

Aus der Klinik für Hals – Nasen – Ohrenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung einer therapeutischen Strategie bei Allergie und
Asthma unter Einsatz von Ribozymen und DNAzymen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Arwed Hostmann

aus Berlin

Gutachter: 1. PD Dr. W. Henke

2. PD Dr. med. A. L. Oberholzer

3. PD Dr. med. A. Lun

Datum der Promotion: 01.06.2008

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. Wolfgang Henke für die Überlassung des Themas sowie für seine unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit. Weiterhin möchte ich Frau Bebenroth und Frau Oelschlägel für ihre Hilfe in allen technischen und methodischen Fragen herzlich danken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Mutter, meinem Bruder und meiner Freundin für ihre großartige Unterstützung in allen Bereichen bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Allergie-Atopie-Anaphylaxie	1
1.1.1	Definitionen	1
1.2	Bedeutung allergischer Erkrankungen	2
1.3	Epidemiologie allergischer Erkrankungen und von Asthma	
1.3.1	Allgemeine epidemiologische Zusammenhänge	2
1.3.2	Ursachen des Prävalenzanstieges allergischer Erkrankungen	
1.3.2.1	Allgemeine Ursachen	2
1.3.2.2	Hygiene-Hypothese	3
1.3.2.3	Spezielle Ursachen allergischer Erkrankungen und von Asthma	3
1.4	Pathogenese des Asthma bronchiale	
1.4.1	Allgemeine Zusammenhänge	5
1.4.2	Zelluläre Prozesse beim Asthma bronchiale	6
1.4.3	Molekulare Prozesse in Th-2-Zellen	6
1.4.4	Entwicklung allergie-spezifischer Th-2-Zellen	7
1.5	Therapie von Allergien und allergischem Asthma	
1.5.1	Allgemeine therapeutische Strategien	8
1.5.2	Neue Therapieansätze bei Allergie und Asthma	8
1.6	Ribozyme	
1.6.1	Definition und Eigenschaften	9
1.6.2	Das Hammerhead-Ribozym	9
1.6.3	Anwendung von Ribozymen	10
1.7	DNAzyme	
1.7.1	Identifizierung und Eigenschaften	11
1.7.2	Anwendungen von DNAzymen	12
2	Zielstellung der Arbeit	13
3	Material und Methoden	
3.1	Materialien	
3.1.1	Chemikalien	14
3.1.2	Verwendete Kits	15
3.1.3	Enzyme, Größenstandards, RNase-Inhibitor	15
3.1.4	Gele, Puffer, Medien und Lösungen	16
3.1.5	Primer, Oligonukleotide und Plasmide	16
3.1.6	Zellen	17

3.1.7	RNase-Freiheit von Chemikalien und Geräten	17
3.2	Methoden	
3.2.1	Standardmethoden	
3.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
3.2.1.2	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	18
3.2.1.3	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	18
3.2.1.4	Präparation Ribozym-exprimierender Vektoren und Klonierung	19
3.2.1.5	Restriktionsverdau	20
3.2.1.6	Sequenzierung	20
3.2.1.7	Asymmetrische PCR	20
3.2.1.8	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation	21
3.2.2	Spezifische Methoden	
3.2.2.1	Präparation der mRNA des mstat6 und der Ribozyme	21
3.2.2.2	Ribozym-Einzel-Aktivitäts-Assay	22
3.2.2.3	Identifizierung aktiver DNAzyme	
3.2.2.3.1	Multiplex-Aktivitäts-Assay	22
3.2.2.3.2	RT-Reaktion	22
3.2.2.3.3	Fragmentlängenanalyse	23
3.2.2.4	DNAzym-Einzel-Aktivitäts-Assay	23
4	Ergebnisse	
4.1	Herstellung und Charakterisierung von Ribozymen zur Spaltung der RNA des stat6 der Maus	
4.1.1	Auswahl von Ribozym-Bindungsstellen über eine Sekundärstrukturvorhersage des stat6 der Maus mittels Mfold	24
4.1.2	Strukturmerkmale der Ribozym-Bindungsstellen	25
4.1.3	Herstellung und Charakterisierung von Ribozym-exprimierenden Plasmiden	
4.1.3.1	Ribozym-Expressionsvektor	27
4.1.3.2	Klonierung von Ribozym-kodierenden Oligonukleotiden in die Ribozym-Expressionskassette	28
4.1.3.3	m-stat6-exprimierendes Plasmid pB-mstat6	30
4.1.4	Präparation der Ribozyme und der RNA des m-stat6	32
4.2	Analyse der Ribozym-Aktivität in einem zellfreien System	33

4.3	Identifikation und Charakterisierung von 10-23 DNAzymen zur Spaltung der RNA des stat6 der Maus	
4.3.1	Design der DNAzyme	34
4.3.2	Identifizierung von DNAzym-Spaltstellen	36
4.3.2.1	Multiplex-Aktivitäts-Assay	36
4.3.2.2	DNAzym-Aktivitäts-Assay	38
4.3.2.3	Kinetische Analyse ausgewählter DNAzyme	39
5	Diskussion	40
5.1	stat6 als Target therapeutischer Strategien bei allergischen Erkrankungen	40
5.2	Nukleinsäure-basierte Strategien zur Inhibition der stat6-Expression	42
5.3	Charakteristika der Ribozyme	44
5.4	Identifizierung potentieller Ribozym-Spaltstellen	45
5.5	Ribozym-Applikation und Ribozym-Expressionskassette	46
5.6	Charakteristika der DNAzyme	47
5.7	DNAzym-Applikation	49
5.8	Identifizierung potentieller DNAzym-Spaltstellen	49
5.9	Zusammenfassung	50
	Quellen	51
	Legende	59

Abkürzungsverzeichnis

AHR	Atemwegshyperreagibilität
AIDS	Erworbenes Immundefizienzsyndrom
AODN	Antisense-Oligodeoxynukleotid
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Rinderserumalbumin
c-MAF	aviärer muskulo-aponeurotischer Fibrosarkom-Faktor
DEPC	Diethylpyrokarbonat
Dz	DNAzym
DTT	1,4-Dithiothreitol
GM-CFS	Granulozyten/ Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h-GH	Humanes Wachstumshormon
HIV	Humanes Immundefizienzsyndrom-Virus
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen
IL	Interleukin
IL-4R	Interleukin-4-Rezeptor
IL-13R	Interleukin-13-Rezeptor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MHC	Haupt-Kompatibilitäts-Komplex
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mstat6	Transkriptionsfaktor stat6 der Maus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxyd
NFAT	Nukleärer Faktor für aktivierte T-Zellen

nF-kB	Nukleärer Factor-kB
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAF	Thrombozyten-aktivierender Faktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Rz	Ribozym
RT-Reaktion	Reverse Transkriptase-Reaktion
SDS	Sodium-Dodezylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SIT	Spezifische Immuntherapie
STAT6	Signal Transducer and Activator of Transkription 6
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',-N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha
vaRNA	Adenovirus-assoziierte RNA
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Allergie-Atopie-Anaphylaxie

Allergien und Asthma zählen zu den am häufigsten vorkommenden Erkrankungen in der modernen Gesellschaft. Sie sind Gegenstand intensiver medizinischer Forschung. Ihre Anfänge reichen bis in das frühe 19. Jahrhundert zurück und beginnen 1819 mit der Beschreibung des Heuschnupfens durch Bostock ¹. Der Begriff Allergie (griechisch: allos = abnorm) wurde 1906 durch Pirquet offiziell in die medizinische Literatur eingeführt. 1923 verwendeten Coca und Cook erstmals die Begriffe Atopie und Anaphylaxie. Weitere Meilensteine waren 1921 der Nachweis der Übertragbarkeit von Typ I-Allergien mittels Serum ² sowie 1966 die Identifikation des Immunglobulins E (IgE) ^{3, 4}.

1.1.1 Definitionen

Unter *Allergie* wird eine spezifisch immunologisch vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion des Organismus gegenüber Fremdstoffen verstanden ⁵. *Atopie* ist die familiär auftretende Neigung, Allergien vom Typ-I bei gleichzeitig erhöhten Serumspiegeln an IgE zu entwickeln ^{6, 7}. *Hypersensitivität* kennzeichnet eine abnorme oder exzessiv gesteigerte immunologische Empfindlichkeit gegenüber einem sensibilisierenden Agens, *Anaphylaxie* die systemisch verlaufende Maximalvariante einer durch IgE vermittelten allergischen Sofortreaktion ⁸. Von Lemanske und Busse ⁹ wurde *Asthma* 2003 als eine chronisch-inflammatorische Erkrankung der Atemwege definiert, bei der Mastzellen, Lymphozyten, Granulozyten und Epithelzellen eine wesentliche Rolle spielen. In prädisponierten Individuen werden dadurch periodisch wiederkehrende Symptome wie Kurzatmigkeit, Husten oder Engegefühl in der Brust verursacht, die mit einer spontan oder durch Therapie reversiblen Atemwegsobstruktion einhergehen.

1.2 Bedeutung allergischer Erkrankungen

Allergische Erkrankungen stellen die häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter in westlichen Industrienationen dar. Sie besitzen eine erhebliche volkswirtschaftliche Bedeutung, da sie bei Erwachsenen zu mehreren Millionen Arbeitsunfähigkeitstagen pro Jahr führen ¹⁰. Ihre zunehmende Prävalenz war bereits Mitte der 90er Jahre mit jährlichen Kosten von ca. 5 Mrd. DM in Deutschland, mit ca. 6 Mrd. Dollar in den USA und mit ca. 1,6 Mrd. US-Dollar in Großbritannien verbunden ¹¹.

¹². Steigende Prävalenzen an Asthma spiegeln sich in der erhöhten Anzahl von Krankenhauseinweisungen, Notfallbehandlungen und Mortalitätsraten wieder ¹³. Allein in Deutschland versterben in Verbindung mit Asthma jährlich ca. 3000 - 4000 Menschen ¹⁰.

1.3 Epidemiologie allergischer Erkrankungen und von Asthma

1.3.1 Allgemeine epidemiologische Zusammenhänge

Die Häufigkeit von Allergien hat sich in den letzten 50 Jahren weltweit dramatisch erhöht. Besonders stark angestiegen sind sogenannte Typ I-Allergien, zu denen Heuschnupfen, allergisches Asthma und atopische Ekzeme zählen ^{14, 15}. Bei Allergien und Asthma bestehen international große Prävalenzunterschiede. Industrienationen wie Großbritannien, Australien und die USA weisen hohe Prävalenzen auf, niedrige Prävalenzen sind in Entwicklungsländern sowie in Osteuropa zu verzeichnen ¹⁶. Deutschland nimmt im internationalen Vergleich bei 13 - 14-jährigen Jugendlichen einen Platz im oberen Drittel der untersuchten Länder ein. Die Prävalenz von Asthma liegt hier bei ca. 15 %, von Heuschnupfen bei ca. 13 % und von atopischen Ekzemen bei ca. 7 %. Bei Erwachsenen rangiert Deutschland im mittleren Drittel, wobei die Häufigkeit von Heuschnupfen zwischen 14 - 23 %, von Asthma bei 2 - 4,5 % sowie von bronchialer Hyperreaktivität bei 16 - 44 % schwankt ^{15, 17, 18}.

1.3.2 Ursachen des Prävalenzanstieges allergischer Erkrankungen

1.3.2.1 Allgemeine Ursachen

Es wird angenommen, daß komplexe Wechselwirkungen aus genetischer Prädisposition und multiplen Umweltfaktoren für die erhöhte Prävalenz allergischer Erkrankungen von Bedeutung sind. Eine verstärkte Aufmerksamkeit in den öffentlichen Medien, die Weiterentwicklung medizinischer Diagnostikmethoden sowie eine individuell erhöhte Wahrnehmung kommen zusätzlich in Frage. Durch Studien kann belegt werden, daß sich der Trend zur steigenden Prävalenz von Asthma bei Schulkindern und Erwachsenen zwischen den frühen 90er Jahren bis ca. 2003 verlangsamt hat ¹⁹⁻²¹. Die Ursachen dafür sind im wesentlichen unbekannt.

1.3.2.2 Hygiene-Hypothese

Die sogenannte *Hygiene-Hypothese* postuliert, daß das Immunsystem von in westlichen, industrialisierten Ländern lebenden Menschen aus Mangel an Gelegenheiten nicht mehr ausreichend auf die Abwehr von Infektionen trainiert ist. Dies hat zur Folge, daß sich bei Kontakt mit harmlosen Umweltbestandteilen, wie z. B. Pollen oder Gräsern, eine immunologische Abwehrreaktion in Form der IgE-Produktion ausbildet. Für die Hygiene-Hypothese spricht, daß Populationen mit einem hohen Grad an parasitärer Durchseuchung (z. B. Ureinwohner Lateinamerikas) hohe endogene IgE-Spiegel und niedrige Prävalenzen an Asthma und Heuschnupfen aufweisen²². Studien belegen zudem, daß Individuen nach Maserninfektionen²³ oder Pertussis-Impfungen²⁴ keine Allergien entwickeln. Auch scheint das vermehrte Vorkommen bestimmter Bakterienspezies im Darm, wie Lactobazilli, Eubacteriaceae oder Anaerobiern, mit einem verminderten Risiko für die Entwicklung von Asthma einher zu gehen^{25, 26}.

1.3.2.3 Spezielle Ursachen allergischer Erkrankungen und von Asthma

a) Genetische Disposition

Für die Vererbung allergischer Erkrankungen und Asthma sind mehrere Gene von Bedeutung. Sie verteilen sich auf die Chromosomen 5, 6, 7, 11 und 12 und kodieren für die Interleukine-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, für Haupt-Kompatibilitäts-Komplex (MHC)-Klasse-II-Moleküle, den Tumornekrosefaktor (TNF)- α sowie für die β -Kette des IgE-Rezeptors-I²⁷. Zusätzlich wurden HLA-DR2, ADAM-33 oder TIM-1 als mit Allergie und Asthma in Zusammenhang stehende Gene identifiziert²⁸⁻³⁰. Darüberhinaus gibt es verschiedene Gen-Polymorphismen, die mit der Entwicklung und/oder Ausprägung allergischer Erkrankungen und von Asthma in Zusammenhang stehen³¹⁻³³. Obwohl genetische Faktoren ohne Zweifel an der Ausbildung allergischer Erkrankungen beteiligt sind, können sie die bei allergischen Erkrankungen beobachteten Prävalenzanstiege nicht hinreichend erklären.

b) Umweltfaktoren

Der Einfluß der Umwelt bei der Entwicklung von Allergien wird insbesondere nach der deutschen Wiedereinigung 1990/1991 offenkundig. Allergische Erkrankungen bei Kindern und Erwachsenen in stark umweltbelasteten Großstädten der ehemaligen DDR waren weniger häufig als bei vergleichbaren Personen in geringer belasteten Großstädten der ehemaligen BRD³⁴. Eine 1994 durchgeführte Wiederholungsstudie

weist in Ostdeutschland einen Prävalenzanstieg von Heuschnupfen und atopischen Sensibilisierungsraten nach ³⁵. Parallel dazu wird auch ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Konzentration von Autoabgasen (Diesel) und der Exazerbation präexistierenden Asthmas bzw. atopischer Erkrankungen angenommen ^{36, 37}. Die Bedeutung des Umweltgases Ozon ist nicht eindeutig geklärt, da eine große interindividuelle Variabilität besteht und durch wiederholte Ozon-Expositionen auch eine Toleranzinduktion erzeugt werden kann.

Weitere Umweltfaktoren sind die seit Mitte der 90er Jahre deutlich gestiegene Allergen-Exposition sowie die soziale Herkunft. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß Kinder von gut ausgebildeten Eltern öfter sensibilisiert sind und häufiger Allergien entwickeln als Kinder von gering gebildeten Eltern ¹⁵. Das Risiko von Kindern, eine *Atopie* zu entwickeln, steigt mit dem Fehlen von Geschwistern oder weiteren Familienmitgliedern ³⁸. Kinder, die auf einem Bauernhof aufwachsen, scheinen dagegen vor atopischen Erkrankungen und Asthma geschützt zu sein ³⁹. Ursächliche Bedeutung wird dabei dem Kontakt zu bakteriellen Antigenen wie Lipopolysaccharid/Endotoxin zugeschrieben, da es über entsprechende Rezeptoren auf Monozyten eine vor Allergien schützende Th-1-Immunantwort induziert ^{39, 40}.

c) Triggerfaktoren

Triggerfaktoren können die Ausprägung bzw. Exazerbation allergischer Erkrankungen und von Asthma beschleunigen. Vor allem die Inhalation von Zigarettenrauch führt zu einer dosisabhängigen Verschlechterung der Lungenfunktion und kann bestehendes Asthma verschlimmern ⁴¹. Studien belegen, daß Kinder rauchender Mütter ein erhöhtes Risiko haben, an Asthma zu erkranken ⁴². Durch jedes zusätzlich rauchende Familienmitglied wird das Erkrankungsrisiko weiter erhöht ⁴³. Ein weiterer Triggerfaktor sind frühkindliche, virale Infektionen. Dabei spielt insbesondere der Nachweis des „Respiratory Syncythial-Virus“ eine wesentliche Rolle ⁴⁴.

1.4 Pathogenese des Asthma bronchiale

1.4.1 Allgemeine Zusammenhänge

Allergisches Asthma bronchiale ist durch eine hyperreagible, ödematöse und chronisch entzündete pulmonale Atemwegsmuskulatur gekennzeichnet. Typisches Asthma-Symptom ist die intermittierende, chronische Atemwegsobstruktion. Der dem Asthma zugrunde liegende Pathomechanismus ist durch komplexe zelluläre und humorale immunologische Prozesse gekennzeichnet, bei dem Th-2-Zellen eine zentrale Rolle spielen (Abbildung 1). Bei Patienten mit Asthma lassen sich Th-2-Zellen sowohl lokal als auch systemisch vermehrt nachweisen⁴⁵⁻⁴⁷. Über ihr charakteristisches Expressionsmuster an Zytokinen aktivieren Th-2-Zellen B-Zellen, Mastzellen sowie eo-

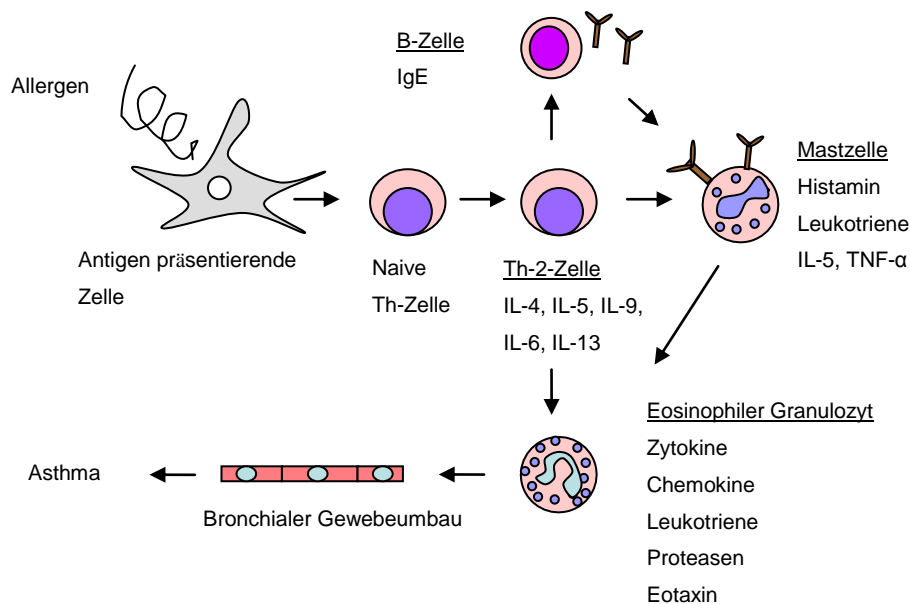


Abbildung 1. Zelluläre Zusammenhänge in der Pathogenese des Asthma bronchiale (modifiziert nach¹).

sinophile Granulozyten und induzieren so akute und verzögerte allergische Entzündungsreaktionen (Abbildung 1). Während akute allergische Reaktionen Antikörper-vermittelt ablaufen und über eine IgE-Produktion gekennzeichnet sind, weisen verzögerte Reaktionen vor allem eine Eosinophilie bzw. eine Mastozytose auf.

1.4.2 Zelluläre Prozesse beim Asthma bronchiale

Nach Aufnahme von Allergenen werden diese durch Antigen-präsentierende Zellen prozessiert. Verschiedene Allergen-Epitope werden mit Hilfe von MHC-Klasse-II- und kostimulatorischen Molekülen T-Helferzellen präsentiert. Im Anschluß daran differenzieren sich naive T-Helferzellen zu Th-2-Zellen. Diese sezernieren ein spezifisches Muster an Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13⁴⁸. IL-4 und IL-13 fördern im Zusammenspiel mit der kostimulatorisch wirksamen Interaktion zwischen CD40 und seinem Liganden den Isotypen-Klassenwechsel in B-Zellen und induzieren eine allergen-spezifische Produktion von IgE, welches an seinen hochaffinen Rezeptor auf Mastzellen bindet. Ein erneuter Antigenkontakt führt zu einer Quervernetzung von IgE-Rezeptoren auf der Mastzellmembran und zur akuten Freisetzung von verschiedenen Mediatoren (Histamin, Proteoglykane, Proteasen, Prostaglandine, Leukotriene) und Zytokinen (TNF- α , IL-4, IL-5) mit der Ausbildung einer pulmonalen Inflammation, Bronchokonstriktion und gesteigerter Mukussektion. Die von Th-2-Zellen ausgeschütteten Zytokine IL-5 und IL-9 fördern die Aktivierung und Proliferation eosinophiler Granulozyten. Diese sind insbesondere bei den allergen-induzierten „Spätphasen-Reaktionen“ von Bedeutung. Durch eosinophile Granulozyten werden u. a. zytotoxische Proteine und reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt, die zu einer Schädigung des Bronchialepithels und zur bronchialen Atemwegshyperreagibilität (AHR) führen.

1.4.3 Molekulare Prozesse in Th-2-Zellen

Die intrazelluläre Signalkaskade in Th-2-Zellen verläuft über a) die allergen-vermittelte Interaktion zwischen MHC-II-Molekülen und dem T-Zell-Rezeptor (TCR), b) die kostimulatorische Interaktionen zwischen den Molekülen CD80/CD86 und CD28, sowie über die Zytokine IL-4 bzw. IL-13. Obwohl dabei verschiedene Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, nimmt der „Signal Transducer and Activator of Transkription“ (STAT) 6 eine zentrale Stellung ein (Abbildung 2). STAT6 wird nach Bindung von IL-4 bzw. IL-13 an den IL-4-Rezeptor (IL-4R) über die Aktivierung von Tyrosinkinase JAK1 und JAK3 phosphoryliert, transloziert in den Zellkern und bindet an spezifische, IL-4-abhängige Zielgene⁴⁹. Diese kodieren u. a. für den Immunglobulin-Klassenwechsel zum IgE, die B-Zell-Differenzierung, die Expression von MHC II-Molekülen sowie für die Expression des niedrigaffinen IgE-Rezeptors CD23.

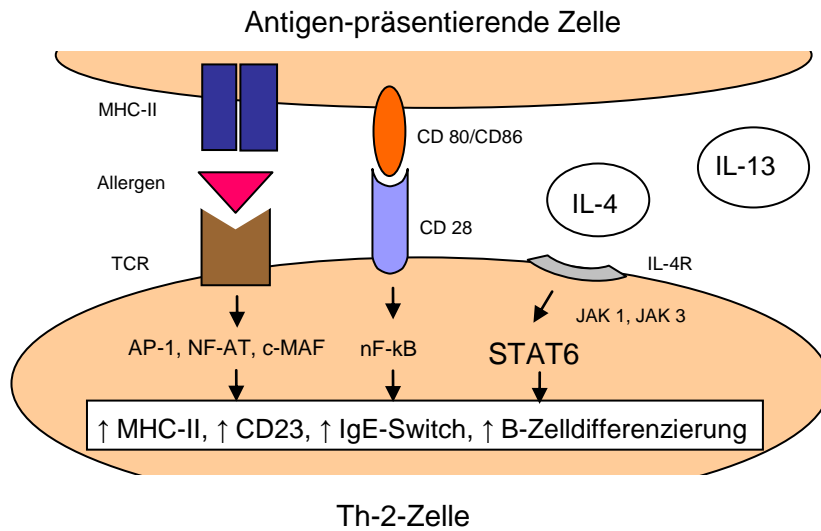


Abbildung 2. Aktivierung IL-4-abhängiger Gene in Th-2-Zellen. TCR = T-Zell-Rezeptor, IL-4R = IL-4-Rezeptor, MHC = Histokompatibilitäts-Molekül Typ II, AP-1 = Aktivator-Protein-1, NFAT = Nukleärer Faktor für aktivierte T-Zellen, c-MAF = aviärer muskuloaponeurotischer Fibrosarkom-Faktor, NF-kB = Nucleärer Faktor-kB, STAT6 = Signal Transducer and Activator of Transkription 6, JAK = Januskinase.

1.4.4 Entwicklung allergie-spezifischer Th-2-Zellen

Naive T-Helferzellen können sich unter dem Einfluß von IL-4, IL-10 und IL-13, aber auch beim Fehlen von IL-12 und TNF- α zu Th-2-Zellen entwickeln⁵⁰. Bei geringen Antigenmengen, einer niedrigen Affinität zum TCR oder wenn die kostimulatorischen Moleküle CD28/CD80 selektiv miteinander wechselwirken, kommt es ebenfalls bevorzugt zu einer Th-2-Zell-Polarisierung. Die in aktivierten Th-2-Zellen exprimierten Transkriptionsfaktoren GATA-3 und c-Maf fördern eine Th-2-Polarisierung und hemmen eine Th-1-Polarisierung^{51, 52}. Über die verminderte Produktion von Interferon- γ sowie die lokale Sekretion von Prostaglandinen, Progesteronen, IL-4 und IL-10 kann eine initiale Th-2-Polarisierung bereits intrauterin erfolgen⁵⁰. Nach neuesten Erkenntnissen sind an einer Th-2-Zell-Polarisierung auch natürlich vorkommende, IL-10 und TGF- β -sezernierende, regulatorische T-Zellen beteiligt⁵³.

1.5 Therapie von Allergien und allergischem Asthma

1.5.1 Allgemeine therapeutische Strategien

Die grundlegenden therapeutischen Strategien bei allergischen Erkrankungen und Asthma beruhen auf der Kombination von antiinflammatorisch (Kortiko-Steroide, Antihistamine, Leukotrien-Antagonisten, Tryptase-Inhibitoren) bzw. bronchodilatatorisch wirksamen Medikamenten (Beta-2-Sympathomimetika, Anticholinergika, Methylxantine). Prophylaktisch wirksame Medikamente sind Mastzellstabilisatoren wie Cromoglyzinsäure. Gleichmaßen zu Prävention und Therapie allergischer Erkrankungen bzw. Asthma geeignet ist die spezifische Immuntherapie (SIT). Sie ist jedoch nicht bei allen Allergien wirksam und muß für eine hinreichende Wirkung mindestens drei Jahre lang angewendet werden. Der bisher einzige kausale Therapieansatz besteht in der strikten Allergenkenz wie z. B. durch Entfernung von Haustieren bei Tierhaar-Allergien oder der Verordnung milbendichter Bettüberzüge bei Hausstaub-Allergien.

Patienten mit einer Allergie bzw. allergischem Asthma sind oftmals lebenslang auf verschiedene Medikamente angewiesen. Dabei wird häufig keine adäquate Krankheitskontrolle erzielt. Insbesondere steroidhaltige Medikamente sind darüber hinaus mit zum Teil starken Nebenwirkungen assoziiert.

1.5.2 Neue Therapieansätze bei Allergien und Asthma

Fortschritte in der Analyse der molekularen Strukturen von Allergenen haben im Rahmen der SIT zur Entwicklung von T-Zell-Epitopen, Allergenfragmenten oder gentechnisch veränderten Allergenen geführt. Ihre Anwendung kann die spezifischen Nebenwirkungen einer SIT reduzieren. Im Tiermodell können allergische Entzündungsreaktion in der Lunge über eine DNA-Vakzinierung mit Dermatophagoides pteronyssinus (Typ 2) unterdrückt werden⁵⁴. Therapeutische Ansätze mit Th-1-Zytokinen oder CpG-haltigen Oligodeoxynukleotiden zeigen, daß Th-2-spezifische Immunantworten supprimiert werden können^{55, 56}. Eine weitere Strategie beruht auf der Neutralisierung bzw. Antagonisierung von IL-4 und IL-5. So weisen ein löslicher, humanisierter, rekombinanter IL-4-Rezeptor und ein monoklonaler, humanisierter Anti-IL-5-Antikörper positive Effekte auf die Lungenfunktion bei Patienten mit mildem Asthma sowie die allergische bedingte Eosinophilie auf^{57, 58}. Parallel dazu sind ein humanisierter IL-4-Rezeptor-Antagonist⁵⁹ bzw. ein humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen IgE entwickelt worden⁶⁰.

In der jüngeren Vergangenheit sind neue Strategien auf der Basis von Nukleinsäuren in den Vordergrund des Interesses der Asthma-Therapie gerückt ⁶¹⁻⁶³. Therapeutische Ansätze bei Allergie und Asthma beinhalten u. a. den Einsatz von IL-4-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden (AODN) ⁶⁴, IL-5-spezifischen Ribozymen ^{64, 65} sowie von DNAzymen ⁶⁴. Das Prinzip der siRNA zur Unterdrückung einer Genexpression wurde 2001 von Tuschl et al. eingeführt ⁶⁶. Da die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen waren, wird auf die siRNA-basierte Strategie nicht weiter eingegangen.

1.6 Ribozyme

1.6.1 Definition und Eigenschaften

Ribozyme sind RNA-Moleküle mit katalytischen Eigenschaften. Sie binden sequenzspezifisch über Watson-Crick-Basenpaarungen an eine Target-mRNA und katalysieren in Anwesenheit zweiwertiger Metallionen die Spaltung von RNA-Phosphodiesterbindungen ⁶⁷. Durch die Degradation der mRNA wird die Translation und damit die Expression des entsprechenden Proteins unterdrückt. Seit ihrer Entdeckung vor ca. 25 Jahren wurden verschiedene Klassen von Ribozymen beschrieben: selbst-spaltende Introns (Gruppe I-Intron-Ribozym aus *T. thermophila*) ⁶⁸, das RNase P-Ribozym aus *E. coli* ⁶⁹ und kleine katalytische RNA's. Zu letzteren zählen das Hepatitis- δ -Virus-Ribozym ⁷⁰, das *Neurospora*-Varkud Satellit-Ribozym ⁷¹, das Hairpin-Ribozym ⁷² sowie das Hammerhead-Ribozym ⁷³.

1.6.2 Das Hammerhead-Ribozym

Das Hammerhead-Ribozym, im folgenden kurz als Ribozym bezeichnet, besteht aus einer hochkonservierten katalytischen Domäne und zwei Substratbindungsregionen, die 5'- und 3'-seitig der Konsensuspaltsequenz lokalisiert sind (Abbildung 3).

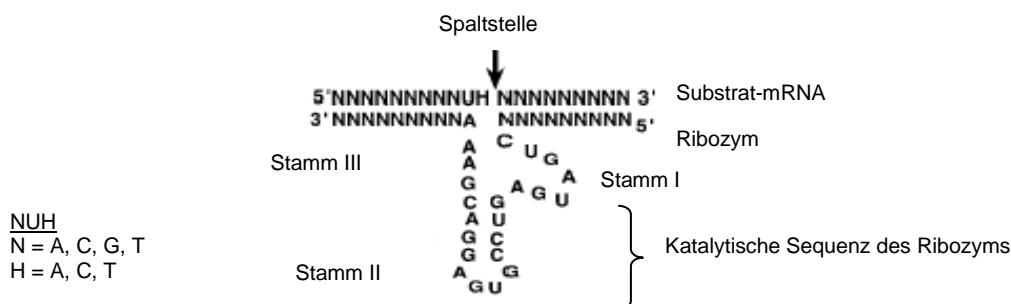


Abbildung 3. Struktur des Hammerhead-Ribozyms.

Die Ribozym-vermittelte Katalyse beinhaltet nach Bildung eines Ribozym-Substrat-Komplexes die Spaltung einer Phosphodiesterbindung (Abbildung 4). Die Spaltungsreaktion erfolgt 3'-seitig zur Substratbindungsregion und führt zur Bildung eines 2',3'-zyklischen Phosphodiesters und einer 5'-OH-Gruppe. Das 5'-NUH-3'-Triplet wurde als Konsensuspaltsequenz des Ribozymes identifiziert ⁷⁴. Dabei steht N für jedes der vier Ribonukleoside, U für Uridin und H für jedes der vier Ribonukleoside außer Guanosin. Durch Auswahl einer entsprechenden Sequenz, die komplementär zu der der Target-mRNA ist, ist es prinzipiell möglich, ein Ribozym zu kreieren, das die Expression des jeweiligen Proteins spezifisch inhibiert.

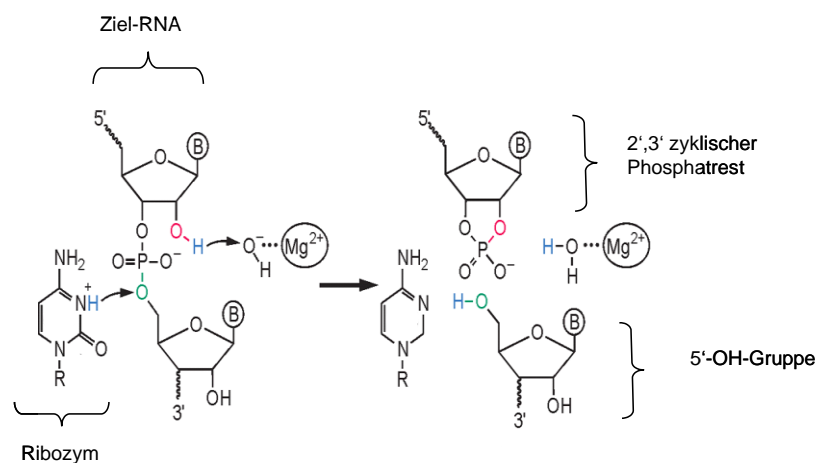


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Ribozym-vermittelten Spaltung einer Phosphodiester-Bindung. Das Ribozym überträgt ein Proton auf den 5'-Hydroxyterminus (grün), ein Mg^{2+} -gebundenes Hydroxylion übernimmt ein Proton der angreifenden 2'-OH-Gruppe (rot), wodurch die Phosphodiesterbindung gespalten wird (modifiziert nach ⁷⁵).

1.6.3 Anwendung von Ribozymen

Ribozyme, einschließlich Hammerhead-Ribozyme, werden sowohl zur Untersuchung von Genfunktionen als auch für die Entwicklung therapeutischer Strategien eingesetzt. Sie kommen vor allem bei viralen Erkrankungen (AIDS, Hepatitis-B, Hepatitis-C) ⁷⁶⁻⁷⁹, Tumorerkrankungen ⁸⁰ und Gefäßerkrankungen ⁸¹ zur Anwendung. In ersten klinischen Studien werden ein anti-angiogenetisches Ribozym („ANGIOZYMETM“), ein antivirales Ribozym („HEPTAZYMETM“) sowie ein antiproliferatives Ribozym („HERZYMETM“) getestet (www.rpi.com).

1.7 DNAzyme

1.7.1 Identifizierung und Eigenschaften

DNAzyme sind synthetisch hergestellte DNA-Moleküle mit RNA-spaltenden Eigenschaften (Abbildung 5). 1994 wird erstmals ein DNAzym durch eine Selektionsstrategie aus einer DNAzym-Library isoliert und für die katalytische Spaltung von RNA benutzt ⁸².

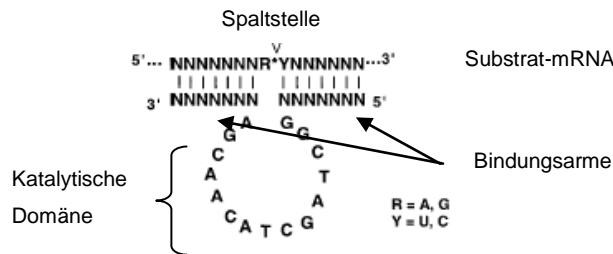


Abbildung 5. Das 10-23 DNAzym.

Die Entwicklung des sogenannten 10-23 DNAzyms erfolgte 1997 durch *in-vitro*-Selektion aus einer Population von insgesamt 10^{14} verschiedenen DNA-Molekülen ⁸³.

Der Name 10-23 DNAzym weist darauf hin, daß es sich dabei um diejenige DNA handelt, die in der 10. Amplifikationsrunde aus dem 23. Klon isoliert wurde. Das 10-23 DNAzym besteht aus einer Mg^{2+} -abhängigen, katalytischen Domäne von insgesamt 15 Nucleotiden (nt) sowie zwei Substratbindungsregionen für die sequenzspezifische Bindung der Ziel-RNA. Das 10-23 DNAzym spaltet innerhalb der Target-RNA eine spezifische Phosphodiesterbindung zwischen einem paaren Purin und einem unpaaren Pyrimidin, in deren Folge ein 2',3'-zyklischer Phosphatrest und eine 5'-OH-Gruppe verbleiben.

Vorteile in der Anwendung von DNAzymen gegenüber Ribozymen liegen insbesondere in ihrer relativ leichten und kostengünstigen Synthese sowie ihrer deutlich höheren Nukleaseresistenz. Eine vergleichende Studie mit 35 10-23 DNAzymen und 6 Ribozymen gegen die full-length-mRNA des Vanilloid-Rezeptors (Subtyp I) ergab, daß die DNAzyme höhere Aktivitäten gegenüber der entsprechender Ribozyme aufweisen

⁸⁴.

1.7.2 Anwendung von 10-23 DNAzymen

10-23 DNAzyme werden *in-vitro* bzw. in Zellen im Rahmen der Entwicklung therapeutischer Strategien bei viralen Erkrankungen⁸⁵, Tumoren⁸⁶⁻⁸⁸ sowie bei Gefäßerkrankungen⁸⁹ eingesetzt. In tierexperimentellen Modellen sind DNAzyme vor allem auf den beiden zuletzt genannten Gebieten eingesetzt worden⁹⁰⁻⁹².

2 Zielstellung der Arbeit

Anhand von allergischen stat6-knockout-Mausmodellen ist gezeigt worden, daß der Transkriptionsfaktor STAT6 eine zentrale Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale spielt. Nukleinsäure-basierte Strategien auf der Grundlage von Ribozymen und DNAzymen stellen eine neue Form eines therapeutischen Ansatzes bei allergischen Erkrankungen und Asthma dar.

Ziel der Arbeit ist es, aktive Ribozyme und DNAzyme zu identifizieren, welche die mRNA des Transkriptionsfaktors STAT6 der Maus spalten können. Die Ermittlung potentieller Ribozym-Spaltstellen erfolgt über eine computerunterstützte Sekundärstrukturvorhersage auf der mstat6-RNA. Potentielle DNAzym-Spaltstellen werden über einen Multiplex-Aktivitäts-Assay identifiziert. Die Aktivität von Ribozymen und DNAzymen wird in *in-vitro*-Assays überprüft. Die Ergebnisse sollen als Grundlage für die weiterführende Testung mstat6-spezifischer Ribozyme und DNAzyme in Zellen bzw. in einem allergischen Mausmodell dienen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Agar-Agar*

Agarose

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Ammoniumazetat

Ampicillin

Betain

Bovines Rinderserumalbumin (BSA, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland)

5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β ,D-galacto-pyranosid (X-gal)

Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonphthalein, Serva, Heidelberg Deutschland)

Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Dithiothreitol (DTT, Sigma, Steinheim, Deutschland)

Ethanol

Ethidiumbromid (EtBr)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Formaldehyd

Glucose

Glycerol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Harnstoff (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Hefe (BD-Difco, Heidelberg, Deutschland)

Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)

Isopropanol

Kaliumchlorid (KCl)

Natriumchlorid (NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Natriumazetat

Natriumhydroxyd (NaOH, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Magnesiumchlorid (MgCl₂, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Magnesiumsulfat (MgSO₄)

Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)

Phenol:Chloroform:Isoamyl (25 : 24 : 1, Sigma, Steinheim, Deutschland)

Sodium-Dodecylsulfat (SDS)

Sucrose

N,N,N',-N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, Sigma, Steinheim, Deutschland)

Tryptone (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Xylencyanol (Serva, Heidelberg, Deutschland)

*Chemikalien ohne Herstellerbezeichnung wurden von Roth bezogen

3.1.2 Verwendete Kits

Big Dye-Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland)

DNA PlasmidMaxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Invisorb TwinSpin Cell Mini Kit (Invitek, Berlin-Buch, Deutschland)

PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAquick Gel Extraktions Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAquick PCR Purification Kit, (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Qiaprep Spin Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Ribomax-T3-Transkriptionskit (Promega, Madison, USA)

Ribomax-T7-Transkriptionskit (Promega, Madison, USA)

TA-Kloning-Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

3.1.3 Enzyme, Größenstandards, RNase-Inhibitor

Alle eingesetzten Enzyme und Größenstandards wurden, sofern nicht anders benannt, von der Firma New England Biolabs, Beverly, USA bezogen

Amplitaq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt, USA)

T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

DNase I (Promega, Madison, USA)

RNasin (Promega, Madison, USA)

Moloney Murin Leukemia Virus-Reverse Transkriptase (MMLV-RT, Promega, Madison, USA)

3.1.4 Gele, Puffer, Medien und Lösungen

DNA-Agarose-Gel (10 x TBE-Puffer, 1,4 % Agarose, 0,1 µg/ml EtBr)

DNA-Auftragungspuffer (50 % Glycerin, 0,2 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol)

EtBr-Lösung (1 mg EtBr ad 1 ml ethanolischer Lösung)

LB (Luria Bertani)-Medium (10 g Tryptone, 5 g Hefe ad 1 l Aqua dest., pH 7,5)

LB-Nährmedium (15 g Agar-Agar ad 1 l LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin)

SOC-Medium (2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 20 mM Glucose, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 250 mM KCl ad 1 l Aqua dest., pH 7,0)

MOPS-EDTA-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumazetat, 5 mM EDTA)

RNA-Agarose-Gel (10 x TAE-Puffer, 1,4 % Agarose, 0,1 µg/ml EtBr)

RNA-Probenpuffer (62,5 % deionisiertes Formamid, 1,15 M Formaldehyd, 200 µg/ml Bromphenolblau, 200 µg/ml Xylencyanol, 1,25 x MOPS-EDTA-Natriumazetat, 50 µg/ml EtBr)

RNA-Ladepuffer (40 % Sucrose, 0,5 % SDS und 100 mM EDTA, pH 8,5 ad 10ml DEPC-Wasser)

Tris-Azetat-EDTA (TAE)-Puffer (0,4 M Tris-Azetat, 10 mM EDTA, pH 8,3, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (1 M Tris-Borat, 20 mM EDTA, Essigsäure, pH 8,3, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Tris-HCl-Puffer (1 M Tris-HCl, 1% SDS, pH 8,5, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

3.1.5 Primer, Oligonukleotide und Plasmide

Primer und die für Ribozyme kodierenden Oligonukleotide wurden von der BioTez-GmbH und von TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) synthetisiert (Tabelle 1). Die verwendeten 10-23 DNase wurden von Sigma, Steinheim, Deutschland bezogen.

Sequenz	Name
5'-TCGAGCACAGACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACATGAATGCA-3'	Rz-284-Sense
5'-TTCATGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGTCTGTGC-3'	Rz-284-Antisense
5'-TCGAGCTCTGGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACATCTATGCA-3'	Rz-311-Sense
5'-TAGATGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGCCAGAGC-3'	Rz-311-Antisense
5'-TCGAGTGGATGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACTGTGATGCA-3'	Rz-2354-Sense
5'-TCACAGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGCATCCAC-3'	Rz-2354-Antisense

Tabelle 1. Sequenzen der verwendeten Ribozym-kodierenden Oligonukleotide.

Das die cDNA des Transkriptionsfaktors stat6 der Maus (mstat6, Accession number L47650, GI 1008876) enthaltende Plasmid pB-mstat6 wurde freundlicherweise von J. N. Ihle (Howard Hughes Institut, Department of Biochemistry, St. Judes Childrens Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA) zur Verfügung gestellt. Der Expressionsvektor pGvaL ist ein Geschenk von A. Lieber (Markey Molecular Medicine Center, Divison of Medical Genetics, University of Washington, Seattle, USA).

3.1.6 Zellen

Top 10-One Shot (Invitrogen, Carlsbad, USA)

3.1.7 RNase-Freiheit von Chemikalien und Geräten

Für die Durchführung von Untersuchungen unter Verwendung von RNA wurden, sofern erforderlich, RNase-freie Chemikalien und Einwegmaterialien eingesetzt. RNase-freie Glaswaren wurden durch Erhitzen im Trockenofen über 6 Stunden bei 200 °C und RNase-freie Lösungen durch Inkubation mit 0,1 % DEPC-Wasser über 12 h mit anschließender Sterilisation hergestellt. Das Ansetzen RNAase-freier Lösungen erfolgte unter Verwendung von 0,1 % DEPC-Wasser. Sofern erforderlich, wurde bei Inkubationen ein RNase-Inhibitor verwendet. Vor dem Start von Gelelektrophoresen wurde die fertig zusammengesetzte Elektrophorese-Apparatur für 15 min mit 3 % H₂O₂-Lösung inkubiert und anschließend mit RNase-freiem Aqua dest. gespült.

3.2 Methoden

3.2.1 Standardmethoden

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in Gegenwart von 5 U Amplitaq-DNA-Polymerase, eines magnesiumfreien PCR-Puffers, des Mastermixes (0,2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 1 M Betain, 0,2 µM Sense- bzw. Antisense-Primer) und 50 - 100 ng DNA im Trio Thermoblock (Biometra, Deutschland) nach der Hot Start Methode durchgeführt. Dabei wird der Reaktionsansatz ohne Zugabe von Amplitaq DNA-Polymerase und PCR-Puffer bei 90 °C vorinkubiert und die fehlenden Reagenzien anschließend als Master-Mix zugegeben. Die Reaktionsansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und für die Ribozym-spezifische PCR ein T7-Primer und ein Reverse Primer bzw. für die mstat6-spezifische PCR ein Stat6-A-Primer, Stat6-S-Primer und ein St6-Primer verwendet (Tabelle 2).

Sequenz	mstat6-spezifische PCR
5'-AGGAGATGCCGTAGGCGT-3'	Stat6-A (S)
5'-AACGCAACACGCCCTCTGT-3'	Stat6-S (AS)
5'-GTCAGAAGAGAACCGCTGG-3'	St6 (AS)

Sequenz	Ribozym-spezifische PCR
5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGA-3'	T7 (S)
5'-GTCCTCACGGACTCATCAG-3'	Rz (AS)

Tabelle 2. Verwendete Primer zur Amplifikation von Ribozymen bzw. mstat6.

3.2.1.2 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte und Plasmid-DNA wurden über Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Auftragung der DNA (100 ng) erfolgte in einem DNA-Auftragungspuffer, die Auftrennung bei 95 V über 60 min in einem EtBr-haltigen (50 µg/ml), 1,4 % TBE-Agarose-Gel, das mit 10 x Tris-Borat-EDTA-Laufpuffer überschichtet wurde. Zur Detektion und Dokumentation der Ergebnisse wurde der UV-Transilluminator T1 (Biometra, Deutschland) mit der Videokamera (MWG-Biotech, Deutschland) verwendet. Die Größe der entstehenden Amplifikate wurde mit einem 100 bp- bzw. 1 kb-Größenstandard charakterisiert.

3.2.1.3 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

50 - 250 ng isolierte RNA wurde über Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Auftragung der RNA erfolgte in einem RNA-Probenpuffer und einem RNA-Ladepuffer. Die RNA wurde bei 65 °C für 15 min denaturiert und nach 3 min auf Eis in einem 1,4 % TAE-Agarose-Gel, das mit 10 x TAE-Laufpuffer überschichtet wurde, analog zur DNA-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Größe der entstehenden Amplifikate wurde mittels eines 100 bp- bzw. 1 kb-Größenstandards charakterisiert.

3.2.1.4 Präparation Ribozym-exprimierender Vektoren und Klonierung

pGvaL wurde mit 5 U Sal I und 20 U Pst I bei 37 °C für 2 h verdaut und durch elektrophoretische Auftrennung auf einem 1,4 % TBE-Agarose-Gel mit anschließender Reinigung über den QIAquick Gel-Extraktions Kit nach den Vorschriften des Herstellers präpariert. Jeweils 10 µM der komplementären, Ribozym-kodierenden Oligonukleotide wurden bei 94 °C über 5 min denaturiert und über 1 h auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Ligation von Plasmid und doppelsträngigem Insert wurde mit 4 U T4-DNA-Ligase, 50 fmol linearisiertem pGvaL, je 150 fmol Rz-284, Rz-311 bzw. Rz-2354 und Ligationspuffer bei 14 °C über 12 h durchgeführt. Chemisch-kompetente E. Coli-Bakterien wurden mit den im Rahmen der Arbeit verwendeten Plasmiden Rz-284-pGvaL, Rz-311-pGvaL und Rz 2354 pGvaL- nach den Vorschriften des Herstellers transformiert. Die transformierten Bakterienkulturen wurden in SOC-Medium und 0,5 M β-Mercaptoethanol bei 37 °C für 1 h inkubiert, jeweils auf Agarplatten aus LB-Medium, welches 50 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml X-Gal und 50 µg/ml IPTG enthielt, ausplattiert und bei 37 °C für 20 h bebrütet. Ausgewählte Klone weißer Kolonien wurden im LB-Medium kultiviert und zur Plasmid-Präparation eingesetzt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit bzw. Qiaprep Spin Maxiprep Kit nach den Vorschriften des Herstellers. Die DNA wurde mit einem 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) eluiert. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte spektralphotometrisch bei 260 nm, wobei 1 optische Dichte (OD) einem Gehalt von 50 µg/ml DNA entspricht. Die Identität der Ribozym-exprimierenden Plasmide (Tabelle 3) wurde durch PCR, Restriktionsverdau und durch Sequenzierung überprüft.

Plasmidbezeichnung	Rz-kodierendes Oligonukleotid
Rz-284-pGvaL	Rz-284
Rz-311-pGvaL	Rz-311
Rz-2354-pGvaL	Rz-2354

Tabelle 3. Bezeichnung der Ribozym-exprimierenden Plasmide.

3.2.1.5 Restriktionsverdau

Die Plasmide pGvaL-Rz 284, pGvaL-Rz 311 und pGvaL-Rz 2354 wurden mit 20 U Xba I, 5 U Nhe I, Plasmide von pB-mstat6 mit 20 U Xho I und 20 U EcoR I in Anwesenheit von 1 µg/ml BSA und Reaktionspuffer bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die entstandenen Fragmente wurden über DNA-Agarose-Gelelektrophorese identifiziert.

3.2.1.6 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen erfolgten nicht-radioaktiv nach Sanger⁹³. PCR-Produkte wurden mit Hilfe des PCR Purification Kits aufgereinigt, mit 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) eluiert und nach asymmetrischer Amplifizierung auf einem denaturierenden 8,75 % Polyacrylamid-Gel, das nach Lösen von Harnstoff in Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1), 5 x TBE-Puffer und Aqua dest. mit 2,5 µl TEMED und 10 % APS auspolymerisiert wurde, im Sequenzer ABI Prism 377 bei einer Laufzeit von 8 bis 10 Stunden sequenziert. Während des Vorlaufes wurden die Proben mit 50 µM EDTA-Formamid versetzt, für 2 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen.

3.2.1.7 Asymmetrische PCR

Je 50 ng Ribozym- bzw. pB-mstat6-DNA wurden in Gegenwart des BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready-Reaction Kits, je eines 0,2 µM Ribozym-bzw. mstat6-Primers (Tabelle 4) sowie 1 M Betain im Trio Thermoblock unter folgenden Reaktionsbedingungen amplifiziert: einem primären Denaturierungsschritt bei 95 °C über 2 min folgen die Denaturierung bei 95 °C für 20 sec., Hybridisierung bei 50 °C über 30 sec. und Extension bei 60 °C über 4 min bei 25 Reaktionszyklen. Einzelsträngige DNA wurde auf 4 °C abgekühlt und mittels QIAquick Nukleotid Removal Kit gemäß der Arbeitsanleitung aufgereinigt.

Sequenz	Ribozym-Primer
5'-GTGGCCAAAAAGCTAGC G-3'	Rz-Sequenzier
5'-GAAACAGCTATGACCATG-3'	Reverse
Sequenz	mstat6-Primer
5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGA-3'	stat6-Sequenzier
5'-AGGAGATGCCGTAGGCGT-3'	Stat6-A

Tabelle 4. Zur asymmetrischen PCR verwendete Primer.

3.2.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation

RNA-haltige Proben wurden im Verhältnis 1 : 1 mit einem Phenol-Chloroform-Isoamyl-Gemisch (25 : 25 : 1) gelöst. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 x g über 10 min wurde die obere, RNA-haltige wässrige Phase abgenommen und die RNA durch Zentrifugation bei 15.000 x g über 30 min sowie nachfolgender 30-minütiger Inkubation mit 2 mM Ammoniumazetat und 2,5 Volumenanteilen an Ethanol (96 %) präzipitiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen.

3.2.2 Spezifische Methoden

3.2.2.1 Präparation der mRNA des mstat6 und der Ribozyme

mstat6-RNA und Ribozym-RNA wurden durch *in-vitro*-Transkription mit dem RiboMax-T3 bzw. -T7-Transkriptionskit hergestellt. Die entsprechenden Templates wurden durch Inkubation von 0,5 µg Plasmid-DNA mit 5 U Nhe I bzw. 20 U EcoR I unter Verwendung von 10 % Volumenanteil Reaktionspuffer und 10 % Volumenanteil BSA bei 37 °C für 2,5 h linearisiert.

1 - 1,5 µg linearisierte Ribozym- bzw. pB-mstat6-DNA wurden mit 50 U T3- bzw. T7-RNA-Polymerase in Anwesenheit von T3- bzw. T7-Transkriptionspuffer, 25 mM rNTP-Mix und 40 U RNasin für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde durch Verdau mit 1 U DNase für 15 min bei 37 °C entfernt. RNA wurde mittels Invisorb Twin Spin Cell Min Kit gemäß der Arbeitsanleitung isoliert. Die RNA wurde mit einem 10 mM Tris-HCl-Puffer eluiert und ihre Integrität durch RNA-Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die

Bestimmung des RNA-Gehaltes erfolgte spektralphotometrisch bei 260 bzw. 280 nm, wobei 1 OD einem Gehalt von 40 µg/ml RNA entspricht.

3.2.2.2 Ribozym-Einzel-Aktivitäts-Assay

1 µM mstat6-RNA wurde mit je 10 µM pGvaL-RNA, 10 µM Rz-284-pGvaL-RNA, je 10 µM Rz-311-pGvaL-RNA und Rz 2354-pGvaL-RNA in Anwesenheit von 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 und 2 mM DTT inkubiert. Die RNA wurde für 90 sec. bei 95 °C denaturiert und nach Zugabe von 40 U RNasin und 10 mM MgCl₂ bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über RNA-Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.2.2.3 Identifizierung aktiver DNAzyme

3.2.2.3.1 Multiplex-Aktivitäts-Assay

1 µg mstat6-RNA wurde unter RNase-freien Bedingungen mit je 5 nM DNAzymen (verteilt auf 4 Mixe) in Anwesenheit von 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl und 0,01 % SDS bei 37 °C für 60 min inkubiert. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Präzipitation schloß sich die Reverse Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) an.

3.2.2.3.2 RT-Reaktion

Je 1 µg mstat6-RNA wurde mit 2 sequenz-spezifischen 5'-Carboxyfluoreszein-markierten Primern (0,5 µM) bei 70 °C für 10 min denaturiert (Tabelle 5).

Sequenz	Primer (Sense/Antisense)	Mix
5'-GACTGCTTCCAGAGCACTT-3'/5'-CGGGGTCAGGAUGGCTCCTC-3'	St6-mSS/mSA-FAM	I / II
5'-AGGAGATGCCGTAGGCGT-3'/5'-GATGGAAGGGCCCTGGCAGGTGGCGG-3'	St6-S/St6-F2	III / IV

Tabelle 5. Die für die RT-Reaktion verwendeten Primer.

Die Hybridisierung der Primer erfolgt bei 45 °C für 1 min. Die sich anschließende RT-Reaktion wurde in Anwesenheit von 200 U/µl MMLV-RT, 0,5 mM dNTP's und Reaktionspuffer bei 45 °C für 1 h mit anschließender Termination bei 90 °C für 5 min durchgeführt.

3.2.2.3.3 Fragmentlängenanalyse

Die Länge der Reaktionsprodukte der RT-Reaktion wurde über Fragmentlängenanalyse in den Sequence Laboratories Göttingen mit dem ABI PRISM 307 (Applied Biosystems, USA) bestimmt.

3.2.2.4 DNAzym-Einzel-Aktivitäts-Assay

Für die Ermittlung von DNAzym-Aktivitäten wurden 0,025 μM mstat6-RNA mit 5 μM DNAzymen unter RNase-freien Bedingungen in Anwesenheit von 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM DTT, 40 U RNase-Inhibitor und 10 mM MgCl_2 bei 37 °C zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander inkubiert. Zur Denaturierung wurde die RNA vorher für 90 sec. bei 95 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über RNA-Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Charakterisierung von Ribozymen zur Spaltung der RNA des stat6 der Maus

4.1.1 Auswahl von Ribozym-Bindungsstellen über eine Sekundärstrukturvorhersage des stat6 der Maus mittels MFold

Für die vorliegenden Untersuchungen werden Ribozyme mit einer GUC-Konsensussequenz verwendet. Insgesamt sind 22 GUC-Triplets auf der RNA des mstat6 vorhanden. Die Lokalisation potentieller GUC-Spaltstellen auf der mstat6-RNA erfolgt über die computergestützte Sekundärstruktur-Vorhersage mit Hilfe von MFold, Version 3.0^{94, 95}. Bei der Auswahl potentieller Spaltstellen werden GUC-tragende einzelsträngige Sequenzen und Loop-Strukturen berücksichtigt (Abbildung 6).

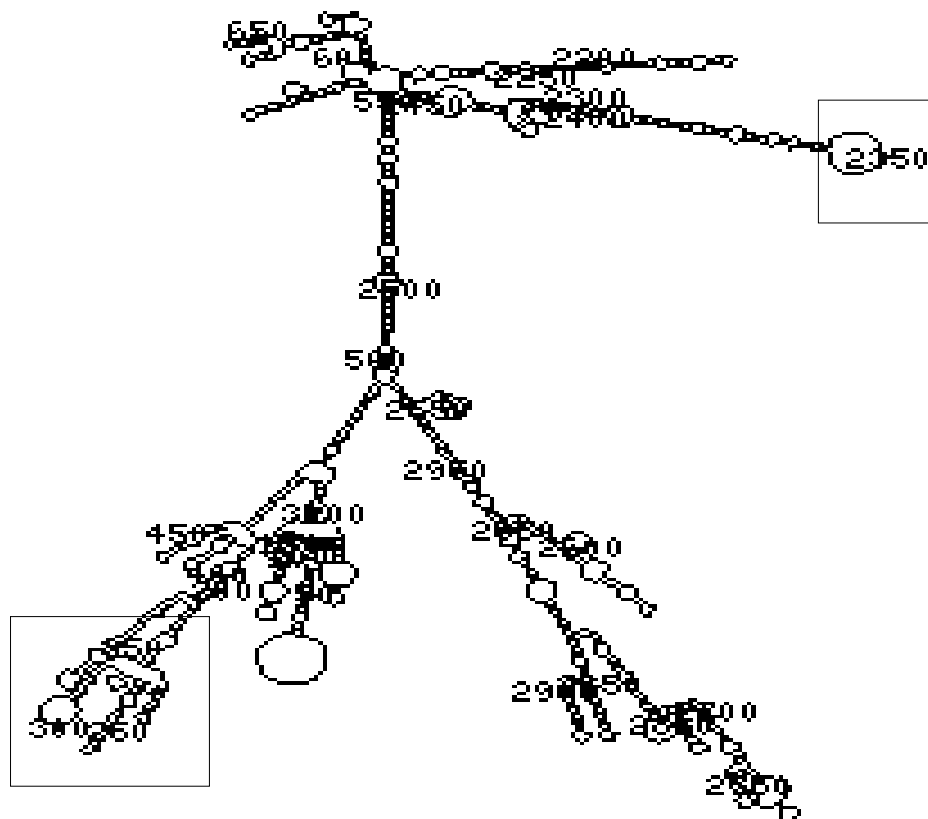


Abbildung 6. Sekundärstruktur-Vorhersage der mRNA des Transkriptionsfaktors stat6 der Maus, berechnet unter Verwendung von MFold. Die ausgewählten Spaltstellen-Bereiche sind umrandet.

4.1.2 Strukturmerkmale der Ribozym-Bindungsstellen

Von den 22 GUC-Tripletts auf dem mstat6-Transkript werden GUC-284 und GUC-311 sowie GUC-2354 als potentielle Ribozym-Spaltstellen ausgewählt (Abbildung 7 - 9).

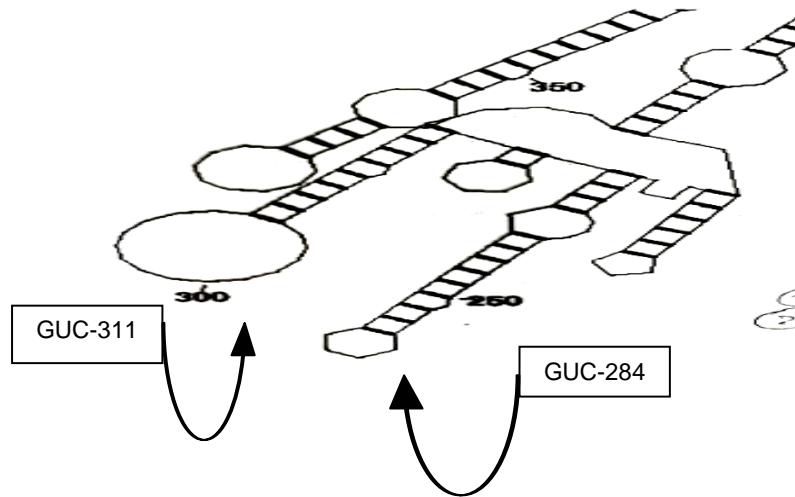


Abbildung 7. Ausschnitt aus der unter Verwendung von MFold berechneten Sekundärstruktur des mstat6-Transkripts im Bereich von GUC-284 und GUC-311. Die Positionen der jeweiligen Konsensussequenzen sind durch Pfeile markiert.

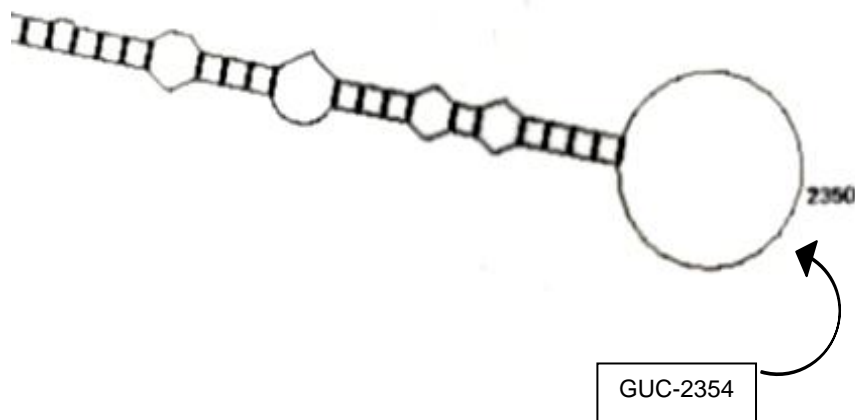


Abbildung 8. Die über MFold ermittelte Sekundärstruktur des mstat6-Transkripts im Bereich von GUC-2354. Die Position der Konsensussequenz ist durch einen Pfeil markiert.

GUC-311 und GUC-2354 befinden sich innerhalb einzelsträngiger Loop-Strukturen. GUC-284 weist kein ausgeprägtes Loop-Kriterium auf, wird jedoch durch seine unmittelbare Nähe zum AUG-Initiationskodon als Ziel-Sequenz ausgewählt. Die Ribozym-Bindungsarme sind so konstruiert, daß die katalytische Domäne der Ribozyme von Armen mit je 6 nt Länge flankiert ist (Abbildung 9).

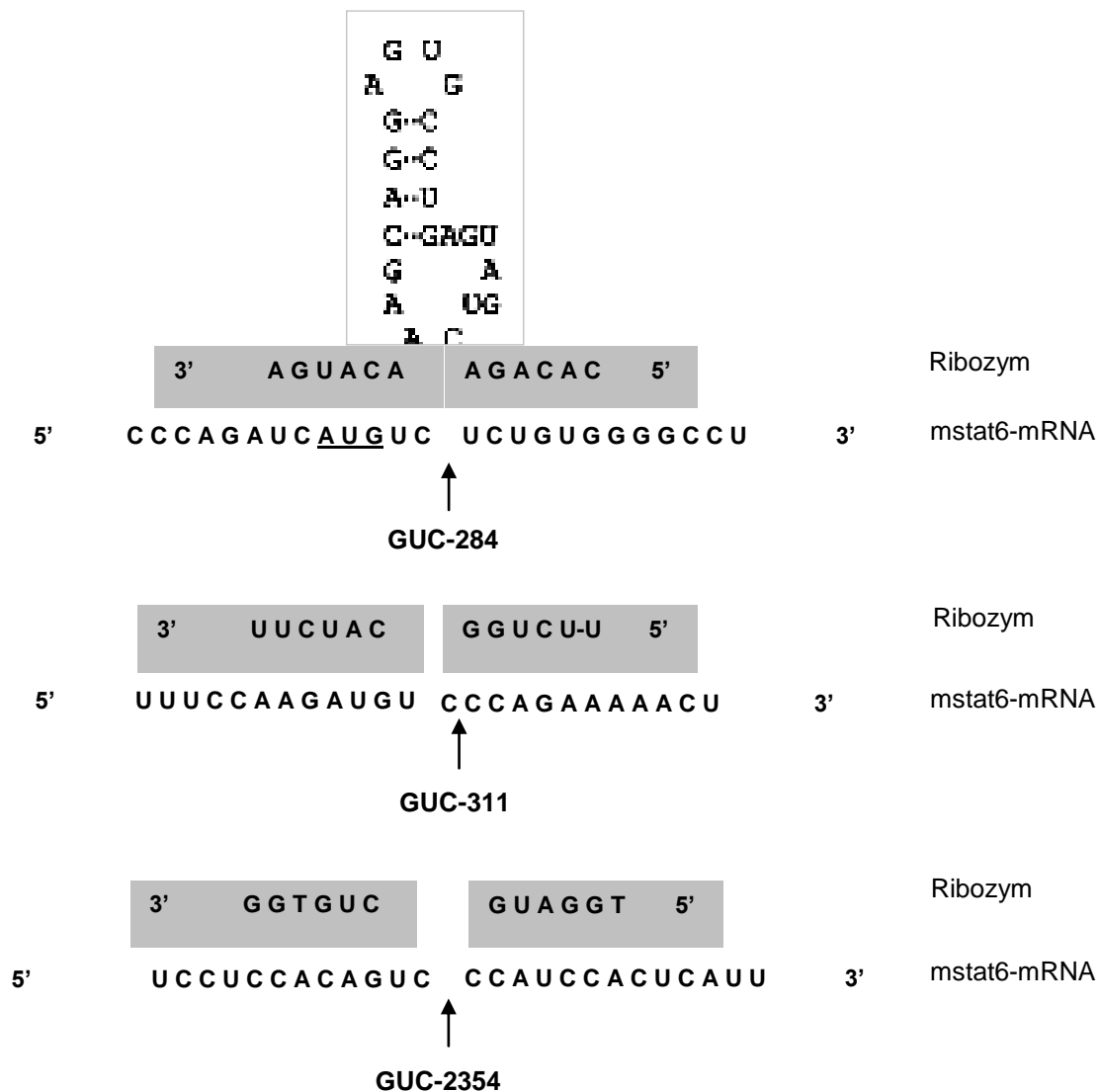


Abbildung 9. Struktur und Bindungsarme mstat6-spezifischer Ribozyme mit GUC-Konsensussequenz. Das AUG-Startkodon ist unterstrichen dargestellt, die Bindungsarme sind grau unterlegt. Die katalytische Sequenz der Ribozyme ist umrandet, ihre jeweiligen Spaltstellen sind durch Pfeile markiert.

4.1.3 Herstellung und Charakterisierung von Ribozym-exprimierenden Plasmiden

4.1.3.1 Ribozym-Expressionsvektor

Für die Herstellung der Ribozyme wird ein Vektor mit der Expressionskassette pGval verwendet (Abbildung 10). pGval kodiert einerseits für eine Vehikel-RNA, die vaRNA I des Adenovirus-assozierten Virus, andererseits für eine Sequenz, die zur Ausbildung einer Loop-Struktur führt, in die das Ribozym-kodierende Oligonukleotid hineinkloniert wurde⁹⁶. Die Expressionskassette verfügt über einen T7-Promotor für die *in-vitro*-Transkription des Ribozyms sowie über einen Pol-III-Promotor für die Ribozym-Expression.

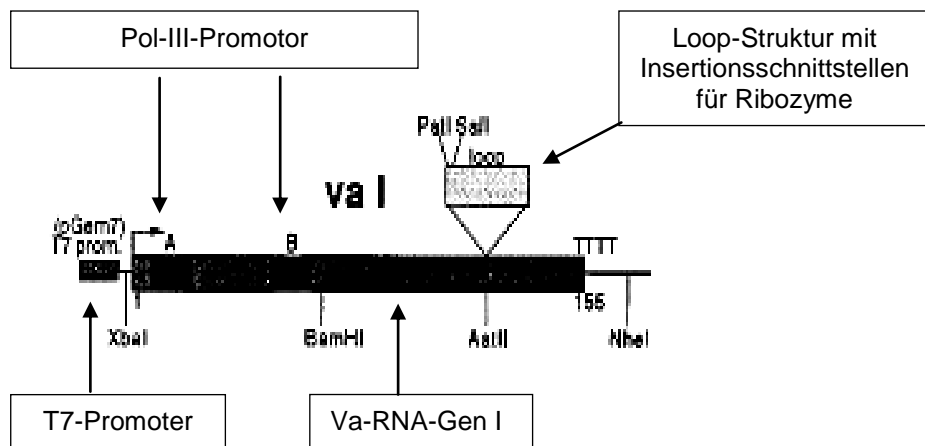


Abbildung 10. Aufbau der Ribozym-Expressionskassette pGval. Ribozym-kodierende Oligonukleotide werden für eine unabhängige Faltung in eine Loop-Struktur innerhalb der vaRNA I und hinter den Pol-III-Promotor inseriert.

4.1.3.2 Klonierung von Ribozym-kodierenden Oligonukleotiden in die Ribozym-Expressionskassette

Die GUC-284-, GUC-311- und GUC-2354-beinhaltenden Ribozyme werden im folgenden als Rz-284, Rz-311 und Rz-2354 bezeichnet. Die Ribozym-kodierenden Oligonukleotide werden über die Restriktionsstellen von Sal I und Pst I in die Expressionskassette pGvaL kloniert. Dazu wird pGvaL mit den Restriktionsenzymen Sal I und Pst I verdaut und die Ribozyme-kodierenden Oligonukleotide unter Verwendung von T4-Ligase in die Loopstruktur von pGvaL insertiert. Die Identifizierung derjenigen Klone, die Rz-284-pGvaL, Rz-311-pGvaL und Rz-2354-pGvaL exprimieren, erfolgt durch Restriktionsverdau, Ribozym-spezifische PCR und Sequenzierung.

a) Restriktionsverdau

Isolierte Plasmide von pGvaL werden mit Xba I und Nhe I verdaut. Plasmide, die Ribozym-kodierende Oligonukleotide enthalten, ergeben eine Größe von 313 bp (Abbildung 11).

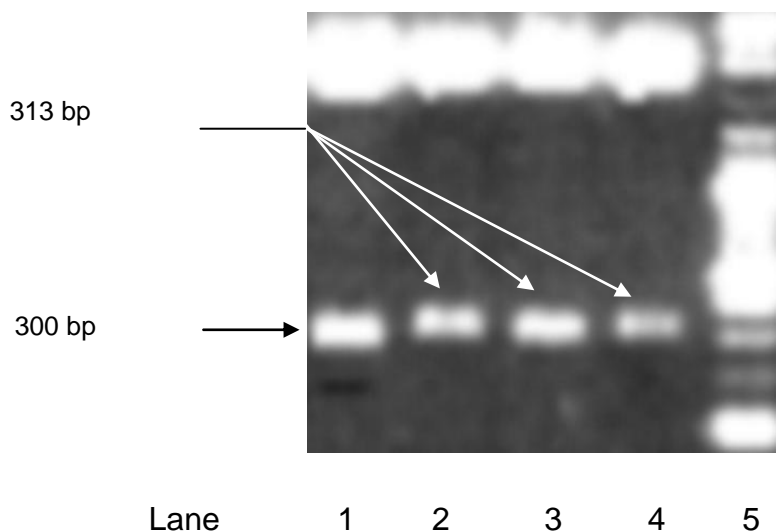


Abbildung 11. Restriktionsverdau von pGvaL-Plasmiden mit Xba I und Nhe I. Der Nachweis des korrekten Einbaus der Ribozym-Oligos in pGvaL erfolgt über DNA-Agarose-Gelelektrophorese. Lane 1 = pGvaL ohne Ribozym-Oligos; Lane 2 = Rz-284-pGvaL, Lane 3 = Rz-311-pGvaL, Lane 4 = Rz-2354-pGvaL, Lane 5 = 100 bp-Marker

b) PCR-Analyse

Die korrekte Integration der Ribozym-Oligos in pGvaL wird durch PCR mit einem Ribozym-spezifischen Primerpaar analysiert. Wenn ein Insert der verwendeten Größe vorhanden ist, besitzen die Amplifikate eine Größe von 243 bp (Abbildung 12).

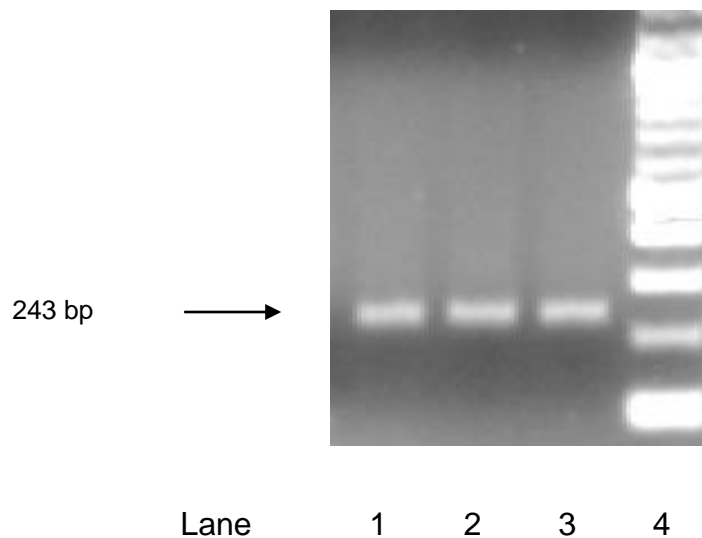


Abbildung 12. Ribozym-spezifische PCR mit dem Rz-Primer und dem T7-Primer. Der Nachweis der korrekten Integration von Ribozym-Oligos in pGvaL erfolgt über DNA-Agarose-Gelelektrophorese. Lane 1 = Rz-284-pGvaL, Lane 2 = Rz-311-pGvaL, Lane 3 = Rz-2354-pGvaL, Lane 4 = 100 bp-Marker

c) Sequenzierung

Diejenigen Plasmide, die sowohl beim Restriktionsverdau als auch bei der Ribozym-spezifischen PCR die erwarteten Produktgrößen zeigen, werden mit Hilfe des T7- bzw. Rz-Sequenzierprimers über „Cycle-Sequenzierung“ analysiert (Abbildung 13). Jedes Plasmid wird sowohl in 5'-Richtung als auch in 3'-Richtung sequenziert. Plasmide, deren Sequenz mit der der insertierten Ribozym-kodierenden Oligonukleotide übereinstimmen, werden für die Präparation der Ribozyme eingesetzt.

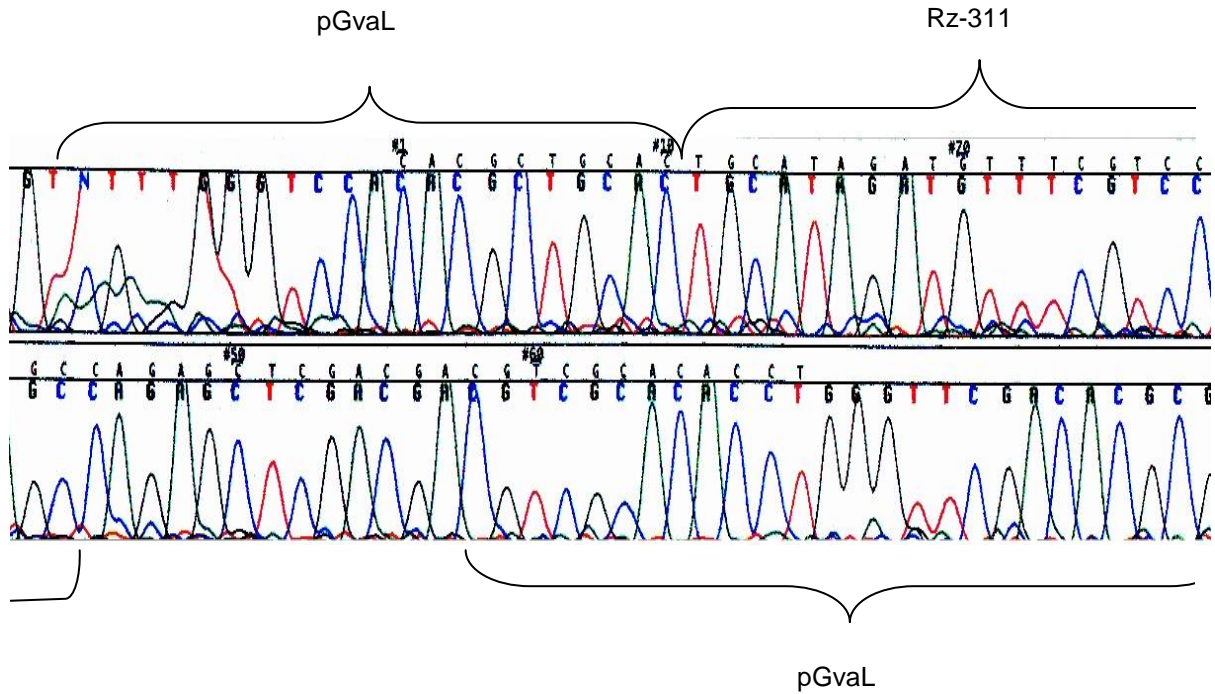


Abbildung 13. Repräsentatives Ergebnis der Sequenzierung des Plasmids Rz-311-pGvaL. pGvaL = Sequenzabschnitt der Loopstruktur der Expressionskassette des pGvaL, Rz-311 = Rz-311-Sequenz.

4.1.3.3 mstat6-exprimierendes Plasmid pB-mstat6

Das Plasmid setzt sich aus pBluescript II KS (+) (2,9 kb) sowie der bereits integrierten mstat6-cDNA (3,2 kb) zusammen. Es wird im folgenden als pB-mstat6 bezeichnet (Abbildung 14). Die Identität des Plasmides wurde durch Restriktionsverdau, mstat6-spezifische PCR und Sequenzierung überprüft.

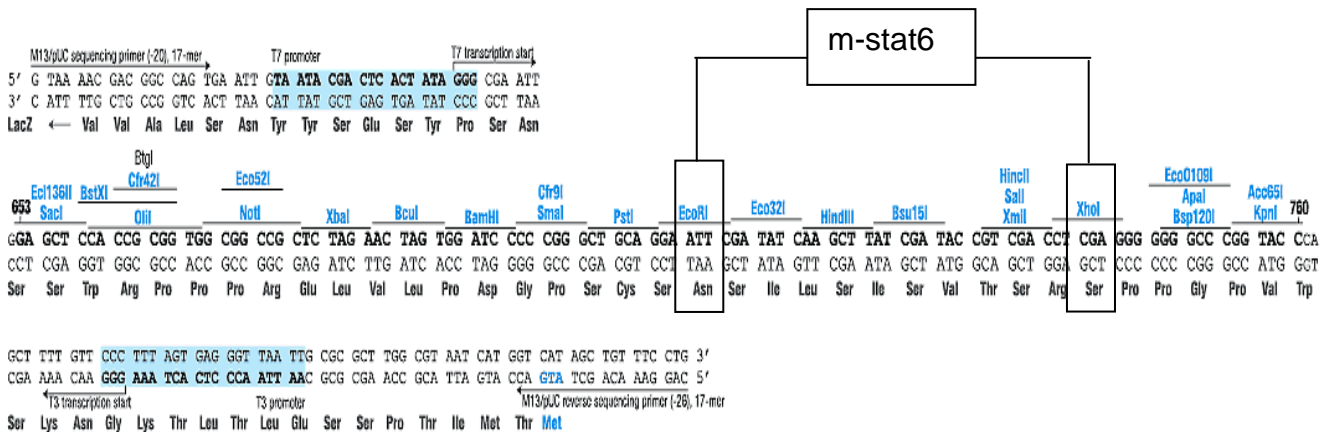


Abbildung 14. Insertionsstellen von EcoR I und Xho I im Plasmid pB II KS (+).

a) Restriktionsverdau

Der Verdau von pB-mstat6 erfolgt mit den Restriktionsenzymen Xho I und EcoR I. Die Schnittstellen von Xho I und EcoR I entsprechen den Insertionsstellen der cDNA des mstat6 in pB II KS. Bei erfolgter Insertion besitzen Reaktionsprodukte eine Größe von 3,2 kb (Abbildung 15).

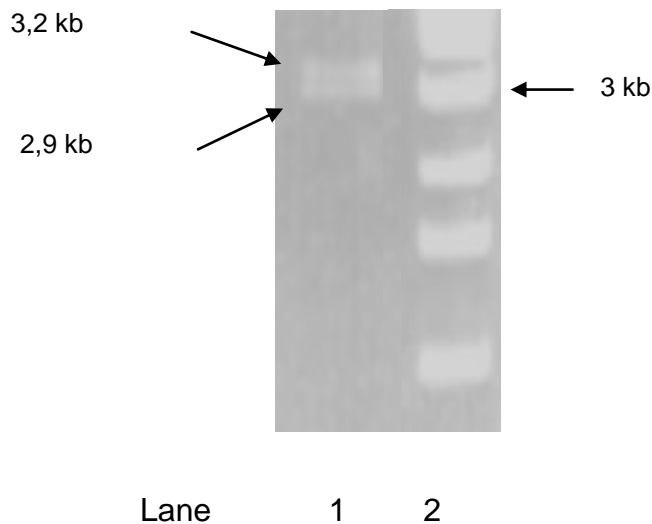


Abbildung 15. Restriktionsverdau von pB-mstat6 mit Xho I und EcoR I. Der Nachweis der Restriktionsprodukte erfolgt über DNA-Agarose-Gelelektrophorese. Lane 1 = Amplifiate, die den korrekten Einbau von mstat6 (3,2 kb) in pB II KS (+) (2,9 kb) zeigen, Lane 2 = 100 bp-Marker.

b) PCR-Analyse von pB-mstat6

pB-mstat6 wurde mit dem Stat6-S-Primer und dem Stat6-A-Primer bzw. dem ST6-Primer und dem Stat6-A-Primer über PCR analysiert. Bei integriertem Insert besitzen die Amplifikate eine Größe von 320 bp bzw. 170 bp (Abbildung 16).

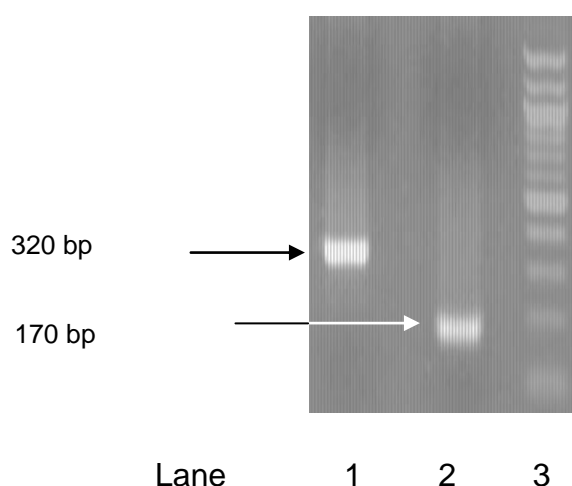


Abbildung 16. mstat6-spezifische PCR von pB-mstat6 mit den Primern Stat6-S/Stat6-A und ST6/Stat6-A. Der Nachweis der Amplifikate erfolgt über DNA-Agarose-Gelelektrophorese. Lane 1 = mit Stat6-S/Stat6-A korrespondierende Bande, Lane 2 = mit ST6/Stat6-A korrespondierende Bande, Lane 3 = 100 bp-Marker.

c) Sequenzierung von pB-mstat6

Plasmide von pB-mstat6, die sowohl beim Restriktionsverdau als auch bei der mstat6-spezifischen PCR die erwartete Produktgröße ergaben, werden über Cycle-Sequencing mit Hilfe des Reverse Primers und des ST6-A-Primers sequenziert. Zur Sicherheit wird sowohl in 5'-Richtung als auch in 3'-Richtung sequenziert. Plasmide, deren Sequenz mit der der insertierten, mstat6-kodierenden Oligonukleotide übereinstimmte, werden für die Präparation von mstat6-RNA eingesetzt.

4.1.4 Präparation der Ribozyme und der RNA des mstat6

Die Präparation der Ribozyme und der mstat6-RNA erfolgt durch *in-vitro*-Transkription mit dem RiboMax-System. Die Plasmide Rz-284-pGvaL, Rz-311-pGvaL und Rz-2354-pGvaL werden durch Restiktionsverdau mit Nhe I linearisiert und mit T7-Polymerase transkribiert. Das pB-mstat6-Plasmid wird mit EcoR I linearisiert, unter Verwendung von T3-Polymerase transkribiert und die RNA über eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Die RNA-Identifikation erfolgt über RNA-Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 17).

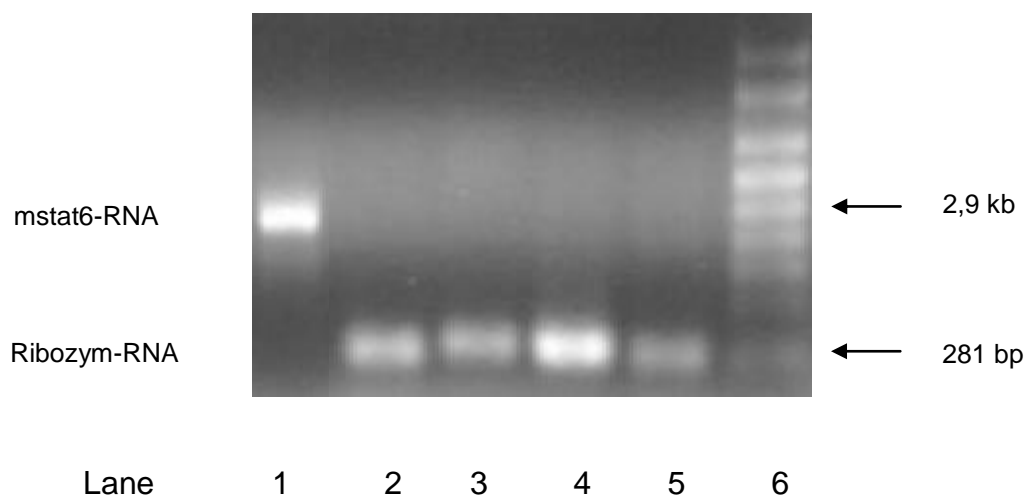


Abbildung 17. RNA-Gelelektrophorese nach Ribozym-Präparation und mstat6-RNA-Präparation. Lane 1 = mstat6-RNA, Lane 2 = Rz-284-RNA, Lane 3 = Rz-311-RNA, Lane 4 = Rz-2354-RNA, Lane 5 = Rz-RNA, Lane 6 = RNA-Leiter.

4.2 Analyse der Ribozym-Aktivität in einem zellfreien System

Für den Nachweis der Spaltungsaktivität der Ribozyme wird ein *in-vitro*-Einzel-Aktivitäts-Assay unter Verwendung von full-length-mstat6-RNA durchgeführt. Dazu werden die Ribozyme unter RNase-freien Bedingungen im Verhältnis von 10 : 1 mit mstat6-RNA in Gegenwart von 10 mM Mg^{2+} bei 37 °C für einen Zeitraum von 30 min inkubiert und die Reaktionsprodukte über RNA-Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Als Negativkontrolle dient Vehikel-RNA. In der RNA-Agarose-Gelelektrophorese lassen sich keine Spaltprodukte nachweisen (Abbildung 18).

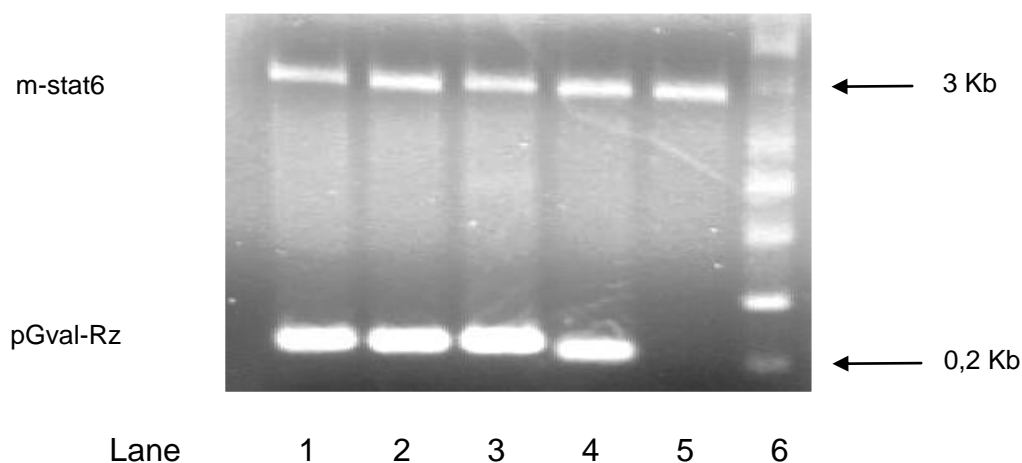


Abbildung 18. Ribozym-Einzel-Aktivitäts-Assay unter Verwendung von 1 μ M mstat6-mRNA und jeweils 10 μ M Rz-284-RNA, Rz-311-RNA bzw. Rz-2354-RNA. Die Reaktionsprodukte sind über RNA-Gelelektrophorese dargestellt. Lane 1 = Rz-284, Lane 2 = Rz-311, Lane 3 = Rz-2354, Lane 4 = pGval, Lane 5 = mstat6 ohne Ribozyme, Lane 6 = 1 kb-RNA-Leiter.

4.3 Identifikation und Charakterisierung von 10-23 DNAzymen zur Spaltung der RNA des stat6 der Maus

4.3.1 Design der DNAzyme

Bei allen nachfolgend aufgeführten DNAzymen handelt es sich um 10-23 DNAzyme, die aus Gründen der Übersichtlichkeit als „DNAzyme“ (Dz) bezeichnet werden. Alle DNAzyme besitzen eine 5'-RU-3'-Konsensussequenz (R = A, G) und jeweils 9 nt lange, spezifische Bindungsarme. Potentielle Spaltstellen weisen eine freie Gesamt-Hybridisierungsenergie $\Delta G_G \leq -25$ kcal/mol auf. Tabelle 6 und Tabelle 7 demonstrieren die ΔG -Werte von von 41 potentiellen DNAzym-Spaltstellen im Sequenzbereich von 1,7 - 2 kb bzw. 150 - 600 bp des stat6 der Maus, die diesen Anforderungen entsprechen.

DNAzyme (Mix I)	Spalt-Position (bp)	Produktgrößen (bp)	ΔG kcal/mol	DNAzyme (Mix II)	Spalt-Position (bp)	Produktgrößen (bp)	ΔG kcal/mol
Dz 1	1704	326	-20,9	Dz 2	1720	310	-20,4
Dz 3	1770	260	-22,2	Dz 4	1776	254	-18,4
Dz 5	1782	248	-16,6	Dz 6	1787	243	-17
Dz 7	1795	235	-22,4	Dz 8	1818	212	-20,4
Dz 9	1830	200	-18,2	Dz 10	1840	190	-21,2
Dz 11	1863	167	-23,7	Dz 12	1878	152	-21,3
Dz 13	1883	147	-23,2	Dz 14	1891	139	-22
Dz 15	1903	127	-16,3	Dz 16	1907	123	-12,7
Dz 17	1914	116	-17	Dz 18	1918	112	-19,3
Dz 19	1981	49	-26,7	Dz 20	1990	40	-25,5
Dz 21	1996	34	-23,1				

Tabelle 6. Produktgrößen, Spaltpositionen und freie Hybridisierungsenergien von 21 DNAzym-Bindungsstellen auf dem Transkript des stat6 der Maus im Bereich von 1,7 - 2 kb.

DNAzyme (Mix III)	Spalt-Position (bp)	Produktgrößen (bp)	ΔG kcal/mol	DNAzyme (Mix IV)	Spalt-Position (bp)	Produktgrößen (bp)	ΔG kcal/mol
Dz 22	542	104	-19,9	Dz 23	538	108	-22,9
Dz 24	520	126	-17,2	Dz 25	508	138	-21,3
Dz 26	467	179	-20,6	Dz 27	460	186	-24,9
Dz 28	425	221	-21,4	Dz 29	410	236	-21,0
Dz 30	406	240	-18,7	Dz 31	399	247	-19
Dz 32	362	284	-17,7	Dz 33	337	309	-25,7
Dz 34	309	337	-21,9	Dz 35	298	348	-17,2
Dz 36	282	364	-18,3	Dz 37	277	369	-18,3
Dz 38	270	376	-20,9	Dz 39	266	380	-20,6
Dz 40	213	433	-23,7	Dz 41	168	478	-24,3

Tabelle 7. Produktgrößen und Spaltpositionen und freie Hybridisierungsenergien von 20 DNAzym-Bindungsstellen auf dem Transkript des stat6 der Maus im Bereich von 150 - 600 bp.

4.3.2 Identifizierung von DNazym-Spaltstellen

4.3.2.1 Multiplex-Aktivitäts-Assay

Um gleichzeitig eine Vielzahl potentieller DNazyme zur Identifizierung von Spaltstellen auf dem mstat6-Transkript zu untersuchen, wird das Prinzip eines Multiplex-Aktivitäts-Assays angewandt. Substrat-RNA wird in einem Ansatz mit den in Tabelle 6 und 7 dargestellten DNazymen inkubiert und nach Extraktion der RNA mit Ammoniumazetat und Ethanol mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Primern in cDNA umgeschrieben. Die jeweilige Primerextensionsreaktion bricht dabei an einer vorhandenen Schnittstelle ab, so daß Spaltprodukte infolge aktiver DNazyme über eine Gelsequenzierung mit anschließender Fragmentlängenanalyse identifiziert werden können (Abbildung 19).

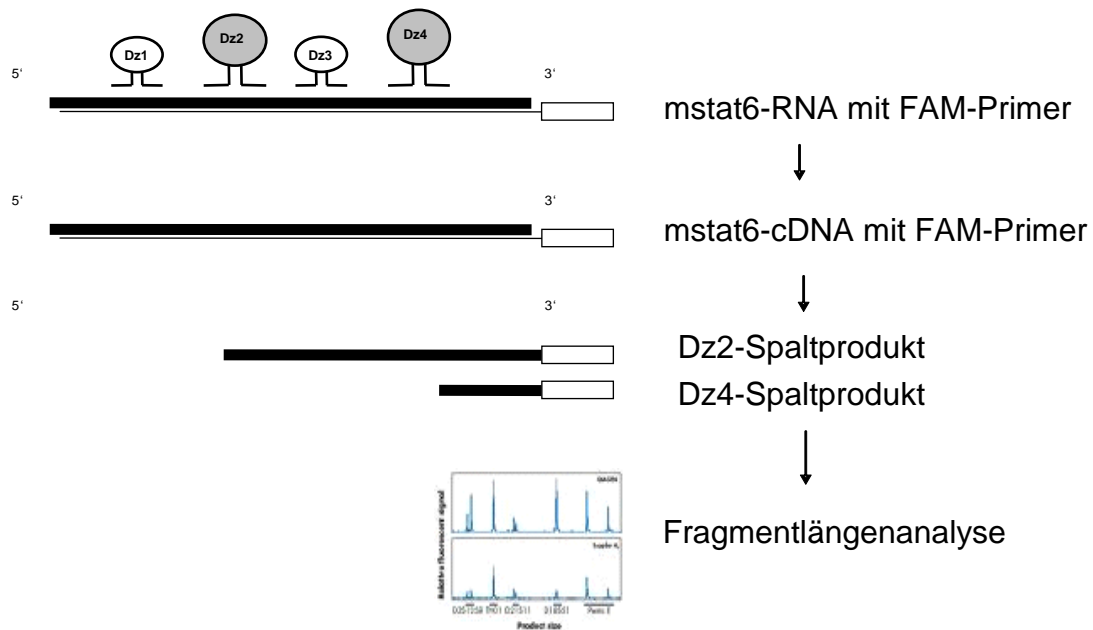


Abbildung 19. Prinzip des Multiplex-Aktivitäts-Assays. Nach Inkubation der mstat6-mRNA mit DNazymen (aktive DNazyme sind grau unterlegt) wird die mstat6-mRNA mit fluoreszenzmarkierten Primern in cDNA-Fragmente umgeschrieben. Spezifische Spaltprodukte infolge aktiver DNazyme können über Fragmentlängenanalyse identifiziert werden.

Insgesamt werden 41 DNAzyme in jeweils vier Mixen mit mstat6-RNA inkubiert. Um intramolekulare Basenpaarungen zwischen einzelnen DNAzymen zu vermeiden, sind die DNAzyme in abwechselnder Reihenfolge auf 4 Gruppen (Mix I, II, III, IV) verteilt (Tabelle 6, 7). Die Primerextensionsreaktionen erfolgen bei 45 °C, Reaktionsprodukte erscheinen in der Fragmentlängenanalyse als Peaks mit unterschiedlicher Retentionszeit. Im Vergleich mit einem Fragmentlängenstandard kann die Größe der gebildeten Fragmente und damit das fragmentbildende DNAzym identifiziert werden (Abbildung 20). Von insgesamt 41 auf dem mstat6-Transkript getesteten DNAzymen sind neun (Dz-3, Dz-17, Dz-18, Dz-24, Dz-25, Dz-37, Dz-38, und Dz-41) aktiv. Davon spalten Dz-3, Dz-17, Dz-18 im Sequenzbereich 1,7 - 2 kb, die restlichen im Sequenzbereich von 150 - 600 bp. Dz-11 mit der Spaltposition 1863 weist einen Basenaustausch auf und besitzt keine katalytische Aktivität, es wird in den nachfolgenden Aktivitäts-Assays als Negativ-Kontrolle verwendet.

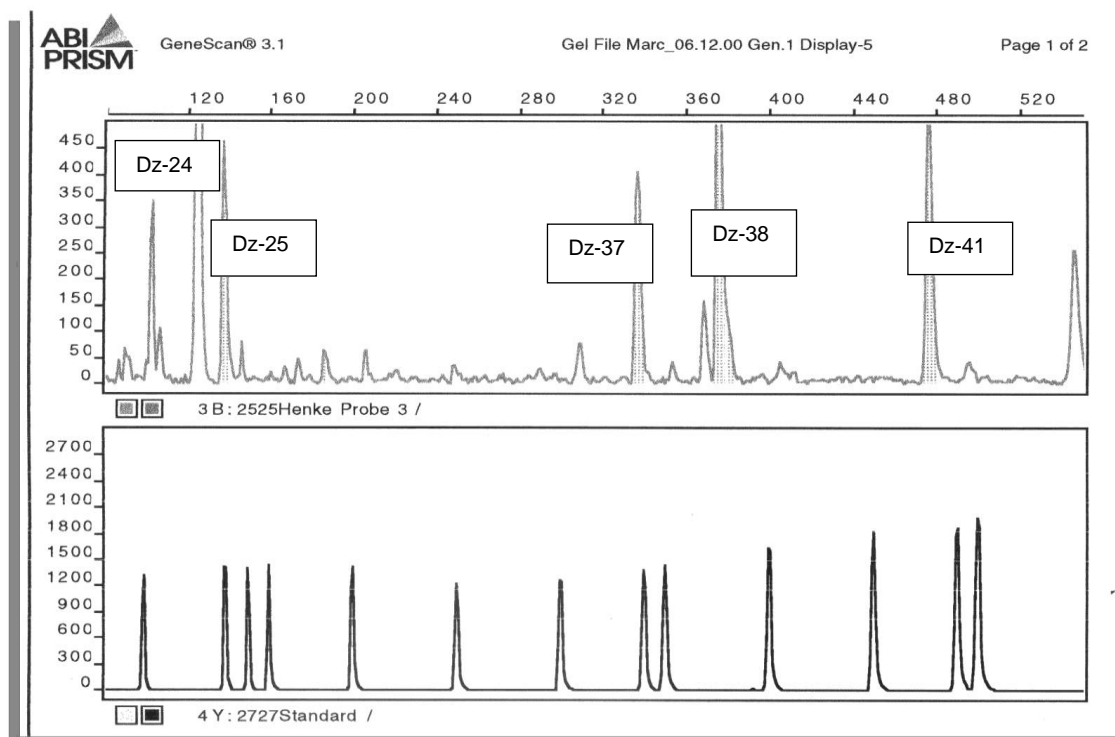


Abbildung 20. Repräsentatives Beispiel der Fragmentlängenanalyse der Produkte des Multiplex-Aktivitäts-Assays. Die Inkubation von 1 μ M mstat6-RNA mit 5 nM DNAzymen aus Mix IV führt zur Bildung von fünf Fragmenten, die auf die Aktivität von Dz-24, Dz-25, Dz-37, Dz-38 und Dz-41 hinweisen. Die Größe der Fragmente wird unter Verwendung eines Längenstandards identifiziert.

4.3.2.2 DNAzym-Aktivitäts-Assay

Die Aktivität der über den Multiplex-Assay identifizierten DNAzyme wird in einem *in-vitro*-Aktivitäts-Assay getestet. Dazu wird full-length-mstat6-RNA mit T3-RNA-Polymerase synthetisiert und unter RNase-freien Bedingungen mit den entsprechenden DNAzymen in Anwesenheit von 50 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂ bei 37 °C für einen Zeitraum von 30 min inkubiert. Reaktionsprodukte der DNAzym-vermittelten Spaltung werden über RNA-Agarose-Gelelektrophorese getrennt, das inaktive DNAzym 11 dient als Negativkontrolle (Abbildung 21).

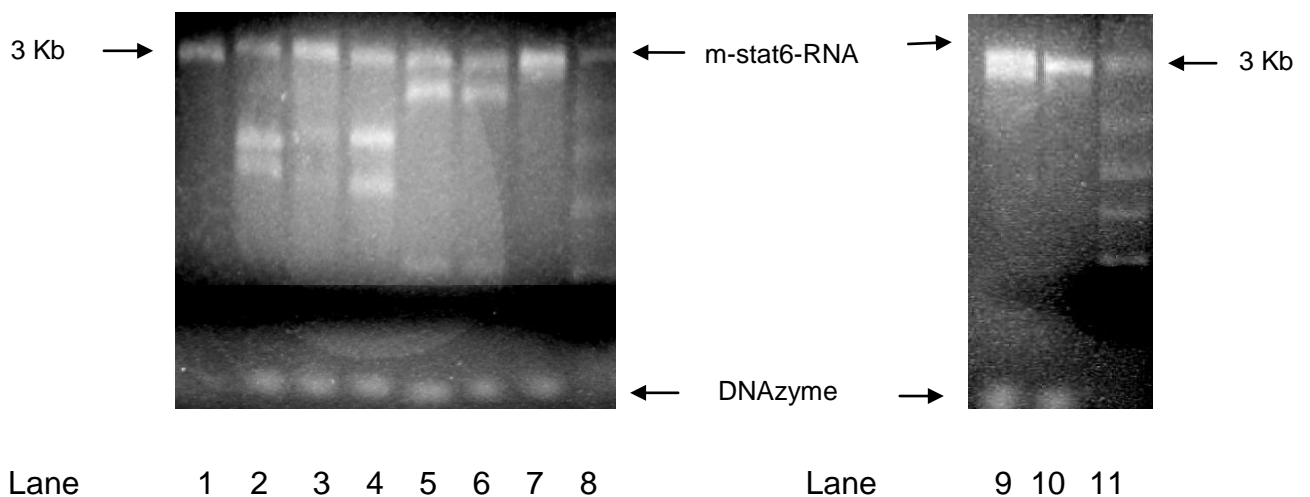


Abbildung 21. RNA-Agarose-Gelelektrophorese nach Inkubation von mstat6-RNA (25 μ M) mit je 5 μ M DNAzymen. Die DNAzym-Aktivität wird anhand der jeweiligen Spaltprodukte gezeigt. Größe und Anzahl der entstandenen Reaktionsprodukte stimmen mit denen der im Multiplex-Assay identifizierten Spaltstellen überein (Tabelle 7 und 8). Lane 1 = inaktives DNAzym, Lane 2 = Dz-3, Lane 3 = Dz-17, Lane 4 = Dz-18, Lane 5 = Dz-24, Lane 6 = Dz-25, Lane 7 =, Dz-37, Lane 8 = 1 kb-RNA-Leiter, Lane 9 = Dz-38, Lane 10 = Dz-41, Lane 11 = 1 kb-RNA-Leiter.

4.3.2.3 Kinetische Analyse ausgewählter DNAzyme

Zur weiteren Charakterisierung des zeitlichen Verlaufes der DNAzym-vermittelten Aktivitäten werden Dz-3, Dz-17, Dz-24 ausgewählt und nach $t = 0,5$ min, $t = 15$ min, $t = 30$ min sowie $t = 60$ min Inkubation mit mstat6-RNA unter den in Punkt 4.3.2.2 beschriebenen Reaktionsbedingungen analysiert. Alle drei DNAzyme sind über einen Zeitraum von 60 min aktiv (Abbildung 22).

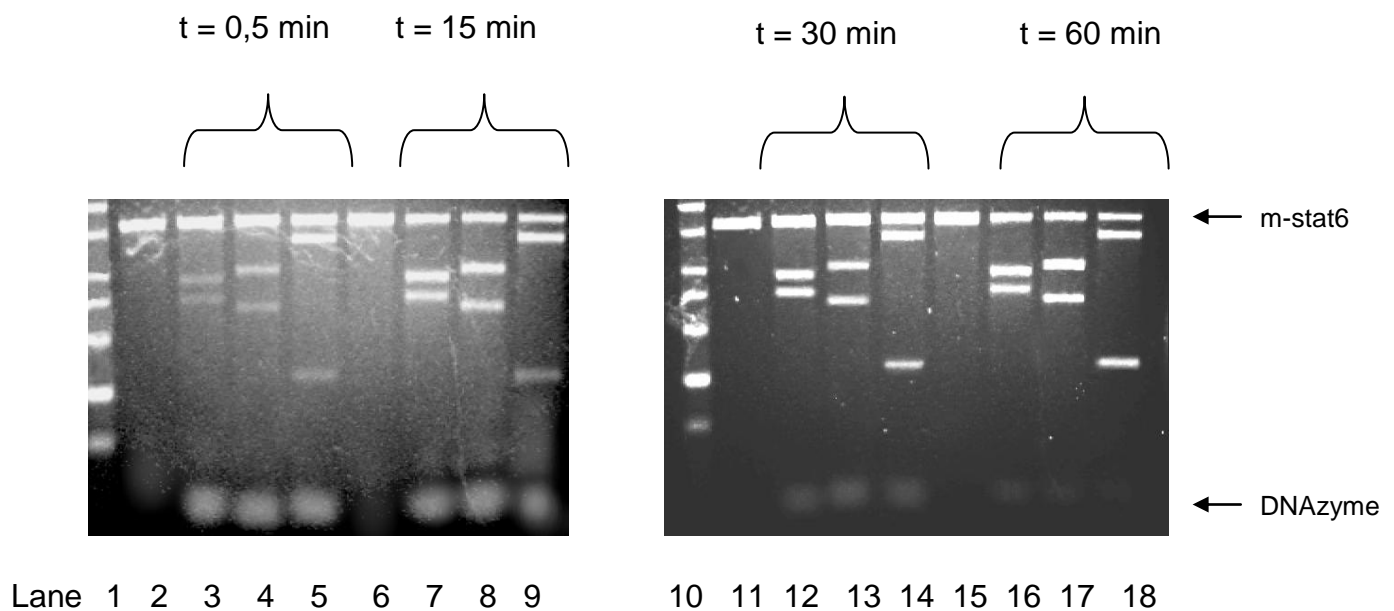


Abbildung 22. RNA-Agarose-Gelelektrophorese nach Inkubation von mstat6-RNA (25 nM) mit je 5 μ M Dz-3, Dz-17 und Dz-24. Die zeitliche DNAzym-Aktivität wird anhand der jeweiligen Spaltprodukte gezeigt. Größe und Anzahl entstandenen Reaktionsprodukte stimmen mit denen der im Multiplex-Assay identifizierten Spaltstellen überein (Tabelle 7 und 8). Lane 1, 10 = RNA-Leiter, Lane 2, 6, 11, 15 = mstat6-RNA, Lane 3, 7, 12, 16 = Dz-3, Lane 4, 8, 13, 17 = Dz-17, Lane 5, 9, 14, 18 = Dz-24.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes bei allergischen Erkrankungen, insbesondere des Asthma bronchiale, am Beispiel der Spaltung der mRNA des Transkriptionsfaktors STAT6 der Maus. Mit dem Einsatz von Ribozymen und DNAzymen wird hierbei eine Nukleinsäure-basierte Strategie verfolgt.

5.1 Stat6 als Target therapeutischer Strategien bei allergischen Erkrankungen

Die Zytokine IL-4 und IL-13 spielen bei der Ausprägung von Symptomen bei Allergien und Asthma eine zentrale Rolle (Abbildung 23). Für die Signalwege beider Zytokine ist der Transkriptionsfaktor stat6 essentiell. Daher stellen sowohl IL-4 und IL-13 bzw. ihre

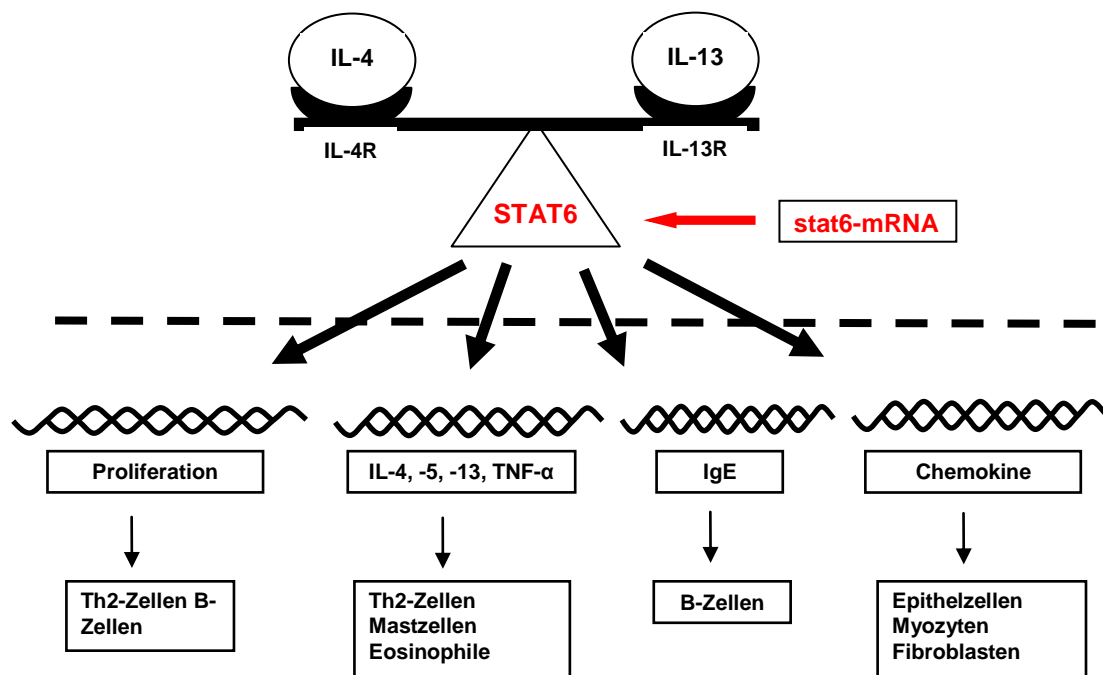


Abbildung 23. Die in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale über stat6 vermittelten biologischen Wirkungen von IL-4 und IL-13.

Rezeptoren, als auch stat6 selbst potentielle Targets für einen therapeutischen Ansatz dar. IL-4 wird wie TNF- α überwiegend in Mastzellen gebildet, zusätzlich kann es von T-Zellen, Makrophagen und basophilen Granulozyten produziert werden ⁹⁷. Es ist hauptverantwortlich für die Proliferation von Th-2-Zellen und B-Zellen sowie für die IgE-Produktion von B-Zellen ⁹⁸. IL-4 stimuliert die pulmonale Expression des endothelialen

vaskulären Zelladhäsions-Moleküls-1⁹⁹ und steigert die antigenpräsentierenden Eigenschaften von B-Zellen, Mastzellen und basophilen Granulozyten¹⁰⁰. Über die Induktion des endothelialen vaskulären Zelladhäsions-Moleküls-1 wirkt es stark proinflammatorisch, da es T-Zellen, Monozyten und eosinophilen Granulozyten an den Ort der Entzündung lockt¹⁰¹. Die pro-inflammatorischen Wirkungen werden durch die Expression des Transkriptionsfaktors Eotaxin verstärkt, der direkten Einfluß auf die Aktivität eosinophiler Granulozyten hat⁵⁹. Auch die pulmonalen Schleimproduktion wird über IL-4 reguliert¹⁰². Studien mit IL-4-knockout-Mäusen demonstrieren, daß IL-4 für eine allergenspezifischen IgE-Antwort sowie für die bronchiale eosinophile Inflammation verantwortlich ist¹⁰³. Transgene, IL-4-überproduzierende Mäuse entwickeln hohe endogene IgE-Spiegel und zeigen eine starke konjunktivale Schleimhautbeteiligung. Letztere weist die histologischen Merkmale einer allergischen Entzündung auf¹⁰⁴.

Ähnlich dem IL-4 zeigt auch das vor allem von Th-2-Zellen produzierte, pleiotrope IL-13 über die B-Zell-vermittelte IgE-Produktion¹⁰⁵, die Expression von MHC-II-Molekülen¹⁰⁵, die Expression des niedrigaffinen IgE-Rezeptors¹⁰⁶, die Expression des endothelialen vaskulären Zelladhäsions-Moleküls-1¹⁰⁷ sowie über seine anti-apoptotischen Effekte auf eosinophile Granulozyten¹⁰⁸ starke pro-allergische Wirkungen. Die Überexpression von IL-13 in bronchialen Epithelien transgener Mäuse verursacht eine entzündliche lymphogene und eosinophile Infiltration, Goblet-Zell-Metaplasie, subepitheliale Fibrose sowie Proliferation glatter Muskelzellen¹⁰². IL-13 knockout-Mäuse haben im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen geringere endogene IgE-Spiegel und zeigen verringerte Th-2-abhängige Immunantworten¹⁰⁹.

Aus den eben geschilderten Zusammenhängen geht hervor, daß beide Zytokine überlappende Effekte aufweisen. Ihre redundanten Wirkungen resultieren im wesentlichen daraus, daß der überwiegende Anteil der IL-4- bzw. IL-13-sensitiven Zellen die Rezeptoren beider Zytokine exprimiert¹¹⁰. Der IL-4-Rezeptor besteht aus zwei funktionellen Domänen, einer α -Untereinheit und einer γ -Untereinheit¹¹¹. Der IL-13-Rezeptor besteht neben der α -Untereinheit des IL-4R aus der IL-13-bindenden IL-13R α 1-Untereinheit sowie einer IL-13R α 2-Untereinheit¹¹². Die biologischen Wirkungen von IL-4 werden nach Bindung an die α/γ -Einheit des IL-4R vermittelt, in Abwesenheit der γ -Untereinheit alternativ über die α -Untereinheit des IL-13R¹¹². In Abwesenheit der IL-4R α -Untereinheit bindet IL-13 mit geringer Affinität an α 1-Untereinheit des IL-13R¹¹³. Diese Affinität ist in Anwesenheit der α -Untereinheit des IL-4R signifikant erhöht. Die zweite Untereinheit des IL-13R bindet IL-13 mit hoher Affinität, jedoch nicht IL-4. Die

funktionelle Bedeutung der IL-13R α 2-Untereinheit ist noch weitestgehend ungeklärt. IL-13R α 2 scheint keine Rolle für die Signaltransduktion zu spielen, da der zytoplasmatische Rezeptoranteil keine entsprechenden Signalmotive enthält. Daher wird vermutet, daß IL-13R α 2 als Köder („Decoy“) für seinen Liganden dient ¹¹⁴. Die Redundanz der Wirkungen beider Interleukine sowie die Variabilität ihrer Rezeptoruntereinheiten lassen den Schluß zu, daß sowohl die Interleukine selbst als auch ihre Rezeptoren nur eingeschränkt als Targets für eine therapeutische Intervention bei allergischem Asthma bronchiale in Frage kommen.

Dagegen wird über den Transkriptionsfaktor stat6 die Signaltransduktion von IL-4 und IL-13 unabhängig von der jeweiligen Rezeptorkonfiguration vermittelt. T-Lymphozyten können sich in Abwesenheit von stat6 nicht in IL-4-produzierende Th-2-Effektorzellen differenzieren ¹¹⁵. In verschiedenen allergischen stat6-knockout-Mausmodellen ist der über IL-4- und IL-13-induzierte allergische Phänotyp stark vermindert. Dabei sind sowohl die Differenzierung von Th-2-Zellen und B-Zellen, der Immunglobulin-Klassenwechsel zum IgE, die eosinophile Infiltration der Atemwege als auch die Entwicklung einer bronchialen AHR mit Mukusüberproduktion reduziert ¹¹⁶⁻¹¹⁸. Zusätzlich werden weitere IL-4-abhängige Wirkungen, wie die Expression von epithelialen Adhäsionsmolekülen oder die Reifung von Mastzellen, mit beeinflußt. Die Rekonstitution von STAT6 in stat6-defizienten allergischen Mäusen kann in pulmonalen Epithelzellen die IL-13-vermittelte bronchiale Atemwegshyperreagibilität und vermehrte Mukusproduktion wiederherstellen ¹¹⁹. Für STAT6 sind bislang keine spezifischen Inhibitoren beschrieben worden. Durch verschiedene Substanzen wie Salizylate, Aspirin oder intrazelluläre Peptide, können Phosphorylierungsreaktionen innerhalb der stat6-Signalkaskade blockiert werden ¹²⁰⁻¹²². Die hier dargestellten Untersuchungsergebnisse machen deutlich, daß der Transkriptionsfaktor STAT6 ein relevantes Target für eine therapeutische Strategie bei allergischen Erkrankungen, insbesondere beim Asthma bronchiale, darstellt.

5.2 Nukleinsäure-basierte Strategien zur Inhibition der stat6-Expression

Nukleinsäure-basierte Strategien zur Inhibition der stat6-Expression sind in der Literatur bisher als Untersuchungen unter Anwendung von AODN ^{62, 63} bzw. Oligodeoxynukleotid-Decoys ⁶¹ beschrieben worden. Während AODN zum Abbau der RNA durch RNasen führen bzw. die Translation inhibieren, wirken Decoys direkt auf der Transkriptionsebene. Hill et al. untersuchten humane und murine AODN zur

Identifizierung von aktiven Antisense-Bindungsstellen auf dem stat6-Transkript⁶². Dabei finden sie von der chemischen Modifikation abhängige AODN-Aktivitäten in murinen und humanen Zellkulturen. Die AODN-Aktivitäten nehmen dabei in folgender Reihenfolge zu: 2'-deoxy-phosphorothioat-AODN < 2'-O-(2-methoxy)ethyl-AODN < Chimeres Konstrukt („9b-AODN“) aus beiden Modifizierungen⁶². Da sich das „9b-AODN“ als am aktivsten herausstellte, wurde es in der humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie „DND39“ eingesetzt. Das „9b-AODN“ inhibiert die stat6-abhängige Expression des Keimbahn C-ε-Transkriptes und zeigt keine Wirkungen auf die Expression von stat1, stat2, stat3 und stat5⁶². Durch Donahay et al. werden zwei stat6-spezifische, Phosphorothioat-modifizierte AODN in einem Mausmodell für allergisches Asthma getestet. Beide unterdrücken die Expression der mRNA und des Proteins in der Milz unabhängig vom endogenen IgE-Spiegel auf ca. die Hälfte der Ausgangswerte⁶³. Durch Stütz et al. wird ein chemisch modifiziertes, Triplehelix-bildendes Oligonukleotid vorgestellt, das Sequenzen enthält, die partiell komplementär zu der STAT6-Bindungsstelle sowie den NF-kb/PU.1-Bindungsstellen auf dem IgE-Keimbahn-Promotor sind. Unter *in-vitro*-Bedingungen blockiert dieses Oligonukleotid die DNA-Bindung aller drei Transkriptionsfaktoren. Die Anwendung dieses Oligonukleotides in humanen B-Zellen ergibt, daß die IL-4-induzierte Aktivität des IgE-Keimbahn-Promotors effektiv unterdrückt wird¹²³.

Alternativ zu AODN werden auch doppelsträngige Oligonukleotidsequenzen, die die Erkennungssequenz eines Gen-Promotors oder Gen-Enhancers enthalten (sogenannte Decoys), verwendet. Ein Decoy konkurriert mit dem Gen um die Bindung eines Transkriptionsfaktors, so daß die Transkription inhibiert wird. Wang et al. zeigen, daß die Applikation eines Phosphorothioat-modifizierten, stat6-spezifischen Decoys in murinen Th-2-Zellen und humanen CD4+ T-Lymphozyten die DNA-Bindung von STAT6 blockiert und die IL-4-vermittelte Proliferation dieser Zellen hemmt⁶¹. Dabei hat die Aktivität des stat6-spezifischen Decoys keinen Einfluß auf Zellfunktionen, die über stat1, stat3, stat5 und stat5b vermittelt werden. Unter *in-vivo*-Bedingungen werden stat6-spezifischen Decoys bisher in experimentellen Mausmodellen für die atopische Dermatitis und die Kontaktallergie beschrieben¹²⁴. Dabei sind deutlich reduzierte pulmonale Infiltrationsraten neutrophiler und eosinophiler Granulozyten nachweisbar¹²⁵. Neben AODN oder Decoys beinhalten Nukleinsäure-basierte Strategien auch die Anwendung von Ribozymen, DNAzymen und siRNA. In der Literatur sind bislang jedoch

keine gegen stat6-spezifischen Ribozyme und DNAzyme beschrieben worden. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu einem Zeitpunkt erstellt worden sind, an dem die Anwendung von siRNA noch nicht bekannt war, werden Untersuchungsergebnisse, die auf der Anwendung STAT6-spezifischer siRNA beruhen, nicht diskutiert.

5.3. Charakteristika der Ribozyme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Ribozyme mit einer GUC-Konsensussequenz und 6 nt langen Bindungsarmen untersucht. Die Bindungsstellen sind im Bereich von Loop-Strukturen bzw. in der Nähe des Initiationskodons lokalisiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit eines Ribozyms wird von der Basenfolge der 5'-NUH-3'-Konsensussequenz determiniert. Substrate mit einem Purin an der ersten Position des NUH-Tripletts und einem Zytosin oder Adenin an der dritten Position werden besonders effektiv gespalten¹²⁶. Die Reaktionsraten von Ribozymen mit verschiedenen Konsensussequenzen weisen in der Reihenfolge AUC, GUC>GUA, AUA, CUC>AUU, UUC, UUA>GUU, CUA>UUU, CUU eine abnehmende Tendenz auf¹²⁷. Erweiterte Untersuchungen zur NUH-Konsensussequenz haben gezeigt, daß eine Substitution des zentralen Uridins durch Adenosin oder Cytidin möglich ist⁷⁴.

Neben der ausgewählten Spaltstelle wird die Effizienz der Ribozym-vermittelten Katalyse auch von der Länge der Ribozymbindungsarme bestimmt. Bei langen Bindungsarmen sinkt die Umsatzrate, da innerhalb der Reaktionskinetik die Produktdissoziation zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. Darüber hinaus kommt es bei Ribozymen mit Bindungsarmlängen von >10 nt zur Bildung von Sekundärstrukturen, die eine Verminderung der Ribozymaktivität zur Folge haben¹²⁸. Im Gegensatz dazu nimmt bei Verwendung kurzer Bindungsarme die Spezifität der Substraterkennung ab¹²⁹. Ribozyme mit Bindungsarmen von je 6 - 8 nt wurden in mehreren Untersuchungen, u. a. zur Inhibition des humanen Wachstumshormons⁹⁶ sowie des Tumorsuppressors p16INK4 α ¹³⁰ eingesetzt. Um den diskutierten Anforderungen an ein Ribozym mit hohem Substratumsatz und ausreichender Spezifität zu genügen, wurden in der vorliegenden Arbeit Ribozyme mit einer GUC-Konsensussequenz und symmetrischen Bindungsarmen von jeweils sechs Nukleotiden verwendet.

In den Experimenten wurden drei potentielle Ribozym-Spaltstellen untersucht, die entweder im Bereich von Loop-Strukturen oder aber in der Nähe des Initiationscodons lokalisiert sind. Die Auswahl der potentiellen Spaltstellen erfolgte auf der Grundlage von

Sekundärstrukturberechnungen der *stat6*-mRNA unter Verwendung von MFold. Potentielle Spaltstellen sind insbesondere in Loop-Regionen zugänglicher sind als in Stammbereichen¹³¹. Einzelsträngige Loop-Strukturen, wie sie z. B. im Bereich von GUC-2354 des *mstat6*-Transkriptes vorkommen oder die ersten 500 - 1000 Nukleotide eines Transkriptes (GUC-284, GUC-311) zeigen eine größere Wahrscheinlichkeit für eine Zugänglichkeit als sog. Bulges (Ausbuchtungen) oder doppelsträngige Stamm-Strukturen¹³²⁻¹³⁴. Da zusätzlich bekannt ist, daß die Positionierung der Ribozym-Bindungsstelle in die unmittelbare Nähe des AUG-Startkodons die Wahrscheinlichkeit für die Identifizierung einer Ribozymbindungsstelle erhöht, fand dies bei der Auswahl von GUC-284 Berücksichtigung¹³⁴. Im Gegensatz zu „down-stream“-kodierenden Bereichen sind hier die für die Bindung des Translationsapparates relativ offenen Strukturen gleichzeitig auch für eine Ribozym-Bindung vorteilhaft. Die Ribozym-vermittelte Inhibition einer Genexpression hängt darüberhinaus auch von der Länge des Substrates ab. Bertrand et al. demonstrieren am Beispiel des *Pit-1*-transkriptes *in-vitro*, daß die Spaltung eines 60 nt langen mRNA-Abschnittes im Vergleich zu einem 950 nt langen mRNA-Abschnitt wesentlich effektiver verläuft¹³⁵. Als Ursache dafür machen die Autoren im wesentlichen die bessere Ribozym-Zugänglichkeit zu den Zielsequenzen auf dem kürzeren mRNA-Abschnitt verantwortlich.

5.4 Identifizierung potentieller Ribozym-Spaltstellen

Auf der Grundlage einer Spaltstellenidentifikation über MFold können aktive Ribozyme generiert werden^{96, 136-140}. Andere Autoren zeigen, daß diese Strategie nicht oder nur teilweise erfolgreich ist^{136, 141}. Amarzguioui et al. vergleichen die computergestützten Sekundärstrukturvorhersage über MFold mit der Methode eines *in-vitro*-Zugänglichkeits-Assays. Am Beispiel der humanen Proteinkinase-1-mRNA zeigen sie, daß Ribozyme, deren Spaltstellen über Mfold ermittelt wurden, aktiver sind als diejenigen, deren Spaltstellen über das *in-vitro*-Zugänglichkeits-Assay ermittelt wurden¹⁴². Beide eben genannten Methoden werden durch Birikh et al. am Beispiel des humanen Azetylcholinesterase-Transkriptes verglichen. Im Gegensatz zu Amarzguioui et al. finden Birikh et al. vermehrt aktive Ribozyme, deren Spaltstellen nicht über MFold, sondern über das *in-vitro*-Zugänglichkeits-Assay ermittelt wurden¹⁴³.

Bei der Vorhersage der Sekundärstruktur der RNA wird davon ausgegangen, daß die Struktur mit der geringsten freien Energie (ΔG) die größte Existenzwahrscheinlichkeit hat. Da mit der Größe einer RNA auch die Anzahl der Strukturen mit vergleichbarem

ΔG steigt, ist die Vorhersage der Sekundärstruktur oftmals nicht exakt möglich. Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten mstat6-spezifischen Ribozyme im *in-vitro*-Assay nicht aktiv sind, bleibt zu vermuten, daß sie nicht zugänglich sind.

Neben der Sekundärstrukturvorhersage über MFold gibt es auch experimentelle Strategien zur Spaltstellenidentifikation. Diese beruhen zum einen auf dem enzymatischen Verdau der Target-RNA mit RNase-H nach der Bindung von AODN, zum anderen auf der Benutzung von Ribozym-Bibliotheken („Libraries“) sowie auf *in-vitro*-Selektionstechniken¹⁴⁴. Ziel-RNA kann nach Hybridisierung mit kurzen AODN in Verbindung RNase-H verdaut werden, wobei potentielle Bindungsstellen anhand der RNase-H-vermittelten Spaltung der DNA-RNA-Duplex auftreten. Bislang sind hierzu spezifische AODN, semirandomisierte oder komplett randomisierte AODN-Sets verwendet worden^{131, 143, 145, 146}. Zusätzlich werden auch Ribozym-Libraries mit komplett oder teilweise randomisierten Bindungsarmen für die Identifikation zugänglicher Stellen benutzt⁹⁶. Parallel dazu ist die Kombination aus einer Ribozym-Library und einem Rnase-H-Verdau beschrieben worden¹⁴⁷. Eine relativ neue Methode ist die *in-vitro*-Selektion von Ribozymen^{148, 149}. Mit dieser Methode kann eine große Zahl verschiedener Ribozyme gleichzeitig auf bestimmte Merkmale wie Bindungsverhalten oder katalytische Eigenschaften hin selektiert werden. Durch Cairns et al. werden erstmals DNAzyme zur Identifikation von Target-Stellen eingeführt¹⁵⁰. Keine der hier diskutierten Methoden zur Spaltstellenidentifikation hat sich jedoch als besonders vorteilhaft herausgestellt.

5.5 Ribozym-Applikation und Ribozym-Expressionskassette

Eine Applikation von Ribozymen in Zellen kann entweder exogen oder endogen erfolgen. Exogen applizierte Ribozyme werden unter zellulären Bedingungen in der Regel schnell degradiert, da sie insbesondere an der 2'-OH-Gruppe ihrer Pyrimidine für eine Spaltung durch Nukleasen anfällig sind¹⁵¹. Invertierte Thymidine am 3'-Ende bzw. Phosphorothioate am 5'-Ende erhöhen die Ribozym-Stabilität und verlängern ihre Halbwertszeit¹⁵². Durch den Einbau eines 2'-C-Allyluridin an Position U4 ist auch eine Stabilisierung des katalytischen Kerns von Ribozymen möglich¹⁵³. Die erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen führt jedoch häufig zu einer verminderten Ribozym-Aktivität¹⁵². Die Einschleusen von Ribozymen in Zellen kann über einen liposomalen Transfer oder über Transfektionsreagenzien aus Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin erfolgen^{154, 155}.

Die endogene Applikation von Ribozymen basiert auf der Verwendung von Vektoren. Diese enthalten eine Expressionskassette, in die ein Ribozym-kodierendes Oligonukleotid kloniert wird. Für die endogene Expression von Ribozymen wurden eine Reihe von Vektoren, u. a. adenovirale, retrovirale oder lentivirale Vektoren etabliert. Die Effizienz der Ribozym-vermittelten Inhibition einer Genexpression beruht neben der Auswahl eines geeigneten Vektors auf dem optimalen Design der Expressionskassette. Die Expressionskassette enthält die kodierende Sequenz einer Vehikel-RNA, in die die kodierende Sequenz des Ribozyms integriert ist. Darüberhinaus verfügt sie über eine Promotorregion, über die die intrazelluläre Synthese der das Ribozym enthaltenden Vehikel-RNA realisiert wird. Die Eigenschaften der Vehikel-RNA werden auf die des insertierten Ribozyms übertragen, d. h. die Vehikel-RNA bestimmt die Expressionsintensität, die zelluläre Lokalisation sowie die Nukleasestabilität. Bislang sind Expressionskassetten mit verschiedenen Promotoren (Pol-III-Promotor, Pol-II-Promotor, Moloney-Murine-Leukemia-Virus-Promotor) ¹⁵⁶ bzw. Vehikel-RNA (tRNA^{VAL}, tRNA^{METH}, 5S rRNA, U1snRNA, U6snRNA) ¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ beschrieben worden.

Von Lieber und Strauß wird 1995 eine Ribozym-Expressionskassette auf der Basis der virus-assoziierten RNA I (vaRNA I) des humanen Adenovirus-assoziierten Virus vom Typ-II publiziert ⁹⁶. Die Ribozyme werden dabei in eine Vehikel-RNA integriert, welche zum einen aus der vaRNA I des humanen Adenovirus-Typ-II, zum anderen aus einer gezielt insertierten Loop-Sequenz besteht. Die Struktur der vaRNA I ist durch ausgedehnte, doppelsträngige Bereiche gekennzeichnet. Die Ribozymsequenz wird in die Loop-Sequenz kloniert, so daß sich durch die strukturdeterminierende Wirkung der Stamm-Bereiche der vaRNA I sowie die strukturarme Loop-Sequenz die eigentliche Ribozymstruktur mit großer Wahrscheinlichkeit ausbilden kann. Die Wirksamkeit der Expressionskassette ist in mehreren Untersuchungen demonstriert worden ^{96, 160}.

5.6 Charakteristika der DNAzyme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mstat6-spezifische DNAzyme mit jeweils 9 nt langen Bindungsarmen verwendet. Die DNAzyme erlangen ihre Spezifität durch die Spaltung definierter Purin (Purin = A, G)/Urazil-Bindungen auf der mstat6-RNA. Als potentielle DNAzym-Spaltstellen wurden Bindungsstellen mit einer freien Gesamt-Hybridisierungsenergie $\Delta G_G \leq -25$ kcal/mol im Bereich von 1,7 - 2 kb bzw. 150 - 600 bp herangezogen.

Eine Korrelation zwischen der DNAzym-Effizienz und der thermodynamischen Stabilität der DNAzym-Substrat-Heteroduplex ist erstmals durch Santoro und Joyce an verschiedenen HIV-spezifischen DNAzymen gezeigt worden⁸³. Um die thermodynamische Stabilität der DNAzym-Substrat-Heteroduplex einzuschätzen, ziehen die Autoren die freie Hybridisierungsenergie ΔG_0 heran und zeigen, daß sich ΔG_0 umgekehrt proportional zur DNAzym-Aktivität verhält. Weitere Untersuchungen bestätigen, daß DNAzyme mit einem niedrigen ΔG_0 häufig am aktivsten sind¹²⁷. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit nur Bindungsstellen mit einem $\Delta G_0 \leq -25$ kcal/mol als potentielle DNAzym-Spaltstellen auf der mstat6-RNA herangezogen. Die Stabilität der DNAzym-Substrat-Heteroduplex wird darüberhinaus durch seinen GC-Reichtum, den spezifischen Gehalt an Pyrimidinen sowie die Länge der Bindungsarme determiniert¹⁶¹. Längere DNAzym-Bindungsarme können die Stabilität der DNAzym-Substrat-Heteroduplex erhöhen und damit die DNAzym-Effizienz steigern. Die Stabilität der DNAzym-Substrat-Heteroduplex ist, ähnlich der von Ribozymen, durch eine verminderte Umsatzrate limitiert, da auch hier die Produktdissoziation zum geschwindigkeitsbestimmenden Faktor wird¹²⁷. Aktive DNAzyme weisen überwiegend Bindungsarmlängen von jeweils 7 - 9 nt auf^{162, 163}. Die DNAzym-Aktivität ist zusätzlich durch ihre 5'-RU-3'-Spaltstelle determiniert. Cairns et al. demonstrieren, daß die Spaltung von RC-Spaltstellen mit R = A, G weniger effizient als die von vergleichbaren RU-Spaltstellen mit R = A, G verläuft¹⁵⁰. Zusätzlich kann die Aktivität von DNAzymen durch die Anhebung des pH-Wertes sowie durch die Erhöhung der Magnesium-Konzentration gesteigert werden^{83, 164}.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Auswahl der potentiellen DNAzym-Spaltstellen Untersuchungsergebnisse berücksichtigt, bei denen verschiedene humane stat6-Spleißvarianten mit negativen regulatorischen Eigenschaften nachgewiesen werden¹⁶⁵. Ursache dieser negativen regulatorischen Eigenschaften ist eine Deletion im Sequenzbereich von 1765 - 1863 bp innerhalb von SH₂-Domänen, die eine Dimeren-Bildung des STAT6-Moleküles verhindert und somit zur Entstehung eines inaktiven Moleküls führt. Durch die Lokalisation von DNAzym-Spaltstellen im Bereich der deletierten Sequenz wird einerseits eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen positiv- und negativ-regulatorischer Variante, andererseits die Inhibition der positiv regulatorischen Variante angenommen. Aufgrund der großen Homologie menschlicher und muriner Gene kann davon ausgegangen werden, daß diese Spleißvariante auf Proteinebene auch für murines stat6 wahrscheinlich ist.

5.7 DNAzym-Applikation

Unmodifizierte 10-23 DNAzyme besitzen wesentlich längere Halbwertszeiten (ca. 2 h) als vergleichbare Ribozyme (wenige Minuten). Die Resistenz gegenüber der Aktivität von Nukleasen kann zusätzlich durch das Hinzufügen einer invertierten Base an das 3'-Ende gesteigert werden ⁹². Darüber hinaus sind 2'-O-methyl-Modifizierungen an den Bindungsarmen sowie des katalytischen Kernes beschrieben worden, die zu einer verstärkten Substrataffinität führen und auf diesem Weg die Aktivität von DNAzymen erhöhen können ¹⁶⁶.

5.8 Identifizierung potentieller DNAzym-Spaltstellen

Als eine neue, zeitsparende Möglichkeit zur RNA-Spaltstellenselektion wird durch Cairns et al. ein Multiplex-Ansatz vorgestellt ¹⁵⁰. Dieser erlaubt die gleichzeitige Untersuchung einer Vielzahl potentieller Spaltstellen und ist weitestgehend unabhängig von der Transkriptgröße. Auf dem E6/E7-Transkript des humanen Papilloma-Virus 16 testen Cairns et al. insgesamt 80 verschiedene DNAzym-Spaltstellen und finden 13 DNAzyme, die unter *in-vitro*-Bedingungen aktiv sind. Weitere Untersuchungen von 60 DNAzym-Spaltstellen auf dem c-myc-Transkript der Ratte belegen, daß die im Multiplex-Assay aktivsten DNAzyme auch die höchsten Aktivitäten *in-vitro* sowie in glatten Muskelzellen der Ratte aufweisen. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur *in-vitro*-Aktivität mstat6-spezifischer DNAzyme zeigen vergleichbare Ergebnisse. Die über den Multiplex-Aktivitäts-Assay identifizierten acht aktiven DNAzyme sind auch unter *in-vitro*-Bedingungen über einen Zeitraum von bis zu 60 min aktiv. Da zum Zeitpunkt des Abschlusses der *in-vitro*-Untersuchungen mstat6-spezifischer DNAzyme keine Ergebnisse in Zellen vorlagen, wird darauf nicht weiter eingegangen.

5.9 Zusammenfassung

Die komplexe Pathogenese allergischer Erkrankungen und des Asthma bronchiale macht die Entwicklung neuer Therapieansätze notwendig. Von grundlegender pathophysiologischer Bedeutung für die Entstehung allergischer Erkrankungen sind die Zytokine IL-4 und IL-13. In der IL-4- und IL-13-vermittelten Signaltransduktion nimmt der Transkriptionsfaktor STAT6 eine zentrale Stellung ein. Untersuchungen an stat6-knockout-Mäusen zeigen, daß stat6 für die Ausprägung des allergischen Phänotypes wesentlich ist. Mit der Anwendung von Ribozymen und DNAzymen wird eine therapeutische Strategie auf Nukleinsäure-Basis zur spezifischen Spaltung der mRNA des Transkriptionsfaktors stat6 der Maus verfolgt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mstat6-spezifischen Ribozyme besitzen eine GUC-Konsensussequenz und 6 nt lange Bindungsarme. Potentielle Ribozym-Spaltstellen werden auf der Grundlage von Sekundärstrukturberechnungen der mstat6-RNA identifiziert und liegen in einzelsträngigen Loop-Strukturen. Für eine stabile Expression werden die für die Ribozyme kodierenden Oligonucleotide in die Expressionskassette pGvaL kloniert. Insgesamt finden drei mstat6-spezifische Ribozyme Verwendung, deren Aktivität unter zellfreien Bedingungen getestet wird. Alle drei untersuchten Ribozyme sind *in-vitro* nicht aktiv.

Unter Verwendung eines Multiplex-Aktivitäts-Assays wird auf der RNA des stat6 der Maus ein Screening nach zugänglichen DNAzym-Spaltstellen vorgenommen. Die dafür eingesetzten DNAzyme haben eine RU-Konsensussequenz (R = A, G) und besitzen Bindungsarme mit einer Länge von jeweils 9 nt. Für die Lokalisation der Bindungsstellen ist die thermodynamische Stabilität ΔG_0 der DNAzym-Substrat-Heteroduplex entscheidend. Die reziproke Korrelation von DNAzym-Aktivität und ΔG_0 führt zur Auswahl von 41 DNAzym-Spaltstellen mit einem ΔG_0 von jeweils ≤ -25 kcal/mol im Sequenzbereich von 150 - 600 bp sowie von 1,7 - 2 kb. Für die Auswahl des Sequenzbereiches 1,7 - 2 kb ist die Beschreibung von humanen stat6-Spleißvarianten von Bedeutung, da sie auf einer Deletion im Sequenzbereich von 1765 - 1863 bp beruhen. Von den 41 im Multiplex-Aktivitäts-Assay getesteten DNAzymen weisen acht DNAzyme eine Spaltungsaktivität auf. Die Testung aller acht DNAzyme in einem zellfreien System ergibt, daß sie über einen Zeitraum von 60 min aktiv sind. In weiterführenden Experimenten wird zu prüfen sein, ob die unter zellfreien Bedingungen aktiven DNAzyme auch in Zellkulturen sowie allergischen Mausmodellen wirksam sind.

6 Quellen

1. Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):B2-4.
2. Prausnitz C, Küstner H. Studien über die Überempfindlichkeit. *Int J Med Microbiol* 1921; 86(160).
3. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol* 1966; 97(6):840-53.
4. Johansson SG. Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. *Lancet* 1967; 2(7523):951-3.
5. Von Pirquet C. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 1906; 30:1457-1458.
6. Coca AE, Cooke RA. *J Immunol* 1923; 8:163-82.
7. Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):B5-11.
8. Rivera RA. Gastroscopic observations during anaphylaxis in a human. *Gastrointest Endosc* 1972; 19(1):21-2.
9. Lemanske RF, Jr., Busse WW. 6. Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2 Suppl):S502-19.
10. Spezialbericht Allergien. Stuttgart:Metzler Poeschel ed: Statistisches Bundesamt, 1998.
11. Nowak D, Volmer T, Wettengel R. [Bronchial asthma--a cost of illness analysis]. *Pneumologie* 1996; 50(5):364-71.
12. Smith DH, Malone DC, Lawson KA, et al. A national estimate of the economic costs of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(3 Pt 1):787-93.
13. Hartert TV, Peebles RS, Jr. Epidemiology of asthma: the year in review. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6(1):4-9.
14. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998; 351(9111):1225-32.
15. Heinrich J, Richter K, Frye C, et al. [European Community Respiratory Health Survey in Adults (ECRHS)]. *Pneumologie* 2002; 56(5):297-303.
16. Asher MI, Keil U, Anderson HR, et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J* 1995; 8(3):483-91.
17. Heinrich J, Hoelscher B, Frye C, et al. Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *Eur Respir J* 2002; 19(6):1040-6.
18. Ring JH. *Weißbuch Allergie in Deutschland 2000. Grundlagen und Epidemiologie, allergische Krankheitsbilder, Diagnostik, Prävention, Rehabilitation, Versorgungsstrukturen, sozioökonomische Bedeutung.* Urban & Vogel Verlag, ISBN: 3899351827 2004.
19. Peat JK, Tovey E, Toelle BG, et al. House dust mite allergens. A major risk factor for childhood asthma in Australia. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(1):141-6.
20. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, et al. No further increase in asthma, hay fever and atopic sensitisation in adolescents living in Switzerland. *Eur Respir J* 2004; 23(3):407-13.
21. Verlato G, Corsico A, Villani S, et al. Is the prevalence of adult asthma and allergic rhinitis still increasing? Results of an Italian study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(6):1232-8.
22. Larrick JW, Buckley CE, 3rd, Machamer CE, et al. Does hyperimmunoglobulinemia-E protect tropical populations from allergic disease? *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71(2):184-8.
23. Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996; 347(9018):1792-6.

24. Ring J, Eberlein-Koenig B, Behrendt H. Environmental pollution and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 87(6 Suppl 3):2-6.
25. Sepp E, Julge K, Vasar M, et al. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr* 1997; 86(9):956-61.
26. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(3):342-6.
27. Ring J, Kramer U, Schafer T, Behrendt H. Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol* 2001; 13(6):701-8.
28. Moffatt MF, Cookson WO. The genetics of specific allergy. *Monogr Allergy* 1996; 33:71-96.
29. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002; 418(6896):426-30.
30. McIntire JJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 25(3-4):335-48.
31. Drazen JM, Yandava CN, Dube L, et al. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nat Genet* 1999; 22(2):168-70.
32. Tamura K, Arakawa H, Suzuki M, et al. Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(10):1509-14.
33. Hoffjan S, Ostrovnaja I, Nicolae D, et al. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(3):511-8.
34. von Mutius E, Fritzschn C, Weiland SK, et al. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ* 1992; 305(6866):1395-9.
35. von Mutius E, Martinez FD, Fritzschn C, et al. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(2 Pt 1):358-64.
36. Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H, Saxon A. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest* 1994; 94(4):1417-25.
37. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 1997; 158(5):2406-13.
38. von Mutius E, Martinez FD, Fritzschn C, et al. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 1994; 308(6930):692-5.
39. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, et al. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(2):187-93.
40. Martinez FD, Holt PG. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999; 354 Suppl 2:SIII2-5.
41. Dold S, Reitmeir P, Wjst M, von Mutius E. [Effects of passive smoking on the pediatric respiratory tract]. *Monatsschr Kinderheilkd* 1992; 140(10):763-8.
42. Ehrlich RI, Du Toit D, Jordaan E, et al. Risk factors for childhood asthma and wheezing. Importance of maternal and household smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(3 Pt 1):681-8.
43. Toren K, Hermansson BA. Incidence rate of adult-onset asthma in relation to age, sex, atopy and smoking: a Swedish population-based study of 15813 adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(3):192-7.
44. von Mutius E, Illi S, Hirsch T, et al. Frequency of infections and risk of asthma, atopy and airway hyperresponsiveness in children. *Eur Respir J* 1999; 14(1):4-11.

45. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326(5):298-304.
46. Walker C, Bode E, Boer L, et al. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146(1):109-15.
47. Mullings RE, Wilson SJ, Puddicombe SM, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(5):832-8.
48. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7):2348-57.
49. Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 1994; 266(5187):1045-7.
50. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):B12-7.
51. Ouyang W, Lohning M, Gao Z, et al. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 2000; 12(1):27-37.
52. Ho IC, Lo D, Glimcher LH. c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* 1998; 188(10):1859-66.
53. Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(3):480-7; quiz 488.
54. Qiu J, Li GP, Liu ZG, et al. DNA vaccine encoding Der p2 allergen down-regulates STAT6 expression in mouse model of allergen-induced allergic airway inflammation. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119(3):185-90.
55. Wills-Karp M. Interleukin-12 as a target for modulation of the inflammatory response in asthma. *Allergy* 1998; 53(2):113-9.
56. Sur S, Wild JS, Choudhury BK, et al. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1999; 162(10):6284-93.
57. Borish LC, Nelson HS, Corren J, et al. Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(6):963-70.
58. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; 356(9248):2144-8.
59. Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* 2001; 2(2):66-70.
60. Milgrom H, Fick RB, Jr., Su JQ, et al. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341(26):1966-73.
61. Wang LH, Yang XY, Kirken RA, et al. Targeted disruption of stat6 DNA binding activity by an oligonucleotide decoy blocks IL-4-driven T(H)2 cell response. *Blood* 2000; 95(4):1249-57.
62. Hill S, Herlaar E, Le Cardinal A, et al. Homologous human and murine antisense oligonucleotides targeting stat6. Functional effects on germline cepsilon transcript. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21(6):728-37.
63. Danahay H, Hill S, Natt F, Owen CE. The in vitro and in vivo pharmacology of antisense oligonucleotides targeted to murine Stat6. *Inflamm Res* 2000; 49(12):692-9.
64. Sel S, Henke W, Dietrich A, et al. Treatment of allergic asthma by targeting transcription factors using nucleic-acid based technologies. *Curr Pharm Des* 2006; 12(25):3293-304.

65. Popescu FD. New asthma drugs acting on gene expression. *J Cell Mol Med* 2003; 7(4):475-86.
66. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411(6836):494-8.
67. Dahm SC, Uhlenbeck OC. Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* 1991; 30(39):9464-9.
68. Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 1981; 27(3 Pt 2):487-96.
69. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, et al. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 1983; 35(3 Pt 2):849-57.
70. Wu HN, Lin YJ, Lin FP, et al. Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(6):1831-5.
71. Saville BJ, Collins RA. A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria. *Cell* 1990; 61(4):685-96.
72. Haseloff J, Gerlach WL. Sequences required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Gene* 1989; 82(1):43-52.
73. Hutchins CJ, Rathjen PD, Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res* 1986; 14(9):3627-40.
74. Kore AR, Vaish NK, Kutzke U, Eckstein F. Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(18):4116-20.
75. Takagi Y, Warashina M, Stec WJ, et al. Recent advances in the elucidation of the mechanisms of action of ribozymes. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):1815-34.
76. Welch PJ, Tritz R, Yei S, et al. Intracellular application of hairpin ribozyme genes against hepatitis B virus. *Gene Ther* 1997; 4(7):736-43.
77. Cordelier P, Kulkowsky JW, Ko C, et al. Protecting from R5-tropic HIV: individual and combined effectiveness of a hammerhead ribozyme and a single-chain Fv antibody that targets CCR5. *Gene Ther* 2004; 11(22):1627-37.
78. Morris KV, Rossi JJ. Anti-HIV-1 gene expressing lentiviral vectors as an adjunctive therapy for HIV-1 infection. *Curr HIV Res* 2004; 2(2):185-91.
79. Hotchkiss G, Maijgren-Steffensson C, Ahrlund-Richter L. Efficacy and mode of action of hammerhead and hairpin ribozymes against various HIV-1 target sites. *Mol Ther* 2004; 10(1):172-80.
80. Shin KS, Sullenger BA, Lee SW. Ribozyme-mediated induction of apoptosis in human cancer cells by targeted repair of mutant p53 RNA. *Mol Ther* 2004; 10(2):365-72.
81. Parry TJ, Cushman C, Gallegos AM, et al. Bioactivity of anti-angiogenic ribozymes targeting Flt-1 and KDR mRNA. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(13):2569-77.
82. Breaker RR, Joyce GF. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol* 1994; 1(4):223-9.
83. Santoro SW, Joyce GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(9):4262-6.
84. Kurreck J, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA. Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. *J Biol Chem* 2002; 277(9):7099-107.
85. Zhang X, Xu Y, Ling H, Hattori T. Inhibition of infection of incoming HIV-1 virus by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett* 1999; 458(2):151-6.
86. Wu Y, Yu L, McMahon R, et al. Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Hum Gene Ther* 1999; 10(17):2847-57.
87. Lu ZX, Ye M, Yan GR, et al. Effect of EBV LMP1 targeted DNAzymes on cell proliferation and apoptosis. *Cancer Gene Ther* 2005; 12(7):647-54.

88. Warashina M, Kuwabara T, Taira K. Comparison of activities between hammerhead ribozymes and DNA enzymes targeted to L6 BCR-ABL chimeric (b2a2) mRNA. *Nucleic Acids Symp Ser* 1997(37):213-4.
89. Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, et al. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med* 2003; 9(8):1026-32.
90. Khachigian LM, Fahmy RG, Zhang G, et al. c-Jun regulates vascular smooth muscle cell growth and neointima formation after arterial injury. Inhibition by a novel DNA enzyme targeting c-Jun. *J Biol Chem* 2002; 277(25):22985-91.
91. Lowe HC, Chesterman CN, Khachigian LM. Catalytic antisense DNA molecules targeting Egr-1 inhibit neointima formation following permanent ligation of rat common carotid arteries. *Thromb Haemost* 2002; 87(1):134-40.
92. Iversen PO, Emanuel PD, Sioud M. Targeting Raf-1 gene expression by a DNA enzyme inhibits juvenile myelomonocytic leukemia cell growth. *Blood* 2002; 99(11):4147-53.
93. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12):5463-7.
94. Zuker M. Computer prediction of RNA structure. *Methods Enzymol* 1989; 180:262-88.
95. Zuker M. Prediction of RNA secondary structure by energy minimization. *Methods Mol Biol* 1994; 25:267-94.
96. Lieber A, Strauss M. Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library. *Mol Cell Biol* 1995; 15(1):540-51.
97. Gavett SH, O'Hearn DJ, Karp CL, et al. Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am J Physiol* 1997; 272(2 Pt 1):L253-61.
98. Finkelman FD, Katona IM, Urban JF, Jr., et al. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol* 1988; 141(7):2335-41.
99. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, et al. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J Clin Invest* 1998; 101(10):2129-39.
100. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, et al. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest* 1997; 99(7):1492-9.
101. Moser R, Fehr J, Bruijnzeel PL. IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol* 1992; 149(4):1432-8.
102. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999; 103(6):779-88.
103. Kips JC, Brusselle GG, Joos GF, et al. Importance of interleukin-4 and interleukin-12 in allergen-induced airway changes in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107(1-3):115-8.
104. Leal LM, Moss DW, Kuhn R, et al. Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 1993; 23(2):566-9.
105. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(8):3730-4.
106. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 1994; 15(1):19-26.
107. Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, et al. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J Immunol* 1995; 154(2):799-803.
108. de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(2):165-9.

109. McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, et al. Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity* 1998; 9(3):423-32.
110. Zurawski SM, Vega F, Jr., Huyghe B, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *Embo J* 1993; 12(7):2663-70.
111. Keegan AD, Beckmann MP, Park LS, Paul WE. The IL-4 receptor: biochemical characterization of IL-4-binding molecules in a T cell line expressing large numbers of receptors. *J Immunol* 1991; 146(7):2272-9.
112. Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(4):677-90; quiz 691.
113. Andrews AL, Nasir T, Bucchieri F, et al. IL-13 receptor alpha 2: a regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(4):858-65.
114. Zhang JG, Hilton DJ, Willson TA, et al. Identification, purification, and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. Evidence that it is distinct from the cloned IL-13 receptor and IL-4 receptor alpha-chains. *J Biol Chem* 1997; 272(14):9474-80.
115. Kaplan MH, Grusby MJ. Regulation of T helper cell differentiation by STAT molecules. *J Leukoc Biol* 1998; 64(1):2-5.
116. Akimoto T, Numata F, Tamura M, et al. Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice. *J Exp Med* 1998; 187(9):1537-42.
117. Kuperman D, Schofield B, Wills-Karp M, Grusby MJ. Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med* 1998; 187(6):939-48.
118. Miyata S, Matsuyama T, Kodama T, et al. STAT6 deficiency in a mouse model of allergen-induced airways inflammation abolishes eosinophilia but induces infiltration of CD8+ T cells. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(1):114-23.
119. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 2002; 8(8):885-9.
120. Schnyder B, Schnyder-Candrian S, Panski A, et al. Phytochemical inhibition of interleukin-4-activated Stat6 and expression of VCAM-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292(4):841-7.
121. Perez GM, Melo M, Keegan AD, Zamorano J. Aspirin and salicylates inhibit the IL-4- and IL-13-induced activation of STAT6. *J Immunol* 2002; 168(3):1428-34.
122. Stolzenberger S, Haake M, Duschl A. Specific inhibition of interleukin-4-dependent Stat6 activation by an intracellularly delivered peptide. *Eur J Biochem* 2001; 268(17):4809-14.
123. Stutz AM, Hoeck J, Natt F, et al. Inhibition of interleukin-4- and CD40-induced IgE germline gene promoter activity by 2'-aminoethoxy-modified triplex-forming oligonucleotides. *J Biol Chem* 2001; 276(15):11759-65.
124. Sumi K, Yokozeki H, Wu MH, et al. In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther* 2004; 11(24):1763-71.
125. Yokozeki H, Wu MH, Sumi K, et al. In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther* 2004; 11(24):1753-62.
126. Perriman R, Delves A, Gerlach WL. Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme. *Gene* 1992; 113(2):157-63.

127. Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, et al. Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol Rev* 2000; 52(3):325-47.
128. Zhao JJ, Lemke G. Rules for ribozymes. *Mol Cell Neurosci* 1998; 11(1-2):92-7.
129. Hertel KJ, Herschlag D, Uhlenbeck OC. Specificity of hammerhead ribozyme cleavage. *Embo J* 1996; 15(14):3751-7.
130. Nylandsted J, Rohde M, Bartek J, Strauss M. Expression of a p16INK4a-specific ribozyme downmodulates p16INK4a abundance and accelerates cell proliferation. *FEBS Lett* 1998; 436(1):41-5.
131. Scherr M, Reed M, Huang CF, et al. Oligonucleotide scanning of native mRNAs in extracts predicts intracellular ribozyme efficiency: ribozyme-mediated reduction of the murine DNA methyltransferase. *Mol Ther* 2000; 2(1):26-38.
132. Amarzguioui M, Prydz H. Hammerhead ribozyme design and application. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54(11):1175-202.
133. Vickers TA, Wyatt JR, Freier SM. Effects of RNA secondary structure on cellular antisense activity. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(6):1340-7.
134. Gaughan DJ, Whitehead AS. Function and biological applications of catalytic nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1445(1):1-20.
135. Bertrand E, Pictet R, Grange T. Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function? *Nucleic Acids Res* 1994; 22(3):293-300.
136. Xing Z, Whitton JL. Ribozymes which cleave arenavirus RNAs: identification of susceptible target sites and inhibition by target site secondary structure. *J Virol* 1992; 66(3):1361-9.
137. Sakamoto N, Wu CH, Wu GY. Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J Clin Invest* 1996; 98(12):2720-8.
138. Lieber A, He CY, Polyak SJ, et al. Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol* 1996; 70(12):8782-91.
139. Liu R, Li W, Karin NJ, et al. Ribozyme ablation demonstrates that the cardiac subtype of the voltage-sensitive calcium channel is the molecular transducer of 1, 25-dihydroxyvitamin D(3)-stimulated calcium influx in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2000; 275(12):8711-8.
140. Grassi G, Grassi M, Platz J, et al. Selection and characterization of active hammerhead ribozymes targeted against cyclin E and E2F1 full-length mRNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; 11(5):271-87.
141. Dropulic B, Jeang KT. Intracellular susceptibility to ribozymes in a tethered substrate-ribozyme provirus model is not predicted by secondary structures of human immunodeficiency virus type 1 RNAs in vitro. *Antisense Res Dev* 1994; 4(3):217-21.
142. Amarzguioui M, Brede G, Babaie E, et al. Secondary structure prediction and in vitro accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(21):4113-24.
143. Birikh KR, Berlin YA, Soreq H, Eckstein F. Probing accessible sites for ribozymes on human acetylcholinesterase RNA. *Rna* 1997; 3(4):429-37.
144. Birikh KR, Heaton PA, Eckstein F. The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur J Biochem* 1997; 245(1):1-16.
145. Jarvis TC, Wincott FE, Alby LJ, et al. Optimizing the cell efficacy of synthetic ribozymes. Site selection and chemical modifications of ribozymes targeting the proto-oncogene c-myc. *J Biol Chem* 1996; 271(46):29107-12.

146. Scherr M, Rossi JJ, Sczakiel G, Patzel V. RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(13):2455-61.
147. Kronenwett R, Haas R, Sczakiel G. Kinetic selectivity of complementary nucleic acids: bcr-abl-directed antisense RNA and ribozymes. *J Mol Biol* 1996; 259(4):632-44.
148. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990; 346(6287):818-22.
149. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; 249(4968):505-10.
150. Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, et al. Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. *Nat Biotechnol* 1999; 17(5):480-6.
151. Heidenreich O, Benseler F, Fahrenholz A, Eckstein F. High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates. *J Biol Chem* 1994; 269(3):2131-8.
152. Beigelman L, McSwiggen JA, Draper KG, et al. Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance. *J Biol Chem* 1995; 270(43):25702-8.
153. Usman N, Blatt LM. Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics. *J Clin Invest* 2000; 106(10):1197-202.
154. Bramlage B, Luzi E, Eckstein F. Designing ribozymes for the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol* 1998; 16(10):434-8.
155. Aigner A, Fischer D, Merdan T, et al. Delivery of unmodified bioactive ribozymes by an RNA-stabilizing polyethylenimine (LMW-PEI) efficiently down-regulates gene expression. *Gene Ther* 2002; 9(24):1700-7.
156. Shiota M, Sano M, Miyagishi M, Taira K. Ribozymes: applications to functional analysis and gene discovery. *J Biochem (Tokyo)* 2004; 136(2):133-47.
157. Michienzi A, Prislei S, Bozzoni I. U1 small nuclear RNA chimeric ribozymes with substrate specificity for the Rev pre-mRNA of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(14):7219-24.
158. Kuwabara T, Warashina M, Nakayama A, et al. tRNA^{Val}-heterodimeric maxizymes with high potential as gene-inactivating agents: simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 Tat mRNA in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(5):1886-91.
159. Vaish NK, Kore AR, Eckstein F. Recent developments in the hammerhead ribozyme field. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(23):5237-42.
160. Lieber A, Kay MA. Adenovirus-mediated expression of ribozymes in mice. *J Virol* 1996; 70(5):3153-8.
161. Sugimoto N, Nakano S, Kato M, et al. Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry* 1995; 34(35):11211-6.
162. Sun LQ, Cairns MJ, Gerlach WL, et al. Suppression of smooth muscle cell proliferation by a c-myc RNA-cleaving deoxyribozyme. *J Biol Chem* 1999; 274(24):17236-41.
163. Santoro SW, Joyce GF. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry* 1998; 37(38):13330-42.
164. Dash BC, Harikrishnan TA, Goila R, et al. Targeted cleavage of HIV-1 envelope gene by a DNA enzyme and inhibition of HIV-1 envelope-CD4 mediated cell fusion. *FEBS Lett* 1998; 431(3):395-9.
165. Patel BK, Pierce JH, LaRochelle WJ. Regulation of interleukin 4-mediated signaling by naturally occurring dominant negative and attenuated forms of human Stat6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(1):172-7.
166. Sioud M, Leirdal M. Therapeutic RNA and DNA enzymes. *Biochem Pharmacol* 2000; 60(8):1023-6.

7 **Legende**

- Abbildung 1. Zelluläre Zusammenhänge in der Pathogenese des Asthma bronchiale.
- Abbildung 2. Aktivierung IL-4-abhängiger Gene in Th-2-Zellen.
- Abbildung 3. Struktur des Hammerhead-Ribozyms.
- Abbildung 4. Schematische Darstellung der Ribozym-vermittelten Spaltung einer Phosphodiester-Bindung.
- Abbildung 5. Das 10-23 DNAzym.
- Abbildung 6. Sekundärstruktur-Vorhersage der mRNA des Transkriptionsfaktors stat6 der Maus.
- Abbildung 7. Ausschnitt aus der unter Verwendung von MFold berechneten Sekundärstruktur des mstat6-Transkriptes im Bereich von GUC-284 und GUC-311.
- Abbildung 8. Die über MFold ermittelte Sekundärstruktur des mstat6-Transkriptes im Bereich von GUC-2354.
- Abbildung 9. Struktur und Bindungsarme mstat6-spezifischer Ribozyme mit GUC-Konsensussequenz.
- Abbildung 10. Aufbau der Ribozym-Expressionskassette pGvaL.
- Abbildung 11. Restriktionsverdau von pGvaL-Plasmiden mit Xba I und Nhe.
- Abbildung 12. Ribozym-spezifische PCR mit dem Rz-Primer und dem T7-Primer.
- Abbildung 13. Repräsentatives Ergebnis der Sequenzierung des Plasmids Rz-311-pGvaL.
- Abbildung 14. Insertionsstellen von EcoR I und Xho I im Plasmid pB II KS (+).
- Abbildung 15. Restriktionsverdau von pB-mstat6 mit Xho I und EcoR I.
- Abbildung 16. mstat6-spezifische PCR von pB-mstat6 mit den Primern Stat6-S/Stat6-A und ST6/Stat6-A.
- Abbildung 17. RNA-Gelelektrophorese nach Ribozym-Präparation und mstat6-RNA-Präparation.
- Abbildung 18. Ribozym-Einzel-Aktivitäts-Assay unter Verwendung von 1µM mstat6-mRNA und jeweils 10 mM Rz-284-RNA, Rz-311-RNA bzw. Rz-2354-RNA.
- Abbildung 19. Prinzip des Multiplex-Aktivitäts-Assays.
- Abbildung 20. Repräsentatives Beispiel der Fragmentlängenanalyse der Produkte des Multiplex-Aktivitäts-Assays.

- Abbildung 21. RNA-Agarose-Gelelektrophorese nach Inkubation von mstat6-RNA (25 μ M) mit je 5 μ M DNAzymen.
- Abbildung 22. RNA-Agarose-Gelelektrophorese nach Inkubation von mstat6-RNA (25 nM) mit je 5 μ M Dz-3, Dz-17 und Dz-24.
- Abbildung 23. Die in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale über stat6 vermittelten biologischen Wirkungen von IL-4 und IL-13.
- Tabelle 1. Sequenzen der verwendeten Ribozym-kodierenden Oligonukleotide.
- Tabelle 2. Verwendete Primer zur Amplifikation von Ribozymen bzw. mstat6.
- Tabelle 3. Bezeichnung der Ribozym-exprimierenden Plasmide.
- Tabelle 4. Zur asymmetrischen PCR verwendete Primer.
- Tabelle 5. Die für die RT-Reaktion verwendeten Primer.
- Tabelle 6. Produktgrößen, Spaltpositionen und freie Hybridisierungsenergien von 21 DNAzym-Bindungsstellen auf dem Transkript des stat6 der Maus im Bereich von 1,7 - 2 kb.
- Tabelle 7. Produktgrößen, Spaltpositionen und freie Hybridisierungsenergien von 20 DNAzym-Bindungsstellen auf dem Transkript des stat6 der Maus im Bereich von 150 – 600 bp.

Erklärung

„Ich, Arwed Hostmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Entwicklung einer therapeutischen Strategie bei Allergie und Asthma unter Einsatz von Ribozymen und DNAzymen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 25.09.2007

Arwed Hostmann

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“