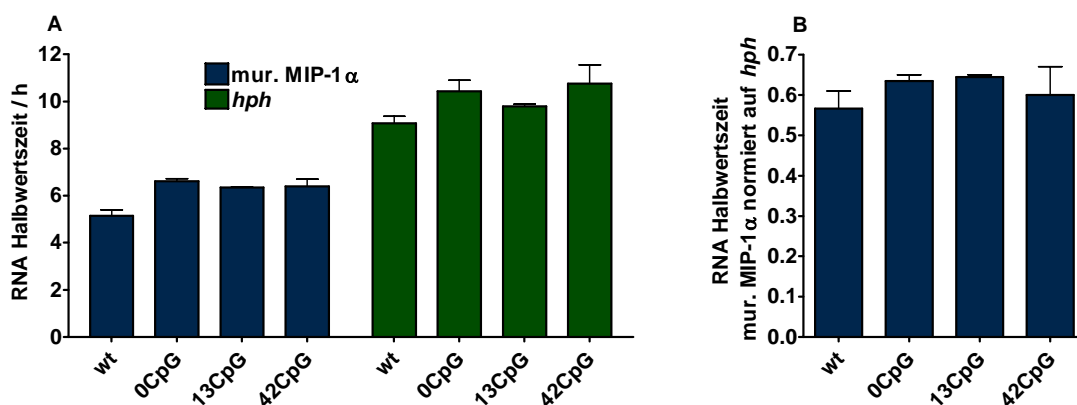


Abb. 18: Halbwertszeit der murinen MIP-1 α und *hph*-Transkripte.

Die stabilen CHO-Zelllinien wurden über verschiedene Zeiträume mit Actinomycin D inkubiert. Nach der Zellernte wurde die RNA isoliert und mittels „real-time“ RT-PCR wie beschrieben quantifiziert. **(A)** Absolute Werte für die RNA-Halbwertszeit. **(B)** relative RNA-Halbwertszeit der Zytokintranskripte bezogen auf die *hph*-Halbwertszeit jeder Zelllinie. Fehlerbalken geben die Abweichungen von zwei unabhängigen Versuchen an.

Die Berechnung der Halbwertszeiten zeigte für die Genvarianten 0CpG, 13CpG und 42CpG eine leicht erhöhte Stabilität der RNA gegenüber der Wildtyp-RNA, während sich

die Varianten untereinander kaum unterschieden (Abb. 18A). Auch für die *hph*-Transkripte des wildtypischen Gens konnte eine schwach verringerte Stabilität gegenüber den Genvarianten gezeigt werden, so dass hier vermutlich ein systemischer Fehler vorlag (Abb. 18A). Die Normierung der murinen MIP-1 α Transkript-Halbwertszeiten auf die jeweilige *hph*-Kontrolle zeigte jedoch eine gleichförmige Halbwertszeit für alle untersuchten Zytokingene (Abb. 18B). Die geringen Unterschiede der RNA-Stabilitäten können die Expressionsverringering des CpG-freien Gens um 80% oder die Expressionssteigerung des CpG-maximierten Gens auf 300% der wildtypischen Expressionskapazität nicht rechtfertigen. Die RNA-Stabilität spielt infolgedessen keine entscheidende Rolle bei der Entstehung der beobachteten Expressionsdifferenzen unter den Genvarianten.

2.3.7 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die *de novo* Transkription

Analysen der „steady-state“ RNA zeigten bei gleicher Stabilität große Unterschiede bezüglich der vorliegenden Transkriptmengen und gaben weitestgehend die Unterschiede der variierenden Proteinmengen wider, so dass eine veränderte Transkription als ausschlaggebende Ursache für das Expressionsmuster angesehen werden kann. Fehlende Hinweise für Stabilitätsunterschiede der Transkripte lassen eine direkte Korrelation von CpG Gehalt und RNA-Neusynthese vermuten. Die genaue Betrachtung dieser transkriptionellen Aktivität erfolgte durch eine Inkubation von aus den stabilen Zelllinien isolierten Zellkernen mit Biotin-16-UTP markierten Nukleotiden für 30 Minuten („nuclear run-on“). Nach Isolierung der gesamten RNA aus den Zellkernen konnten die neu synthetisierten und daher biotinylierten Transkripte mit Hilfe von Streptavidin gekoppelten Magnetkügelchen („Dynabeads“; Invitrogen) isoliert werden. Die erhaltenen Transkripte wurden unspezifisch revers transkribiert und die resultierende cDNA wurde in eine quantitative „real-time“ PCR eingesetzt, um die Anzahl der während der Inkubation neu synthetisierten MIP-1 α - sowie *hph*-Transkripte mit jeweils spezifischen Primern zu bestimmen (Abb. 19).

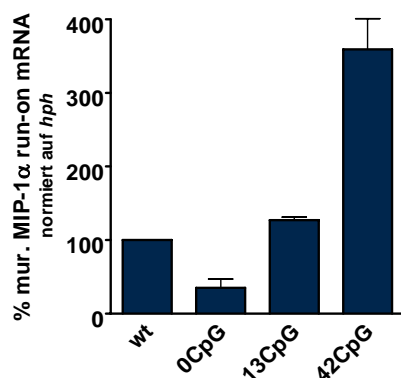


Abb. 19: Quantifizierung *de novo*-synthetisierter RNA durch „real-time“ RT-PCR.

Aus den stabilen CHO-Zellen wurden Zellkerne präpariert und diese mit Biotin markierten dUTP für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die markierte RNA isoliert, revers transkribiert und in einer „real-time“ PCR quantifiziert. Die Anzahl der *de novo*-synthetisierten Zytokintranskripte wurde auf die Anzahl neu entstandener *hph*-Transkripte normiert und in Relation zum Wildtyp (100%) angegeben. Die Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten werden angezeigt.

Die Rate der RNA-Neusynthese wurde entscheidend vom CpG Gehalt der Genvarianten bestimmt. Transkripte des CpG-freien Gens hatten in diesem Versuchsaufbau eine geringe transkriptionelle Aktivität und erzielten etwa 30% der Neusyntheserate an spezifischen Zytokintranskripten gegenüber dem wildtypische MIP-1 α -Gen. Die Integration einer maximalen Anzahl von CpG Dinukleotiden steigerte die Rate der Neusynthese um den Faktor 3.5 gegenüber dem wildtypischen Gen. Die Kodonoptimierung hatte einen mäßigen Einfluss auf die RNA-Neusynthese, diese konnte um den Faktor 1.3 gesteigert werden.

Die Daten der *de novo* Transkriptionsrate standen somit in gutem Einklang mit den Daten des Northern Blots, der quantitativen Analyse der „steady-state“ RNA und der gemessenen Proteinmenge (Tab. 5).

	wt	0CpG	13CpG	42CpG
Protein im Überstand (ELISA)	1.0	0.2	3.1	11.8
RNA im Kern (Northern Blot)	1.0	0.3	0.9	2.6
RNA im Zytoplasma (Northern Blot)	1.0	0.2	1.0	4.0
RNA im Kern (qRT-PCR)	1.0	0.2	1.9	3.4
RNA im Zytoplasma (qRT-PCR)	1.0	0.1	1.8	3.0
“de novo” RNA	1.0	0.3	1.3	3.5

Tab. 5: Übersicht über die Protein- und RNA-Synthese der murinen MIP-1 α Genvarianten in stabilen Zelllinien.

Die Expressionsdaten der MIP-1 α -Genvarianten 0CpG, 13CpG und 42CpG sind jeweils als Vielfaches der wildtypischen Expressionskapazität (1.0) angegeben.

Nur die Erhöhung der Zytokinmenge im Kulturüberstand der stabilen Zelllinien mit der CpG-reichen murinen MIP-1 α Genvariante (42CpG) betrug ein Vielfaches der Expressionssteigerung auf RNA-Ebene. Diese Diskrepanz könnte jedoch durch einen eventuell nicht-linearen Zusammenhang zwischen Transkript- und Proteinmenge verursacht werden. Betrachtet man jedoch die Gesamtheit der vorliegenden Ergebnisse, implizieren die gewonnenen Daten eine auf unmethylierten CpG Dinukleotiden basierende Regulation der Transgenexpression auf Ebene der Transkription.

3. Diskussion

3.1 Rekombinante Expression therapeutischer Proteine

Die Entwicklung von diagnostischen Verfahren, Impfstoffen und therapeutischen Medikamenten erfordert eine stetig zunehmende Menge gereinigter rekombinanter Proteine für den Einsatz als Wirkstoff oder aber als Adjuvanz (168). Eine entsprechend starke und stabile Expression des rekombinanten Genproduktes im Wirtsorganismus ist jedoch nicht nur hierfür von entscheidender Bedeutung. Auch erfolgreiche Ansätze auf den Gebieten der Gentherapie und DNA-Impfstoffentwicklung basieren auf einer möglichst optimalen Expression der eingesetzten Transgene. Im Bereich der rekombinanten Expression sind prokaryontische Systeme genetisch relativ leicht zu manipulieren und gleichzeitig eine kostengünstige Plattform für die Produktion. Die Kehrseiten der prokaryontischen Expression, wie schlechte Löslichkeit und Denaturierung des produzierten Proteins, die Bildung von "inclusion bodies" und eine in Einzelfällen geringe und instabile Expression, bleiben trotz verschiedener Ansätze zur Verbesserung weiterhin bestehen (169). Hinzu kommt das Unvermögen der Prokaryonten spezielle posttranslationale Modifikationen am Produktprotein vorzunehmen, die oft essentiell für die korrekte Faltung und Funktionalität des rekombinanten Proteins sind. Die Expression in eukaryontischen Zellen ist geprägt von kostspieligen Medien und Zellkultursystemen, denen jedoch eine gute Löslichkeit, die korrekte posttranslationale Prozessierung sowie der Ausschluss bakterieller Kontaminationen gegenüberstehen. Bei entsprechender Quantität überwiegen deshalb die Vorteile dieses Systems aufgrund der qualitativ hochwertigen Produkte und lassen die hohen Kosten in den Hintergrund treten. Für die industrielle Produktion rekombinanter Proteine im eukaryontischen System besteht daher weiterhin der Bedarf an neuen Technologien, um die Expressionsraten zu steigern und die Produktionskosten zu verringern.

3.1.1 Strategien zur Verbesserung der rekombinanten Expression

Eine Möglichkeit die Expression sowohl quantitativ als auch qualitativ zu verbessern bieten Veränderungen auf Ebene der Nukleinsäuresequenz, die das rekombinante Protein kodiert. Für Proteine, die im Rahmen einer Gentherapie oder DNA-Vakzinierung exprimiert werden sollen, stellen Modifikationen der betreffenden DNA-Sequenz sogar die einzige Möglichkeit einer Expressionsoptimierung dar, da hier keine expressionssteigernden Substanzen wie zum Beispiel 5-Aza-2'-Deoxycytidin eingesetzt werden sollten (170).

Das rege Interesse an einer hohen und stabilen Expression zeigen die zahlreichen Untersuchungen und Strategien zur Besserung der Expressionsleistung, die im Laufe der Zeit entwickelt wurden. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Fusion intronischer Sequenzen an das 5'-Ende einer kodierenden Region (143) ebenso wie das Einfügen von UCOEs (ubiquitous chromatin opening elements) einen positiven Einfluss auf die eukaryontische Expression hat. In der Regel bezeichnen UCOEs unmethylierte, mit dualen und divergent transkribierten Promotoren assoziierte CpG-Inseln, wie sie in den Promotoren der Proteine TBP (TATA-Box binding protein) und HNRPA2B1 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1) vorkommen. Aufgrund ihrer Chromatin öffnenden Funktion verhindern sie die Formation von Heterochromatin und damit das Abschalten der Expression (157). Auch der Einsatz von starken Hybridpromotoren (148) oder starken zellspezifischen Promotoren (144) fördert eine hohe und stabile Expression des Transgens. Eine große Bedeutung im Bereich der Plasmide übernehmen Strukturen die eine autonome Replikation ohne Integration ins Wirtsgenom gestatten. Bei gesteigerten Initiationsraten der Transkription (171) und stabiler Expression (145;146) verhindern solche episomal replizierenden Vektoren den Abbau der Fremd-DNA und beugen gleichzeitig den Gefahren einer unter Umständen gesundheitsschädigend Integration vor. Erreicht wird dieses Ziel z.B. durch den Einbau der Epstein-Barr Virus Elemente oriP oder EBNA1 (148), die Verwendung von „scaffold/matrix attachment regions“ (S/MARs) (147) oder von Elementen basierend auf natürlichen Chromosomen (149;150). Ebenso hat sich eine Anpassung der zu exprimierenden Gensequenz auf die Kodonverwendung des gewählten Wirtsorganismus bewährt (151).

3.1.2 Einfluss von CpG Dinukleotiden auf die rekombinante Expression

Die Rolle von CpG Dinukleotiden während der Expression wird diskrepant diskutiert. Prinzipiell unterliegen CpG Dinukleotide der Methylierung durch die Methyltransferase Familien DNMT1 und DNMT3A/B, die im Weiteren eine Bindung mit Transkriptionsrepressoren eingehen, und die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern (172), oder durch Rekrutierung Histon modifizierender Proteine - wie den Histon-Deacetylasen - zur Verdichtung der Chromatinstruktur und damit dem Abschalten der Expression führen können (173;174). Studien die sich mit einer nicht-viralen Expression von Transgenen befassen, vermeiden daher CpGs und bevorzugen CpG-depletierte Plasmide (163).

Im Widerspruch zu diesen Studien stehen Ergebnisse die belegen, dass eine Depletion von intragenischen CpG Dinukleotiden eine Verringerung der Transgenexpression zur Folge hat (63). Auch in Arbeiten der Arbeitsgruppe Ralf Wagner (Regensburg) konnte der negative Einfluss einer CpG Depletion gezeigt werden (159;160). Die Herstellung einer

CpG-freien Variante des Reportergens GFP und des murinen Erythropoietingens sollte hier durch Eliminierung potentieller Substrate für DNA-Methylasen eine erhöhte und verlängerte Expression gegenüber der CpG-reichen Variante erzielen. Entgegen der Erwartung bewirkte die CpG Depletion jedoch eine Reduktion der Expressionsleistung.

3.1.3 Relevanz intragenischer CpGs für die rekombinante Expression

Um die Beteiligung von CpG Dinukleotiden im offenen Leserahmen eines Gens an den Prozessen der Transkription und Translation genauer zu verstehen, wurden für die vorliegende Arbeit die murinen und humanen Nukleotidsequenzen der beiden Zytokine MIP-1 α sowie GM-CSF basierend auf drei Strategien verändert. Das Hauptaugenmerk der Genoptimierung lag zum einen auf der Güte des verwendeten Kodons, zum anderen auf der CpG Depletion und zum dritten auf der maximal möglichen CpG Anreicherung im jeweiligen offenen Leserahmen. Grundlage der CpG Maximierung war die beschriebene Abnahme der Expression nach Depletion der CpG Dinukleotide im offenen Leserahmen und die Frage nach der Gültigkeit des Umkehrschlusses. Die Aminosäuresequenz war von den Modifikationen des Wildtypgens nicht betroffen. Für jedes Zytokingen entstanden so drei weitere Genvarianten mit ungleichem CpG Gehalt. Im Wesentlichen unterschieden sich die Genvarianten nur in der Anzahl an CpG Dinukleotiden im offenen Leserahmen. Die Anzahl an TpA Dinukleotiden, die für eine beschleunigte Degradierung der mRNA verantwortlich gemacht werden (158), sowie der GC-Gehalt wurden während der Veränderung der Nukleinsäuresequenz weitestgehend erhalten. Dennoch ergaben sich aus den angestrebten Veränderungen des CpG-Gehaltes zwangsläufig Unterschiede im „Codon Adaptation Index“ (CAI).

3.2 Analysen im transienten System

Zu Beginn der Untersuchungen zum Einfluss von CpG Dinukleotiden im offenen Leserahmen auf die Expression der Zytokine standen transiente Expressionsversuche. In diesen Experimenten sollte zum einen die Gültigkeit der CpG-abhängigen Expression, wie sie bereits beobachtet wurde (159), bestätigt werden, und zum anderen ein geeignetes Modellzytokin für weitere Studien ausgewählt werden, das sich durch besonders starke Reaktionen auf die Veränderungen der Nukleinsäuresequenz auszeichnen sollte.

3.2.1 Transiente Expression der Zytokine

Die transiente Transfektion mit den Genvarianten bestätigte in allen vier Fällen die Bedeutung von CpG Dinukleotiden für die Expression. Abhängig von der Optimierungsstrategie variierte die Expressionskapazität der Zytokinvarianten beachtlich. Für nahezu jedes der getesteten Zytokine bewirkte die Eliminierung der CpG Dinukleotide

aus dem offenen Leserahmen einen deutlichen Einbruch in der Expressionsleistung. Im Gegensatz zur Expression des jeweiligen wildtypischen Gens wurde für die CpG-freien Versionen im Fall des humanen MIP-1 α eine Expression von 55%, für das murine MIP-1 α von 4% und für das humane GM-CSF von 90% erzielt. Das humane GM-CSF schien mit einer Expressionssteigerung auf 140% dagegen von der CpG Depletion zu profitieren. Verglichen mit den anderen Zytokingenen war für diese Genvariante die Verbesserung der Kodonqualität, repräsentiert durch den „Codon Adaptation Index“ (CAI), jedoch besonders ausgeprägt. Die Komplexität der Regulation transkriptioneller und translationeller Mechanismen bietet in diesem Fall möglicherweise Gelegenheit für die Entfaltung kodonorientierter, translationeller Vorteile, die die ansonsten ungünstigen Effekte der CpG Depletion überlagern.

Die Optimierung der Sequenz hinsichtlich genutzter Kodons (maximaler CAI-Wert) konnte in jedem Fall eine Steigerung der Expression bewirken. Bezogen auf die Expression des jeweiligen wildtypischen Gens betrug diese Verbesserung zwischen 110% für das murine MIP-1 α und 300% für das murine GM-CSF.

Die Anreicherung von CpG Dinukleotiden im offenen Leserahmen der Zytokingene hatte einen ausnahmslos positiven Einfluss auf die Expression. Gemessen an den unveränderten Sequenzen war für das murine MIP-1 α eine Zunahme des Zytokingehaltes auf 170%, für das humane MIP-1 α auf 350%, für das murine GM-CSF auf 410% und für das humane GM-CSF auf 310% zu verzeichnen.

Obwohl also die Optimierung der Kodonverwendung und die Eliminierung der CpG Dinukleotide in vergleichbaren CAI Werten resultierten, wiesen die erzielten Expressionsleistungen der beiden Strategien große Unterschiede auf. Während die Gene mit optimalen Kodons zu einer stärkeren Expression als das entsprechende wildtypische Gen führten, war für die CpG Depletion eine beachtliche Expressionsabnahme für drei der vier Zytokine zu verzeichnen, so dass neben der Translation weitere Mechanismen an der veränderten Expression beteiligt sein müssen. Diese Hypothese wird darüber hinaus von den Daten der CpG Maximierung gestützt. Diese erzielte die besten Ergebnisse bezüglich der Expressionsmenge, hatte aber für alle Zytokine eine Verschlechterung des CAI zur Folge, der sogar unterhalb des Wertes für die wildtypischen Gene lag.

Eine ungleiche Degradationsrate für die Genprodukte der verschieden optimierten Varianten kann hier ausgeschlossen werden, da die Aminosäuresequenz nicht von Veränderungen betroffen war und daher der jeweils wildtypischen Aminosäuresequenz entsprach. Ebenso konnte im Verlauf der Arbeit in einer Immunoblotanalyse der Überstände der vier generierten CHO-Zelllinien mit einem anti-MIP-1 α -Antikörper nur eine Bande der erwarteten Größe identifiziert werden (Abb. 11B). Aufgrund der enorm ausgeprägten Reaktionen des murinen MIP-1 α auf Änderungen des CpG Gehaltes wurde

dieses Zytokin mit seinen Genvarianten (wt (7CpG), 0CpG, kodonoptimiert (13CpG) und 42CpG) für alle weitere Untersuchungen herangezogen.

3.2.2 Transfektionseffizienz

Eine mögliche Ursache für die beobachteten unterschiedlichen Expressionsraten wäre die ungleichmäßige Aufnahme der transfizierten Plasmide durch die Zellen, verursacht durch die Veränderungen der MIP-1 α Gensequenz. Da der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme während der Transfektion nicht bekannt ist, kann ein Einfluss der Nukleinsäuresequenz auf die Effizienz der Transfektion nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden. Transiente Transfektionen im Kontext des Plasmides pIRES-EGFP2 (Clontech), das die MIP-1 α Expression über die interne Ribosomen Einstiegsstelle (IRES) des Encephalomyokarditis Virus (ECMV) an die Expression von GFP koppelt, schlossen divergente Transfektionseffizienzen der Genvarianten dagegen aus und bestätigten eine für alle Varianten gleich bleibende GFP Expression. Da die vier Genvarianten stets im selben Vektorkontext appliziert wurden, können die beobachteten Ergebnisse somit direkt auf Veränderungen des offenen Leserahmens des MIP-1 α als einziges variables Element zurückgeführt werden.

3.2.3 *Cis*-aktive Elemente der Zytokingene

Den oben genannten Ergebnissen zu Folge übernimmt der veränderte offene Leserahmen der Zytokingenvarianten eine wichtige Rolle für die Entstehung der unterschiedlichen Expressionsniveaus. In Frage kommen hierfür *cis*-aktive Sequenzen in der kodierenden Region, die mit Hilfe von Ko-Transfektionsanalysen eines Luziferase kodierenden Plasmides zusammen mit den murinen MIP-1 α Genvarianten untersucht werden sollten. Unter Verwendung von drei verschiedenen Promotoren (CMV, SV40 und MCK1350) zur Expression des Luziferasegens konnte die Gegenwart *cis*-aktiver Sequenzen im CpG-maximierten murinen MIP-1 α Gen (42CpG) nachgewiesen werden. Die Ko-Transfektion des Luziferasegens mit der MIP-1 α Variante 42CpG führte stets zu einer Reduktion der Luziferaseexpression. Dies deutet auf die Gegenwart *cis*-aktiver Sequenzen in offenen Leserahmen des Zytokingens und eine Konkurrenz beider transfizierter Gene um *trans*-Faktoren der Zelle hin. Die Ko-Transfektionen der Kontrollvektoren pcDNA3.1 und der 0CpG Genvariante hatten indessen keinen signifikanten Einfluss auf die ermittelte Luziferaseaktivität. Für den CMV Promotor der Luziferase betrug die Minderung der Aktivität nach Ko-Transfektion des CpG-maximierten Zytokingens 20%, und für die Promotoren SV40 und MCK1350 50%. Für alle Promotoren war der durch die Ko-Transfektion mit dem CpG-maximierten Gen herbeigeführte Verlust an Luziferaseaktivität von statistischer Signifikanz ($p < 0.015$). Der nicht so stark

ausgeprägte Reduktion im Falle des starken CMV Promotors ist eventuell auf das Überschreiten des Proportionalitätsbereiches des für die Luziferasemessung verwendeten Photometers zurückzuführen.

3.2.4 *In vitro* Methylierung intragenischer CpG Dinukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Genvarianten unterschieden sich nur in der Anzahl intragenischer CpG Dinukleotide, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese ein wesentlicher Bestandteil der *cis*-aktiven Elemente sind. Ob die CpG Dinukleotide, die, abgesehen von einer für Eukaryonten irrelevanten prokaryontischen Methylierung (175), zum Zeitpunkt der Transfektion unmethyliert vorliegen, die beobachteten Expressionsdifferenzen verursachen, wurde durch die Transfektion *in vitro* methylierter Plasmide untersucht. Da methylierte CpG Dinukleotide innerhalb eines Promotors die Expression zum Erliegen bringen (57), wurde der in der Arbeitsgruppe entwickelte, CpG-reduzierte Vektor pS (159) gewählt, der keine CpG Dinukleotide im CMV Promotor aufweist. Die Expressionsdaten der unmethylierten pS-Konstrukte entsprachen den Daten für die transiente Expression im Kontext des CpG-haltigen Plasmides pcDNA3.1. Gegenüber dem Wildtyp konnte die Expression durch die Kodonoptimierung auf 110% und durch CpG Maximierung auf 180% gesteigert werden. Die Expression des CpG-freien Gens war mit 3% kaum nachweisbar. Die Transfektion methylierter Plasmide brachte dagegen die Expression für alle Genvarianten fast vollständig zum Erliegen und betrug gegenüber der Expressionsleistung des unmethylierten, wildtypischen Zytokingens zwischen 0.1 und 3.6%. Für die Expressionsdaten der methylierten Plasmide konnte keine Korrelation zum CpG Gehalt der Zytokinvariante festgestellt werden.

3.3 Analysen in stabilen Zelllinien

Durch die Etablierung stabil MIP-1 α exprimierender Zelllinien sollten Widrigkeiten des transienten Expressionssystems, wie z.B. technisch bedingte Abweichungen in der Zusammensetzung des Transfektionsansatzes oder Konformationsunterschiede der eingesetzten Plasmide, vermieden werden. Für die Etablierung dieser Zelllinien wurde das Flp-In System der Firma Invitrogen genutzt, bei dem das verwendete Transgen zusammen mit dem Selektionsmarker *hph* an einen definierten Locus im Zellgenom inseriert wird. Die gerichtete Integration der Transgene an dieselbe, vordefinierte Stelle im Genom, garantierte darüber hinaus gleiche transkriptionelle Aktivitäten für jede Zelllinie.

3.3.1 Zytokinexpression stabiler Zelllinien

Die Ergebnisse der transienten Expressionsanalysen wurden durch Analysen der stabilen Zelllinien nicht nur bekräftigt, sie waren um ein Vielfaches ausgeprägter. Während nach

CpG Depletion die Expression auf ein nur schwer detektierbares Niveau von 5% absank, steigerte die Kodonoptimierung die Expression auf 300% und die CpG Maximierung sogar auf 1200%.

Obwohl alle MIP-1 α -Genvarianten dieselbe Aminosäuresequenz kodieren und die Integrität der Proteine durch Immunoblotanalysen bestätigt wurde, sollte die Funktionalität der exprimierten Zytokine künftig durch geeignete Bioassay getestet werden. Da MIP-1 α zu den chemotaktischen Zytokinen gehört, könnte die Untersuchung des Migrationsverhaltens frisch isolierter Monozyten in einer so genannten Boyden-Kammer verfolgt werden (176).

Unter ständigem Selektionsdruck der Zelllinien mit Hygromycin B wurden in einem Zeitraum von zwei Jahren konstante Expressionswerte ermittelt. Obgleich das *hph*-Gen, welches die Hygromycin B-Resistenz vermittelt, und das jeweilige Zytokingen unter Kontrolle verschiedener Promotoren stehen, war der ständige Selektionsdruck notwendig, um einer eventuellen Stilllegung der Zytokingene entgegenzuwirken (177). Nur so konnte gewährleistet werden, dass die Analysen zu CpG-abhängigen, expressionssteigernden Mechanismen ohne Überlagerung der Daten durch epigenetische Mechanismen durchgeführt werden konnten.

3.3.2 Methylierungsstatus der Zytokine in stabilen Zelllinien

Die transkriptionelle Genstilllegung geht gewöhnlich mit der Methylierung von CpG Dinukleotiden einher, wobei sowohl Methylierungen im Promotor (178) wie auch im offenen Leserahmen (61) negativen Einfluss auf die Expression nehmen. Auch wenn der fortwährende Selektionsdruck eine Methylierung der MIP-1 α Expressionskassetten verhindern sollte, besteht aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Promotoren für MIP-1 α und *hph* die Möglichkeit, dass nur das Resistenzgen exprimiert wird, während die Expression des Zytokines unterbunden oder gemindert wird. Neben der Methylierung des Promotors kann auch die intragenische Methylierung, durch Rekrutierung Chromatin modifizierender Proteine, eine reprimierende Wirkung auf die Expression haben (70;153;174;179). Für die vier generierten stabilen Zelllinien wurde daher der Methylierungsstatus der integrierten Zytokingene untersucht. Die Auswertung des Chromatogramms nach Bisulfit-Sequenzierung entsprach der Erwartung eines methylierungsfreien Status für alle vier Genvarianten. Dementsprechend ist der Effekt der unterschiedlichen Expressionsmengen genau wie bei der transienten Expression auf unmethylierte intragenische CpG Dinukleotiden zurückzuführen. Im Folgenden sollte nun eingehend untersucht werden, welche Ebene der Genexpression durch den unterschiedlichen CpG-Gehalt der Genvarianten beeinflusst wird.

3.3.3 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die Translation

Die Sequenzmodifikationen des murinen MIP-1 α hatte zum Teil einen beträchtlichen Einfluss auf den „Codon Adaptation Index“ (CAI), dem Maß für die Qualität der in den Varianten verwendeten Kodons. Generell wirkt sich ein erhöhter CAI durch verbesserte Bedingungen der Translation aus (151). Entsprechend dieser Annahme vermittelte das kodonoptimierte Gen (13CpG; CAI: 0.96) eine gesteigerte Expression im Vergleich zum Wildtyp (7CpG; CAI: 0.77). Die Varianten 0CpG und 42CpG zeigten jedoch eine CAI unabhängige Expression. Obgleich das CpG-maximierte murine MIP-1 α Gen mit einem Wert von 0.73 den schlechtesten CAI unter den Genvarianten besitzt, führte es zur stärksten Expression. Entgegengesetzt zeigt das CpG-freie Gen trotz sehr gutem CAI von 0.92 die schwächste Expression, so dass die Effizienz der Translation für die beobachteten Effekte von untergeordneter Bedeutung zu sein schien. Für die Überprüfung der Translationseffizienz wurde ein auf einem „modified vaccinia ankara“ Virus mit integrierter T7-Polymerase (MVA-T7) basierendes, zytoplasmatisches Transkriptions-/Translationssystem gewählt, das ausschließlich die zytoplasmatische Transkription und Expression T7-kontrollierter Gene gewährleistet (180). Die Abweichungen der ermittelten Translationseffizienzen entsprachen der auf den CAIs der Genvarianten basierenden Erwartung mit einer Signifikanz von $p < 0.05$. Dies bedeutet gleichzeitig, dass in diesem System die CpG-freie Genvariante signifikant besser translatiert wurde als das wildtypische Gen und die CpG-maximierte Genvariante. Die Differenz der Translationseffizienzen ist folglich nicht geeignet, um eine Erklärung für die deutlichen Abweichungen im Zytokin-Expressionmuster der stabilen Zelllinien in Abhängigkeit der CpG Dinukleotide im offenen Leserahmen zu bieten. Für eine gesicherte Angabe zur Translationseffizienz müsste jedoch in weiteren Analysen die Übereinstimmung der Transkriptmengen der Genvarianten im Zytoplasma der Zellen durch quantitative RT-PCR (qRT-PCR) bestätigt werden.

3.3.4 Einfluss der CpG Dinukleotide auf die Transkription

Nachdem eine Beteiligung translationaler Mechanismen an den divergenten Expressionsleistungen ausgeschlossen werden konnte, erfolgte die Analyse transkriptioneller Ereignisse. Auf dieser Ebene kann die beobachtete Veränderung der MIP-1 α Expression der Genvarianten auf Unterschiede in der Anzahl kodierender Transkripte, der Beeinträchtigung des RNA-Exports, Abweichungen der RNA-Stabilitäten, fehlerhaftem Spleißen oder veränderten Transkript-Syntheseraten beruhen.

In Northern Blot Analysen der zytoplasmatischen und nukleären RNA der murinen MIP-1 α Gene konnte gezeigt werden, dass die Verminderung bzw. Erhöhung der Proteinmenge strikt mit geringeren oder gesteigerten „steady-state“ RNA-Mengen korreliert. Die

Interpretation der Northern Blot Analysen widerlegen auch die Annahme von fehlerhaften Spleißereignissen oder einem veränderten RNA-Export aus dem Zellkern. Die densitometrische Auswertung legte für zytoplasmatische und nukleäre RNA-Fractionen eine Erhöhung der Transkriptrate des CpG-maximierten Gens (42CpG) um 300 - 400% dar, die Depletion der CpG Dinukleotide verringerte diese auf 15% der wildtypischen Transkriptrate des murinen MIP-1 α Gens. Die Kodonoptimierung (13CpG) hatte keine nennenswerten Auswirkungen auf die Menge der „steady-state“ Transkripte.

Für eine differenziertere Darstellung der im Zytoplasma und Zellkern vorliegenden Transkripte wurde die Methode der „real-time“ RT-PCR (qRT-PCR) gewählt, die zu einer besseren Auflösung der Transkriptmenge befähigt. Bereits minimale Unterschiede der Transkriptmenge resultieren hierbei in erheblich veränderten Zeitpunkten der DNA-Detektion. Gegenüber dem Wildtyp erzielte die relative Quantifizierung für das CpG-maximierte Gen (42CpG) eine Zunahme der RNA-Menge um 350% im Zellkern und 300% im Zytoplasma, und war damit in etwa analog zur densitometrischen Auswertung des Northern Blots. Auch die RNA-Quantifizierung für das CpG-freie Gen (0CpG) mit 15% der Wildtyp-RNA-Menge entsprach den Ergebnissen der Northern Blot-Analyse. Die kodonoptimierte Genvariante (13CpG) zeigte gemäß der relativen Quantifizierung eine zweifache Erhöhung der Transkriptmenge. Diese steht damit im Widerspruch zum Northern Blot, der für diese Variante keinen Unterschied zum Wildtyp zeigte. Entgegen der qRT-PCR sollte der Northern Blot jedoch vorwiegend Auskunft über Spleißprodukte und RNA-Export geben.

Die „steady-state“ RNA-Mengen der Genvarianten spiegeln die ermittelten Unterschiede auf Proteinebene sehr gut wieder, können jedoch selbst das Resultat einer veränderten RNA-Stabilität oder RNA *de novo* Synthese sein. Da die Modifikationen der Nukleinsäuresequenz unter Umständen variierende RNA-Stabilitäten der Transkriptvarianten bedingen, wurden die RNA-Halbwertszeiten der jeweiligen MIP-1 α -Genvariante und des *hph*-Transkripts für die vier Zelllinien ermittelt (181). In diesem Experiment konnte keine Begründung für die unterschiedlichen „steady-state“ RNA-Mengen gefunden werden. Es ergaben sich keine signifikanten Differenzen in der Halbwertszeit für die MIP-1 α Transkriptvarianten, welche unter Einbeziehung der *hph*-Kontrolle eine durchschnittliche Halbwertszeit von sechs Stunden besaßen. Somit bietet die RNA-Stabilität keine Erklärung für die divergente Zytokinexpression. Diese Beobachtung steht im scheinbaren Widerspruch zu einer Studie, derzufolge CpG Dinukleotide die Menge an „steady-state“ RNA durch Stabilisierung der RNA erhöhen, während CpG-reduzierte Transgene, in denen CpG Dinukleotide, soweit möglich, durch TpA Dinukleotide ersetzt wurden, dies nicht vermögen (182). Die Stabilisierung wird hier mit dem Fehlen von UpA Dinukleotiden in der mRNA begründet, die Ziel zellulärer

Endonukleasen sind, und deren Anhäufung die schnellere mRNA-Degradierung begünstigt (158). Im Gegensatz zu dieser Studie weisen die vier Genvarianten des murinen MIP-1 α aber alle eine vergleichbare Anzahl an TpA Dinukleotiden auf, somit sollte die Wahrscheinlichkeit der RNA-Degradierung für alle MIP-1 α Transkriptvarianten einheitlich sein.

Weder posttranskriptionelle Ereignisse wie RNA-Export oder Spleißen, noch die RNA-Stabilität bieten also eine Erklärung für die differierenden Mengen an „steady-state“ RNA.

3.3.5 Veränderung der *de novo* Transkription durch CpG Dinukleotide

Die bisher analysierten Parameter Translation, RNA-Export, Spleißverhalten und RNA-Stabilität erbrachten für alle Genvarianten des murinen MIP-1 α korrekte und von der Sequenzmodifikation im Wesentlichen unbeeinträchtigte Resultate. Möglicherweise liegt also die Ursache für den CpG-abhängigen Effekt der Expressionsveränderung in der Anzahl *de novo*-synthetisierter MIP-1 α Transkripte. Ob ein Zusammenhang von CpG-Gehalt und RNA-Neusynthese gegeben ist, wurde in einem „nuclear run-on“ Assay analysiert. Die Ergebnisse dieses Versuchs geben die genaue Anzahl an *de novo*-synthetisierten Transkripten in einem Zeitfenster von 30 Minuten an (183). Hierfür wurden Zellkerne mit Biotin markierten Nukleotiden inkubiert, die *de novo*-synthetisierte und somit Biotin markierte RNA isoliert und mittels „real-time“ RT-PCR quantifiziert. In diesem Versuch konnte für das CpG-maximierte Gen (42CpG) eine deutlich erhöhte Neusyntheserate der entsprechenden RNA ermittelt werden. Gegenüber der Neusyntheserate für Transkripte des wildtypischen Gens war für das CpG-maximierte Gen eine Steigerung der Transkriptmenge von 400% zu verzeichnen. Die Anzahl an Transkripten für das CpG-freie MIP-1 α Gen (0CpG) betrug 30% des Wildtyps. Für die kodonoptimierte Version des MIP-1 α Gens konnte eine leicht gesteigerte Syntheserate von 130% der wildtypischen Syntheserate festgestellt werden. Die Daten der Neusynthese für die MIP-1 α Gene wildtyp, 13CpG und 42CpG stimmen mit der densitometrischen Vermessung des Northern Blots und den Daten der „steady-state“ RNA-Quantifizierung mit quantitativer RT-PCR weitestgehend überein. Nur für die CpG-freie Genvariante (0CpG) variieren die Ergebnisse. Während die Neusyntheserate hier noch 30% des Wildtyps beträgt, finden sich bei Analysen der „steady-state“ RNA nur noch 15-20% der Transkripte des Wildtyps. Die ermittelten Mengen an *de novo* RNA korrelieren auch mit den Daten der Proteinexpression, entsprechen ihnen jedoch nicht vollkommen. So wurde durch CpG Maximierung eine Steigerung der Zytokinmenge auf Proteinebene auf bis zu 1500% ermittelt, während die Zunahme an RNA nur 400% betrug. Für die Depletion von CpG Dinukleotiden war das Gegenteil der Fall. Hier war die Abnahme der Proteinexpression auf 5% ausgeprägter als der Rückgang der *de novo* RNA. Da der

genaue Zusammenhang zwischen der RNA- und der Proteinmenge, insbesondere die Frage der Linearität zwischen Transkriptmenge und Proteinexpression, nicht bekannt sind, kann hier keine Aussage über die genauen Hintergründe gemacht werden.

Dennoch zeigen die Ergebnisse einen klaren positiven Zusammenhang zwischen der Anzahl intragenischer CpG Dinukleotide und *de novo*-synthetisierter Transkripte. Die vorliegenden Daten weisen auf einen Einfluss der intragenischen, unmethylierten CpG Dinukleotide auf die transkriptionelle Aktivität des Promotors hin. Zwischen einer gesteigerten Initiationsrate oder einer beschleunigten Elongation der Transkription kann hier nicht unterschieden werden. Mit Chromatin-Immunopräzipitations-Assays (ChIP-Assays) soll künftig die Menge gebundener RNA-Polymerasen am Promotor bestimmen werden. Weiterhin bieten Antikörper, die die Phosphorylierung aktiver Polymerasen an deren carboxyterminaler Domäne (CTD) erkennen, die Möglichkeit, den Aktivierungsstatus der gebundenen Polymerasen aufzuklären (184).

3.4 Beteiligung des CFP1 an der *de novo* RNA-Synthese

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine intragenische Methylierung von CpG Dinukleotiden den nahezu vollständigen Rückgang der transienten Expression verursachte, während unmethylierte CpGs einen positiven Effekt auf die Expression bzw. Transkription ausüben, spielen eventuell Faktoren eine Rolle, die spezifisch unmethylierte CpG Dinukleotide binden und die *de novo* RNA-Synthese beeinflussen. Das kernlokalisierte CpG Binde-Protein (CGBP) aus Tabakpflanzen bindet mit erhöhter Affinität an unmethylierte CpG Dinukleotide (75), das in Säugern vorkommende Protein CFP1 (CXXC finger protein 1; ursprünglich human CpG binding protein (hCGBP)) bindet mit seiner konservierten CXXC-Domäne ausschließlich unmethylierte CpG Dinukleotide. Das 88kDa große CFP1 findet sich hauptsächlich an für Euchromatin typischen Strukturen im Zellkern (76) und ist ein Bestandteil des Set1-Methyltransferase-Komplexes, der an Chromatin-„remodeling“ Prozessen teilnimmt (83). Da CFP1 den genannten Anforderungen der Bindung unmethylierter CpG Dinukleotide und der Transkriptionsaktivierung genügt (77), wird aktuell ein Mitwirken dieses Proteins an der Expressionssteigerung der Zytokingenvarianten vermutet. Bisher wurde die Transkriptionsaktivierung durch CFP1 jedoch nur nach Bindung im Promotor gelegener CpGs gezeigt (77). Da CFP1 selbst aber kein Transkriptionsfaktor ist, kann diese Aktivierung nur auf Interaktionen mit weiteren Proteinen basieren, so dass auch eine Beeinflussung der Transkription durch intragenische CpG Dinukleotide denkbar wäre. Erste vorläufige Versuche hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführt.

3.4.1 Rekombinante Expression der CFP1-Zinkfinger-Domäne

Ist das Protein CFP1 an den beschriebenen Expressionsunterschieden der murinen MIP-1 α Genvarianten beteiligt, sollte eine Bindung der CXXC-Domäne an den offenen Leserahmen der CpG-haltigen Genvarianten erfolgen, wohingegen das Protein nicht mit dem intragenischen Bereich des CpG-freien MIP-1 α -Gens interagieren sollte. Für entsprechende Analysen wurde daher die CXXC-Domäne des humanen CFP1 rekombinant als Glutathion-S-Transferase Fusionsprotein rekombinant in *E.coli* exprimiert und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Neben der erwarteten Bande bei 56kDa für das CFP1-GST-Fusionsprotein trat noch eine weitere Bande bei ca. 45kDa auf, bei der es sich vermutlich um ein Abbauprodukt des Fusionsproteins handelt (Abb.20).

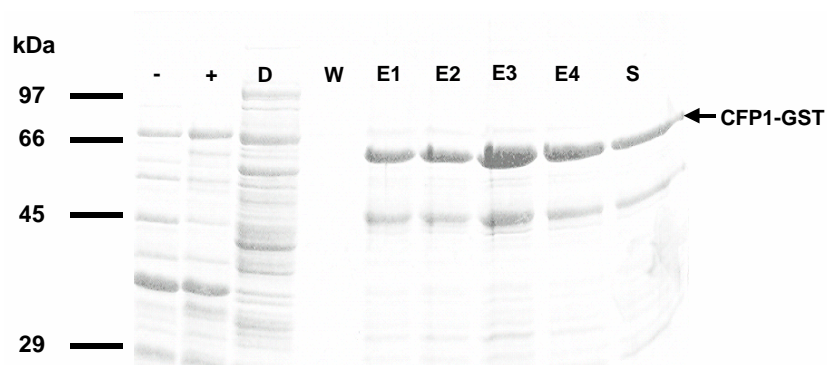


Abb. 20: Heterologe Expression und Affinitätsreinigung des GST-CFP1 Fusionsproteins.

Das Protein CFP1 wurde als Fusionsprotein (56 kDa) mit der Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* heterolog exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie über eine Glutathion-Sepharose gereinigt. 12.5% SDS-Gel, Coomassie-Färbung. -: *E.coli*-Lysat vor Induktion; +: *E.coli*-Lysat nach Induktion; D: Durchlaufraction; W: Waschfraction; E1-E4: Elutionsfraktionen 1-4; S: Aliquot der Sepharose nach Elution;

3.4.2 CFP1-Bindung an die MIP-1 α Nukleinsäuresequenz

Im Weiteren wurden „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) mit dem rekombinanten CXXC-GST-Fusionsprotein und intragenischen DNA-Bereichen der CpG-freien (0CpG) und CpG-reichen (42CpG) MIP-1 α Genvariante durchgeführt. Der gesamte offene Leserahmen der murinen MIP-1 α Genvarianten ohne CpG Dinukleotide (0CpG) und mit maximaler Anzahl an CpG Dinukleotiden (42CpG) wurde daher in einer PCR Reaktion mit jeweils spezifischen Primern amplifiziert. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit dem isolierten GST-CFP1 Fusionsprotein inkubiert und die Proben mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) analysiert. Unter den genannten Bedingungen sollte bei Gegenwart unmethylierter CpGs im Reaktionsansatz eine Bindung des Fusionsproteins an die DNA erfolgen, der sich als „shift“ der DNA zu einem höheren Molekulargewicht ausdrückt. Für die Auswertung des EMSAs wurde das native Polyacrylamidgel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Neben Proben, in denen das CFP1-GST-Fusionsprotein entweder mit dem PCR-Produkt des

CpG-freien murinen MIP-1 α (0CpG) oder des CpG-maximierte Gens (42CpG) versetzt wurde, gab es Reaktionsansätze mit aus der Literatur bekannten DNA Fragmente (77), die sich nur in der Ab- bzw. Anwesenheit eines einzigen CpG Dinukleotides unterschieden (CpG- bzw. CpG+, Abb. 21B). Eine Bindung der Glutathion-S-Transferase alleine an CpG Dinukleotide konnte durch vorangestellte Kontrollen ausgeschlossen werden, so dass eine klare Interpretation der Ergebnisse gewährleistet war (Abb. 21A).

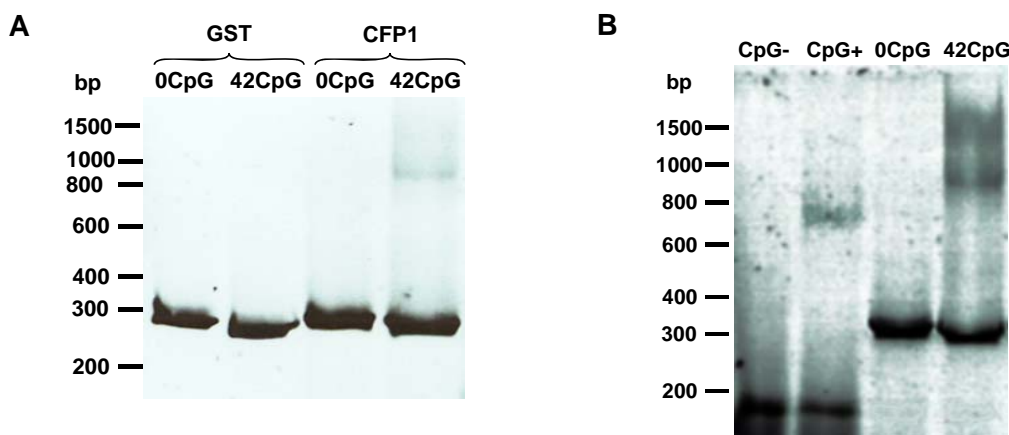


Abb. 21: EMSA-Analyse der Interaktion des CFP1-GST-Fusionsproteins mit den Zytokingenvarianten. (A) DNA Fragmente mit und ohne CpG Dinukleotid wurden mit der als GST-Fusionsprotein rekombinant exprimierten CXXC Domäne des CFP1 Proteins und der GST alleine inkubiert. (B) Bindung der CFP1-CXXC-Domäne an die MIP-1 α -Genvarianten 0CpG und 42CpG, und im Vergleich an Oligonukleotide mit und ohne CpG Dinukleotid. Die Analysen von Interaktionen erfolgten durch elektrophoretische Trennung der Moleküle in einem nativen, 6%igen Polyacrylamidgel, das mit Ethidiumbromid (0.5mg/ml) gefärbt wurde. Aus Gründen der Klarheit wurde eine inverse Darstellung gewählt. GST: Glutathion-S-Transferase; CFP1: CXXC Domäne des humanen CFP1 Proteins als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase; 0CpG: offener Leserahmen des CpG-freien MIP-1 α Gens; 42CpG: offener Leserahmen des CpG-maximierten MIP-1 α Gens; CpG-: DNA-Fragment ohne CpG; CpG+: DNA-Fragment mit einem CpG.

Mit dem „electrophoretic mobility shift assay“ konnte sowohl die Bindung des CFP1 Proteins an das bereits beschriebenen DNA Fragment bestätigt als auch die Bindung an den offenen Leserahmen der Zytokingene gezeigt werden (Abb. 21B). Das CpG-freie DNA Fragment (CpG-) zeigte erwartungsgemäß keine Verlagerung des DNA Signals von 170bp auf ein höheres Niveau, die eine Bindung des Fusionsproteins verursacht hätte. Bei Anwesenheit nur eines einzigen CpG Dinukleotides in einer ansonsten identischen Sequenz (CpG+) ist die Bindung des Fusionsproteins an das DNA Fragment durch ein hochmolekulares DNA Signal bei ca. 700bp gekennzeichnet. Die Bande des DNA-Protein Komplexes war relativ distinkt, da nur die Bindung eines einzigen Proteins pro DNA Molekül möglich ist und somit nur eine Bande aus dem „shift“ der DNA entstehen konnte. Analog zu diesem Ergebnis entstand kein DNA-Protein Komplex bei Inkubation des CpG-freien Zytokingens (0CpG) mit dem Fusionsprotein und eine sehr deutliche Bindung der CFP1-Domäne an das CpG-reiche Gen (42CpG). Letzteres enthält wegen seiner 42 CpG Dinukleotide auch 42 potentielle Bindestellen für das CFP1. Das durch zahlreiche DNA-Protein Interaktionen generierte Signal erscheint daher weniger distinkt, da durch Bindung

einer unterschiedlichen Anzahl von Proteinen die Verschiebung des Signals von 300bp zu höheren Molekulargewichten entsprechend variabel ist (~900-1700bp).

3.4.3 Identifizierung eines CFP1-Homologs in CHO-Zellen

Die Bindung der Zinkfinger-Domäne des humanen CFP1 an CpGs im offenen Leserahmen der Zytokingene und seine Eigenschaft, die Transkriptionsrate zu steigern, könnten eine Erklärung für die beobachteten Expressionsunterschiede nach transienter Transfektion von humanen H1299 Zellen mit den verschiedenen Genvarianten bieten. In den stabilen „chinese hamster ovary“ (CHO) Zellen waren die ungleichen Expressionskapazitäten in einer weit deutlicheren Form zu beobachten, ein CFP1-Homolog in Hamsterzellen wurde bisher dagegen noch nicht nachgewiesen. Entsprechende Untersuchungen sollten aufdecken, ob ein CFP1-Homolog der CHO-Zellen an der Expressionssteigerung involviert sein könnte. Für die Identifizierung eines Hamster CFP1 durch RT-PCR wurden die cDNA-Nukleinsäuresequenzen der bisher bekannten humanen und murinen CFP1-Gene und die vorhergesagte cDNA-Sequenz für ein CFP1 Homolog aus Ratten computergestützt auf Übereinstimmungen hin analysiert. Bereiche, die unter diesen drei Organismen eine besonders hohe Kongruenz aufwiesen, dienten der Erstellung von acht sequenzspezifischen Primern. Diese wurden so gewählt, dass bei vier PCR-Reaktionen ca. 650bp große, sich überlappende Produkte entstanden, die den vollständigen Bereich der cDNA abdeckten. Mögliche Fehler, die durch die unter Umständen artifizielle Sequenz der verwendeten Oligonukleotide eingeführt wurden, konnten durch die Sequenzierung der überlappenden Fragmente korrigiert werden. Mit den beschriebenen Primerpaaren konnte die Expression eines CFP1-Homologs der CHO-Zellen nachgewiesen werden. Die entsprechenden cDNA-Produkte wurden anschließend sequenziert. Die Sequenzierung von ca. 500bp am 5' Ende der cDNA war bis zum Abschluss dieser Arbeit leider nicht möglich. Für die restlichen sequenzierten 1463bp ergab sich eine Homologie des Hamstergens zu den drei bereits bekannten Sequenzen von 95% (siehe 8.2.2.3, Abb. 24). Nach Übersetzung der Nukleinsäuresequenz in Aminosäuren (Abb. 22) zeigt der Vergleich der Aminosäuresequenz des Hamsterproteins mit den CFP1 Sequenzen aus Mensch, Maus und Ratte eine Identität von 99%.

H.sapiens	MEGDGSDLEPPDAG E DSKSENGENAPIYICIRKRPDINCFMIGCDNCNEWFHGDICIRITEKMAKAIREWYC	70
M.musculus	MEGDGSDLEPPDAG D DSKSENGENAPIYICIRKRPDINCFMIGCDNCNEWFHGDICIRITEKMAKAIREWYC	70
R.norvegicus	MEGDGSDLEPPDAG E DSKSENGENAPIYICIRKRPDINCFMIGCDNCNEWFHGDICIRITEKMAKAIREWYC	70
C.griseus		0
H.sapiens	RECREKDPKLEIRYRHK K SRERDGN R D S SEPRDEGGGRKRPVDPN L QRRAGSGTGVGAMLARGSAS P H	140
M.musculus	RECREKDPKLEIRYRHK K CRERDGSERAGSEPRDEGGGRK R PAS D PE L QRRAGSGTGVGAMLARGSAS P H	140
R.norvegicus	RECREKDPKLEIRYRHK K CRERDGSER D SEPRDEGGGRK R PAS D PE L QRRAGSGTGVGAMLARGSAS P H	140
C.griseus		0
CXXC-Domäne		
H.sapiens	KSSPQPLVATPSQH H Q Q Q Q Q IKRSARMCGECEACRRTEDCGHCDFCRDMKKFGGPNKIRQKCRL	205
M.musculus	KSSPQPLVATPSQH H Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q IKRSARMCGECEACRRTEDCGHCDFCRDMKKFGGPNKIRQKCRL	209
R.norvegicus	KSSPQPLVATPSQH H Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q IKRSARMCGECEACRRTEDCGHCDFCRDMKKFGGPNKIRQKCRL	210
C.griseus	ECEACRRTEDCGHCDFCRDMKKFGGPNKIRQKCRL	35
H.sapiens	RQCQLRARES Y KYFPSSLS P VT P SE L PR R RR P LP T Q Q Q P Q S Q K LGRIREDEGAVAS T V K EP E AT A T	275
M.musculus	RQCQLRARES Y KYFPSSLS P VT P SE A L P RR R PP P T Q Q P Q S Q K LGRIREDEGT V LS S V V K E P E AT A T	279
R.norvegicus	RQCQLRARES Y KYFPSSLS P VT P SE A L P RR R PP P T Q Q P Q S Q K LGRIREDEGT V LS S V V K E P E AT A T	280
C.griseus	RQCQLRARES Y KYFPSSLS P VT P SE A L P RR R PP P T Q Q P Q S Q K LGRIREDEGT V LS S V G K E L P EAT A T	105
H.sapiens	PEPLSDEDL L DPDLYQDFCAGAFDD N GLPWMSD T EES P FLDPAL R KRA V KV H VKRRE K SE K KEE R Y	345
M.musculus	PEPLSDEDL L DPDLYQDFCAGAFDD H GLPWMSD A EES P FLDPAL R KRA V KV H VKRRE K SE K KEE R Y	349
R.norvegicus	PEPLSDEDL L DPDLYQDFCAGAFDD H .VPWMSD A EES P FLDPAL R KRA V KV H VKRRE K SE K KEE R Y	349
C.griseus	PEPLSDEDL L DPDLYQDFCAGAFDD H GLPWMSD A EES P FLDP A M R KRA V KV H VKRRE K SE K KEE R Y	175
H.sapiens	KRHRQKQKHDKWKH P ERADAKDPAS L PQCLGPGCV R AA P Q S SKYCSDDCGMKLAANRIYEILPQRIQ Q W	415
M.musculus	KRHRQKQKHDKWKH P ERADAKDPAS L PQCLGPGCV R AA P Q S SKYCSDDCGMKLAANRIYEILPQRIQ Q W	419
R.norvegicus	KRHRQKQKHDKWKH P ERADAKDPAS L PQCLGPGCV R AA P Q S SKYCSDDCGMKLAANRIYEILPQRIQ Q W	419
C.griseus	KRHRQKQKHDKWKH P ERADAKDPAS L PQCLGPGCV H AA P Q S SKYCSDDCGMKLAANRIYEILPQRIQ Q W	245
H.sapiens	QQSPCIAEEHGKLLERIRREQQSAR T RLQEMERRFHE L EAI L RA K Q Q AVREDEESNEGSDDD T DLQ I F	485
M.musculus	QQSPCIAEEHGKLLERIRREQQSAR T RLQEMERRFHE L EAI L RA K Q Q AVREDEE N ENDSDDD T DLQ I F	489
R.norvegicus	QQSPCIAEEHGKLLERIRREQQSAR T RLQEMERRFHE L EAI L RA K Q Q AVREDEE N ENDSDDD T DLQ I F	489
C.griseus	QQSPCIAEEHGKLLERIRREQQSAR T RLQEMERRFHE L EAI L RA K Q Q AVREDEE N ENDSDDD T DLQ I F	315
H.sapiens	CVSCGHPINPRVALRHMER C YAK Y ES Q TSFGSM P TRIEGAT R LFCDVYN P Q S KTYCK R LQ V LCPE H SRD	555
M.musculus	CVSCGHPINPRVALRHMER C YAK Y ES Q TSFGSM P TRIEGAT R LFCDVYN P Q S KTYCK R LQ V LCPE H SRD	559
R.norvegicus	CVSCGHPINPRVALRHMER C YAK Y ES Q TSFGSM P TRIEGAT R LFCDVYN P Q S KTYCK R LQ V LCPE H SRD	559
C.griseus	CVSCGHPINPRVALRHMER C YAK Y ES Q TSFGSM P TRIEGAT R LFCDVYN P Q S KTYCK R LQ V LCPE H SRD	385
H.sapiens	PKVPADEVCGCPLVRD V FELTGDFC R LP K RQ C NR H YC W EKL R RAE V DLER V R V W Y KL D E L F E Q E R N VR T A	625
M.musculus	PKVPADEVCGCPLVRD V FELTGDFC R LP K RQ C NR H YC W EKL R RAE V DLER V R V W Y KL D E L F E Q E R N VR T A	629
R.norvegicus	PKVPADEVCGCPLVRD V FELTGDFC R LP K RQ C NR H YC W EKL R RAE V DLER V R V W Y KL D E L F E Q E R N VR T A	629
C.griseus	PKVPADEVCGCPLVRD V FELTGDFC R LP K RQ C NR H YC W EKL R RAE V DLER V R V W Y KL D E L F E Q E R N VR T A	455
H.sapiens	MTNRAGLLALML H Q T I Q H D PL T DLR S S A D R *	656
M.musculus	MTNRAGLLALML H Q T I Q H D PL T DLR S S A D R *	660
R.norvegicus	MTNRAGLLALML H Q T I Q H D PL T DLR S S A D R *	660
C.griseus	MTNRAGLLALML H Q T I Q H D PL T DLR S S A D R *	486

Abb. 22: Abgleich der Aminosäuresequenz für CFP1 aus vier verschiedenen Organismen. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen für Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*) und Hamster (*Cricetulus griseus*). Aminosäurereste, die in nur zwei der vier Sequenzen identisch sind, sind blau hinterlegt, in drei Organismen konservierte Reste gelb. Nur 19, der für alle vier Organismen bekannten 486 Aminosäuren, sind nicht zu 100% konserviert. Die für die DNA-Bindung essentielle CXXC-Zinkfinger-Domäne ist eingerahmt dargestellt.

3.4.4 Stilllegung der CFP1-Expression in CHO-Zellen

Mit Hilfe der gewonnenen Sequenzinformationen über 1500bp des CFP1 aus *Cricetulus griseus* war es nun möglich, zu überprüfen, ob in den stabilen CHO-Zelllinien der Effekt der CpG Dinukleotide durch dieses Protein vermittelt wird. Fundierte Einblicke könnten CHO-Zellen geben, die zum einen die verschiedenen MIP-1 α -Varianten stabil exprimieren und bei denen zum anderen die Expression des CFP1 durch einen „knock-out“ abgeschaltet wird. Die Etablierung solcher CFP1^{-/-} „knock-out“ Zelllinien erfordert jedoch ein sehr aufwendiges Selektionsverfahren und ist für erste Analysen zu komplex. Leichter

lässt sich die Herabsetzung der CFP1-Expression durch so genannte „small interfering“ RNAs (siRNAs) herbeiführen. siRNAs sind 21-28 Nukleotide lang und entstehen in eukaryontischen Zellen durch Spalten doppelsträngiger RNA durch das Enzym Dicer. Diese RNA-Fragmente interagieren mit dem Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) und binden komplementär an ihre Ziel-mRNA, wobei diese dann von RISC degradiert wird. Ursprünglich für den physiologischen Abbau zellulärer oder fremder RNA in der Zelle entstanden, ermöglicht diese Methode der Expressionsverringering („knock-down“) gezielte Analysen zur Funktion eines Proteins.

In dieser Arbeit wurde die Information für die Sequenz und Bildung Hamster CFP1-spezifischer siRNAs in Form von DNA in den shRNA-Expressionsvektor pRNAT-U6.1/Neo (Genscript) eingebracht, der zudem eine GFP-Expressionskassette besaß. Voraussetzung für die Funktionalität der abgelesenen RNA als siRNA ist die so genannte „short hairpin“ Sekundärstruktur. Nur in dieser Form kann die shRNA über Interaktionen mit Dicer und RISC spezifisch die Translation eines bestimmten Proteins verhindern. Für den „knock-down“ von CFP1 in Hamsterzellen wurden auf Basis der gewonnenen Sequenzinformation vier shRNAs für die Bindung an verschiedene Positionen der mRNA entworfen, sowie zu Kontrollzwecken eine shRNA gegen das vektorkodierte GFP und eine nicht funktionale shRNA. Im Anschluss wurden CHO-Zellen transient mit den Konstrukten transfiziert. Für jedes transfizierte Konstrukt wurde aus einem Teil der Zellen RNA isoliert, um über „real-time“ RT-PCR die CFP1 Transkriptmenge zu bestimmen, während die verbleibenden Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der vektorvermittelten GFP Expression untersucht wurden. Die zeitgleiche Bestimmung von Transfektionseffizienz und CFP1 Transkripten sollte Rückschlüsse auf die „knock-down“-Effizienz der einzelnen shRNAs erlauben. Die effizienteste shRNA sollte anschließend für die Transfektion der stabil murines MIP-1 α exprimierenden Zelllinien eingesetzt werden, um den Beitrag von CFP1 zur Transkriptionssteigerung zu bewerten. Die Quantifizierung der CFP1 mRNA zeigte jedoch gegenüber untransfizierten Zellen für keine der vier shRNAs eine signifikante Verringerung des Transkriptgehalts, welcher immer zwischen 90 und 110% der CFP1-Transkriptmenge der Kontrollzellen betrug (Abb. 23). Dies ist dabei vermutlich nicht auf die mangelhafte Funktionalität der shRNAs, sondern vielmehr auf die geringen Transfektionseffizienzen des shRNA-kodierenden Plasmides in die CHO-Zellen zurückzuführen. Die Verarbeitung der Durchflusszytometriedaten ergab für wiederholte Transfektionen der shRNA-Vektoren stets eine Effizienz von nur 15-20% positive Zellen. Für die Interpretation der Ergebnisse ist zudem von Bedeutung, dass shRNAs nicht zur vollständigen Genstilllegung führen, sondern nur zu einer Herunterregulierung der Expression. Bei einer Transfektionseffizienz von 20% exprimieren noch 80% der Zellen CFP1 mit unveränderter Aktivität, so dass für eine so geringe Transfektionseffizienz keine

Bewertung über die Wirksamkeit einzelner shRNAs erfolgen konnte. Es kann somit keine eindeutige Aussage zur Beteiligung des CFP1 Proteins an den beobachteten Effekten der gesteigerten Expressionsrate durch intragenische CpG Dinukleotide getroffen werden.

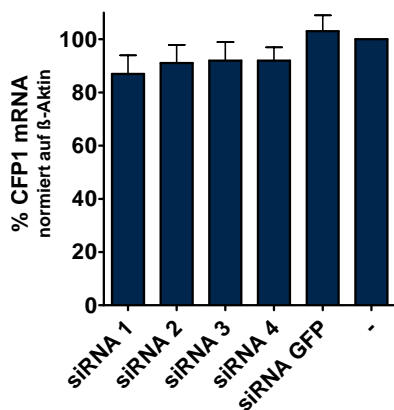


Abb. 23: Quantifizierung der CFP1 Transkriptmenge nach Transfektion von shRNAs mit „real-time“ PCR.

CHO-Zellen wurden mit den Konstrukten für die siRNA transfiziert. Nach Isolierung der RNA und reverser Transkription wurde in „real-time“ PCR-Analysen die Menge an CFP1 Transkripten ermittelt. Die Daten wurden auf die CFP1-Transkriptmenge nicht-transfizierter Zellen (100%) bezogen. Fehlerbalken geben Abweichungen zweier unabhängiger Experimente an.

Neben der Anwendung spezieller Transfektionsreagenzien zur Steigerung der Transfektionseffizienz, sollte zukünftig die Transfektion mit synthetisch hergestellten siRNAs zu einer verbesserten Aufnahme durch die Zellen führen. Des Weiteren könnten diese Studien in anderen Zelltypen, wie z.B. 293T Zellen, durchgeführt werden, die eine bessere Aufnahme des shRNA-Plasmids gewährleisten.

3.5 Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CpG Dinukleotiden innerhalb der kodierenden Region des murinen MIP-1 α -Gens auf die *in vitro* Expression des Genproduktes untersucht. Die Studien zeigten, dass mit der Anzahl intragenischer CpG Dinukleotide auch die Expressionsleistung zunimmt. Dieser Effekt konnte bis zur Ebene der *de novo* RNA-Synthese zurückverfolgt werden. Weitere Arbeiten in der Arbeitsgruppe wiesen vergleichbare Ergebnisse für das HIV-Kapsidgen p24, das humanisierte GFP und das murine Erythropoietin auf (159;160). Alle bisher untersuchten Transgene befanden sich jedoch unter Kontrolle des CMV Promotors. Ob es sich folglich um ein CMV-spezifisches oder um ein allgemein gültiges Resultat handelt, wird derzeit durch transiente Transfektionen der MIP-1 α Genvarianten unter Kontrolle eines weiteren Polymerase II-Promotors geprüft. Ergebnisse liegen jedoch bisher noch nicht vor. Die Etablierung von stabil MIP-1 α exprimierenden Zellen, deren Transgen unter Kontrolle des EF-1 α -Promotor steht, könnte Aufschluss über Gen-Regulationsmechanismen geben, da es sich um einen endogenen Promotor eines Haushaltsgens handelt, der nicht derselben extensiven Methylierung unterliegt wie der CMV Promotor (185). Weiterhin ist die konstant hohe Expression der Zytokingene innerhalb der stabilen Zelllinien mutmaßlich auf den ständigen Selektionsdruck zurückzuführen, der auf die Zellen ausgeübt wurde. Die

Beobachtung von epigenetischen Langzeitmechanismen soll folglich durch parallele Kultivierung von stabilen Zelllinien mit und ohne Selektionsdruck und deren regelmäßige Überprüfung auf Zytokinexpression und Methylierungsstatus erfolgen. Unabhängig von der Wahl des Promotors muss ferner eine mögliche Beteiligung des CFP1-Proteins an der Steigerung der *de novo* RNA-Syntheserate geprüft werden. Der vollständige „knock-out“ des CFP1 würde sicherere Angaben zur Beteiligung dieses Proteins erlauben, doch müssen derartige Versuche in Zellkultur erfolgen, da der Genotyp CFP1^{-/-} z.B. für Mausembryonen letal ist (84). Ob die Interaktion des CFP1 Proteins mit den intragenischen CpG Dinukleotiden direkter oder indirekter Natur ist, kann durch den „knock-down“ nicht geklärt werden. Dieser Fragestellung soll jedoch mit Chromatin-Immunopräzipitationsstudien nachgegangen werden.

Für den Fall einer CFP1 Beteiligung an CpG-abhängigen Transkriptionsereignissen ist eine Expressionssteigerung durch Auflockerung der Chromatinstruktur denkbar. CFP1 ist Bestandteil des Set1 Komplexes, der maßgeblich an der Methylierung von Histonen und der Modifikation der Chromatinstruktur beteiligt ist (186). Die Set1 vermittelte Methylierung des Lysin 4 am Histon 3 ist charakteristisch für transkriptionell aktive Gene im Euchromatin (187). Die gelockerte Struktur des Euchromatins erleichtert im Folgenden die Bindung von allgemeinen Transkriptionsfaktoren an ihre Zielsequenzen und ermöglicht so eine Steigerung der *de novo* Syntheserate für die jeweiligen Gene. Ob eine Auflockerung der Chromatinstruktur auch im vorliegenden Fall die detektierten Expressionsunterschiede bedingt, wird bereits durch Untersuchung der Nukleosomendichte des betreffenden DNA- bzw. Promotor-Abschnittes, sowie durch Bestimmung der Nukleosomenaffinität an die murinen MIP-1 α Genvarianten geklärt. Diese Analysen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Der genaue Beitrag des Set1 Komplexes und insbesondere des CFP1 an expressionsverändernden Mechanismen ist bisher nicht bekannt. Zwar existiert ein CFP1 Ortholog in *Saccharomyces cerevisiae*, doch besitzt dieses, vermutlich wegen der fehlenden Cytosin-Methylierung der Hefen, keine CXXC-Domäne für eine Bindung an DNA (188). Bekannt ist, dass Säuger-CFP1 essentiell für die Embryogenese und eine normale Cytosin-Methylierung ist (189). Ferner scheint CFP1 innerhalb des Set1 Komplexes die Expression CpG-haltiger Gene nicht einfach zu steigern, sondern vielmehr zu regulieren (83). Weitere Funktionen des CFP1 im Kontext anderer H3-Lys4 Methyltransferase-Komplexe von höheren Organismen wurden bisher nicht untersucht, kommen aber ebenfalls als Ursache für die in dieser Arbeit beobachteten Effekte in Frage. Solche Interaktionspartner des CFP1 könnten z.B. durch das „yeast two-hybrid“ System oder Ko-Immunopräzipitationsassays identifiziert werden, wobei letzteres die Herstellung eines Antikörpers gegen das CFP1 Protein aus Hamster voraussetzt.

Trotz der weiterhin unbekanntenen Mechanismen, die zu einer stark verbesserten Expression nach CpG Maximierung von Gene führen, bietet diese intragenische Modifikation eine effiziente Möglichkeit, die rekombinante Expression von z.B. therapeutisch relevanten Proteinen zu steigern.

4. Zusammenfassung

Das stetig zunehmende Wissen um die Struktur und Funktion von Zytokinen, insbesondere ihrer immunmodulierenden Eigenschaften weckten das Interesse an deren therapeutischer Applikation. Der daraufhin ständig steigende Bedarf an rekombinanten Zytokinen erfordert daher effiziente Strategien für eine optimale, eukaryontische Expression. Um den Gefahren der Genstilllegung durch Methylierung von CpG Dinukleotiden zu entgehen, wurden bisher CpG-freie Varianten des jeweiligen Gens für die Expression eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel des murinen MIP-1 α , als biotechnologisch relevantes Protein, der Einfluss von CpG Dinukleotiden auf die Expression genauer untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die wildtypische Nukleinsäuresequenz des murinen MIP-1 α modifiziert. Neben einem kodonoptimierten Gen wurden ein CpG-freie sowie eine CpG-maximierte Genvariante hergestellt. Anhand dieser vier Genvarianten konnte im Folgenden gezeigt werden, dass intragenische CpG Dinukleotide einen positiven Einfluss auf die Expression ausüben, während die CpG Depletion zu starken Expressionsverlusten führt. Dieser Zusammenhang zwischen CpG Dinukleotiden und Expression konnte sowohl für die transiente wie auch für die stabile Expression des Zytokines beobachtet werden, wobei für alle Genvarianten die gleiche Translationseffizienz ermittelt wurde. Ferner konnte gezeigt werden, dass der CpG-vermittelte Effekt in stabil MIP-1 α exprimierenden Zellen bereits auf Ebene der „steady-state“ RNA im Zellkern und im Zytoplasma nachzuweisen ist. Ein ungleicher Export der mRNA-Varianten aus dem Zellkern, unerwartete Spleißereignisse oder eine veränderte RNA-Stabilität konnten für die divergierenden RNA-Niveaus nicht verantwortlich gemacht werden. Die Analyse der *de novo* RNA-Syntheserate mittels „nuclear run-on“ Assay offenbarte eine direkte und positive Korrelation zwischen der Anzahl intragenischer CpG Dinukleotide und einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität. Transiente Transfektionen *in vitro* methylierter Plasmide sowie die Bestimmung des Methylierungsstatus der stabilen Zelllinien ergab darüber hinaus, dass nur unmethylierte CpG Dinukleotide diesen Effekt vermitteln. Für das Protein humanes CFP1 wurde bereits beschrieben, dass es ausschließlich an unmethylierte CpG Dinukleotide bindet und daraufhin die Transkription aktiviert. Die Existenz eines Homologs in den stabilen CHO-Zelllinien, sowie die Interaktion der DNA-bindenden Domäne des humanen CFP1 mit der CpG-maximierten Zytokingenvariante konnten in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Der Beitrag des CFP1 Proteins wurde durch shRNA-Transfektionen überprüft, es konnte jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden.

In dieser Arbeit konnte der positive Einfluss unmethylierter CpG Dinukleotide auf die Expression eines Transgens, am Beispiel des murinen MIP-1 α , klar dargelegt werden. Für die Entwicklung effizienter eukaryontischer Expressionssysteme sollte daher künftig auch die intragenische CpG Maximierung des zu exprimierenden Gens in Erwägung gezogen werden.

5. Material

5.1 Organismen

5.1.1 Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Beschreibung
H1299	<i>Homo sapiens</i>	p53-negative Lungenkarzinomzellen (ATCC: CRL-5803; (190))
293T	<i>Homo sapiens</i>	Ad5/SV40 (T) transformierte Nierenepithelzellen (ATCC: CRL-11268; (191))
CHO Flp-In	<i>Cricetulus griseus</i>	basiert auf den "Chinese hamster ovary" Zellen CHO-K1 ((192); ATCC: CCL-61; Invitrogen: R758-07)

5.1.2 Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung
DH5 α	(f- <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR1</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi1</i> <i>relA1</i>)
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> <i>nupG</i> /pMON14272 / pMON7124
BL21 (DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>rB</i> - <i>mB</i> -) <i>dcm</i> + <i>Tetr</i> <i>gal</i> (DE3) <i>endA</i>

5.2 Medien

Medium	Zusammensetzung
LB ₀ (Luria Bertani)	1% Bacto-Trypton 0.5% Hefe Extrakt 1% NaCl mit NaOH ad pH 7.0, autoklavieren
LB _{Amp}	100 μ g/ml Ampicillin in sterilem LB ₀
Plattenmedium	jeweiliges Medium mit 1.5% Agar

5.3 Kitsysteme

Kit	Verwendung	Bezugsquelle
CCL3/MIP-1 alpha DuoSet Human	ELISA	R&D
CCL3/MIP-1 alpha DuoSet Mouse	ELISA	R&D
DIG RNA Labeling Mix	Sondenmarkierung	Roche
EpiTect Bisulfite Kit	Bisulfitkonversion	Qiagen
OptEIA Human GM-CSF ELISA Set	ELISA	BD
OptEIA Mouse GM-CSF ELISA Set	ELISA	BD
QIAamp DNA Mini Kit	gDNA Isolierung	Qiagen
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	pDNA Isolierung	Qiagen
QIAGEN Plasmid Midi Kit	pDNA Isolierung	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarose	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR	Qiagen
Riboprobe <i>in vitro</i> Transcription Kit	Herstellung von RNA-Sonden	Promega
RNeasy Mini Kit	RNA Isolierung	Qiagen

5.4 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
AP-Färbelösung	100mM Tris/HCl pH 9.5 50mM MgCl ₂ 100mM NaCl
APS	10% Ammoniumperoxidsulfat in H ₂ O
Bindepuffer	10mM Tris/HCl pH 7.5 1mM EDTA 2M NaCl
Coomassie Blue	0.1% Coomassie Brilliant Blue (w/v) 50% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)
Coomassie-Entfärbelösung	20% Methanol (v/v) 15% Essigsäure (v/v)
Detektionspuffer pH 9.5	100mM Tris/HCl pH 9.5 100mM NaCl
DNA-Probenpuffer (6x)	0.001% Bromphenolblau (w/v) 0.001% Xylencyanol (w/v) 50mM EDTA pH 8.0 30% Glycerin (w/v)

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Denhardt's (100x)	2% Ficoll 400 (w/v) 2% Polyvinylpyrrolidon K30 (w/v) 2% BSA (w/v)
Elutionspuffer	20mM reduziertes Glutathion 100mM Tris/HCl pH 8.0 150mM NaCl 1mM EDTA
Fixierlösung	2% Formaldehyd 0.2% Glutaraldehyd in PBS
Formaldehyd-Ladepuffer (6x)	0.25% Bromphenolblau (w/v) 0.25% Xylencyanol (w/v) 1mM EDTA pH 8.0 50% Glycerin (w/v)
Glycerinpuffer	50mM Tris/HCl pH 8.3 5mM MgCl ₂ 0.1mM EDTA 40% Glycerin
HeBs-Puffer (2x)	280mM NaCl 10mM Glukose 1mM KCl 40mM HEPES 1.1mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.0
Hochsalzpuffer (10x)	250mM Tris/HCl pH 8.5 2.5M NaCl
Hybridisierungspuffer	3M NaCl 200mM NaH ₂ PO ₄ 20mM EDTA + DIG-Sonde
Karbonatpuffer pH 9.0	5mM Na ₂ CO ₃ 45mM NaHCO ₃
Lysepuffer	0.5% NP-40 10mM Tris/HCl pH 7.4 3mM MgCl ₂ 10mM NaCl 150mM Succrose
Maleinsäurepuffer pH 7.5	100mM Maleinsäure 150mM NaCl

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Methylenblau-Färbelösung	0.03% Methylenblau (w/v) 0.3M Na-Acetat
MOPS-Laufpuffer (5x)	100mM MOPS 40mM Na-Acetat 5mM EDTA pH 8.0
NETN-Lysepuffer	0.5% Nonidet P-40 20mM Tris/HCl pH 8.0 100mM NaCl 1mM EDTA
PBS	7mM Na ₂ HPO ₄ 3mM NaH ₂ PO ₄ 130mM NaCl
PBS-T	PBS mit 0.5% Triton X-100
Ponceau-S-Lösung	2% Ponceaurot in 3% Trichloressigsäure (TCA)
Prä-Hybridisierungspuffer pH 7.4 (20x)	3M NaCl 200mM NaH ₂ PO ₄ 20mM EDTA + tRNA
Probenpuffer nach Laemmli (6x)	300mM Tris/HCl pH 6.8 12% SDS (w/v) 60% Glycerin (w/v) 10% Mercaptoethanol (v/v) 0.025% Bromphenolblau
RIPA-Puffer (Radioimmunoprecipitation analysis)	50mM Tris/HCl pH 8.0 150mM NaCl 0.1% SDS (w/v) 1% Nonidet P-40 (w/v) 0.5% Natriumdesoxycholat (w/v)
SDS-PAGE-Puffer nach Laemmli (5x)	3% Tris 14.4% Glycin 0.1% SDS
SSC pH 7.0 (20x)	3M NaCl 300mM Na-Citrat
TBE-Puffer (10x)	1M Tris 1M Borsäure 20mM EDTA pH 8.0

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
TBS (tris buffered saline)	150mM NaCl 50mM Tris/HCl pH 7.5
Transferpuffer pH 8.3	0.3% Tris 1.45% Glycin 20% Methanol 0.2% SDS
Transkriptionspuffer	200mM KCl 20mM Tris/HCl pH 8.0 5mM MgCl ₂ 4mM DTT je 4mM ATP, GTP und CTP 200mM Succrose 20% Glycerin
Trypanblau-Lösung	0.5% Trypanblau
TTBS	0.05% Tween-20 in TBS
Waschpuffer	100mM Tris/HCl pH 8.0 150mM NaCl 1mM EDTA
X-Gal-Färbelösung	4mM Ferricyanid 4mM Ferrocyanid 2mM MgCl ₂ 5% X-Gal (20mg/ml in Dimethylsulfonamid (DMSO))
X-Gal Stock	20mg/ml in DMSO

5.5 Plasmide

Plasmid	Cat. No.	Bezugsquelle
pcDNA3.1 (+)	V790-20	Invitrogen
pcDNA5/FRT	V6010-20	Invitrogen
pOG44	V6005-20	Invitrogen
pPCR-Script Amp	211188	Stratagene
pRNAT-U6.1/Neo	SD1211	GenScript Corporation
pIRES2-EGFP	6029-1	Clontech
pGL2-Basic	E1641	Promega

5.6 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Annealing
BGH-fwd	CTCGAGCATGCATCTAGAGG	50°C
BGH-rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	47°C
T7-Promoter-fwd	TTAATACGACTCACTATAGGG	45°C
T7-BGH-rev	TAATACGACTCACTATAGGGGGAAAGGACAGTGGGAGTGG	72°C
CMV-Bis-5-fwd	TTGTATGAAGAATTTGTTTAGGG	48°C
CMV-Bis-5-rev	TAATACCAAACAACTCCCAT	48°C
CMV-Bis-3-fwd	TTTATGGGATTTTTTTATTTGGT	49°C
CMV-Bis-3-rev	TACAAAATTCACCACACTAAA	47°C
CpG-pos (upper)	CTATGCTTCTTCTCCGGTGAGGAAATGAAAACAGCAG	72°C
CpG-pos (lower)	CTGCTGTTTTTCATTTCTCACCGGAAGAAGAAGCATAG	72°C
CpG-neg (upper)	CTATGCTTCTTCTCCAATGAGGAAATGAAAACAGCAG	69°C
CpG-neg (lower)	CTGCTGTTTTTCATTTCTCATTGGAAGAAGAAGCATAG	69°C
hamsterCGBP1-fwd	ATGGAAGGAGATGGCTCAGACC	56°C
hamsterCGBP-1-rev	CGGCACTTCTGCCGGATC	56°C
hamsterCGBP-2-fwd	AGCTCGGATGTGTGGTGAGTG	55°C
hamsterCGBP-2-rev	GCCCTCTCTGGGTGTTTCCA	56°C
hamsterCGBP-3-fwd	AAGAAGTCTGAGAAGAAGAAGGAGGAG	56°C
hamsterCGBP-3-rev	CACAGAAGAGTCGGGTAGCCC	55°C
hamsterCGBP-4-fwd	TGCCTTGCGTCACATGGAG	55°C
hamsterCGBP-4-rev	TCAGCGGTCCGCACTAGAG	52°C
hamCGBP3-LC-fwd	GAGTGCCCGAACCCGTCTT	56°C
hamCGBP3-LC-rev	GTAGCCCCTTCAATGCGTGTG	57°C
Hygro-LC-fwd	CTGGAGCGAGGCGATGTTC	55°C
Hygro-LC-rev	CTGCGGGCGATTTGTGTAC	54°C
mMIP-wt-fwd	ATGAAGGTCTCCACCACTGC	51°C
mMIP-wt-rev	TCATGAAGACTAGGCATTCAGTTC	52°C
mMIP-0CpG-fwd	ATGAAGGTGAGCACAACAGCTC	53°C
mMIP-0CpG-rev	TCATGAAGACTAGGCATTCAGCT	53°C
mMIP-0CpG-LC-fwd	GGTGAGCACAACAGCTCTGG	53°C
mMIP-0CpG-LC-rev	CTAGGCATTCAGCTCCAGGTC	53°C
mMIP-13CpG-fwd	ATGAAGGTGAGCACACAGCT	54°C
mMIP-13CpG-rev	TCATGAAGACTAGGCGTTCAGC	54°C
mMIP-42CpG-fwd	ATGAAGGTGTCGACGACCG	53°C
mMIP-42CpG-rev	TCATGAAGACTACGCGTTCAGTT	53°C
pc5-763-bis-fwd	TATTGATGTAATGGGTGGTAGGTGTG	57°C
pc5-1213-bis-rev	CTTCCCAATCCTCCCCCTTACT	56°C
pc5-871-bis- α -fwd	CTCACTATAAAAAACCCAACTAAC	50°C
pc5-1119-bis- α -rev	TTAGGAAAGGATAGTGGGAGTGGT	54°C

Oligonukleotide mit Restriktionsschnittstellen		
mMIP-wt-NotI-fwd	TGCGGCCGCATGAAGGTCTCCAC	69°C
mMIP-0CpG-NotI-fwd	TGCGGCCGCATGAAGGTGAGCAC	69°C
mMIP-13CpG-NotI-fwd	TGCGGCCGCATGAAGGTGAGCAC	
mMIP-42CpG-NotI-fwd	TGCGGCCGCATGAAGGTGTCGAC	69°C
mMIP-wt-EcoRI-rev	GGAATTCTCATGAAGACTAGGCATTCAGTTCC	64°C
mMIP-0CG-EcoRI-rev	GGAATTCTCATGAAGACTAGGCATTCAGCTCC	66°C
mMIP-13CG-EcoRI-rev	GGAATTCTCATGAAGACTAGGCGTTCAGCT	64°C
mMIP-42CG-EcoRI-rev	GGAATTCTCATGAAGACTACGCGTTCAGTTCCG	67°C
Oligonukleotide für die Herstellung von shRNAs		
Nr. 1	s	GATCCCGTCGATGCCGTTTATATCTCTTGGATATCCGGAGAGATATAAACGGCATCGATTTTTTCCAAA
	αs	AGCTTTTGGAAAAATCGATGCCGTTTATATCTCTCCGGATATCAAGAGAGATATAAACGGCATCGACGG
Nr. 2	s	GATCCCGTTGGTCATGGCTGTGCGAACATTGATATCCGTGTTTCGCACAGCCATGACCAATTTTTTCCAAA
	αs	AGCTTTTGGAAAAATTGGTCATGGCTGTGCGAACACGGATATCAATGTTTCGCACAGCCATGACCAACGG
Nr. 3	s	GATCCCATGGCTGTGCGAACATTACGTTTATATCCGACGTAATGTTTCGCACAGCCATTTTTTCCAAA
	αs	AGCTTTTGGAAAAATGGCTGTGCGAACATTACGTCGGATATCAAACGTAATGTTTCGCACAGCCATGG
Nr. 4	s	GATCCCGCAATACTTAGAACCAGGCTGGTTGATATCCGCCAGCCTGGTTCTAAGTATTGTTTTTCCAAA
	αs	AGCTTTTGGAAAAACAATACTTAGAACCAGGCTGGCGGATATCAACCAGCCTGGTTCTAAGTATTGCGG
Nr. 5	s	GATCCCGCAATACTCAGAGCCATGATGGTTGATATCCGCCATCATGGCTCTGAGTATTGTTTTTCCAAA
	αs	AGCTTTTGGAAAAACAATACTCAGAGCCATGATGGCGGATATCAACCATCATGGCTCTGAGTATTGCGG
Nr. 6	s	GATCCCGCATCCTCCTTGAAATCGGTGCTTATATCCGGCACCGATTTCAGGAGGATGTTTTTCCAAA
	αs	AGCTTTTGGAAAAACATCCTCCTTGAAATCGGTGCCGGATATCAAGCACCGATTTCAGGAGGATGCGG

s: sense; αs: anti-sense

5.7 Chemikalien, Enzyme und Materialien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von SIGMA (Deisenhofen), FLUKA CHEMIE (Buchs, CH), Roth (Karlsruhe) oder MERCK (Darmstadt) in der Reinheitsstufe *pro analysis* bezogen. Abweichende Herstellerfirmen verwendeter Reagenzien, Enzyme und Chemikalien werden an entsprechender Stelle genannt.

5.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien mit den entsprechenden Herstellern sind an den jeweiligen Stellen im Text vermerkt.

6. Methoden

6.1 Kulturhaltung

6.1.1 Eukaryontische Zellen

6.1.1.1 Kultivierung

Sämtliche für die Kulturhaltung notwendigen Reagenzien wurden von PAN Biotech (Aidenbach) oder Invitrogen (GIBCO, Karlsruhe) bezogen und waren auf Zellkultureignung getestet. Kulturgefäße für Zellen stammten von Greiner (Frickenhäusen) oder BD Biosciences.

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO₂ herangezogen. Für die Kultivierung der adhärennten eukaryontischen Zelllinien 293T und H1299 wurde Dullbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, PAN, Heidenheim), Penicillin (100U/ml, PAN, Heidenheim) und Streptomycin (100µg/ml, PAN, Heidenheim) verwendet.

Die Anzucht der CHO Flp-In Zellen erfolgte in Ham's F12 Medium (Invitrogen) mit 2mM L-Glutamin (PAN) und zusätzlich 100µg/ml Zeocin (Invitrogen).

Für die Subkultivierung wurden adhärennte Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA Lösung (0.25% Trypsin, Invitrogen) vom Boden der Kulturschale gelöst. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert (300g, 5 min) und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Ein Zehntel dieser Suspension wurde in ein neues Kulturgefäß überführt, und mit ausreichend Medium versehen.

6.1.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Nach einer 1:1 Verdünnung von 50µl einer Zellsuspension mit 0.5% Trypanblau wurde die Anzahl vitaler Zellen unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe) bestimmt.

6.1.1.3 Transiente Transfektion

Die transiente Expression rekombinanter Proteine in eukaryontischen Zellen wurde in der Regel durch Transfektion eukaryontischer Expressionsplasmide auf der Basis von pcDNA3.1-Vektoren (Invitrogen) erzielt. Die Expression der in den Polylinker inserierten Fremdgene stand hierbei entweder unter der Kontrolle des konstitutiven CMV immediate early Promotors (CMV, human cytomegalie virus) oder des konstitutiven SV40-early Promotors (SV40, Simian Virus 40). Die Polyadenylierung der Transkripte wurde durch

eine BGHpolyA-Signalsequenz (BGH, bovine growth hormone) initiiert. Zur transienten Expression der Proteine in eukaryontischen Zellen wurden diese in 6-well Platten (\varnothing 3 cm) ausgesät (3×10^5 - 5×10^5 Zellen / 3 ml Medium), 24 h kultiviert und mittels der Kalziumphosphat-Präzipitation Technik (193) mit dem jeweiligen eukaryontischen Expressionsplasmid transfiziert. Hierzu wurden je 15 μ g DNA mit 30 μ l 2,5M CaCl_2 in einem Volumen von 300 μ l H_2O vereint und das Gemisch tropfenweise unter leichtem Vortexen zu 300 μ l 2xHeBs pipettiert. Nach einer Inkubation von 20 min (Raumtemperatur) wurde der Transfektionsansatz (600 μ l) gleichmäßig auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde nach 8-16 h abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. In der Regel wurden die Zellen bzw. der Zellkulturüberstand 48 h nach Transfektion geerntet. Für Transfektionen in kleineren Kulturschalen wurden die eingesetzten Mengen entsprechend verringert.

6.1.1.4 Herstellung stabiler Zelllinien

Für die Herstellung stabiler CHO-Zellen wurde das Flp-In System (Invitrogen) verwendet. CHO-Zellen tragen stabil integriert ein lacZ-Zeocin Fusionsgen unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Eine FRT-Stelle nach dem SV40 Promotor und dem ATG-Startkodon dient als Bindungs- und Insertionsstelle für die Rekombinase. Der pcDNA5/FRT Expressionsvektor (5.1 kb) enthält ebenfalls eine FRT-Stelle. Bei Ko-Transfektion dieses Vektors mit dem pOG44 Flp-Rekombinase Expressionsplasmid in Flp-In Säugerzellen wird das Transgen durch homologe Rekombination gezielt in das Genom der Wirtszelle integriert. Zur Selektion stabil transfizierter Zellklone enthält der pcDNA5/ FRT Vektor ein Hygromycin B-Resistenzgen.

Zur stabilen Transfektion von CHO-Zellen mittels Kalziumphosphat wurden je 15 μ g Gesamt-DNA eingesetzt, wobei das Verhältnis der Plasmide pOG44 zu pcDNA5/FRT 9:1 betrug. Die Transfektion wurde analog zum Reaktionsansatz der transienten Transfektion vorbereitet. Anschließend wurde die Transfektionsmischung auf die Zellen (3×10^5 Zellen / 3ml Medium) gegeben. Nach einer Inkubation von 8-10 h wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen wurden weiter kultiviert. Nach Transfektion der eukaryontischen CHO Flp-In Zellen wurden die positiven Klone durch Zugabe von Hygromycin B (Invitrogen) selektioniert, wobei die Konzentration wöchentlich von 50 μ g/ml in Schritten zu 50 μ g auf 500 μ g/ml Medium gesteigert wurde.

6.1.1.5 X-Gal-Färbung

Die X-Gal-Färbung wurde durchgeführt, um den Selektionsstatus der transfizierten CHO-Zellen zu überprüfen.

Die mit dem pFRT/lacZeo hergestellte Flp-In-Wirtszelllinie enthält ein LacZ-Zeocin-Fusionsgen unter der Kontrolle des SV 40 Promotors. Dieses setzt sich aus einer

Zeocinresistenzkassette und dem β -Galaktosidasegen (*lacZ*) aus *E. coli* zusammen. Durch die Ko-Transfektion der pcDNA5/FRT-Konstrukte mit dem Plasmid pOG44- und der resultierenden homologen Rekombination verliert das LacZ-Zeocin-Fusionsgen seine Funktionalität. Transfizierte Zellen können daher mit Hilfe des chromogenen Substrates 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden, da letztere durch die Spaltung des Substrates X-Gal eine im Lichtmikroskop sichtbare Blaufärbung annehmen.

Hierzu wurden 1×10^6 Zellen in ein 15ml Falcon überführt, 5 min bei 300g pelletiert und mit PBS gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellpellets in 3ml Fixierlösung resuspendiert und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 12ml PBS wurden die Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 300g) und 3x mit PBS gewaschen, um die Reste der Fixierlösung vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden in 3 ml Färbelösung aufgenommen und für 4-6 h bei 37°C inkubiert. Waren in der Positivkontrolle nahezu alle Zellen blau eingefärbt, wurde die Färbereaktion durch einmaliges Waschen mit PBS gestoppt. Die blauen Zellen wurden im Lichtmikroskop ausgezählt.

6.1.2 Prokaryontische Zellen

Für Klonierungen und zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* K12-Stamm DH5 α (f- *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR1* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi1* *relA1*) (194) verwendet. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C auf LB₀-Agarplatten oder in LB (*Luria Bertani*) –Flüssigmedium. Zur Selektion positiver Transformanten wurden dem Medium Ampicillin (100 μ g/ml) zugesetzt bzw. LB_{Amp}-Platten verwendet.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 RNA-Methoden

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurden für die Arbeiten mit RNA ausschließlich sterile, gestopfte Pipettenspitzen (Biozym, Hessisch Oldendorf) sowie sterile Plastikpipetten (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Alle Apparaturen und Gefäße wurden vor ihrer Nutzung mit 0,2M NaOH gereinigt. Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem H₂O hergestellt und durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert. Dazu wurde 1ml/l DEPC (SIGMA, Deisenhofen) zugegeben, mind. 12 h inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der kanzerogenen Chemikalie autoklaviert.

6.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die für die RNA-Isolierung herangezogenen CHO-Zellen wurden zunächst in Petrischalen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit Trypsin abgelöst, die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellen zentrifugiert (300g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde durch Zugabe von 175µl RLN-Lysepuffer partiell lysiert und die zytoplasmatische Fraktion wurde durch anschließende Zentrifugation (300g, 2 min, 4°C) von der unlöslichen, nukleären Fraktion abgetrennt. Die pelletierten Zellkerne wurden nachfolgend durch Zugabe von 350µl RLT Puffer vollständig lysiert. Die Isolierung und Aufreinigung der RNA aus der zytoplasmatischen bzw. nukleoplasmatischen Fraktion wurden unter Verwendung des „RNeasy-Mini Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die präparierte RNA wurde anschließend in RNase-freiem Wasser (30-50µl) aufgenommen, mittels PCR auf DNA Kontaminationen überprüft, und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

6.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der isolierten RNA diente das Photometer Nanodrop der Fa. Peqlab. Hierfür wurden 1.5µl der RNA direkt auf das Messpodest aufgebracht und in einem spektralen Bereich von 220 bis 300nm gegen eine Referenz (H₂O) gemessen. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$) lässt sich aus der Absorption bei 260nm die Konzentration der isolierten RNA ermitteln, wobei eine Absorption von 1.0 einer Konzentration von ca. 40µg/ml entspricht (E: Extinktion; ϵ : molarer Absorptionskoeffizient [cm^2/mol]; c: Konzentration der absorbierenden Moleküle [mol/l]; d: Schichtdicke [cm]). Das Verhältnis der Absorption bei 260nm und 280nm gibt Aufschluss über die Reinheit der RNA. Das optimale Verhältnis $A_{260/280}$ reiner RNA beträgt 2.0 (195).

6.2.1.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Reverse Transkription wurden 5µg gereinigte RNA zunächst mit 1.5µl (10U/µl) DNase I (Roche, Mannheim) von DNA-Kontaminationen befreit (1 h, 37°C) und anschließend die DNase I inaktiviert (95°C, 10 min). Die Verifizierung des vollständigen DNase-Verdau erfolgte durch eine PCR mit RNA als Template. Waren keine DNA-Kontamination in der RNA, wurden 500ng DNA-freie RNA in eine RT-Reaktion eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Oligo(dT)₁₅ Oligonukleotiden nach Angaben des Herstellers der Reversen Transkriptase „M-MLV RNaseH⁻ Point Mutant“ (Promega, Mannheim).

6.2.1.4 Herstellung von RNA-Sonden für den Northern Blot

Zur Detektion von RNA im Northern Blot wurden antisense-RNA-Sonden verwendet, da die Stabilität von RNA-RNA-Hybriden diejenige von DNA-RNA-Hybriden übertrifft. Einzelsträngige RNA-Sonden wurden durch *in vitro* Transkription von geeigneten DNA-Fragmenten mit Hilfe des „Riboprobe *in vitro* Transcription Kits“ (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben gefertigt. Um alle Konstrukte mit einer Sonde erfassen zu können, wurde diese auf der Basis des BGH-Polyadenylierungssignals hergestellt. Für die *in vitro* Transkription wurde ein PCR Produkt generiert, wobei das rückwärts gerichtete Oligonukleotid am 5'-Ende um die Sequenz des T7 Promotors erweitert war, um die Initiation der im „Riboprobe *in vitro* Transcription Kits“ enthaltenen T7 Polymerase zu ermöglichen. Zum Transkriptionsansatz (1mM ATP, 1mM CTP, 1mM GTP, 0.65mM UTP) wurde das mit Digoxigenin (DIG) markierte Nukleotid DIG-11-UTP (0.35mM; Roche, Mannheim) zugegeben, welches während der Synthese in die Sonde eingebaut wird.

6.2.1.5 Northern Blot Analyse

Gleiche Mengen der aus den Zellen isolierten und gereinigten RNA (5-20 µg) wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20µl gebracht, mit 5x RNA-Auftragspuffer versetzt, aufgekocht (65°C, 10 min) und auf Eis (4°C) inkubiert. Anschließend wurde die RNA auf einem 1,5%igen Formaldehyd-Agarosegel (1,5% Agarose in 1x MOPS-Laufpuffer) elektrophoretisch aufgetrennt (100-150 V, 1-2 h). Für die Bestimmung der Transkriptgröße wurden 2µl eines 0,2-10kb RNA-Markers (SIGMA, Deisenhofen) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 3x 20 min mit DEPC-Wasser gewaschen, und nachfolgend 20 min in 0,05N NaOH und 45 min in 20x SSC-Puffer inkubiert. Das Blotten der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne Plus; Pall, Dreieich) erfolgte für 16 h über Kapillarkräfte. Als Transferpuffer wurde 20x SSC-Puffer verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran 5 min mit 5x SSC-Puffer gewaschen, und die RNA durch UV-Behandlung (1200kJ, 1 min) im Stratalinker (Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert („cross-linking“). Die ribosomale RNA wurde anschließend unspezifisch und reversibel mit 0.3% Methylenblau gefärbt und visuell dokumentiert. Nach Markierung des Größenstandards sowie der Laufhöhe der 5S- (<0,2kb), 18S- (1,9kb) und 28S- (4,7-5,0kb) RNA wurde die Membran zunächst in Hybridisierungsgefäßen (Biometra, Göttingen) 2 h in 50ml Prä-Hybridisierungspuffer bei 40°C im Hybridisierungsöfen prä-inkubiert. Im Anschluss wurde der Prä-Hybridisierungspuffer verworfen, durch die gleiche Menge Hybridisierungspuffer mit denaturierter (68°C, 10 min), spezifischer DIG-markierter Sonde ersetzt und im Hybridisierungsöfen inkubiert (16 h, 40°C). Die Membranen wurden anschließend 2x für 10 min in 2x SSC und 3x für 15 min in 0.2% SSC gewaschen. Die Membran wurde

daraufrin für 2 min (RT) in Waschpuffer, und anschließend für mindestens 30 min (RT) in Blockierlösung (1% Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer) inkubiert. In einem weiteren Schritt wurde die Membran für 30 min (RT) in Antikörperlösung (Anti-DIG-Antikörper AP-konjugiert 1:10.000 in Maleinsäurepuffer; 1% Blocking Reagenz) geschüttelt, 2x mit Waschpuffer gewaschen und in Detektionspuffer (2-5 min) equilibriert. Zur Detektion wurde die Membran in Klarsichtfolie eingelegt und mit Substratlösung (CDP-Star RTU-Lösung, 1:100 in Detektionspuffer, TROPIX, Bedford, MA, USA) beträufelt. Die spezifische RNA wurde durch Chemolumineszenz detektiert (KODAK Biomax MR, Amersham).

6.2.1.6 RNA-Stabilität

Die Untersuchung der RNA-Halbwertszeit erfolgte durch die Inhibition der Transkription für verschiedene Zeitabschnitte und die Analyse der in den Zellen verbliebenen, spezifischen Transkriptmenge durch qRT-PCR (181). Die Inhibition der Transkription wurde durch das Antibiotikum Actinomycin D (Biocat, Heidelberg) vermittelt, welches in den Doppelstrang der DNA interkaliert und die RNA-Polymerase II inhibiert. Vor Beginn des Experimentes wurden stabil MIP-1 α exprimierende Zellen unterschiedlicher Konzentrationen so in 6-Well-Schalen ausgesät, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Actinomycin D Zugabe 90% Konfluenz aufwiesen. Für eine Inkubation von 24h und 12h mit Actinomycin D wurden je 6×10^5 Zellen pro Schale eines 6-well Kulturgefäßes ausgesät. Für eine Inhibition der RNA-Synthese über 6h, 3h, 1.5h und 0h wurden je 3.5×10^5 Zellen in einer Schale vorgelegt. Die vier stabilen Zelllinien wurden anschließend für 0, 1.5, 3, 6, 12 und 24 h mit 2.4 μ M Actinomycin D kultiviert. Nach der jeweiligen Inkubationsdauer wurden die verschiedenen Ansätze mit PBS gewaschen und die Zellen durch Trypsinieren geerntet. Anschließend wurde für alle Proben die Gesamt-RNA unter Verwendung des „RNeasy-Kits“ (Qiagen) nach Herstellerangaben präpariert. Bei exponentieller Auftragung der erhaltenen RNA-Kopienzahlen gegen die jeweiligen Zeitpunkte sollte sich eine Gerade ergeben. Wie aus der Geradengleichung

$$\frac{N(t)}{N(0)} = e^{-kt} \Rightarrow \ln N(t) = -kt - \ln N(0)$$

zu entnehmen ist, entspricht die Zerfallskonstante k der Geradensteigung. Die Halbwertszeit der RNA kann anhand der Gleichung

$$t_{1/2} = -\ln 2 / k$$

berechnet werden.

6.2.1.7 „Nuclear run-on“

Zunächst wurden 3×10^7 stabil MIP-1 α exprimierende Zellen geerntet und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 4ml Lysepuffer resuspendiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden anschließend durch Zentrifugation (170g, 2 min, 4°C) abgetrennt und mit Lysepuffer ohne NP-40 gewaschen. Die Kerne wurden erneut sedimentiert (170g, 2 min, 4°C) und in 100 μ l Glycerinpuffer aufgenommen. Zu den Kernpräparationen wurden 2 Volumen Transkriptionspuffer und 8 μ l Biotin-16-UTPs eines 10mM Tetralithiumsalzes (Roche) gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 29°C wurden 6 μ l 250mM CaCl₂ sowie 6 μ l RNase-freier DNase I (10U/ μ l; Roche) zugegeben (10 min, 29°C), um die Reaktion zu stoppen. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und in 50 μ l H₂O aufgenommen. Die RNA wurde mit einem Volumenteil, in Bindepuffer vorliegender, Dynabeads M-280 (Dyna, Oslo) versetzt und 20 min bei 42°C sowie 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads mittels Magneten (Dyna, Oslo) separiert und zweimal 15 min mit 500 μ l 15% Formamid und 2x SSC gewaschen. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1ml 2x SSC (5 min) wurden die Dynabeads in RNase-freiem H₂O aufgenommen, und je 3 μ l der *de novo*-transkribierten RNA nach DNase-Behandlung in eine Reverse Transkription eingesetzt. Die resultierende cDNA wurde in „real-time“ Analysen quantifiziert.

6.2.2 DNA-Methoden

6.2.2.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Für die Präparation der DNA wurden ca. 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die Methode der Isolierung beruht auf der Lyse der Zellen durch ein im Lysepuffer enthaltenes Detergenz und der Degradation der Proteine durch Zugabe von Proteinase K. Die DNA wurde in einem Volumen von 200 μ l H₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

6.2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Für die Konzentrationsbestimmung wurde analog zur RNA (6.2.1.2) 1.5 μ l der DNA direkt auf das Messpodest des Nanodrops (Fa. Peqlab) aufgebracht und in einem spektralen Bereich von 220 bis 300nm vermessen. Als Referenz diente H₂O. Die Konzentration wurde gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt, wobei eine Extinktion von 1.0 einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 μ g/ml entspricht. Die Reinheit ergab sich aus dem Quotienten $A_{260/280}$, wobei ein Quotient von 1.8 reiner DNA entspricht (195).

6.2.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Analytische Restriktionsverdaue wurden in einem Gesamtvolumen von 10µl angesetzt. Dabei wurde 1µg DNA mit 10U Restriktionsenzym, 1µl 10x Enzympuffer, und gegebenenfalls mit 1µl 10x BSA versetzt und mit H₂O auf 10µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend und für 1 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

6.2.2.4 Gelelektrophorese von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Molekülen verschiedener Größe erfolgte in 1-2%igen Agarosegelen in TBE-Puffer mit 0.5mg/l Ethidiumbromid. Die Proben wurden mit 0.2 VT 6x DNA-Probenpuffer versetzt und wie der Größenmarker bei einer konstanten Spannung von 80 Volt für kleine Gele und 160 Volt für große Gele getrennt. Die Detektion der DNA erfolgte durch UV-Licht induzierte Fluoreszenz.

6.2.2.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Um reine DNA zu erhalten, wurden elektrophoretisch aufgetrennte Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers in 50µl H₂O eluiert.

6.2.2.6 Bisulfitkonversion von DNA

Die Analyse des Methylierungsstatus der stabilen Zelllinien erfolgte mittels Bisulfitkonversion. Während dieser Reaktion werden alle unmethylierten Cytosine deaminiert, und dementsprechend zu Uracilen konvertiert. Methylierte Cytosine werden durch die Konversion nicht verändert. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich Sequenzen, die mithilfe von PCR-Amplifikationen und anschließenden Sequenzierungen analysiert werden können. Die Methode der Bisulfitkonversion ermöglicht somit Aussagen zum Methylierungsstatus jedes einzelnen CpG Dinukleotides. Die Bisulfitkonversion wurde mit Hilfe des „EpiTect Bisulfite-Kits“ (Qiagen) durchgeführt. Sie umfasste die Bisulfitkonversion, die Bindung der nun nicht mehr komplementären und somit einzelsträngigen DNA an eine Matrix, und die Desulfonierung. Die konvertierte DNA wurde in einem Volumen von 20µl H₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

6.2.3 Herstellung der Plasmide

Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurde das jeweilige Insert entweder mit Hilfe entsprechender Restriktionsenzyme endonukleolytisch aus dem Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen) gespalten oder durch PCR-Amplifikation generiert, wobei entsprechende Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme an die eingesetzten

Oligonukleotide fusioniert waren. In beiden Fällen wurde die DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung isoliert, mit einem entsprechend präparierten Zielvektor ligiert und der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert.

Zielvektor	Transgen / Quelle	Schnittstellen	Konstrukt
pIRES-EGFP	MIP-1 α / pcDNA3.1	<i>NheI</i> / <i>XhoI</i>	pIRES-xxx
pGL2-Basic	CMV-SV40-MCK / PCR*	<i>BglII</i> / <i>HindIII</i>	pGL-xxx
pS	MIP-1 α / pcDNA3.1	<i>HindIII</i> / <i>PmeI</i>	pS-xxx
pcDNA5/FRT	MIP-1 α / pcDNA3.1	<i>NheI</i> / <i>XhoI</i>	pc5-xxx
pPCR-Script	MIP-1 α / PCR*	<i>EcoRI</i> / <i>NotI</i>	pT7-xxx
pRNAT-U6.1/Neo	Oligonukleotide für shRNAs	<i>BamHI</i> / <i>HindIII</i>	siRNA-xxx
pGEX-KG	CFP1 / pPCR-Script	<i>HindIII</i> / <i>BamHI</i>	CFP1

* Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide beinhalten die Erkennungssequenzen für die jeweiligen Restriktionsenzyme

6.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Soweit nicht anders vermerkt, wurden sämtliche PCR-Reaktionen entweder im iCycler (Biorad, München) oder im PCR Thermal Cycler GeneAmp 2400 (PerkinElmer, Waltham, USA) durchgeführt.

6.2.4.1 Amplifikation von DNA

DNA-Amplifikationen (gDNA und cDNA) wurden im iCycler der Fa. Biorad durchgeführt. Die PCR-Reaktionsansätze wurden in sterilen 0.2ml PCR-Softtubes der Fa. Biozym nach folgendem Schema angesetzt:

Volumen	Komponente
50-100ng	Template-DNA
1 μ l	10mM dNTP
1 μ l	10 μ M Oligonukleotid forward
1 μ l	10 μ M Oligonukleotid reverse
5 μ l	10x PCR-Puffer mit 1.5mM MgCl ₂ (Fa. Stratagene)
1 μ l	<i>Taq</i> -Precision Plus Polymerase (Fa. Stratagene)
ad 50 μ l	H ₂ O

Nach einer fünfminütigen Denaturierung der DNA bei 95°C fand die Amplifikation mittels des angegebenen zyklischen Drei-Temperaturprogrammes statt, das den Bedürfnissen der jeweiligen Primer und des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst wurde. Konstant für sämtliche PCR-Reaktionen war eine Denaturierung der DNA bei 95°C für 30

Sekunden. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Richtlinie „60 Sekunden pro Kilobasenpaare“ und der erwarteten Größe des PCR-Fragments berechnet.

Nach 30 PCR-Zyklen erfolgte eine abschließende Kettenverlängerung für 7 Minuten bei 72°C.

	Temperatur	Dauer
<u>Denaturierung</u>	95°C	30 sec
<u>Annealing</u>	50-61°C	30 sec
<u>Elongation</u>	72°C	60 sec/kb

Die verwendete Polymerase *Taq*-Precision Plus besitzt eine 3´-5´Exonuklease Aktivität („proof-reading“), wodurch eine fehlerfreie Amplifikation gewährleistet wird. Alle Klonierungen wurden durch Sequenzanalysen nach der Sanger-Methode (196) durch die Fa. GENEART AG überprüft. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Lasergene-Software (SeqMan).

6.2.4.2 Kolonie-PCR mit *Escherichia coli*

Die Kolonie-PCR diente der schnellen Analyse eventuell positiv transformierter *E.coli*-Klone. Zu diesem Zweck wurde ein der Probenzahl entsprechendes Volumen des 2x GoTaq Green Master Mix (Fa. Promega) mit Primern und H₂O versetzt und auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurde ein Teil der jeweiligen *E.coli*-Kolonien mit einer Pipettenspitze von der Platte aufgenommen, auf einer neuen LB_{Amp}-Platte ausgestrichen, der Rest der Kolonie in das entsprechende Reaktionsgefäß überführt und im vorgelegten Reaktionsansatz resuspendiert. Die Bakterienlyse fand während der initialen DNA-Denaturierung des PCR-Programmes (s. 6.2.3.1) statt.

6.2.4.3 Amplifikation von DNA nach Bisulfitkonversion

Bedingt durch die Instabilität der konvertierten und einzelsträngigen DNA ist die Amplifikation verhältnismäßig komplex. Um eine einseitige Amplifikation methylierter bzw. unmethylierter Substrate zu verhindern erfordert der Entwurf der Oligonukleotide besondere Aufmerksamkeit. Im Idealfall werden CpG Dinukleotide innerhalb des Oligonukleotides vollständig vermieden, und im „forward“ Primer alle übrigen Cytosine durch Thymin bzw. im „reverse“ Primer alle Guanine durch Adenine ersetzt. Weiterhin kann mit einem Oligonukleotidpaar nur ein Strang der DNA („sense“ oder „antisense“) amplifiziert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation konvertierter DNA sind unter 5.6 aufgelistet und durch den Zusatz „-bis-“ gekennzeichnet. Für die Amplifikation des konvertierten offenen Leserahmens wurden Oligonukleotide gewählt, die im nicht kodierenden Bereich des Plasmids pcDNA5/FRT lokalisiert waren.

Die eigentliche Amplifikation der DNA folgte dem Programm einer „touchdown“-PCR, bei der die Spezifität der Primer-Bindung, durch zyklusweise Absenkung der Annealing-Temperatur an die zu erwartenden Schmelztemperatur des Primers, erhöht wird.

	Temperatur	Dauer	Zyklen
<u>Denaturierung</u>	95°C	30 sec	
<u>Annealing</u>	65°C	30 sec	10
<u>Dekrement pro Zyklus</u>	0.5°C		
<u>Elongation</u>	72°C	60 sec/kb	
<u>Denaturierung</u>	95°C	30 sec	
<u>Annealing</u>	65°C	30 sec	30
<u>Elongation</u>	72°C	60 sec/kb	

Die Amplifikation erfolgte mit dem Go Taq Green Mastermix (Promega) nach Herstellerangaben.

6.2.4.4 „real-time“ PCR

Für die Durchführung der „real-time“ PCR-Analysen wurden Geräte der Firmen Roche (LightCycler; Mannheim) und Applied Biosystems (StepOne Real-Time PCR System; Darmstadt) verwendet. Die Quantifizierung revers transkribierter RNA mittels „real-time“ PCR erfolgte unter Verwendung des DyNAmo Capillary SYBR Green qPCR Kits (Finnzymes, Espoo, Finnland). Daten aus Analysen mit dem LightCycler wurden mit dem Programm Lightcycler Software 4.0 (Roche) ausgewertet, Daten des StepOne mit der StepOne Software v2.0. Die Quantifizierung von Transkripten erfolgte über die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I, dessen Fluoreszenzintensität proportional zur Amplifikation der DNA zunimmt. Quantitative Aussagen über die Menge des Ausgangstemplates können nur im Proportionalitätsbereich der Fluoreszenzmessung getroffen werden, welcher durch die logarithmisch-lineare Phase gekennzeichnet ist. Der PCR-Zyklus, zu dem erstmalig eine Fluoreszenzintensität im Proportionalitätsbereich gemessen wurde, wird als „crossing point“ (Cp) bezeichnet und lässt auf die Ausgangskonzentration des zugehörigen Amplikons schließen. Da SYBER Green I auch an unspezifische Produkte bindet, muss zusätzlich die spezifische Schmelztemperatur der einzelnen PCR-Produkte untersucht werden. Der Entwurf der Amplikons und der Oligonukleotide erfolgte nach Herstellerangaben. Für alle „real-time“ PCR-Analysen wurde ein Mastermix laut Herstellerangaben vorbereitet, wobei das Gesamtvolumen in den einzelnen Reaktionsgefäßen 10µl betrug. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die anstelle der cDNA H₂O enthielt. Für die Amplifikation der cDNA wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass der jeweilige gesamte offene Leserahmen generiert

wird, wobei jede Genvariante eigene spezifische Primer hatte (s. 5.6; mMIP-wt-fwd/rev, mMIP-0CpG-LC-fwd/rev, mMIP-13CpG-fwd/rev, mMIP-42CpG-fwd/rev)

Komponente	Volumen	PCR:	Temperatur	Dauer	Zyklen
SYBR Green qPCR Mix	5µl	<u>Denaturierung</u>	95°C	10min	1
5´ Primer fwd (10µm)	0.5µl	<u>Denaturierung</u>	95°C	15sec	} 40
3´Primer rev (10µm)	0.5µl	<u>Annealing</u>	50°C	20sec	
cDNA	1µl	<u>Elongation</u>	72°C	30sec	
H ₂ O	3µl	<u>Schmelzkurve</u>	40°C-95°C	5min	1

Um verschiedene cDNA-Proben gleicher Länge mittels „real-time“ PCR hinsichtlich ihrer Kopienzahl vergleichen zu können, muss für jede PCR-Reaktion die spezifische Effizienz ermittelt werden. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungen der zu untersuchenden DNA-Probe hergestellt und in „real-time“-Analysen eingesetzt. Anhand der crossing points und Verdünnungsstufen kann aus den sich ergebenden Regressionsgeraden der so genannte „slope“, die negative Steigung der Geraden ermittelt werden. Die PCR-Effizienz E errechnet sich nach der Gesetzmäßigkeit

$$E = 10^{-1/slope}$$

Aufgrund der Kenntnis der Effizienz können im selben Lauf amplifizierte cDNA-Proben unterschiedlicher Konzentration relativ zueinander verglichen werden. Dabei gilt:

$$N = N(0) \cdot E^{Cp}$$

Für die relative Quantifizierung gilt weiterhin (197):

$$\frac{N_A(0)}{N_B(0)} = \frac{E_B^{CpB}}{E_A^{CpA}}$$

Während für die relative Quantifizierung nur die Kenntnis des Cps und der jeweiligen Effizienzen notwendig ist, erfordert die absolute Quantifizierung die Herstellung einer Standardgeraden. Hierzu wurde ein Plasmid mit dem zu quantifizierenden Gen photometrisch vermessen und die Kopienzahl unter Verwendung der Avogadro'schen Konstante $A=6.023 \times 10^{23}$ und der Formel:

$$pmol(dsDNA) = \frac{\mu g(dsDNA) \cdot 1515}{N_{bp}}$$

berechnet. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen des Plasmids mit bekannter Kopienkonzentration (10^9 Kopien/µl – 10^2 Kopien/µl) mittels „real-time“ PCR vermessen. Die Abweichung von der Geradenfunktion, der „error“, sollte den Wert 0.2 nicht überschreiten. Durch Extrapolation kann auf Basis der Standardgeraden die Konzentration unbekannter Proben ermittelt werden.

Die absolute Quantifizierung wurde für die Bestimmung der RNA-Halbwertszeit angewandt. Die Datenerhebung erfolgte hier mit dem StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Alle relativen Quantifizierungen erfolgten mit dem LightCycler (Roche).

6.2.5 Klonierung von DNA

6.2.5.1 Ligation

Ligationen wurden in einem Gesamtvolumen von 10µl durchgeführt. Hierzu wurden der präparierte Vektor und das entsprechende Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit 1µl des 10x T4 Ligase-Puffers und 1µl T4 Ligase (NEB) versetzt und der Ansatz mit H₂O auf 10µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für 1h.

6.2.5.2 Transformation von *Escherichia coli*

Zur Hitzeschocktransformation wurden 100µl-Aliquots chemisch kompetenter DH5α Bakterien vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit dem gesamten Ligationsansatz versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 45 sec ein Hitzeschock bei 42°C, und nach Zugabe von 900µl LB₀-Medium eine Inkubation von 1h auf einem Schüttelinkubator bei 37°C. Die Zellen wurden abzentrifugiert (13000 rpm), in 200µl LB₀-Medium resuspendiert und auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C. Positive Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR und Restriktionsanalysen ermittelt.

6.2.6 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Die Gewinnung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke beruhte auf der Methode der alkalischen Lyse. Hierfür wurden 2ml einer Übernachtskultur zentrifugiert (13000rpm, 1 min, RT) und in 200µl P1 (Qiagen) resuspendiert. Anschließend wurden 200µl P2 (Qiagen) zugegeben, der Ansatz 5 min bei RT inkubiert, und die Lyse mit 200µl P3 (Qiagen) gestoppt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde zweimal zentrifugiert (13000rpm, 10min, RT), wobei der Überstand jeweils in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt wurde, und die DNA durch Zugabe von 0.8 VT Isopropanol und Zentrifugation (13000rpm, 30min, 16°C) gefällt. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde das DNA-Pellet in 50µl H₂O aufgenommen. Größere Mengen an Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad wurden mittels des Qiagen Midi- bzw. Maxi-Kits nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Rekombinante Expression

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde die CXXC-Zinkfingerdomäne des humanen CFP1 in das Expressionsplasmid pGEX-KG kloniert und anschließend zur Transformation des *E.coli*-Stamms BL21(DE3) eingesetzt (198). Eine *E.coli*-Einzelkolonie wurde in 5ml Flüssigkultur (LB_{Amp}) angeimpft und bei 37°C und 210 rpm über Nacht (üN) geschüttelt. Aus dieser üN-Kultur wurde ein Volumen von 40µl in 400ml LB_{Amp} angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (220rpm) bis zu einer optischen Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) von 0,6-0,8 herangezogen. Die Proteinexpression wurde mit 1mM IPTG (Isopropyl-β-Dithiogalaktosid) induziert und für 2 h bei 37°C durchgeführt. Sowohl vor der Induktion als auch nach Expression wurde eine Probe entnommen, pelletiert (1 min, 20800g) und in 50µl 2 x SDS-Probenpuffer bei 95°C für 5 min aufgekocht. Nach der Expression der rekombinanten Fusionsproteine wurden die *E.coli*-Kulturen abzentrifugiert (15min, 6000g, 4°C). Im Anschluss folgte die Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine. Nach jedem Aufschluss- und Reinigungsschritt wurde eine Probe von 25µl entnommen, mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, aufgekocht und bei 4°C gelagert.

6.3.2 Affinitätschromatographie

Nach der rekombinanten Expression wurden die Bakterien sedimentiert, und das Pellet in 20ml kalten NETN-Puffer mit 1mM PMSF (Serin-Proteaseinhibitor, Roche) resuspendiert. Die Bakterien wurden unter Zugabe von 1mg/ml Lysozym für 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler (GFL 3025, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) geschüttelt. Der vollständige Aufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung (5 min, 60%, Cycle 5) mit einer Nadelschwingsonde (Ultraschall-Homogenisator Bandelin Sonoplus, Bandelin Electronic, Berlin). Das Lysat wurde anschließend zentrifugiert (60 min, 20.000g, 4°C), um unlösliche Proteinbestandteile und Zelltrümmer abzutrennen. Die nachfolgenden Reinigungsschritte wurden mit dem Proteinüberstand durchgeführt. Das Pellet wurde in 20ml NETN-Puffer resuspendiert und davon ein Aliquot von 25µl entnommen. Die selektive Bindung der GST-Fusionsproteine aus dem Überstand erfolgte an die Affinitätsmatrix Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg). Dabei entsteht ein Enzym-Substrat-Komplex zwischen Glutathion, das über eine Oxirangruppe an die Sepharose-Matrix gekoppelt ist, und dem Enzym Glutathion-S-Transferase (GST), welches eine Bindestelle für Glutathion besitzt. Somit wird das GST-Fusionsprotein reversibel an die Glutathion-Sepharose-Matrix gekoppelt. Hierfür wurde eine Säule (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) zunächst mit 5ml NETN-Puffer vorgespült. Anschließend wurden 1.33ml 75%ige Glutathion-Sepharose auf die Säule gegeben. Um

Alkoholreste zu entfernen, wurde das Säulenmaterial dreimal mit 5ml NETN-Puffer gewaschen. Die Matrix wurde im löslichen Proteinüberstand resuspendiert, die Suspension in ein 50ml Falcon-Tube (Falcon, Heidelberg) überführt und üN bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Während dieser Inkubation erfolgte die Bindung der Fusionsproteine an die Affinitätsmatrix im Batch-Verfahren. Die Glutathion-Sepharose wurde am nächsten Tag in die Säule überführt. Vor der Elution wurde die Matrix dreimal mit jeweils 5ml NETN-Puffer sowie dreimal mit jeweils 5ml Waschpuffer für GST-Fusionsproteine gewaschen. Die Elution der rekombinanten GST-Fusionsproteine erfolgte in 3 Schritten durch Zugabe von je 1ml Elutionspuffer und anschließender Inkubation für 10 min. Das Säulenmaterial wurde nach der Elution mit 1ml 20% Ethanol gewaschen, erneut mit 1ml 20% Ethanol aufgefüllt und bei 4°C zur Wiederverwendung aufbewahrt.

6.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte nach der Methode von Bradford (199) und wurde unter Verwendung der „Bio-Rad Protein Assay“ Reagenz (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinmenge wurde näherungsweise anhand einer BSA-Standardgeraden bestimmt.

6.3.4 SDS-PA nach Laemmli

Zur Analyse der Expression von Proteinen wurden die jeweiligen Proben mit 5x SDS Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Gleiche Mengen an Gesamtproteinmengen (z.B. 50 µg) der zu untersuchenden Proben wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht über ein 12.5%iges bzw. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (200). Die Konzentration des Sammelgels betrug stets 5%.

6.3.5 Coomassie-Färbung von SDS-PA Gelen

Die Färbung von SDS-PA-Gelen erfolgte mit einer Coomassie-Färbelösung unter Schwenken für 20-30 min. Entfärbt wurde durch mehrmaliges Schwenken in jeweils frischer Coomassie-Entfärbelösung.

6.3.6 Western Blotting und Immunodetektion

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach Standardverfahren (195) und unter Verwendung einer „SemiDry-Blotting“-Apparatur nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, München) aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (0,2µm) (Schleicher Schuell, Dassel) in Transferpuffer überführt (201). Zur Kontrolle des Transfers wurden die Proteine reversibel mit Ponceau S angefärbt. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 1h bei RT in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver in TBS). Nach

dreimaligem Waschen in TTBS für jeweils 20 Minuten wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem in TTBS-Puffer verdünnten Primär-Antikörper Anti-murine-MIP-1- α (PeproTech, Rocky Hill, USA) inkubiert. Die Inkubation des Blots mit dem „horseradish peroxidase“ (HRP) konjugierten Sekundär-Antikörper (Pierce, Rockford, USA) erfolgte nach erneutem Waschen der Membran in TTBS (3x 20 min) für 1h bei RT. Die Antikörper-Antigen-Komplexe auf der Membran wurden nach wiederholtem Waschen mit Hilfe des SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrates (Pierce) und des Geldokumentationssystems Westernblot Imager ChemiLux Imager 2008 (Intas, Göttingen) detektiert und analysiert.

6.3.7 „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Zur Quantifizierung von Zytokinkonzentration in Zelllysaten und Zellkulturüberständen dienten kommerzielle ELISA-Kits. Für die Bestimmung des humanen und murinen GM-CSF wurden Systeme der Fa. BD Biosciences herangezogen, die Detektion des humanen und murinen MIP-1 α erfolgte durch Kits der Fa. R&D. Zu Beginn wurden 96-well MaxiSorb-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) mit je 100 μ l einer Verdünnung des Zytokin-spezifischen „Capture“-Antikörpers (BD: 1:500; R&D: 1:200) in 0.1M Karbonatpuffer pH 9.5 (BD) oder PBS (R&D) über Nacht bei 4°C beschichtet. Für die Herstellung der Standardgeraden wurde der im Kit enthaltene Standard seriell in Verdünnungspuffer (PBS/10% FKS) verdünnt (500 - 0pg/ml). Je 100 μ l der Verdünnung wurden nach mehrmaligem Waschen (3x) der Mikrotiterplatten mit Waschpuffer (PBS/0.05%Tween-20) zugegeben. Anschließend wurden die verdünnten Zelllysate (1-5 μ g Gesamtprotein in 100 μ l Verdünnungspuffer) und Kulturüberstände auf die Platten aufgetragen und 1h (37°C) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (6x) wurden je 100 μ l einer Verdünnung des biotinylierten „Detection“-Antikörpers und eine 1:500 Verdünnung des Streptavidin-HRP (horse raddish peroxidase) Konjugats des jeweiligen Herstellers zugegeben und eine weitere Stunde (RT) inkubiert. Nach weiteren zehn Waschschritten wurden die Antikörper-Antigen Komplexe unter Verwendung von je 100 μ l TMB-Substratlösung nach Angaben des Herstellers (BD, Heidelberg) detektiert. Die Adsorption wurde mit einem Spektrophotometer (Biorad, Modell 680 Microplate Reader, München) bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt. Mit Hilfe der Standardgeraden wurden anschließend die Zytokinkonzentration bestimmt.

6.3.8 „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)

Für den „electrophoretic mobility shift assay“ wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μ l 250ng gereinigtes PCR-Produkt des offenen Leserahmens der Zytokingene mit 500ng des rekombinant exprimierten und gereinigten GST-CFP1 Fusionsproteins und 1 μ l BSA

(2.5mg/ml) für 20 min bei Raumtemperatur in Hochsalzpuffer inkubiert und die Proben mittels gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem 6%igen nativen Polyacrylamidgels analysiert. Für die Auswertung wurde das native Polyacrylamidgel mit Ethidiumbromid-haltigem TBE-Puffer (500µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Eine Bindung der Glutathion-S-Transferase alleine an die DNA-Fragmente wurde durch Inkubation der gereinigten MIP-1 α -PCR-Produkte mit rekombinant exprimierter und gereinigter Glutathion-S-Transferase ausgeschlossen.

7. Literaturverzeichnis

1. LEVI-MONTALCINI,R. and HAMBURGER,V. (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J.Exp.Zool.*, **116**, 321-361.
2. BENNETT,I.L., Jr. and BEESON,P.B. (1953) Studies on the pathogenesis of fever. II. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exudates. *J.Exp.Med.*, **98**, 493-508.
3. Isaacs,A. and Lindenmann,J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.*, **147**, 258-267.
4. Dumonde,D.C., Wolstencroft,R.A., Panayi,G.S., Matthew,M., Morley,J. and Howson,W.T. (1969) "Lymphokines": non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature*, **224**, 38-42.
5. Carswell,E.A., Old,L.J., Kassel,R.L., Green,S., Fiore,N. and Williamson,B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **72**, 3666-3670.
6. Liles,W.C. and Van Voorhis,W.C. (1995) Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J.Infect.Dis.*, **172**, 1573-1580.
7. Renner,U., Paez-Pereda,M., Arzt,E. and Stalla,G.K. (2004) Growth factors and cytokines: function and molecular regulation in pituitary adenomas. *Front Horm.Res.*, **32**, 96-109.
8. McInnes,I.B. and Schett,G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat.Rev.Immunol.*, **7**, 429-442.
9. Lucey,D.R., Clerici,M. and Shearer,G.M. (1996) Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin.Microbiol.Rev.*, **9**, 532-562.
10. Watkins,L.R., Maier,S.F. and Goehler,L.E. (1995) Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, **63**, 289-302.
11. Glickstein,L.J. and Huber,B.T. (1995) Karoushi--death by overwork in the immune system. *J.Immunol.*, **155**, 522-524.
12. Lusso,P. (2006) HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J.Clin.Virol.*, **37 Suppl 1**, S4-10.
13. Islam,D., Bandholtz,L., Nilsson,J., Wigzell,H., Christensson,B., Agerberth,B. and Gudmundsson,G. (2001) Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat.Med.*, **7**, 180-185.
14. Alpdogan,O. and van den Brink,M.R. (2005) IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. *Trends Immunol.*, **26**, 56-64.
15. Dreno,B. (1993) Roferon-A (interferon alpha 2a) combined with Tigason (etretinate) for treatment of cutaneous T cell lymphomas. *Stem Cells*, **11**, 269-275.
16. Lori,F., Weiner,D.B., Calarota,S.A., Kelly,L.M. and Lisziewicz,J. (2006) Cytokine-adjuvanted HIV-DNA vaccination strategies. *Springer Semin.Immunopathol.*, **28**, 231-238.

17. Okada,H., Villa,L., Attanucci,J., Erff,M., Fellows,W.K., Lotze,M.T., Pollack,I.F. and Chambers,W.H. (2001) Cytokine gene therapy of gliomas: effective induction of therapeutic immunity to intracranial tumors by peripheral immunization with interleukin-4 transduced glioma cells. *Gene Ther.*, **8**, 1157-1166.
18. Gold,M.H., Goldman,M.P. and Biron,J. (2007) Efficacy of novel skin cream containing mixture of human growth factors and cytokines for skin rejuvenation. *J.Drugs Dermatol.*, **6**, 197-201.
19. Valente,C.A., Monteiro,G.A., Cabral,J.M., Fevereiro,M. and Prazeres,D.M. (2006) Optimization of the primary recovery of human interferon alpha2b from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr.Purif.*, **45**, 226-234.
20. Rabhi-Essafi,I., Sadok,A., Khalaf,N. and Fathallah,D.M. (2007) A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in *E. coli*. *Protein Eng.Des.Sel.*, **20**, 201-209.
21. Magistrelli,G., Gueneau,F., Muslmani,M., Ravn,U., Kosco-Vilbois,M. and Fischer,N. (2005) Chemokines derived from soluble fusion proteins expressed in *Escherichia coli* are biologically active. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **334**, 370-375.
22. Elliott,S., Lorenzini,T., Asher,S., Aoki,K., Brankow,D., Buck,L., Busse,L., Chang,D., Fuller,J., Grant,J. *et al.* (2003) Enhancement of therapeutic protein *in vivo* activities through glycoengineering. *Nat.Biotechnol.*, **21**, 414-421.
23. Hahn,S. (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, **11**, 394-403.
24. Travers,A. and Muskhelishvili,G. (2007) A common topology for bacterial and eukaryotic transcription initiation? *EMBO Rep.*, **8**, 147-151.
25. Woychik,N.A. and Hampsey,M. (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*, **108**, 453-463.
26. Green,M.R. (2005) Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol.Cell*, **18**, 399-402.
27. Thomas,M.C. and Chiang,C.M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.*, **41**, 105-178.
28. Li,B., Carey,M. and Workman,J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*, **128**, 707-719.
29. Coppola,J.A., Field,A.S. and Luse,D.S. (1983) Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II *in vitro*: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **80**, 1251-1255.
30. Kramer,A. (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu.Rev.Biochem.*, **65**, 367-409.
31. Cramer,P., Caceres,J.F., Cazalla,D., Kadener,S., Muro,A.F., Baralle,F.E. and Kornblihtt,A.R. (1999) Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Mol.Cell*, **4**, 251-258.
32. Lavigueur,A., La Branch, Kornblihtt,A.R. and Chabot,B. (1993) A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev.*, **7**, 2405-2417.
33. Hirose,Y. and Manley,J.L. (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.*, **14**, 1415-1429.

34. Zhao, J., Hyman, L. and Moore, C. (1999) Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 405-445.
35. Orphanides, G. and Reinberg, D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell*, **108**, 439-451.
36. Butler, J.E. and Kadonaga, J.T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.*, **16**, 2583-2592.
37. Pfeifer, G.P. (2006) Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **301**, 259-281.
38. Sved, J. and Bird, A. (1990) The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 4692-4696.
39. Cooper, D.N. and Youssoufian, H. (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum. Genet.*, **78**, 151-155.
40. Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R. and Harris, C.C. (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 141-146.
41. Delaval, K. and Feil, R. (2004) Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **14**, 188-195.
42. Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H. and Razin, A. (1992) Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev.*, **6**, 705-714.
43. Stancheva, I. and Meehan, R.R. (2000) Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes Dev.*, **14**, 313-327.
44. Macleod, D., Clark, V.H. and Bird, A. (1999) Absence of genome-wide changes in DNA methylation during development of the zebrafish. *Nat. Genet.*, **23**, 139-140.
45. Turek-Plewa, J. and Jagodzinski, P.P. (2005) The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol. Biol. Lett.*, **10**, 631-647.
46. Liu, Y., Oakeley, E.J., Sun, L. and Jost, J.P. (1998) Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1038-1045.
47. Robertson, K.D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F.A. and Jones, P.A. (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2291-2298.
48. Hsu, D.W., Lin, M.J., Lee, T.L., Wen, S.C., Chen, X. and Shen, C.K. (1999) Two major forms of DNA (cytosine-5) methyltransferase in human somatic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 9751-9756.
49. Bonfils, C., Beaulieu, N., Chan, E., Cotton-Montpetit, J. and MacLeod, A.R. (2000) Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10754-10760.
50. Mertineit, C., Yoder, J.A., Taketo, T., Laird, D.W., Trasler, J.M. and Bestor, T.H. (1998) Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development*, **125**, 889-897.

51. Okano,M., Xie,S. and Li,E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat.Genet.*, **19**, 219-220.
52. Okano,M., Bell,D.W., Haber,D.A. and Li,E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell*, **99**, 247-257.
53. Lawrence,R.J. and Pikaard,C.S. (2004) Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA genes. *Cell Cycle*, **3**, 880-883.
54. Yoder,J.A., Walsh,C.P. and Bestor,T.H. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*, **13**, 335-340.
55. Smit,A.F. (1999) Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **9**, 657-663.
56. Woodcock,D.M., Lawler,C.B., Linsenmeyer,M.E., Doherty,J.P. and Warren,W.D. (1997) Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J.Biol.Chem.*, **272**, 7810-7816.
57. Couture,J.F. and Trievel,R.C. (2006) Histone-modifying enzymes: encrypting an enigmatic epigenetic code. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **16**, 753-760.
58. Bird,A., Taggart,M., Frommer,M., Miller,O.J. and Macleod,D. (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, **40**, 91-99.
59. Caiafa,P. and Zampieri,M. (2005) DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. *J.Cell Biochem.*, **94**, 257-265.
60. Keshet,I., Yisraeli,J. and Cedar,H. (1985) Effect of regional DNA methylation on gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **82**, 2560-2564.
61. Appanah,R., Dickerson,D.R., Goyal,P., Groudine,M. and Lorincz,M.C. (2007) An unmethylated 3' promoter-proximal region is required for efficient transcription initiation. *PLoS.Genet.*, **3**, e27.
62. Chevalier-Mariette,C., Henry,I., Montfort,L., Capgras,S., Forlani,S., Muschler,J. and Nicolas,J.F. (2003) CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes. *Genome Biol.*, **4**, R53.
63. Dalle,B., Rubin,J.E., Alkan,O., Sukonnik,T., Pasceri,P., Yao,S., Pawliuk,R., Leboulch,P. and Ellis,J. (2005) eGFP reporter genes silence LCRbeta-globin transgene expression via CpG dinucleotides. *Mol.Ther.*, **11**, 591-599.
64. Yew,N.S., Zhao,H., Przybylska,M., Wu,I.H., Tousignant,J.D., Scheule,R.K. and Cheng,S.H. (2002) CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression *in vivo*. *Mol.Ther.*, **5**, 731-738.
65. Bird,A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, **16**, 6-21.
66. Hendrich,B. and Bird,A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol.Cell Biol.*, **18**, 6538-6547.
67. Roder,K., Hung,M.S., Lee,T.L., Lin,T.Y., Xiao,H., Isobe,K.I., Juang,J.L. and Shen,C.J. (2000) Transcriptional repression by *Drosophila* methyl-CpG-binding proteins. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 7401-7409.
68. Fujita,N., Shimotake,N., Ohki,I., Chiba,T., Saya,H., Shirakawa,M. and Nakao,M. (2000) Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 5107-5118.

-
69. Cross,S.H., Meehan,R.R., Nan,X. and Bird,A. (1997) A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat.Genet.*, **16**, 256-259.
 70. Ng,H.H., Jeppesen,P. and Bird,A. (2000) Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 1394-1406.
 71. Sansom,O.J., Maddison,K. and Clarke,A.R. (2007) Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nat.Clin.Pract.Oncol.*, **4**, 305-315.
 72. Saito,M. and Ishikawa,F. (2002) The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J.Biol.Chem.*, **277**, 35434-35439.
 73. Ahringer,J. (2000) NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet.*, **16**, 351-356.
 74. Millar,C.B., Guy,J., Sansom,O.J., Selfridge,J., MacDougall,E., Hendrich,B., Keightley,P.D., Bishop,S.M., Clarke,A.R. and Bird,A. (2002) Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science*, **297**, 403-405.
 75. Fisscher,U., Weisbeek,P. and Smeekeens,S. (1996) A tobacco nuclear protein that preferentially binds to unmethylated CpG-rich DNA. *Eur.J.Biochem.*, **235**, 585-592.
 76. Lee,J.H. and Skalnik,D.G. (2002) CpG-binding protein is a nuclear matrix- and euchromatin-associated protein localized to nuclear speckles containing human trithorax. Identification of nuclear matrix targeting signals. *J.Biol.Chem.*, **277**, 42259-42267.
 77. Voo,K.S., Carlone,D.L., Jacobsen,B.M., Flodin,A. and Skalnik,D.G. (2000) Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 2108-2121.
 78. Carlone,D.L., Hart,S.R., Ladd,P.D. and Skalnik,D.G. (2002) Cloning and characterization of the gene encoding the mouse homologue of CpG binding protein. *Gene*, **295**, 71-77.
 79. Lee,J.H., Voo,K.S. and Skalnik,D.G. (2001) Identification and characterization of the DNA binding domain of CpG-binding protein. *J.Biol.Chem.*, **276**, 44669-44676.
 80. Aasland,R., Gibson,T.J. and Stewart,A.F. (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem.Sci.*, **20**, 56-59.
 81. Pena,P.V., Davrazou,F., Shi,X., Walter,K.L., Verkhusha,V.V., Gozani,O., Zhao,R. and Kutateladze,T.G. (2006) Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature*, **442**, 100-103.
 82. Li,H., Ilin,S., Wang,W., Duncan,E.M., Wysocka,J., Allis,C.D. and Patel,D.J. (2006) Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*, **442**, 91-95.
 83. Lee,J.H. and Skalnik,D.G. (2005) CpG-binding protein (CXXC finger protein 1) is a component of the mammalian Set1 histone H3-Lys4 methyltransferase complex, the analogue of the yeast Set1/COMPASS complex. *J.Biol.Chem.*, **280**, 41725-41731.
 84. Carlone,D.L. and Skalnik,D.G. (2001) CpG binding protein is crucial for early embryonic development. *Mol.Cell Biol.*, **21**, 7601-7606.
 85. Sterner,D.E. and Berger,S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, **64**, 435-459.
-

86. Pokholok,D.K., Harbison,C.T., Levine,S., Cole,M., Hannett,N.M., Lee,T.I., Bell,G.W., Walker,K., Rolfe,P.A., Herbolzheimer,E. *et al.* (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, **122**, 517-527.
87. Blander,G. and Guarente,L. (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu.Rev.Biochem.*, **73**, 417-435.
88. Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (2005) Reversing histone methylation. *Nature*, **436**, 1103-1106.
89. Berger,S.L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, **447**, 407-412.
90. Shi,Y., Lan,F., Matson,C., Mulligan,P., Whetstine,J.R., Cole,P.A., Casero,R.A. and Shi,Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-953.
91. Metzger,E., Wissmann,M., Yin,N., Muller,J.M., Schneider,R., Peters,A.H., Gunther,T., Buettner,R. and Schule,R. (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, **437**, 436-439.
92. Cuthbert,G.L., Daujat,S., Snowden,A.W., Erdjument-Bromage,H., Hagiwara,T., Yamada,M., Schneider,R., Gregory,P.D., Tempst,P., Bannister,A.J. *et al.* (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*, **118**, 545-553.
93. Kouzarides,T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.
94. Edgil,D. and Harris,E. (2006) End-to-end communication in the modulation of translation by mammalian RNA viruses. *Virus Res.*, **119**, 43-51.
95. Gross,J.D., Moerke,N.J., von der,H.T., Lugovskoy,A.A., Sachs,A.B., McCarthy,J.E. and Wagner,G. (2003) Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell*, **115**, 739-750.
96. Kahvejian,A., Roy,G. and Sonenberg,N. (2001) The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, **66**, 293-300.
97. Svitkin,Y.V., Imataka,H., Khaleghpour,K., Kahvejian,A., Liebig,H.D. and Sonenberg,N. (2001) Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *RNA.*, **7**, 1743-1752.
98. Pestova,T.V., Kolupaeva,V.G., Lomakin,I.B., Pilipenko,E.V., Shatsky,I.N., Agol,V.I. and Hellen,C.U. (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 7029-7036.
99. Pestova,T.V., Lomakin,I.B., Lee,J.H., Choi,S.K., Dever,T.E. and Hellen,C.U. (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature*, **403**, 332-335.
100. Kozak,M. (1995) Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **92**, 2662-2666.
101. Schwartz,S., Felber,B.K. and Pavlakis,G.N. (1992) Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic *human immunodeficiency virus type 1* mRNAs. *Mol.Cell Biol.*, **12**, 207-219.
102. Lin,C.G. and Lo,S.J. (1992) Evidence for involvement of a ribosomal leaky scanning mechanism in the translation of the hepatitis B virus pol gene from the viral pregenome RNA. *Virology*, **188**, 342-352.

103. Stacey,S.N., Jordan,D., Williamson,A.J., Brown,M., Coote,J.H. and Arrand,J.R. (2000) Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of *human papillomavirus type 16* E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J.Virol.*, **74**, 7284-7297.
104. Chenik,M., Chebli,K. and Blondel,D. (1995) Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism. *J.Virol.*, **69**, 707-712.
105. Sedman,S.A., Gelembiuk,G.W. and Mertz,J.E. (1990) Translation initiation at a downstream AUG occurs with increased efficiency when the upstream AUG is located very close to the 5' cap. *J.Virol.*, **64**, 453-457.
106. Futterer,J., Kiss-Laszlo,Z. and Hohn,T. (1993) Nonlinear ribosome migration on *cauliflower mosaic virus* 35S RNA. *Cell*, **73**, 789-802.
107. Hinnebusch,A.G. (1990) Transcriptional and translational regulation of gene expression in the general control of amino-acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, **38**, 195-240.
108. Chen,C.Y. and Sarnow,P. (1995) Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science*, **268**, 415-417.
109. Mendez,R. and Richter,J.D. (2001) Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **2**, 521-529.
110. Bermano,G., Arthur,J.R. and Hesketh,J.E. (1996) Role of the 3' untranslated region in the regulation of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene expression by selenium supply. *Biochem.J.*, **320 (Pt 3)**, 891-895.
111. Wilusz,C.J., Wormington,M. and Peltz,S.W. (2001) The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **2**, 237-246.
112. Paillard,L. and Osborne,H.B. (2003) East of EDEN was a poly(A) tail. *Biol.Cell*, **95**, 211-219.
113. Hoek,K.S., Kidd,G.J., Carson,J.H. and Smith,R. (1998) hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry*, **37**, 7021-7029.
114. Ainger,K., Avossa,D., Diana,A.S., Barry,C., Barbarese,E. and Carson,J.H. (1997) Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J.Cell Biol.*, **138**, 1077-1087.
115. King,M.L., Zhou,Y. and Bubunenko,M. (1999) Polarizing genetic information in the egg: RNA localization in the frog oocyte. *Bioessays*, **21**, 546-557.
116. Melton,D.A. (1987) Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of *Xenopus* oocytes. *Nature*, **328**, 80-82.
117. Zhang,J. and King,M.L. (1996) *Xenopus* VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development*, **122**, 4119-4129.
118. Mowry,K.L. and Melton,D.A. (1992) Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science*, **255**, 991-994.
119. Betley,J.N., Frith,M.C., Graber,J.H., Choo,S. and Deshler,J.O. (2002) A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates. *Curr.Biol.*, **12**, 1756-1761.

120. Zhou, Y., Zhang, J. and King, M.L. (2004) Polarized distribution of mRNAs encoding a putative LDL receptor adaptor protein, xARH (autosomal recessive hypercholesterolemia) in *Xenopus* oocytes. *Mech.Dev.*, **121**, 1249-1258.
121. Claussen, M. and Pieler, T. (2004) Xvelo1 uses a novel 75-nucleotide signal sequence that drives vegetal localization along the late pathway in *Xenopus* oocytes. *Dev.Biol.*, **266**, 270-284.
122. McKeown, M. (1992) Alternative mRNA splicing. *Annu.Rev.Cell Biol.*, **8**, 133-155.
123. Varmus, H. (1988) Retroviruses. *Science*, **240**, 1427-1435.
124. Daly, T.J., Cook, K.S., Gray, G.S., Maione, T.E. and Rusche, J.R. (1989) Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element *in vitro*. *Nature*, **342**, 816-819.
125. Ernst, R.K., Bray, M., Rekosh, D. and Hammarskjold, M.L. (1997) A structured retroviral RNA element that mediates nucleocytoplasmic export of intron-containing RNA. *Mol.Cell Biol.*, **17**, 135-144.
126. Cairrao, F., Arraiano, C. and Newbury, S. (2005) *Drosophila* gene tazman, an orthologue of the yeast exosome component Rrp44p/Dis3, is differentially expressed during development. *Dev.Dyn.*, **232**, 733-737.
127. Meyer, S., Temme, C. and Wahle, E. (2004) Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.*, **39**, 197-216.
128. Newbury, S. and Woollard, A. (2004) The 5'-3' exoribonuclease xrn-1 is essential for ventral epithelial enclosure during *C. elegans* embryogenesis. *RNA.*, **10**, 59-65.
129. Newbury, S.F. (2006) Control of mRNA stability in eukaryotes. *Biochem.Soc.Trans.*, **34**, 30-34.
130. Chen, C.Y. and Shyu, A.B. (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem.Sci.*, **20**, 465-470.
131. Guhaniyogi, J. and Brewer, G. (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*, **265**, 11-23.
132. Carballo, E. and Blackshear, P.J. (2001) Roles of tumor necrosis factor-alpha receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome. *Blood*, **98**, 2389-2395.
133. Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Carballo, E., Alexopoulou, L., Blackshear, P.J., Gaestel, M., Davis, R., Flavell, R. and Kollias, G. (2001) Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J.*, **20**, 3760-3770.
134. Taylor, G.A., Carballo, E., Lee, D.M., Lai, W.S., Thompson, M.J., Patel, D.D., Schenkman, D.I., Gilkeson, G.S., Broxmeyer, H.E., Haynes, B.F. *et al.* (1996) A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity.*, **4**, 445-454.
135. Air, G.M., Blackburn, E.H., Coulson, A.R., Galibert, F., Sanger, F., Sedat, J.W. and Ziff, E.B. (1976) Gene F of bacteriophage phiX174. Correlation of nucleotide sequences from the DNA and amino acid sequences from the gene product. *J.Mol.Biol.*, **107**, 445-458.
136. Crick, F.H. (1968) The origin of the genetic code. *J.Mol.Biol.*, **38**, 367-379.
137. Freeland, S.J., Wu, T. and Keulmann, N. (2003) The case for an error minimizing standard genetic code. *Orig.Life Evol.Biosph.*, **33**, 457-477.

-
138. Grantham,R., Gautier,C., Gouy,M., Mercier,R. and Pave,A. (1980) Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res.*, **8**, r49-r62.
 139. Dong,H., Nilsson,L. and Kurland,C.G. (1996) Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J.Mol.Biol.*, **260**, 649-663.
 140. Kurland,C. and Gallant,J. (1996) Errors of heterologous protein expression. *Curr.Opin.Biotechnol.*, **7**, 489-493.
 141. Goldman,E., Rosenberg,A.H., Zubay,G. and Studier,F.W. (1995) Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.*, **245**, 467-473.
 142. Mattes,R. (2001) The production of improved tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Semin.Thromb.Hemost.*, **27**, 325-336.
 143. Chapman,B.S., Thayer,R.M., Vincent,K.A. and Haigwood,N.L. (1991) Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3979-3986.
 144. Takeshita,F., Takase,K., Tozuka,M., Saha,S., Okuda,K., Ishii,N. and Sasaki,S. (2007) Muscle creatine kinase/SV40 hybrid promoter for muscle-targeted long-term transgene expression. *Int.J.Mol.Med.*, **19**, 309-315.
 145. Oshikiri,T., Miyamoto,M., Hiraoka,K., Shichinohe,T., Kawarada,Y., Kato,K., Suzuoki,M., Nakakubo,Y., Kondo,S., Dosaka-Akita,H. *et al.* (2006) Transcriptional targeting of adenovirus vectors with the squamous cell carcinoma-specific antigen-2 promoter for selective apoptosis induction in lung cancer. *Cancer Gene Ther.*, **13**, 856-863.
 146. van Gaal,E.V., Hennink,W.E., Crommelin,D.J. and Mastrobattista,E. (2006) Plasmid engineering for controlled and sustained gene expression for nonviral gene therapy. *Pharm.Res.*, **23**, 1053-1074.
 147. Jenke,A.C., Scinteie,M.F., Stehle,I.M. and Lipps,H.J. (2004) Expression of a transgene encoded on a non-viral episomal vector is not subject to epigenetic silencing by cytosine methylation. *Mol.Biol.Rep.*, **31**, 85-90.
 148. Stoll,S.M., Scimienti,C.R., Baba,E.J., Meuse,L., Kay,M.A. and Calos,M.P. (2001) *Epstein-Barr virus*/human vector provides high-level, long-term expression of alpha1-antitrypsin in mice. *Mol.Ther.*, **4**, 122-129.
 149. Grimes,B.R., Warburton,P.E. and Farr,C.J. (2002) Chromosome engineering: prospects for gene therapy. *Gene Ther.*, **9**, 713-718.
 150. Spence,J.M., Critcher,R., Ebersole,T.A., Valdivia,M.M., Earnshaw,W.C., Fukagawa,T. and Farr,C.J. (2002) Co-localization of centromere activity, proteins and topoisomerase II within a subdomain of the major human X alpha-satellite array. *EMBO J.*, **21**, 5269-5280.
 151. Graf,M., Deml,L. and Wagner,R. (2004) Codon-optimized genes that enable increased heterologous expression in mammalian cells and elicit efficient immune responses in mice after vaccination of naked DNA. *Methods Mol.Med.*, **94**, 197-210.
 152. Brockmann,R., Beyer,A., Heinisch,J.J. and Wilhelm,T. (2007) Posttranscriptional expression regulation: what determines translation rates? *PLoS.Comput.Biol.*, **3**, e57.
 153. Hisano,M., Ohta,H., Nishimune,Y. and Nozaki,M. (2003) Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene, Tact1/Actl7b, represses its expression in somatic cells. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4797-4804.

-
154. Yew,N.S., Wysokenski,D.M., Wang,K.X., Ziegler,R.J., Marshall,J., McNeilly,D., Cherry,M., Osburn,W. and Cheng,S.H. (1997) Optimization of plasmid vectors for high-level expression in lung epithelial cells. *Hum.Gene Ther.*, **8**, 575-584.
 155. Yew,N.S. (2005) Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design. *Adv.Drug Deliv.Rev.*, **57**, 769-780.
 156. Akan,P. and Deloukas,P. (2008) DNA sequence and structural properties as predictors of human and mouse promoters. *Gene*, **410**, 165-176.
 157. Antoniou,M., Harland,L., Mustoe,T., Williams,S., Holdstock,J., Yague,E., Mulcahy,T., Griffiths,M., Edwards,S., Ioannou,P.A. *et al.* (2003) Transgenes encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and HNRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing. *Genomics*, **82**, 269-279.
 158. Beutler,E., Gelbart,T., Han,J.H., Koziol,J.A. and Beutler,B. (1989) Evolution of the genome and the genetic code: selection at the dinucleotide level by methylation and polyribonucleotide cleavage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **86**, 192-196.
 159. Leikam,D. Die Rolle von CpG-Dinukleotiden bei der Regulation der Transgenexpression am Beispiel verschiedener Reportergene. OPUS Regensburg . 6-11-2006.
Ref Type: Thesis/Dissertation
 160. Kosovac,D. Plasmid basierte DNA-Vektor-Systeme; Aktivierung der angeborenen Immunität durch Modulationen im Vektor-Rückgrat und Einsatz in der Gentherapie. 2008.
Ref Type: Thesis/Dissertation
 161. Reinhart,B. and Chaillet,J.R. (2005) Genomic imprinting: cis-acting sequences and regional control. *Int.Rev.Cytol.*, **243**, 173-213.
 162. Konduri,S.D., Srivenugopal,K.S., Yanamandra,N., Dinh,D.H., Olivero,W.C., Gujrati,M., Foster,D.C., Kisiel,W., Ali-Osman,F., Kondraganti,S. *et al.* (2003) Promoter methylation and silencing of the tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), a gene encoding an inhibitor of matrix metalloproteinases in human glioma cells. *Oncogene*, **22**, 4509-4516.
 163. Przybylska,M., Wu,I.H., Zhao,H., Ziegler,R.J., Tousignant,J.D., Desnick,R.J., Scheule,R.K., Cheng,S.H. and Yew,N.S. (2004) Partial correction of the alpha-galactosidase A deficiency and reduction of glycolipid storage in Fabry mice using synthetic vectors. *J.Gene Med.*, **6**, 85-92.
 164. Sharp,P.M. and Li,W.H. (1987) The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 1281-1295.
 165. Gonzalez-Nicieza,R., Turner,D.P. and Connolly,B.A. (2001) DNA binding and cleavage selectivity of the Escherichia coli DNA G:T-mismatch endonuclease (vsr protein). *J.Mol.Biol.*, **310**, 501-508.
 166. Marinus,M.G. and Morris,N.R. (1973) Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of Escherichia coli K-12. *J.Bacteriol.*, **114**, 1143-1150.
 167. Carr,I.M., Valleley,E.M., Cordery,S.F., Markham,A.F. and Bonthron,D.T. (2007) Sequence analysis and editing for bisulphite genomic sequencing projects. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e79.
 168. Sodoyer,R. (2004) Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *BioDrugs*, **18**, 51-62.
 169. Care,S., Bignon,C., Pelissier,M.C., Blanc,E., Canard,B. and Coutard,B. (2008) The translation of recombinant proteins in *E.coli* can be improved by in silico generating and

- screening random libraries of a -70/+96 mRNA region with respect to the translation initiation codon. *Nucleic Acids Res.*, **36**, e6.
170. Cihak,A. (1974) Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology*, **30**, 405-422.
171. Phi-Van,L., von Kries,J.P., Ostertag,W. and Stratling,W.H. (1990) The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol.Cell Biol.*, **10**, 2302-2307.
172. Fujii,G., Nakamura,Y., Tsukamoto,D., Ito,M., Shiba,T. and Takamatsu,N. (2006) CpG methylation at the USF-binding site is important for the liver-specific transcription of the chipmunk HP-27 gene. *Biochem.J.*, **395**, 203-209.
173. Deng,G., Chen,A., Pong,E. and Kim,Y.S. (2001) Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene*, **20**, 7120-7127.
174. Sarraf,S.A. and Stancheva,I. (2004) Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol.Cell*, **15**, 595-605.
175. Allamane,S., Jourdes,P., Ratel,D., Vicat,J.M., Dupre,I., Laine,M., Berger,F., Benabid,A.L. and Wion,D. (2000) Bacterial DNA methylation and gene transfer efficiency. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **276**, 1261-1264.
176. Wang,J.M., Sherry,B., Fivash,M.J., Kelvin,D.J. and Oppenheim,J.J. (1993) Human recombinant macrophage inflammatory protein-1 alpha and -beta and monocyte chemotactic and activating factor utilize common and unique receptors on human monocytes. *J.Immunol.*, **150**, 3022-3029.
177. Liu,W., Xiong,Y. and Gossen,M. (2006) Stability and homogeneity of transgene expression in isogenic cells. *J.Mol.Med.*, **84**, 57-64.
178. Brooks,A.R., Harkins,R.N., Wang,P., Qian,H.S., Liu,P. and Rubanyi,G.M. (2004) Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J.Gene Med.*, **6**, 395-404.
179. Narlikar,G.J., Fan,H.Y. and Kingston,R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**, 475-487.
180. Sutter,G., Ohlmann,M. and Erfle,V. (1995) Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett.*, **371**, 9-12.
181. Leclerc,G.J., Leclerc,G.M. and Barredo,J.C. (2002) Real-time RT-PCR analysis of mRNA decay: half-life of Beta-actin mRNA in human leukemia CCRF-CEM and Nalm-6 cell lines. *Cancer Cell Int.*, **2**, 1.
182. Duan,J. and Antezana,M.A. (2003) Mammalian mutation pressure, synonymous codon choice, and mRNA degradation. *J.Mol.Evol.*, **57**, 694-701.
183. Patrone,G., Puppo,F., Cusano,R., Scaranari,M., Ceccherini,I., Puliti,A. and Ravazzolo,R. (2000) Nuclear run-on assay using biotin labeling, magnetic bead capture and analysis by fluorescence-based RT-PCR. *Biotechniques*, **29**, 1012-1017.
184. Hirose,Y. and Ohkuma,Y. (2007) Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J.Biochem.*, **141**, 601-608.

185. Hong,S., Hwang,D.Y., Yoon,S., Isacson,O., Ramezani,A., Hawley,R.G. and Kim,K.S. (2007) Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mol. Ther.*, **15**, 1630-1639.
186. Dehe,P.M. and Geli,V. (2006) The multiple faces of Set1. *Biochem.Cell Biol.*, **84**, 536-548.
187. Martin,C. and Zhang,Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **6**, 838-849.
188. Nagy,P.L., Griesenbeck,J., Kornberg,R.D. and Cleary,M.L. (2002) A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99**, 90-94.
189. Carlone,D.L., Lee,J.H., Young,S.R., Dobrota,E., Butler,J.S., Ruiz,J. and Skalnik,D.G. (2005) Reduced genomic cytosine methylation and defective cellular differentiation in embryonic stem cells lacking CpG binding protein. *Mol.Cell Biol.*, **25**, 4881-4891.
190. Mitsudomi,T., Steinberg,S.M., Nau,M.M., Carbone,D., D'Amico,D., Bodner,S., Oie,H.K., Linnoila,R.I., Mulshine,J.L., Minna,J.D. *et al.* (1992) p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene*, **7**, 171-180.
191. Numa,F., Hirabayashi,K., Tsunaga,N., Kato,H., O'Rourke,K., Shao,H., Stechmann-Lebakken,C., Varani,J., Rapraeger,A. and Dixit,V.M. (1995) Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res.*, **55**, 4676-4680.
192. Kao,F.T. and Puck,T.T. (1968) Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **60**, 1275-1281.
193. Schenborn,E.T. and Goiffon,V. (2000) Calcium phosphate transfection of mammalian cultured cells. *Methods Mol.Biol.*, **130**, 135-145.
194. Hanahan,D. and Meselson,M. (1980) Plasmid screening at high colony density. *Gene*, **10**, 63-67.
195. Sambrook,J., Fritsch,E.F. and Maniatis,T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, New York.
196. Sanger,F., Nicklen,S. and Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **74**, 5463-5467.
197. Pfaffl,M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45.
198. Guan,K.L. and Dixon,J.E. (1991) Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal.Biochem.*, **192**, 262-267.
199. 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**, 248-254.
200. Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
201. Towbin,H., Staehelin,T. and Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **76**, 4350-4354.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
A_x	Absorption bei x nm Wellenlänge
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARE	<i>AU rich element</i>
AS	Aminosäure
Amp	Ampicillin

B

b	Basen
bp	Basenpaare
BGH	Bovines Wachstumshormon (bovine growth hormone)

C

ca.	zirka
m^5C	5-Methylcytosin
CAI	Codon Adaptation Index
cDNA	(zu RNA) komplementärer DNA-Strang
CF	Cleavage Factor
CFP1	CXXC Finger Protein
CGBP	<i>CpG binding protein</i>
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMV Promotor	humaner Cytomegalievirus immediate early promoter
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin Dinukleotid
CPSF	Cleavage and polyadenylation specific factor
CREB	Ca^{2+} /cAMP-response element binding protein
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
CStF	Cleavage stimulatory factor
CXXC	Cystein-X-X-Cystein

D

Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig

E

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKS	fötale Kälberserum
FRT	Flp Rekombinationsstellen
fwd	Vorwärts (<i>forward</i>)
G	
g	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
GST	Glutathion-S-Transferase
H	
HAT	Histon-Acetyltransferase
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HDAC	Histondeacetylase
HIV	<i>humane immunodeficiency virus</i>
<i>hph</i>	Hygromycin B-Resistenzgen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
hum.	Humanes
I	
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
K	
k	Zerfallskonstante
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
L	
λ	Wellenlänge
LC	LightCycler
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidasegen
LB	Luria Bertoni
M	
M	Molar
MBD	methylCpG-Bindedomäne
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MeCP2	methylCpG-Bindeprotein 2
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität

MIP	Makrophagen Entzündungsprotein
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mur.	murin
MVA	<i>modified vaccinia ankara</i>
N	
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NGF	<i>nerve growth factor</i>
Nukl.	Nukleotid
O	
OD _x	optische Dichte bei xnm Wellenlänge
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
P	
PA	Polyacrylamid
PAB	PolyA-Bindeprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pos.	Position
R	
R	Purinbase
rev	Rückwärts (<i>reverse</i>)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur reverse Transkription
S	
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
Sp1	<i>Specificity Protein 1</i>
ss	einzelsträngig
SV40	<i>simian virus 40</i>
SV40 Promotor	<i>SV40 early promoter</i>
T	
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TMD	Transmembrandomäne

TNF	Tumor Nekrose Faktor
TpA	Thymidin-Phosphat-Adenosin Dinukleotid
TRD	Transkriptionsreprimierende Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	
U	Units
UTR	Nichttranslatierte Region
üN	üner Nacht
UV	Ultraviolett
V	
VT	Volumenteil
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
W	
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
X	
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
Y	
Y	Pyrimidinbase
Z	
z.B.	zum Beispiel

8.2 Sequenzen

8.2.1 Zytokine

Grau unterlegte Sequenzen kennzeichnen CpG Dinukleotide im „sense“-Strang

8.2.1.1 *humanes GM-CSF*

humanes GM-CSF wt (10CpG)

```

1      ATGTGGCTGC AGAGCCTGCT GCTCTTGGGC ACTGTGGCCT GCAGCATCTC TGCACCCGCC
61     CGCTCGCCCA GCCCCAGCAC GCAGCCCTGG GAGCATGTGA ATGCCATCCA GGAGGCCCGG
121    CGTCTCCTGA ACCTGAGTAG AGACACTGCT GCTGAGATGA ATGAAACAGT AGAAGTCATC
181    TCAGAAATGT TTGACCTCCA GGAGCCGACC TGCCTACAGA CCGCCTGGA GCTGTACAAG
241    CAGGGCCTGC GGGGCAGCCT CACCAAGCTC AAGGGCCCCT TGACCATGAT GGCCAGCCAC
301    TACAAGCAGC ACTGCCCTCC AACCCCGGAA ACTTCCTGTG CAACCCAGAT TATCACCTTT
361    GAAAGTTTCA AAGAGAACCT GAAGGACTTT CTGCTTGTCA TCCCCTTTGA CTGCTGGGAG
421    CCAGTCCAGG AGTAG

```

humanes GM-CSF 0CpG

```

1      ATGTGGCTGC AGTCTCTGCT GCTGCTGGGA ACAGTGGCCT GTTCTATTTT TCCCCCTGCC
61     AGATCTCCTA GCCCTTCTAC ACAGCCTTGG GAGCATGTGA ATGCCATTC A GGAGGCCAGG
121    AGACTGCTGA ATCTGAGCAG AGACACAGCT GCTGAGATGA ATGAGACAGT GGAGGTGATC
181    TCTGAGATGT TTGACCTGCA GGAGCCTACA TGCCTGCAGA CAAGGCTGGA GCTGTATAAG
241    CAGGGCCTGA GAGGCTCTCT GACAAAGCTG AAGGGCCCCT TGACAATGAT GGCCAGCCAC
301    TACAAACAGC ACTGCCCTCC TACACCTGAG ACAAGCTGTG CCACCCAGAT CATCACCTTT
361    GAGAGCTTCA AGGAGAACCT GAAGGACTTC CTGCTGGTGA TCCCCTTTGA TTGTTGGGAG
421    CCTGTGCAGG AGTAG

```

humanes GM-CSF 12CpG (kodonoptimiert)

```

1      ATGTGGCTGC AGAGCCTGCT GCTGCTGGGA ACAGTGGCCT GTAGCATCTC TCCCCCTGCC
61     AGAAGCCCTA GCCCTAGCAC ACAGCCTTGG GAGCAGCTGA ATGCCATCCA GGAGGCCAGG
121    AGACTGCTGA ACCTGAGCAG AGATACAGCC GCCGAGATGA ACCGAGACCGT GGAGGTGATC
181    AGCGAGATGT TCGACCTGCA GGAGCCTACA TGCCTGCAGA CCGGCTGGA GCTGTATAAG
241    CAGGGCCTGA GAGGCTCTCT GACCAAGCTG AAGGGCCCCC TGACAATGAT GGCCAGCCAC
301    TACAAGCAGC ACTGCCCTCC TACCCCTGAG ACAAGCTGCG CCACCCAGAT CATCACCTTC
361    GAGAGCTTCA AGGAGAACCT GAAGGACTTC CTGCTGGTGA TCCCCTTCGA TTGCTGGGAG
421    CCCGTGCAGG AGTAG

```

humanes GM-CSF 63CpG

```

1      ATGTGGCTGC AGTCGCTGCT GCTGCTCGGA ACCGTCGCGT GTTCGATCAG CGCGCCTGCC
61     CGGTGCGCGT CGCCGTCGAC GCAGCCGTGG GAGCACGTGA ACGCGATCCA GGAGGCGCGA
121    CGGCTGCTGA ACCTGTGCGG CGATACAGCC GCCGAGATGA ACCGAGACCGT CGAGGTGATC
181    AGCGAGATGT TCGACCTGCA GGAGCCGACG TGCCTGCAGA CGCGGCTCGA ACTGTATAAG
241    CAGGGCCTCC GCGGCTCGCT CACGAAGCTG AAGGGCCCCT TCACGATGAT GCGTCCGCAC
301    TACAAGCAGC ACTGCCCGCC GACGCCCGAA ACGTCTGCGG CGACGCAGAT CATCACGTTT
361    GAGTCGTTCA AGGAGAACCT GAAGGACTTC CTGCTCGTGA TCCCCTTCGA TTGCTGGGAG
421    CCCGTGCAGG AGTAG

```

8.2.1.2 murines GM-CSF

murines GM-CSF wt (11CpG)

```

1      ATGTGGCTGC AGAATTTACT TTTCTGGGC ATTGTGGTCT ACAGCCTCTC AGCACCCACC
61     CGCTCACCCA TCACTGTCAC CCGGCCTTGG AAGCATGTAG AGGCCATCAA AGAAGCCCTG
121    AACCTCCTGG ATGACATGCC TGTACATTG AATGAAGAGG TAGAAGTCGT CTCTAACGAG
181    TTCTCCTTCA AGAAGCTAAC ATGTGTGCAG ACCCGCCTGA AGATATTCGA GCAGGGTCTA
241    CGGGGCAATT TCACCAAAC TCAAGGGCGC TTGAACATGA CAGCCAGCTA CTACCAGACA
301    TACTGCCCCC CAACTCCGGA AACGGACTGT GAAACACAAG TTACCACCTA TGCCGATTTT
361    ATAGACAGCC TTAAAACCTT TCTGACTGAT ATCCCCTTTG AATGCAAAAA ACCAGGCCAA
421    AAATAG

```

murines GM-CSF 0CpG

```

1      ATGTGGCTGC AGAACCTGCT GTTCTGGGC ATTGTGGTGT ACAGCCTGTC TGCCCCTACA
61     AGAAGCCCTA TCACAGTGAC CAGACCCTGG AAGCATGTGG AGGCTATCAA GGAGGCTCTG
121    AACCTGCTGG ATGACATGCC TGTGACCCTG AATGAGGAGG TGGAGGTGGT GAGCAATGAG
181    TTCAGCTTCA AGAAGCTGAC CTGTGTGCAG ACCAGGCTGA AGATCTTTGA GCAGGGCCTG
241    AGAGGCAACT TCACAAAGCT GAAGGGGGCC CTGAATATGA CAGCCAGCTA CTACCAGACC
301    TACTGTCCCTC CTACACCTGA GACAGACTGT GAGACCCAGG TGACCACCTA TGCAGACTTC
361    ATTGACAGCC TGAAAACCTT CCTGACAGAC ATCCCCTTTG AGTGCAAGAA GCCTGGCCAG
421    AAGTAG

```

murines GM-CSF 21CpG (kodonoptimiert)

```

1      ATGTGGCTGC AGAACCTGCT GTTCTGGGC ATCGTGGTGT ACAGCCTGAG CGCCCCCACC
61     AGGAGCCCCA TCACCGTGAC CAGGCCCTGG AAGCACGTGG AGGCCATCAA GGAGGCCCTG
121    AACCTGCTGG ACGACATGCC CGTGACCCTG AACGAGGAGG TGGAGGTGGT GAGCAACGAG
181    TTCAGCTTCA AGAAGCTGAC CTGCGTGCAG ACCAGGCTGA AGATCTTCGA GCAGGGCCTG
241    AGGGGCAACT TCACCAAGCT GAAGGGCGCC CTGAACATGA CCGCCAGCTA CTACCAGACC
301    TACTGCCCCC CCACCCCGA GACCGACTGC GAGACCCAGG TGACCACCTA CGCCGACTTC
361    ATCGACAGCC TGAAGACCTT CCTGACCGAC ATCCCCTTCG AGTGCAAGAA GCCCGGCCAG
421    AAGTAG

```

murines GM-CSF 61CpG

```

1      ATGTGGCTGC AGAACCTGCT GTTCTCGGC ATCGTCTGTGT ACTCGCTGAG CGCGCCGACG
61     CGCTCGCCGA TCACCGTGAC GCGGCCGTGG AAGCACGTGG AGGCGATCAA GGAGGCGCTG
121    AACCTGCTCG ACGACATGCC CGTGACGCTG AACGAGGAGG TCGAGGTTCGT GTCGAACGAG
181    TTCTCGTTCA AGAAGCTGAC GTGCGTGCAG ACGCGGCTGA AGATCTTCGA GCAGGGCCTG
241    CGCGGCAACT TCACGAAGCT GAAGGGCGCG CTGAACATGA CCGCGTCGTA CTACCAGACG
301    TACTGCCCGC CGACGCCGA GACCGATTGC GAGACGCAGG TGACGACGTA CGCCGACTTC
361    ATCGACTCGC TGAAGACGTT CCTGACCGAC ATCCCCTTCG AGTGCAAGAA GCCCGGCCAG
421    AAGTAG

```

8.2.1.3 humanes MIP-1 α

humanes MIP-1 α wt (8CpG)

```

1      ATGCAGGTCT CCACTGCTGC CCTTGCCGTC CTCCTCTGCA CCATGGCTCT CTGCAACCAG
61     GTCTCTCTTG CACCACTTGC TGCTGACACG CCGACCGCCT GCTGCTTCAG CTACACCTCC
121    CGACAGATTC CACAGAATTT CATAGCTGAC TACTTTGAGA CGAGCAGCCA GTGCTCCAAG
181    CCCAGTGTC TCTTCCTAAC CAAGAGAGGC CGGCAGGTCT GTGCTGACCC CAGTGAGGAG
241    TGGGTCCAGA AATACGTCAG TGACCTGGAG CTGAGTGCCT AG

```

humanes MIP-1 α 0CpG

```

1      ATGCAGGTGT CCACAGCTGC CCTGGCTGTG CTGCTGTGTA CAATGGCCCT GTGCAATCAG
61     GTGCTGTCTG CCCCACTGGC TGCAGATAACA CCCACAGCCT GCTGCTTTAG CTACACCAGC
121    AGACAGATCC CCCAGAACTT CATTGCAGAT TACTTTGAGA CCAGCAGCCA GTGTAGCAAG
181    CCCTCTGTGA TCTTCCTGAC CAAGAGGGGC AGACAAGTGT GTGCAGATCC TTCTGAGGAG
241    TGGGTGCAGA AGTATGTGAG TGACCTGGAG CTGTCTGCCT GA

```

humanes MIP-1 α 11CpG (kodonoptimiert)

```

1      ATGCAAGTGT CTACAGCCGC CCTGGCCGTG CTGCTGTGTA CAATGGCCCT GTGCAATCAG
61     GTGCTGTCTG CCCCTCTGGC CGCCGATAACA CCTACAGCCT GCTGCTTCAG CTACACCAGC
121    AGACAGATCC CCCAGAACTT CATCGCCGAC TACTTCGAGA CAAGCAGCCA GTGTAGCAAG
181    CCTAGCGTGA TCTTCCTGAC CAAGAGAGGC AGACAGGTGT GCGCCGATCC TTCTGAAGAG
241    TGGGTGCAGA AGTACGTCAG TGATCTGGAG CTGTCTGCCT AG

```

humanes MIP-1 α 43CpG

```

1      ATGCAAGTGT CGACCGCCGC TCTCGCCGTG CTGCTGTGCA CGATGGCGCT GTGCAACCAA
61     GTGCTGAGCG CGCCTCTCGC CGCCGACACG CCGACCGCGT GCTGCTTCTC GTACACGTCG
121    CGGCAGATCC CGCAGAACTT CATCGCCGAC TACTTCGAGA CGTCGTCGCA GTGCTCGAAG
181    CCGAGCGTGA TCTTCCTGAC GAAGCGCGGA CCGCAAGTGT GCGCCGACCC GAGCGAGGAG
241    TGGGTGCAGA AGTACGTCAG CGACCTCGAA CTGAGCGCGT AG

```

8.2.1.4 murines MIP-1 α

murines MIP-1 α wt (7CpG)

```

1      ATGAAGGTCT CCACCACTGC CCTTGCTGTT CTTCTCTGTA CCATGACACT CTGCAACCAA
61     GTCTTCTCAG CGCCATATGG AGCTGACACC CCGACTGCCT GCTGCTTCTC CTACAGCCGG
121    AAGATTCCAC GCCAATTCAT CGTTGACTAT TTTGAAACCA GCAGCCTTTG CTCCCAGCCA
181    GGTGTCATTT TCCTGACTAA GAGAAACCGG CAGATCTGCG CTGACTCCAA AGAGACCTGG
241    GTCCAAGAAAT ACATCACTGA CCTGGAACTG AATGCCTAG

```

murines MIP-1 α 0CpG

```

1      ATGAAGGTGA GCACAACAGC TCTGGCTGTG CTGCTGTGTA CCATGACCCT GTGCAACCAG
61     GTGTTCTCTG CCCCTTATGG AGCAGATACC CCTACAGCCT GCTGTTTCAG CTACAGCAGG
121    AAGATCCCCA GGCAGTTCAT TGTGGACTAC TTTGAGACCA GCAGCCTGTG TTCTCAGCCT
181    GGGGTGATCT TTCTGACCAA GAGGAACAGG CAGATCTGTG CAGACAGCAA GGAGACATGG
241    GTGCAGGAGT ACATCACAGA CCTGGAGCTG AATGCCTAG

```

murines MIP-1 α 13CpG (kodonoptimiert)

```

1      ATGAAGGTGA GCACCACAGC TCTGGCTGTG CTGCTGTGCA CCATGACCCT GTGCAACCAG
61     GTGTTCAGCG CTCCTTACGG CGCCGATACC CCTACAGCCT GCTGCTTCAG CTACAGCAGG
121    AAGATCCCCA GGCAGTTCAT CGTGGACTAC TTTGAGACCA GCAGCCTGTG TTCTCAGCCC
181    GCGGTGATCT TCCTGACCAA GCGGAACAGA CAGATCTGCG CCGACAGCAA GGAGACATGG
241    GTGCAGGAGT ACATCACCGA CCTGGAGCTG AACGCCTAG

```

murines MIP-1 α 42CpG

```

1      ATGAAGGTGT CGACGACCGC GCTCGCCGTG CTGCTGTGCA CGATGACGCT GTGCAACCAG
61     GTGTTCAGCG CCCCGTACGG CGCCGACACG CCGACCGCGT GCTGCTTCTC GACTCGCGG
121    AAGATCCCGC GGCAGTTCAT CGTCGACTAC TTTGAAACGT CGTCGCTGTG CTCGCAGCCC
181    GCGGTGATCT TCCTCACGAA GCGGAACCGG CAGATCTGCG CCGACTCGAA GGAAACGTGG
241    GTGCAGGAGT ACATCACCGA CCTCGAACTG AACCGCTAG

```

8.2.2 CFP1

8.2.2.1 CFP1 *Homo sapiens*

```

1      ATGGAGGGAG ATGGTTCAGA CCCAGAGCCT CCAGATGCCG GGGAGGACAG CAAGTCCGAG
61     AATGGGGAGA ATGCGCCCAT CTA CTACTGCATC TGCCGCAAAC CGGACATCAA CTGCTTCATG
121    ATCGGGTGTG ACAACTGCAA TGAGTGGTTC CATGGGGACT GCATCCGGAT CACTGAGAAG
181    ATGGCCAAGG CCATCCGGGA GTGGTACTGT CGGGAGTGCA GAGAGAAAAGA CCCCAAGCTA
241    GAGATTTCGCT ATCGGCACAA GAAGTCACGG GAGCGGGATG GCAATGAGCG GGACAGCAGT
301    GAGCCCCGGG ATGAGGGTGG AGGGCGCAAG AGGCCTGTCC CTGATCCAAA CCTGCAGCGC
361    CGGGCAGGGT CAGGGACAGG GGTGGGGGCC ATGCTTGCTC GGGGCTCTGC TTCGCCCCAC
421    AAATCCTCTC CGCAGCCCTT GGTGGCCACA CCCAGCCAGC ATCACCAGCA GCAGCAGCAG
481    CAGATCAAAC GGT CAGCCCG CATGTGTGGT GAGTGTGAGG CATGTCCGGC CACTGAGGAC
541    TGTGGTCACT GTGATTTCTG TCGGGACATG AAGAAGTTCG GGGGCCCCAA CAAGATCCGG
601    CAGAAGTGCC GGCTGCGCCA GTGCCAGCTG CGGGCCCGGG AATCGTACAA GTACTTCCCT
661    TCCTCGTCTT CACCAGTGAC GCCCTCAGAG TCCCTGCCAA GGCCCCGCCG GCCACTGCC
721    ACCCAACAGC AGCCACAGCC ATCACAGAAG TTAGGGCGCA TCCGTGAAGA TGAGGGGGCA
781    GTGGCGTCAT CAACAGTCAA GGAGCCTCCT GAGGCTACAG CCACACCTGA GCCACTCTCA
841    GATGAGGACC TACCTCTGGA TCCTGACCTG TATCAGGACT TCTGTGCAGG GGCTTTTGAT
901    GACAATGGCC TGCCCTGGAT GAGCGACACA GAAGAGTCCC CATTCCTGGA CCCC GCGCTG
961    CGGAAGAGGG CAGTGAAAAGT GAAGCATGTG AAGCGTCGGG AGAAGAAGTC TGAGAAGAAG
1021   AAGGAGGAGC GATACAAGCG GCATCGGCAG AAGCAGAAGC ACAAGGATAA ATGGAAACAC
1081   CCAGAGAGGG CTGATGCCAA GGACCCTGCG TCACTGCCCC AGTGCC TGGG GCCCGGCTGT
1141   GTGCGCCCCG CCCAGCCCAG CTCCAAGTAT TGCTCAGATG ACTGTGGCAT GAAGCTGGCA
1201   GCCAACC GCA TCTACGAGAT CCTCCCCCAG CGCATCCAGC AGTGGCAGCA GAGCCCTTGC
1261   ATTGCTGAAG AGCACGGCAA GAAGCTGCTC GAACGCATT C GCGAGAGCA GCAGAGTGCC
1321   CGCACCCGCC TTCAGGAAAT GGAACGCCGA TTCCATGAGC TTGAGGCCAT CAT TCTACGT
1381   GCCAAGCAGC AGGCTGTGCG CGAGGATGAG GAGAGCAACG AGGGTGACAG TGATGACACA
1441   GACCTGCAGA TCTTCTGTGT TTCTGTGGG CACCCCATCA ACCCACGTGT TGCCTTGCGC
1501   CACATGGAGC GCTGCTACGC CAAGTATGAG AGCCAGACGT CCTTTGGGTC CATGTACCCC
1561   ACACGCATTG AAGGGGCCAC ACGACTCTTC TGTGATGTGT ATAATCCTCA GAGCAAAAACA
1621   TACTGTAAGC GGCTCCAGGT GCTGTGCCCC GAGCACTCAC GGGACCCCAA AGTGCCAGCT
1681   GACGAGGTAT GCGGGTGCCC CCTTGTACGT GATGTCTTTG AGCTCACGGG TGACTTCTGC
1741   CGCCTGCCCA AGCGCCAGTG CAATCGCCAT TACTGCTGGG AGAAGCTGCG GCGTGCGGAA
1801   GTGGACTTGG AGCGCGTGCG TGTGTGGTAC AAGCTGGACG AGCTGTTTGA GCAGGAGCGC
1861   AATGTGCGCA CAGCCATGAC AAACCGCGCG GGATTGCTGG CCTGATGCT GCACCAGACG
1921   ATCCAGCAGC ATCCCCTCAC TACCGACCTG CGCTCCAGTG CCGACCGCTG A

```

8.2.2.2 CFP1 *Cricetulus griseus*

```

1      GTGAGTGTGA GGCATGCCGG CGCACTGAGG ACTGTGGCCA CTGTGATTTT TGCCGTGACA
61     TGAAGAAGTT CGGGGGGCCC AACCAAGATCC GGCAGAAGTG CCGGCTTCGC CAGTGTCCAGC
121    TGCGGGCACG GGAATCGTAC AAGTACTTCC CTTCCTCGCT CTCGCCGGTG ACGCCCTCAG
181    AGGCCCTGCC AAGGCCCCGC CGGCCACCAC CCACTCAACA GCAGCCACAG CCATCCCAGA
241    AGCTGGGGCG TATCCGTGAA GATGAGGGGA CAGTGTGTGC ATCTGTGGGT AAGGAGCTGC
301    CAGAGGCTAC AGCAACACCC GAGCCACTCT CAGATGAGGA CCTGGCATTG GACCCTGACC
361    TGTACCAGGA CTCTGTGACC GGAGCCTTTG ATGATCACGG CCTACCCTGG ATGAGTGACG
421    CAGAAGAGTC CCCATTCCCTG GATCCCACAA TGAGGAAACG GGCCGTAAAA GTGAAGCACG
481    TGAAGCGTCG AGAGAAGAAG TCTGAGAAGA AGAAGGAGGA GAGATATAAA CGGCATCGAC
541    AGAAGCAGAA GCATAAAGAC AAATGGAAAC ACCCAGAGAG GGCTGATGCC AAGGACCCTG
601    CATCACTACC GCAGTGCCTG GGGCCTGGCT GTGTGCATGC TGCCCAGCCT GGTTCCTAAGT
661    ATTGTTTCTG TGACTGTGGC ATGAAGCTGG CAGCCAACCG AATCTATGAG ATTCTCCCGC
721    AGCGCATCCA GCAGTGGCAG CAAAGCCCCT GCATTGCTGA AGAACATGGC AAGAAGCTCC
781    TGGAACGCAT CCGCCGTGAA CAGCAGAGTG CCCGAACCCG TCTTCAAGAA ATGGAACGCA
841    GATTCCATGA ACTTGAGGCC ATCATTCTTC GTGCTAAGCA GCAGGCTGTG CGTGAGGATG
901    AGGAGAACAA TGAGAAATGAC AGTGACGACA CAGATCTACA GATCTTCTGT GTCTCCTGTG
961    GACATCCCAT CAACCCACGT GTTGCCTTGC GTCACATGGA GCGTTGCTAT GCCAAGTATG
1021   AGAGCCAGAC ATCCTTTGGG TCCATGTACC CCACACGCAT TGAAGGGGCT ACCCGACTCT
1081   TCTGTGACGT CTACAATCCC CAGAGCAAAA CATACTGTAA GCGGCTCCAG GTGCTATGTC
1141   CTGAGCACTC ACGGGACCCC AAAGTGCCCG CTGATGAGGT CTGTGGGTGT CCACTTGTAC
1201   GTGATGTCTT TGAACTCACA GGTGATTTTT GCCGTCTGCC TAAGCGCCAG TGCAATCGCC
1261   ATTATTGCTG GGAGAAGCTT CGGCGTGCAG AAGTGGACTT AGAGCGTGTG CGGGTGTGGT
1321   ATAAGCTGGA CGAGCTGTTT GAGCAGGAAC GTAATGTTTC CACAGCCATG ACCAACCGAG
1381   CAGGATTACT TGCCCTGATG CTGCACAAA CGATCCAACA TGACCCACTC ACTACCGACC
1441   TTCGCTCTAG TGCCGACCGC TGA

```

Publikationen

Posterpräsentationen

Bauer A., Notka F., Graf M., Wild J. and Wagner R. (2004)

Recombinant Chemokines as natural adjuvant of innovative HIV-Vaccines. Poster presentation; 2nd International Conference on Strategies for Immune Therapy; February 28-March 3, 2004, Würzburg, Germany

Bauer A., Notka F., Graf M., Wild J. and Wagner R. (2004)

Recombinant Chemokines as Natural Adjuvants of Innovative HIV Candidate Vaccines. Poster presentation; 25th Annual Meeting of the German society of Virology; March 17-20, 2004, Tübingen, Germany

Bauer A., Notka F., Graf M., Wild J. and Wagner R. (2004)

Recombinant chemokines as natural adjuvant of innovative HIV vaccines. Poster presentation; 3rd European Conference on Viral Diseases (ConVir); May 14–16, 2004, Regensburg, Germany

Bauer A., Notka F., Graf M., Wild J. and Wagner R. (2005)

Recombinant chemokines as molecular adjuvants for innovative HIV-vaccines. Poster presentation; 26th Annual Meeting of the German Society of Virology (GfV); March 16-20, 2005, Hannover, Germany

Bauer A., Notka F., Graf M., Wild J. and Wagner R. (2006)

Influence of transgenic CpG Dinucleotides on Transgene Expression. Poster presentation; AIDS Vaccine Conference; August 29-September 1, 2006, Amsterdam, The Netherlands

Bauer A., Notka F., Graf M., Wild J. and Wagner R. (2006)

Recombinant Chemokines as Molecular Adjuvants. Poster presentation; 27th Annual Meeting of the German Society of Virology (GfV); March 15-18, 2005, Munich, Germany

Bauer A., Notka F., Graf M., Wild J. and Wagner R. (2006)

Regulating cytokine expression via modulation of the coding sequence. Poster presentation; 13th Annual Meeting of the German Society of Gene Therapy (DG-GT); July 12-14, 2006, Düsseldorf, Germany

Bauer A., Notka F., Graf M., Wild J. and Wagner R. (2007)

Modulation of transgene expression by transgenic CpG dinucleotides. Poster presentation; 3rd International Conference DNA Vaccines; May 23-25, 2007, Malaga, Spain

Bauer A., Notka F., Graf M. and Wagner R. (2007)

Improvement of Vaccines by Influencing Transgene Expression via intragenic CpG Dinucleotides. Poster presentation; 14th Annual Meeting of the German Society of Gene Therapy (DG-GT); July 18-20, 2007, Heidelberg, Germany

Wagner R., Bauer A., Notka F., Graf M. and Wild J.

Improvement of vaccines by influencing transgene expression via intragenic CpG dinucleotides. Poster presentation; AIDS Vaccine Conference; August 20-23, 2007, Seattle, USA

Vortrag

Bauer A., Notka F., Graf M. and Wagner R. (2007)

Improvement of vaccines by influencing transgene expression via intragenic CpG dinucleotides. Oral presentation; 15th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), October 27-30, 2007, Rotterdam, The Netherlands

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen, sowie für die interessante Promotionsthematik, die Finanzierung und die fachlich kompetente Betreuung dieser Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hans Wolf für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Klinikum der Universität Regensburg.

Herrn Prof. Dr. Stephan Schneuwly danke ich für die bereitwillige und unkomplizierte Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Dr. Frank Notka bedanke ich mich ganz herzlich für die kompetente Einführung in das Promotionsthema, die stete Diskussionsbereitschaft, die konstruktiven Vorschläge trotz übervollem Terminkalender und die aufbauenden Worte in Phasen der Resignation.

Der gesamten AG Wagner danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Kollegialität und die Unterstützung bei kleineren und größeren Problemen fachlicher und privater Natur. Ein ganz besonderer Dank gilt den Bewohnern des Labors 66: Kristina ("geh weg von die Regale..."), Patricia ("ganz ehrlich, ich seh des nich ein..."), Simon ("... da nix dann veit da nix"), Simone ("warum bin ich eigentlich immer die Letzte...?") und Immigrant Andi ("manchmal kannst Du echt widerlich sein..."). Egal, wie tief das Motivationsloch war, Ihr habt meine Lebenspester immer wieder geweckt!

Liebe Pelin, danke für die aufbauenden Gespräche und die vielen guten Wünsche, die Du mir geschickt hast.

Dir, Markus, danke ich für deine Liebe und Unterstützung. Du hast mir beharrlich den Rücken frei gehalten und mir Mut gemacht, selbst wenn ich am Verzweifeln war.

Ganz besonders herzlich und aufrichtig möchte ich meinen Eltern danken, die mich mit ihrer Liebe und ihrem Vertrauen in jeder Situation begleitet und mich auf meinem Weg bedingungslos unterstützt haben.