Ribozyme zur Genregulation in *Aspergillus giganteus*

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Dirk Müller
aus Holzminden

Von der Fakultät für Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurswissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. U. Szewzyk
Berichter: Prof. Dr.-Ing. Ulf Stahl
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Johannes Wöstemeyer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache:
17.12.2004

Berlin 2004
D83

Ich widme diese Arbeit meinem Großvater, Herrn Wilhelm Müller, in Angedenken an sein ereignisreiches Leben und sein gütiges Wesen

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie, Fachgebiet für Mikrobiologie und Genetik, an der Technischen Universität Berlin angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulf Stahl für die wissenschaftliche Betreuung der vorliegenden Arbeit. Sein stetes Interesse an der Entwicklung der Arbeit sowie die ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Johannes Wöstemeyer möchte ich für die Übernahme des Gutachtens dieser Arbeit danken.

Besonderer Dank Herrn Dr. Markus Wedde, unter dessen Anleitung ich diese Arbeit begonnen habe und Frau Dr. Vera Meyer, die die Leitung der Aspergillus-Arbeitsgruppe von Herrn Wedde übernommen hat. Beide haben mir als direkte Ansprechpartner in wissenschaftlichen Fragen hilfreich zur Seite gestanden und mich tatkräftig unterstützt. Viele anregende Diskussionen verdanke ich den Mitgliedern der Aspergillus-Arbeitsgruppe, Herrn Dr. Torsten Theis, Frau Dr. Heike Röhr, Frau Silke Hagen sowie Frau Anja Spielvogel. Vor allem bei unserem RNA-Spezialisten, Herrn Dr. Udo Schmidt, bedanke ich mich für wertvolle Hinweise, Informationen und Gespräche in Sachen RNA. Besonderer Dank gebührt insbesondere Herrn Dr. Thomas Polakowski für stete Motivation und wertvolle kritische Anregungen.
Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Mitarbeiter/innen, Frau Marion Janczikowski, Herrn Gunnar Köhler und Frau Barbara Walewska für ihr Interesse an dieser Arbeit und ihr Engagement bei der praktischen Durchführung vieler Versuche. Es hat mir sehr viel Freude bereitet, mit ihnen zusammenzuarbeiten.

Frau D. Vera Meyer, Frau Dr. Heike Röhr, Herrn Dr. Thomas Polakowski und Herrn Dr. Udo Schmidt danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Den Mitarbeiter/innen des Fachgebietes für Mikrobiologie und Genetik danke ich für die freundliche und kooperative Zusammenarbeit. Insbesondere Frau Rita Waggad möchte ich danken, so manche Ausnahme vom „Spülküchenalltag“ machte, um meine Versuchplanungen zu ermöglichen.

Großer Dank gebührt meinen Eltern, meinem Bruder Thorsten, meiner Freundin Silke und meinen Freunden, auf deren Verständnis, Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

Dirk Müller

Literaturverzeichnis

Abkürzungen I
Abbildungsverzeichnis II
Tabellenverzeichnis IV

1 RNA-basierte Methoden zur Beeinflussung der Genexpression 1
1.1 Antisense RNA 1
1.2 Ribozyme 5
1.2.1 Kleine Ribozyme 6
1.2.2 Große Ribozyme 7
1.3 Ribozyme als molekularbiologische Werkzeuge 9
1.3.1 Das Hammerhead Ribozym 10
1.3.2 Die katalytischen Eigenschaften des Hammerhead Ribozyms 12
1.3.3 Das katalytische Zentrum des Hammerhead Ribozyms 15
1.3.4 Helix I und Helix III 17
1.3.5 Helix II 17
1.4 Anwendung der Ribozymtechnologie 18
1.5 RNA Interference (RNAi) 20
1.6 Fazit 24
2 Aufgabenstellung 27
2.1 Expressionsanalyse mit Hilfe des Reporters ß-Glukuronidase 29
2.2 Ansprüche an das *in vivo* Ribozymsystem 29
3 Material und Methoden 32
3.1 Geräte 32
3.2 Anzuchtmedien, Puffer und Lösungen 32
3.3 Enzyme, Chemikalien und Kits 34
3.4 Stämme 34
3.5 Plasmide 35
3.6 Oligonukleotide 36
3.7 Methoden 37
3.7.1 Anzucht von *E. coli*, *A. giganteus* und *A. nidulans* 37
3.7.2 Transformationsmethoden 37
3.7.3 Konstruktion der Plasmide 38
3.7.4 DNA Methoden 39
3.7.5 RNA Methoden 40
3.7.6 PCR Methoden 41
3.7.7 Aufreinigung von PCR Produkten 42
3.7.8 Gelelektrophorese 42
3.7.9 Northern und Southern Analyse 42
3.7.10 GUS Extraktion und GUS Assay 43
4 Ergebnisse 44
4.1 *In silico* Analyse der uidA mRNA 44
4.2 *In vitro* Analyse der Ribozyme 50
4.2.1 *In vitro* Ribozym Assay mit *uidA* Substraten 51
4.2.1.1 Ribozym Assay mit dem Substrat SUB1-1short 52
4.2.1.2 Ribozym Assay mit Substrat SUB1-1med 58
4.2.3.3 Ribozym Assay mit Substrat SUB1-1 long 59
4.2.1.4 Zusammenfassung der *in vitro* Ribozym Assays 60
4.3 *In vivo* Analyse der Ribozyme 61
4.3.1 Ribozymplasmide für die Transformation von *A. giganteus* 0903 62

4.3.1.1 Evaluierung und Optimierung des *alcA* Promotors für die Steuerung der Transkription des *uidA* Gens in *A. giganteus* 0903 62
4.3.1.2 Der *pah4* Promotor zur Steuerung der Expression der β-Glukuronidase 64
4.3.1.3 Konstruktion der Plasmide pRxsym/asym und Transfer in *A. giganteus* 65
4.3.2 Protein Extraktion und GUS Assay von Ribozymtransformanten 66
4.3.3 Analyse der Integrationsereignisse in den Ribozym Transformanten 68
4.3.4 Analyse von Ribozym Transformanten auf Spaltprodukte der *in vivo* Ribozymreaktion 69
4.3.5 *In vitro* Analyse von Antisense-Konstrukten gegen die *uidA* mRNA 70
5 Diskussion 74
5.1 *In vitro* Restriktion von *uidA* Transkripten durch *in silico* entwickelte spezifische Ribozyme 75
5.2 Mutagenese des *alcA* Promotors aus *A. nidulans* 1711 78
5.3 Expression des *uidA* Gens durch den *pah4* Promotor aus *Podospora anserina* 79
5.4 Transformation von *A. giganteus* 0903 mit den Ribozymplasmiden 80
5.5 GUS-Assay mit Proteinextrakten der Ribozymtransformanten 81
5.6 Effizienz und Spezifität von Ribozymen mit symmetrischen und mit asymmetrischen bindenden Armen 82
5.7 Analyse der *in vivo* detektierten Reaktionsprodukte 83
5.8 Eignung der *in silico* Selektion für *in vivo* aktive Ribozyme 85
5.9 Schlussfolgerung und Ausblick 87
Zusammenfassung 89
6 Literaturverzeichnis 90

Anhang 102

Abkürzungen

A	Adenin
Abb	Abbildung
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Da	Dalton
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
dUTP	2´-Desoxy-Uridin-5´-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
GUS	ß-Glukuronidase
H	Cytosin, Adenin oder Uracil
IPTG	Isopropyl-1-thio-ß-D-Galactopyranosid
kb	Kilobasen
LNA	Locked nucleic acid
MUG	4-Methylumbelliferyl ß-D-Glukuronid
mRNA	messenger-RNA
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
nt	Nukleotide
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PNA	Peptide nucleic acid
pNPG	p-Nitrophenol ß-D-Glukuronid
R	Purin
RISC	Random induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer RNA
rz	Ribozym
siRNA	small interfering RNA
ssRNA	einzelsträngige RNA (single stranded RNA)
T	Thymin
Tab	Tabelle
U	Uracil
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indol ß-D-Glukuronid
Y	Pyrimidin

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Struktur eines DNA Oligonukleotid und des dazugehörigen PNA (Peptid Nukleinsäure) Analogon. 4
Abb. 2 Funktion des Ribozyms in der "rolling circle" Replikation viraler RNA. 7
Abb. 3 Schematische Darstellung des Selbstspleißens von Gruppe I und Gruppe II Introns.. .. 8
Abb. 4: Minimale Konsensus-Struktur des Hammerhead Ribozym 10
Abb. 5 Restriktion einer RNA durch das Hammerhead Ribozym in *cis* oder in *trans* 11
Abb. 6 Ribozym Zyklus. 12
Abb. 7 Spaltung der Phosphodiester Bindung durch das Hammerhead Ribozym 13
Abb. 8 Minimaler kinetischer Mechanismus der intermolekularen Katalyse durch das Hammerhead Ribozym 14
Abb. 9 Kinetischer Mechanismus Katalyse durch das Hammerhead Ribozym unter „single turnover" Bedingungen 14
Abb. 10: Darstellung Hammerhead Ribozym anhand der Kristallstruktur des Moleküls..... 16
Abb. 11 Schematische Darstellung des RNAi Mechanismus 22
Abb. 12 Zweidimensionale Struktur der *uidA* mRNA (1812 nt) berechnet mit RNADRAW. 45
Abb. 14 Zielsequenz der Ribozyme rz4 und rz5 in der *uidA* mRNA..... 48
Abb. 15 Zielsequenz des Ribozyms rz6 in der *uidA* mRNA..... 49
Abb. 16 Zielsequenz der Ribozyme rz7 und rz8 in der *uidA* mRNA..... 49
Abb. 17 Zielsequenz des Ribozyms rz9 in der *uidA* mRNA..... 50
Abb. 18 Zielsequenz des Ribozyms rz10 in der *uidA* mRNA..... 50
Abb. 19 Zeitreihe eines Ribozym Assays mit dem Substrat SUB1-1short und Ribozym rz4sym 53
Abb. 20 Ribozym Assay mit SUB1-1short und rz4sym 54
Abb. 21 Einfluss der Konzentration von rz4asym auf die Restriktion der radioaktiv markierten SUB1-1short RNA *in vitro* 55
Abb. 22 Zeitreihe des Ribozym Assay mit SUB1-1short und rz5sym..... 56
Abb. 23 Vergleich des Einflusses der Ribozymkonzentration auf den Umsatz des radioaktiv markierten Substrates SUB1-1short bei einer Inkubation von 30 min und 240 min 57
Abb. 24 Vergleich der Aktivität der Ribozyme rz4sym, rz4asym, rz5sym und rz5asym in einem Ribozym Assay mit dem Substrat SUB1-1short 58
Abb. 25 Ribozym Assay mit dem SUB1-1med 59
Abb. 26 Ribozym Assay mit dem RNA-Substrat SUB1-1long 60

Abb. 27 Vergleich der GUS Aktivität von *A. giganteus* Transformanten, die das Plasmid pHah4uidA bzw. pHNOM102 genomisch integriert haben 65
Abb. 28 Schematische Darstellung von Plasmid pR4asym 66
Abb. 29 Southern Analyse von *Aspergillus giganteus* Ribozym Transformanten mit einer PCR Sonde 69
Abb. 30 Northern Analyse von Spaltprodukten der *uidA* mRNA in *Aspergillus giganteus* Transformanten 70
Abb. 31 RNaseH Assay mit SUB1-1short und den synthetisierten aODN's 72
Abb. 32 RNaseH Assay und den synthetisierten aODN's 73
Abb. 33 RNaseH Assay mit SUB1-1long und den synthetisierten aODN's 74
Abb. 34 Auffaltung der RNA des Substrates SUB1-1short, berechnet mit dem Programm RNADRAW für eine Temperatur von 28 °C 77

Anhang

Abb. A1: Ribozyminsert für die Klonierung in Plasmid pRZx am Beispiel von Ribozym r4asym 102
Abb. A2: Konstruktion der Plasmide pRZx (z.B. pRZ4asym) für die *in vitro* Transkription sowie der Plasmide mit der Ribozym Expressionskassette pPRZTx, (z.B. pPRZT4asym) 102
Abb. A3: Konstruktion des Plasmids pSUB1-1 für die *in vitro* Transkription des *uidA* Gen 103
Abb. A4: Konstruktion des Plasmids pRx (z.B. pR4asym) für die Transformation von *A. giganteus* 104
Abb. A5: Klonierungsstrategie für das Plasmid pHAU2 105
Abb. A6 GUS hydrolysiert spezifisch ß-D-Glukuronide zu D-Glukuronsäure und Aglykon 106
Abb. A7 Bei dem Umsatz von X-Gluc entsteht der unlösliche Niederschlag di-Chlor-di-Bromindigo 106
Abb A8 Alignment der *alcA* Promotors der *A. nidulans* Stämme 1709 und 1711 108

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Beispiele kommerzieller Antisense-Produkte. 5
Tab. 2 Kleine Ribozyme sind an der viralen Replikation beteiligt und produzieren 2', 3'-zyklische Phosphate sowie ein 5'-OH. 6
Tab. 3 Große Ribozyme sind in zelluläre Prozesse involviert und werden zumeist als „housekeeping“ Ribozyme bezeichnet. 6
Tab. 4 *In silico* ausgewählte Schnittstellen für Ribozyme (rz) auf der *uidA* mRNA. 48
Tab. 5 Theoretisch berechnete Transkriptgrößen der verschiedenen Versionen des *uidA* Gens und der Ribozyme 51
Tab. 6 Theoretische berechnete Größen der Reaktionsprodukte für den *in vitro* Ribozym Assay mit den verschiedenen *uidA* Transkripten 52
Tab. 7 Vergleich der theoretisch erwarteten Produkte des Ribozym Assay mit den *uidA* Substraten mit den tatsächlich beobachteten Produkten 61
Tab. 8 Wachstum von *A. giganteus* transformiert mit pHAU2 64
Tab. 9 GUS Assay der Ribozym Transformanten 67
Tab. 10 Vergleich von theoretisch erwarteten mit den in einem RNase H Assay mit den drei *uidA* Substraten detektierten Produkten 71
Tab. 11 Vergleich der Ergebnisse der *in vitro* Ribozym Assays mit der maximal erreichten Reduktion der GUS-Aktivität in *A. giganteus* Ribozymtransformanten *in vivo*. 87

Anhang

Tab. A1 GUS Assay der Ribozymtransformanten. 106

1 RNA-basierte Methoden zur Beeinflussung der Genexpression

Etablierte gerichtete und ungerichtete Methoden zur Regulation der Genexpression haben gemeinsam, dass sie die DNA eines Organismus mutieren bzw. rekombinieren. Somit verändern sie zwangsweise irreversibel die genetische Identität eines Organismus. Ein solcher Eingriff ist in der Regel auf solche Gene bzw. Genorte beschränkt bleiben, die nicht essentiell für den Organismus sind.

In den letzten Jahren sind neue Techniken etabliert worden, die nicht die DNA sondern viel mehr die RNA zum Ziel haben. Diese RNA-Techniken erlauben die Genexpression derart zu steuern, dass noch ein minimaler Level an funktioneller mRNA vorhanden ist, so dass selbst essentielle Gene in ihrer Expression beeinflusst werden. Neben der Produktion von spezifischen Phänotypen ist damit auch die Analyse von Genfunktionen in bestimmten Entwicklungsphasen möglich.

Vorreiter unter den RNA-Methoden war die Antisense-Technik. Hier werden RNA-Moleküle in einer revers-komplementären Version zur Ziel-RNA eingesetzt, um so die Translation zu verhindern (Dias and Stein 2002). Mit der Entdeckung katalytisch aktiver RNA-Moleküle, den so genannten Ribozymen, sowie des RNAi-Mechanismus wurde eine Vielfalt neuer Möglichkeiten für den Einsatz von RNA-Techniken geschaffen. Neben der technologischen Bedeutung im „Metabolic Engineering“ bieten diese Techniken einen tiefen Einblick in die RNA-Chemie sowie in grundlegende evolutionäre Prozesse.

In den folgenden Kapiteln - soll ein Überblick über die Entwicklung und Anwendung von RNA-Techniken gegeben, sowie ihre Vor- und Nachteile erläutert werden.

1.1 Antisense RNA

Antisense-Oligonukleotide binden spezifisch an eine komplementäre mRNA. Antisense-Moleküle werden in einer Länge von 14 bis zu mehreren hundert Nukleotiden eingesetzt. Je kleiner das Antisense-Molekül ist, desto geringer ist die thermodynamische Stabilität des Hybrides und damit auch die Spezifität der Bindung, wobei diese durch die Anzahl der hybridisierenden Nukleotide bestimmt wird. Die Sequenz eines Antisense-Moleküls mit einer Größe von 8 Nukleotiden wiederholt sich durchschnittlich alle 55 kb in einem Genom. Das humane Genom hat eine Größe von ca. 2.900.000 kb (Venter et al. 2001), damit sind für das 8 nt Molekül etwa 45.000 mögliche Bindestellen verfügbar. Bei sehr kleinen Molekülen

können somit unerwünschte Nebeneffekte durch eine unspezifische Bindung die Folge sein. Demgegenüber ist die Sequenz eines 20 nt großen Antisense-Moleküls statistisch nur alle 1.099.511.627 kb zu finden, was eine ausreichend hohe Spezifität gewährleistet. Nach der Hybridisierung mit der Ziel-mRNA kommt es dann zu einer Behinderung bei der mRNA Prozessierung oder auch zum Stillstand der Translation, beim Einsatz von DNA-Antisense-Molekülen auch zum Abbau durch RNase H (Dias and Stein 2002). RNase H ist eine Endoribonuklease, die spezifisch die Phosphodiester Bindung einer mit DNA hybridisierten RNA spaltet. Um die Antisense Spezifität zu überprüfen, wird ein DNA Antisense-Molekül mit der Ziel RNA hybridisiert und einem RNase H Verdau unterworfen. RNase H baut nun den RNA Teil in dem RNA/DNA Hybrid ab, wodurch das DNA Antisense-Molekül sowie zwei aus der initialen RNA produzierten kleineren RNA-Moleküle freigesetzt werden (Sohail and Southern 2000). Die Bindungsstelle und damit die Spezifität der Reaktion können durch Ermittlung der Größe der RNA-Produkte bestimmt werden.

Die Antisense-Technologie ist keine artifizielle Erscheinung. Natürliche Antisense-Moleküle konnten in der Genregulation bei vielen Organismen nachgewiesen werden. Die meisten Beispiele hierfür stammen aus Prokaryonten (Wagner et al. 2002) und Viren (Liu et al. 1994). In jüngster Zeit wurden allerdings auch vermehrt Antisense-Moleküle gefunden, die in Eukaryonten eine regulatorische Funktion ausüben (Chu and Dolnick 2002). Kurze, nicht-kodierende RNAs sind an der komplexen Regulation diverser Gene in Bakterien und in Eukaryonten beteiligt (Wagner and Vogel 2003). Die Regulation der Kopiezahl, der Konjugation sowie der segregatorischen Stabilität von Plasmiden konnte plasmidkodierten Antisense-Molekülen zugeschrieben werden (Brantl 2002). Im Rahmen des „Human Genome Sequencing Project“ wurden mehr als 2500 Orte im Genom gefunden, die putative transkriptionelle Einheiten auf beiden DNA Strängen besitzen. Die Zahl an tatsächlichen Sense/Antisense Partnern wird dabei auf mindestens 1600 geschätzt. Dementsprechend haben ca. 8% aller humanen Gene einen Antisense Partner. Somit könnte die Regulation durch Antisense-Moleküle auch im menschlichen Genom als ein natürlicher Mechanismus sein (Yelin et al. 2003).

Obwohl die Antisense-Technologie universell einsetzbar und sehr spezifisch ist, zeigen in der Praxis viele Konstrukte nur eine geringe oder gar keine Aktivität. Eine Erklärung gründet auf der komplexen dreidimensionalen Struktur eines RNA-Moleküls. Durch Auffaltung kann es dazu kommen, dass Bereiche des Moleküls unzugänglich werden für eine Hybridisierung zwischen Antisense-Molekül und Ziel-mRNA. Es ist daher von großer Bedeutung, eine geeignete Bindestelle für das Antisense-Molekül zu finden (Sczakiel and Far 2002). Eine

große Zahl an externen Nukleotiden, die von außen zugänglich sind, sowie eine globale Flexibilität des RNA –Moleküls erhöhen dabei die Wahrscheinlichkeit einer Duplexbildung (Patzel and Sczakiel 1998). Die sehr schwierige Vorhersage der optimalen Bindestelle führt in der Praxis dazu, dass umfangreiche RNA-Bibliotheken getestet werden müssen, um nur wenige funktionelle Antisense Konstrukte zu finden. Hier wird deutlich, dass trotz der relativ simplen Theorie hinter der Antisense-Technologie ein großer materieller und zeitlicher Aufwand damit verbunden sein kann.

Eine Selektion von Bindestellen für das Antisense-Molekül auf der Ziel-mRNA kann durch *in silico* Strukturvorhersagen vorgenommen werden (Lehmann et al. 2000). Allerdings sind das Verständnis der RNA-Faltung und der Duplex Stabilität, sowie auch die Leistungsfähigkeit und Qualität computergestützter Strukturvorhersagen noch unzureichend für exakte Vorhersagen. Daher wird vielfach ein Ansatz gewählt, bei dem computergestützte Methoden der Strukturvorhersage mit experimentellen Methoden, wie z.B. der Southern Analyse oder dem RNase H Assay, kombiniert werden (Sczakiel 2000; Sohail and Southern 2000).

Die Stabilität von Antisense-Molekülen lässt sich durch chemische Modifikationen erhöhen. Ziel hierbei ist es, das Antisense-Molekül in einer Form darzustellen, die auf natürlichem Weg nicht entstehen kann. Somit ist das modifizierte Antisense-Molekül vor dem Abbau durch natürliche Enzyme weitgehend geschützt. Ein weiterer, durch Modifikationen erzielter Effekt, ist die Erhöhung der Affinität zum Zielmolekül. Gebräuchliche Modifikationen beinhalten den Austausch der Phosphodiester Bindung zwischen den Nukleotiden durch Phosphorothioate oder Polyamide (Braasch and Corey 2002), den Austausch des Zucker-Phosphat Rückgrates durch ungeladene N-(2-Aminoethyl) Glycine (PNA, Abb.1; (Doyle et al. 2001), den Austausch des Zuckeranteils durch sogenannte “locked nucleic acids“ (LNA; (Wahlestedt et al. 2000) oder auch die Addition funktioneller Gruppen wie dem 2’-Methoxyethyl (Chen et al. 2001). Von großer wissenschaftlicher, wie auch kommerzieller Bedeutung, war die Einführung der Peptid-Nukleinsäuren (PNA, Abb. 1). Das negativ geladene Zucker-Phosphate Rückgrat der DNA oder der RNA Antisense-Moleküle wurde dabei durch ein Polypeptid Rückgrat ersetzt. Hierdurch konnten Stabilität und Affinität zur Zielsequenz drastisch verbessert werden (Wahlestedt et al. 2000). LNA-Oligonukleotide wurden von Wahlestedt et al. (2000) als Oligonukleotide definiert, die ein oder mehrere 2'-C,4'-C-Oxy-Methylen-verbundene bizyklische Ribonukleotid Monomer (LNA Monomer) enthalten.

Zusätzlich zu Verbesserungen durch chemische Modifikationen entstehen unter Umständen aber auch nachteilige Effekte. So kann es zu einer verminderten Aktivität des modifizierten Antisense-Moleküls oder auch zu einer toxischen Wirkung durch die Modifikation kommen.

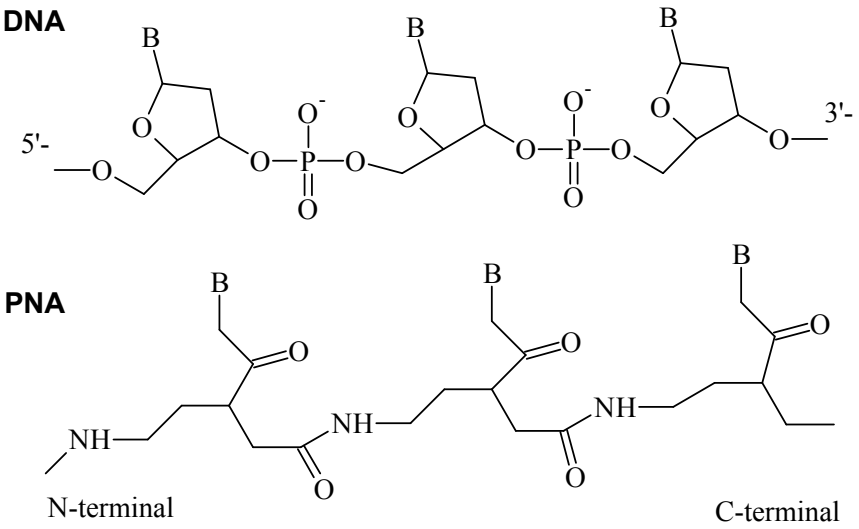


Abb. 1 Struktur eines DNA Oligonukleotid und des dazugehörigen PNA (Peptid Nukleinsäure) Analogon. (B: Nukleobase)

Eine große Zahl an Antisense Konstrukten wird bereits als pharmazeutischer Wirkstoff bzw. zur Optimierung von Nutzpflanzen entwickelt und getestet. Die wenigsten dieser Moleküle konnten die ersten Testphasen passieren oder bis zur Marktreife gebracht werden (Tab. 1). Obwohl das Prinzip der Antisense Methode sehr einfach und elegant ist, scheint die Anwendung *in vivo* sehr kompliziert zu sein. Die große Zahl an zu evaluierenden Antisense-Konstrukten beschränkt die Technologie allerdings auf Organismen, bei denen eine hohe Transformationsrate erreicht wird, und für die ein einfaches Selektionssystem zur Verfügung steht.

Offensichtlich existiert eine Vielzahl an Faktoren, welche die Effizienz von Antisense-Molekülen *in vivo* beeinflussen - nicht zuletzt eine nur ungenau vorhersagbare Sekundärstruktur der Zielsequenz wie auch des Antisense-Moleküls. Es ist daher weiterer Forschungsbedarf vorhanden, um die Einflussfaktoren aufzuklären und die Antisense-Technologie zielsicher und mit einem günstigen Kosten/Nutzen Aufwand einsetzten zu können.

Tab. 1 Beispiele kommerzieller Antisense-Produkte (* Produkt in klinischer Testphase).

Antisense-Produkt	Zielstruktur	Bemerkung	Produzent
Flavr Savr Tomate	Polygalakturonidase	Verbesserung der Lagereigenschaften	Calgene, Inc., Davis, CA, (jetzt Monsanto Co.), USA
AP 12009*	Krebsprotein TGF-b2	Behandlung von malignen Hirntumoren	Antisense Pharma GmbH, Regensburg, Deutschland
Vitravene*	CMV	Behandlung der Cytomegalovirus Renititis	Isis Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, USA
Genasense* (Banerjee 2001)	Bcl-2	von Krebszellen produziertes Protein, das vermutlich durch Chemotherapie induzierten Zelltod blockiert	Genta, Berkeley Heights, New Jersey, USA
Zeaxanthin Kartoffel	Zeaxanthinepoxidase	Anhäufung des Karotinoides Zeaxanthin	TU München, Deutschland

1.2 Ribozyme

Ribozyme wurden 1982 von Cech und Kollegen im Protozoen *Tetrahymena thermophila* entdeckt (Kruger et al. 1982). Dieser Organismus enthält ein RNA-Molekül, das sich selbst schneiden kann, ohne dazu eine externes Protein oder eine externe Energiequelle zu benötigen. Nur ein Jahr später veröffentlichten Altman und Kollegen mit dem Enzym Ribonuclease P aus *Escherichia coli* eine ebenfalls katalytisch aktive RNA (Guerrier-Takada et al. 1983). Cech und Altman wurden „für ihre Entdeckung der katalytischen Eigenschaften der Ribonukleinsäure (RNA)“ im Jahr 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie belohnt.

Ein Ribozym ist ein RNA-Molekül, das eine chemische Reaktion katalysiert und diese Reaktion unverändert wieder verlässt. Ribozyme können, basierend auf Größe und Mechanismus, in zwei Gruppen eingeteilt werden (Warashina et al. 2000; Doudna and Cech 2002). Die erste Gruppe beinhaltet die **kleinen Ribozyme** (Tab. 2). Die meisten dieser Ribozyme wurden in ssRNA Viren gefunden. Der bekannteste Vertreter hier ist das “Hammerhead” Ribozym. Die zweite Gruppe stellt die **großen Ribozyme** dar und enthält neben den Gruppe I und II Introns auch die RNaseP und der RNA-Anteil des Ribosoms (Tab. 3).

Tab. 2 Kleine Ribozyme sind an der viralen Replikation beteiligt und produzieren 2', 3'-zyklische Phosphate sowie ein 5'-OH.

Ribozym	**Größe [nt]**	**Quelle**	**Referenz**
Hammerhead	ca. 40	Virale Satelliten und Viroide aus Pflanzen, newt Satellit, *Schistosoma mansoni*	(Buzayan et al. 1986; Rubino et al. 1990)
Hairpin	50 – 60	Tabak Ringspot Virus	(Fedor 2000)
HDV	ca. 80	Hepatitis Delta Virus	(Perrotta and Been 1990; Perrotta and Been 1991; Shih and Been 2002)
VS	154	Varkud Satellit aus *Neurospora crassa* Mitochondrien	(Collins 2002)

Tab. 3 Große Ribozyme sind in zelluläre Prozesse involviert und werden zumeist als „housekeeping“ Ribozyme bezeichnet.

Ribozym	**Größe [nt]**	**Quelle**	**Reaktionsprodukt**	**Funktion**	**Referenz**
Gruppe I Intron	200 – 1500	Eukaryonten (Organellen, Kern), Prokaryonten	5’-/3’-ligierte Exons, Intron mit 5’-Guanosin und 3’-OH	Intron Spleißen	(Kruger et al. 1982)
Gruppe II Intron	300 – 3000	Eukaryontische Organellen, Prokaryonten	5’-/3’-ligierte Exons, Intron mit 2’-5’ Lariat und 3’-OH	Intron Spleißen	(Lehmann and Schmidt 2003)
RNase P	140 – 490	Eukaryonten (Organellen, Kern), Prokaryonten	5'-Phosphat und 3'-OH	tRNA Prozessierung	(Schon 1999; Xiao et al. 2002)
70 S Ribosom		Prokaryonten	Peptid Bindung	Peptidyl-Transferase	(Moore and Steitz 2003; Steitz and Moore 2003)

1.2.1 Kleine Ribozyme

Kleine Ribozyme haben eine Länge von etwa 40 bis 154 Nukleotiden. Sie katalysieren die endonukleolytische Spaltung der Phosphodiester Bindung zwischen zwei Nukleinsäuren. Die Reaktionsprodukte tragen ein 5’-OH bzw. ein 2’, 3’-zyklisches Phosphat. Das kleinste und auch am besten charakterisierte Mitglied dieser Gruppe ist das „**Hammerhead**“ Ribozym (Tab. 2). Den Namen bekam dieses Molekül aufgrund seiner Sekundärstruktur, die der eines Hammers ähnelt. Das Hammerhead Ribozym wurde in Pflanzenviren entdeckt, die eine einzelsträngige, zirkuläre RNA als Erbsubstanz besitzen (Buzayan et al. 1986; Rubino et al. 1990). Die Replikation der RNA dieser Viren wird in einer dem „rolling circle“ Prinzip durchgeführt. Das Hammerhead Ribozym wirkt dabei wie eine Schere, die ein mehrere Genome langes RNA-Transkript in Fragment mit der Länge eines einzelnen Genoms

zerschneidet. Nachfolgend ligieren diese Fragmente wieder zu einem zirkulären Virengenom (Abb. 2).

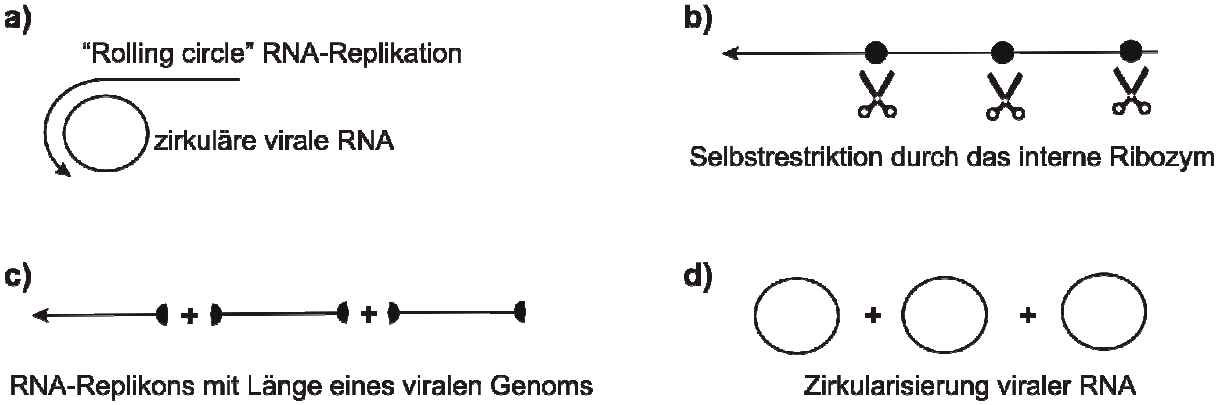


Abb. 2 Funktion des Ribozyms in der "rolling circle" Replikation viraler RNA. Die *cis*-aktiven Ribozyme befinden sich an der Stelle der gefüllten Kreise. a) Die zirkuläre virale RNA wird in Form einer langen polyzistronischen RNA transkribiert. b) Interne Ribozyme separieren die einzelnen Genome durch Selbstschneiden. c) Einzelfragmente in Genomlänge. d) Einzelne zirkuläre virale Genome

Der *Neurospora crassa* Stamm Varkud-1c enthält zwei RNA-Moleküle von etwa 0,9 kb Länge. Es konnte gezeigt werden, dass diese Transkripte die zirkuläre bzw. die lineare Form eines Plasmid namens „**VS**" (Varkud Satellit) sind. Das VS Plasmid enthält keinen offenen Leserahmen, allerdings zeigen Bereiche seiner Sequenz eine hohe Ähnlichkeit zur Konsensus Sequenz des minimalen Promoters vom mitochondrialen Genom *Neurospora*'s. Es wird vermutet, dass die VS RNA multimere Transkripte durch spezifische Selbstrestriktion in eine monomere, zirkuläre Form überführt (Collins 2002). Das „**Hairpin**" Ribozym und das **HDV** (Hepatitis Delta Virus) Ribozym haben eine dem VS Ribozym ähnliche Funktion. Hammerhead, Hairpin und HDV Ribozyme benötigen eine lineare RNA als Substrat, wogegen das VS Ribozym eine „stem loop" als minimales Substrat bevorzugt (Guo and Collins 1995).

1.2.2 Große Ribozyme

Gruppe I und Gruppe II selbst-spleißende Introns

Introns der Gruppe I und der Gruppe II (Tab. 3, Cech 1990; Lehmann and Schmidt 2003) katalysieren das Spleißen ihrer RNA durch zwei aufeinander folgende Transesterifikationen. Zu den Gruppe I Ribozymen gehört auch das *Tetrahymena* Ribozym, welches ursprünglich von Kruger et al. (1982) entdeckt wurde. Die Größe dieser Introns reicht von wenigen hundert bis zu über 2500 nt. Gruppe I und Gruppe II Introns sind in der Lage, sich selbst aus dem

RNA-Transkript auszuschneiden und die benachbarten Exons zusammenzufügen (Schmidt et al. 1992).

Im ersten Schritt des Spleißen von **Gruppe I Introns** greift ein externer Guanosin Kofaktor die 5'-Spleißstelle an und produziert ein freies 5'-Exon sowie ein Intron-3'Exon Intermediat mit einem zusätzlichen 5'-G (Abb. 3a). Im zweiten Schritt erfolgt der Angriff des 3'-OH des 5'-Exon auf die 3'-Spleißstelle. Das Intron wird dabei in linearer Form freigesetzt und die zwei Exons ligieren.

Eine ähnliche Funktion erfüllen **Gruppe II Introns** (Abb. 3b). Im einleitenden Schritt greift ein Intron-internes Adenosin nahe dem 3'-Ende des Intron die 5'-Spleißstelle an. Hierbei entsteht ein freies 5'-Exon sowie ein verzweigtes Intron-3'-Exon. In der zweiten Transveresterung greift das 3'OH des 5'-Exon die 3'-Spleißstelle an, ligiert die beiden Exons und entlässt das Intron in der Form eines Lassomoleküls oder Lariats.

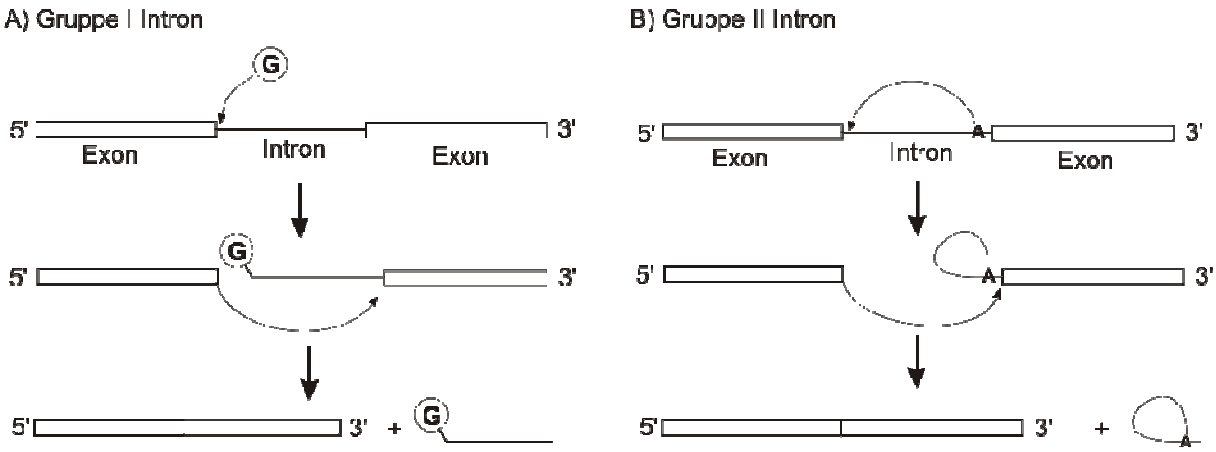


Abb. 3 Schematische Darstellung des Selbstspleißens von Gruppe I und Gruppe II Introns (A: Adenin, G: Guanosin). A: Ein externes Guanosin leitet das Spleißen von Gruppe I Introns ein. Es entsteht ein Intron-3'-Exon Intermediat. Im letzten Schritt wird das Intron mit dem gebundenen 5'-G freigesetzt und die Exons ligieren. B: Ein internes Adenosin greift die 5'-Spleißstelle an, es einsteht ein 5'-Exon und ein verzweigtes Intron-3'-Exon. Wie bei dem Gruppe I Intron greift das 5'-Exon die 3'-Spleißstelle an, so dass das verzweigte Intron freigesetzt wird und die Exons ligieren können.

Ribonuklease P

Ribonuklease P ist ein RNA-Protein Komplex (Riboprotein), der in nahezu allen Zellen gefunden werden kann. Die bakterielle RNase P besteht aus einer katalytischen RNA (~ 400 nt) und einem einzelnen Protein. In der eukaryontischen Zelle sind demgegenüber 9-12 Proteine mit der RNA verbunden.

Die Hauptfunktion dieses Riboproteins ist die Prozessierung von tRNAs (Schon 1999; Kirsebom 2002): Alle tRNAs werden als Vorstufen-tRNA (prä-tRNA) transkribiert und benötigen eine nachfolgende Prozessierung, um reife 5'- und 3'-Enden zu erhalten. Im Verlauf dieser Prozessierung entfernt die Ribonuklease P eine 5'-Leitsequenz von der prä-

tRNA, wobei eine freie 5'-Phosphat Gruppe entsteht. Im Gegensatz zur eukaryontischen RNase P ist in Prokaryonten und Archaebakterien der RNA-Anteil der RNase P alleine in der Lage, die prä-tRNA zu erkennen und zu prozessieren. Somit kann dieses Riboprotein der Klasse der Ribozyme zugeordnet werden.

Das Ribosom ist ein Ribozym

Ribosomen sind große Riboproteine, die in Prokaryonten aus drei und in Eukaryonten aus vier rRNA-Molekülen, sowie einer größeren Anzahl von Proteinen bestehen. Das Ribosom katalysiert die Entstehung einer Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren in einer wachsenden Polypeptidkette. Die Untersuchung der Kristallstruktur zeigt, dass die Knüpfung der Peptidbindung einzig durch die 23S RNA der großen Untereinheit katalysiert wird (Nissen et al. 2000). Die Aufgabe der ribosomalen Proteine scheint dagegen die Formierung einer bestimmten Tertiärstruktur zu sein und nicht, wie bislang vermutet, die Katalyse der Reaktion. Die Entdeckung, dass nur der rRNA-Anteil des Ribosoms katalytisch aktiv ist legt die Vermutung nahe, dass das Ribosom in der Tat ein Ribozym ist (Lilley 2001).

Das Auflösen der kovalenten Bindung zwischen zwei Nukleotiden durch ein RNA-Molekül wurde lange Zeit als eine zufällige Entwicklung betrachtet. Hier finden wir nun eine weitere von einem RNA-Molekül durchgeführte chemische Reaktion, nämlich die Knüpfung einer Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren. Dass ein Riboprotein von so essentieller Bedeutung für die Zelle wie das Ribosom nun als Ribozym identifiziert werden konnte, verleiht den katalytischen RNAs einen neuen Stellenwert in der molekularbiologischen Welt (siehe 4. für weitere, durch Ribozyme katalysierte, chemische Reaktionen).

1.3 Ribozyme als molekularbiologische Werkzeuge

Die Entdeckung der katalytischen Aktivität von bestimmten RNA-Molekülen war in sich bereits revolutionär. Wie aber können solche Ribozyme nun in der Molekularbiologie eingesetzt werden? Die Entwicklung der Ribozymtechnologie in der Grundlagenforschung, wie auch die Anwendung im kommerziellen Bereich, sollen in diesem Kapitel näher erläutert werden. Dabei wird insbesondere das Hammerhead Ribozym als das best untersuchte Ribozym als ein Beispiel herangezogen.

1.3.1 Das Hammerhead Ribozym

Das Hammerhead Motiv ist in seiner natürlichen Form in der RNA von pflanzenpathogenen Viroiden lokalisiert („Tabak Ringspot“ Virus RNA (Buzayan et al. 1986), „Chicory yellow mottle“ Virus (Rubino et al. 1990), „Barley yellow dwarf” Virus (Miller et al. 1991), “Velvet tobacco mottle” Virus (Haseloff and Symons 1982)). Es besteht aus drei Helices sowie einem zentralen Bereich mit 11 freien, ungepaarten Nukleotiden (Abb. 4). Eine graphische Animation der Kristallstruktur des Hammerhead Ribozym ist auf der Internetseite von William Scott (http://chemistry.ucsc.edu/~wgscott/pubs/movies2.html) zu sehen.

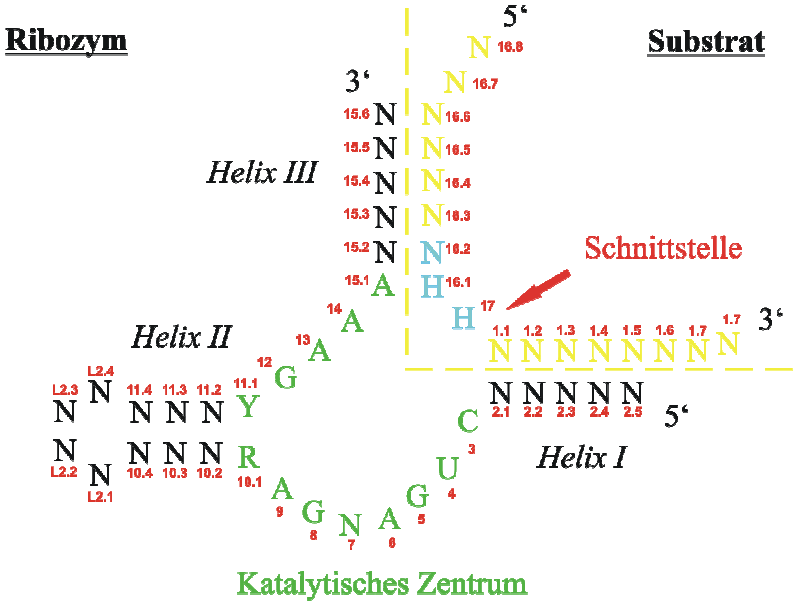
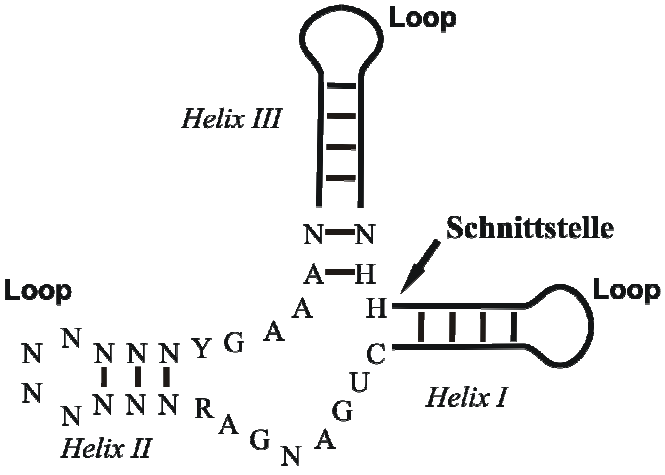


Abb. 4: Minimale Konsensus-Struktur des Hammerhead Ribozym (N: A,C,G oder T; H: C, A oder U; R: Purin; Y: Pyrimidin; Kore et al. 1998). Die Substrat-RNA ist in gelb dargestellt, die Erkennungssequenz des Ribozyms in blau. Der rote Pfeil markiert die Schnittstelle des Ribozyms. Das katalytische Zentrum mit den größtenteils konservierten Nukleotiden ist in grün dargestellt. Die Arme I und III des Ribozyms bilden mit dem Substrat die Helices I und III. Die Nummerierung der Nukleotide erfolgt nach Hertel et al. (1992).

In ihrer natürlichen Form faltet sich die virale RNA derart, dass ein einzelsträngiger, katalytisch aktiver Kern von drei durch Schleifen terminierten dsRNA Helices umgeben wird. Natürliche Ribozyme werden auf einem RNA-Strang kodiert, der gleichzeitig als Substrat dient. Hier spricht man von einer *cis*-Restriktion der RNA (selbstschneidende RNA, Abb. 5a). Um mit dem Hammerhead Ribozym andere RNAs schneiden zu können, muss es aus seinem natürlichen Umfeld herausgelöst werden, so dass die Restriktion des Substrates in *trans* erfolgen kann. Dieses wird durch Entfernen der beiden „loops“ in Helix I und Helix III erreicht, wodurch zwei getrennte Moleküle entstehen (Abb. 5b); auf der einen Seite das

Ribozym mit einer „stem loop“ und den beiden Armen I und III, welche mit der Substrat-RNA auf der anderen Seite die Helices I und III bilden. In dieser Form wird nun die *trans*-Restriktion von nahezu jeder fremden Substrat-RNA durch das Ribozym ermöglicht (Birikh et al. 1997).

a) Hammerhead Riboyzm, *cis*-Restriktion



b) Hammerhead Ribozym, *trans*-Restriktion

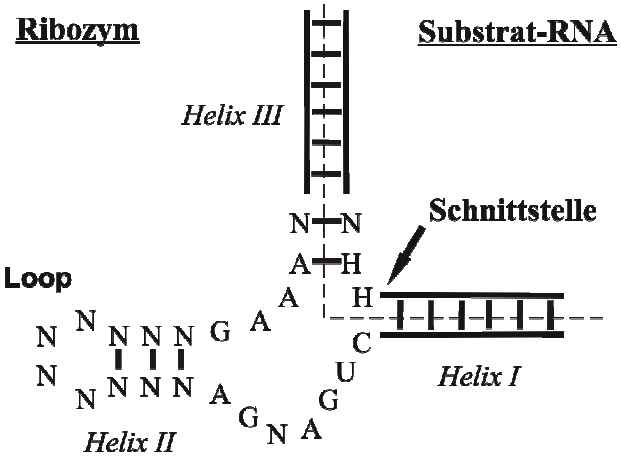


Abb. 5 Restriktion einer RNA durch das Hammerhead Ribozym in *cis* oder in *trans* (N: A, C, G oder T; H: C, A oder U; R: Purin; Y: Pyrimidin, Kore et al. 1998). a) *cis*-Restriktion. Ribozym- und Substratteil befinden sich auf demselben Molekül. b) *trans*-Restriktion. Beide Schleifen aus Abb. 5a wurden entfernt. Damit wird das Molekül in das Ribozym auf der linken Seite der gestrichelten Linie und in das Substrat auf der rechten Seite unterteilt.

1.3.2 Die katalytischen Eigenschaften des Hammerhead Ribozyms

Durch die Trennung in einen katalytischen Teil und einen Substratteil kann das Ribozym wie ein „echtes“ Enzym agieren: 1. Hybridisierung mit der Substrat-RNA. 2. Restriktion der Substrat-RNA. 3. Freisetzung der Reaktionsprodukte. 4. Einleitung eines neuen Zyklus (Abb. 6).

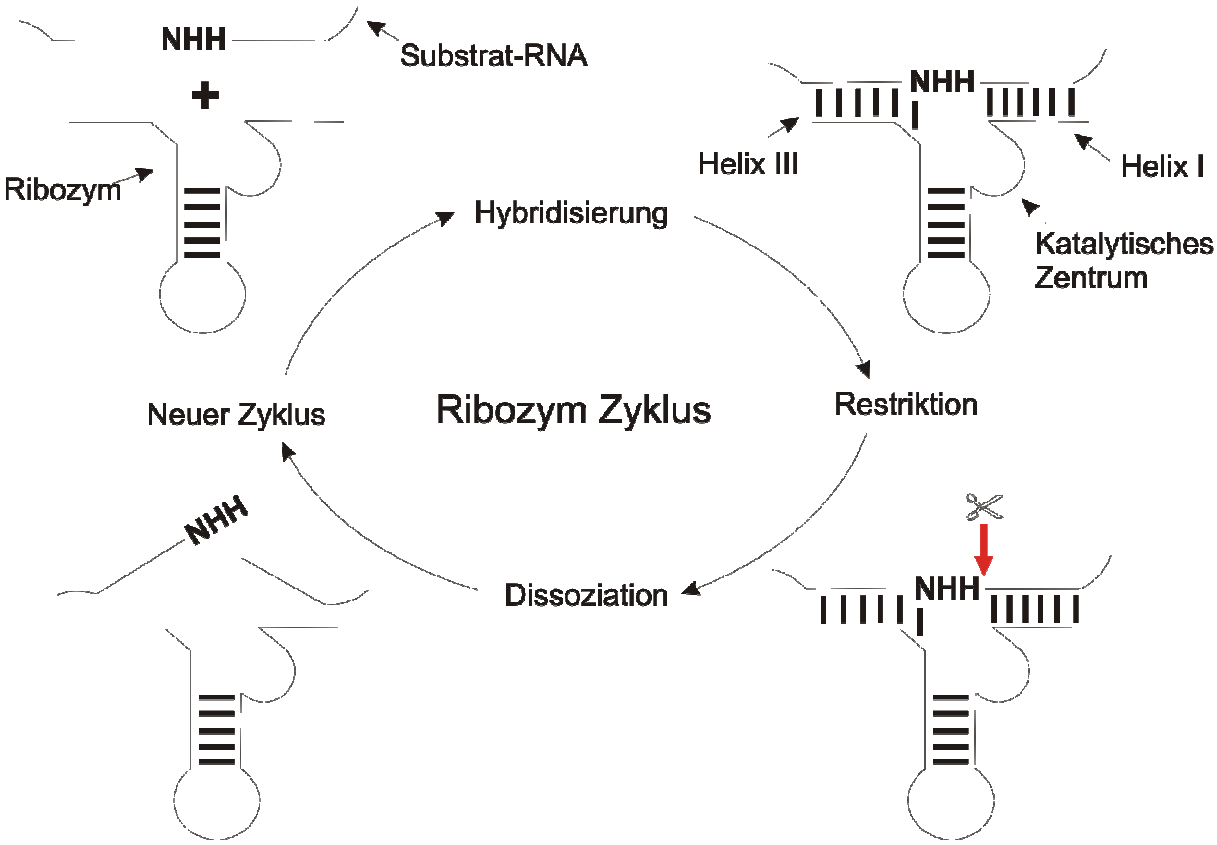


Abb. 6 Ribozym Zyklus: 1. Der katalytische Zyklus wird durch die Bildung eines Hybrides zwischen Ribozym und geeignetem RNA-Substrat durch Watson-Crick Basen Paarung initiiert; 2. Das Ribozym schneidet die Substrat-RNA an der spezifischen Schnittstelle; 3. Die Reaktionsprodukte werden freigesetzt; 4. Das Ribozym bindet an ein neues Substrat und initiiert einen neuen Zyklus.

Die an Ribozym und Substrat für eine effiziente Restriktion gestellten Anforderungen sind gering, wodurch das Ribozym ein äußerst attraktives molekularbiologisches Werkzeug darstellt. Die Erkennungssequenz für das Hammerhead Ribozym ist ein “NHH“ Triplet (N: A, U, G, oder C; H: A, U, oder C; Shimayama et al. 1995; Kore et al. 1998). Die Nukleotide in Arm I und Arm III sind nicht konserviert und können somit frei gewählt werden, so dass sie homolog zu der Substratsequenz sind (Abb. 5 & 6).

Obwohl die Struktur des Hammerhead Ribozyms ausführlich erforscht ist, konnte der exakte Mechanismus der Restriktion noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt werden. Da Metallionen an der chemischen Reaktion beteiligt sind, wird das Hammerhead Ribozym oftmals als

Metalloenzym dargestellt (Ohkawa et al. 1995). Für eine erfolgreiche *in vitro* Restriktion müssen divalente Kationen, vorzugsweise Mg^{2+}, der Reaktion zugefügt werden. Allerdings konnte eine erfolgreiche Restriktion auch unter hohen Konzentrationen an monovalenten Kationen gezeigt werden, wenn auch mit verminderter Effizienz (Murray et al. 1998).

Allgemein akzeptiert ist eine stabilisierende Wirkung von Metallionen auf die tertiäre Struktur von RNA Molekülen (Misra and Draper 2002; Pyle 2002), im Fall des Ribozyms die Stabilisierung des Ribozym-Substrat Komplexes. Andererseits fungieren die Metallionen als Kofaktor oder Katalysator in der chemischen Reaktion. Es ist nicht auszuschließen, dass beide Rollen gleichzeitig von Metallionen ausgeübt werden.

Verschiedene Experimente weisen auf eine Änderung der Konformation vor der chemischen Reaktion hin (Takagi et al. 2001; Blount and Uhlenbeck 2002). Ein solcher Transitionszustand würde nachfolgende Reaktionen thermisch begünstigen und unterstützt ein neueres Modell, welches zwei Klassen von Kationenbindestellen beschreibt (DeRose 2003; Hampel and Burke 2003). Die erste Klasse hat eine sehr hohe Affinität zu Kationen und trägt zu umfangreichen strukturellen Veränderungen bei, die eine stabile tertiäre Grundstruktur des Ribozyms zur Folge haben. Die zweite Klasse zeigt eine nur schwache Affinität zu Kationen und kann durch minimale Veränderungen der Konformation an der aktiven Stelle den Transitionszustand herstellen.

Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung des Mechanismus der Katalyse durch das Hammerhead Ribozym. Das 2-OH der Ribose wird durch einen Mg-OH-H_2O Komplex deprotoniert. Dieser wiederum ist an das *pro-R* Sauerstoffatom der zu schneidenden Phosphatgruppe gebunden. Es schließt sich ein nukleophiler Angriff des entstandenen 2-Alkoxides auf das Phosphoratom an, wobei ein fünffach koordiniertes Phosphatintermediat entsteht. Nach Abgang der 5'-Gruppe bleibt ein 2',3'-zyklisches Phosphat in einer invertierten Konformation zurück.

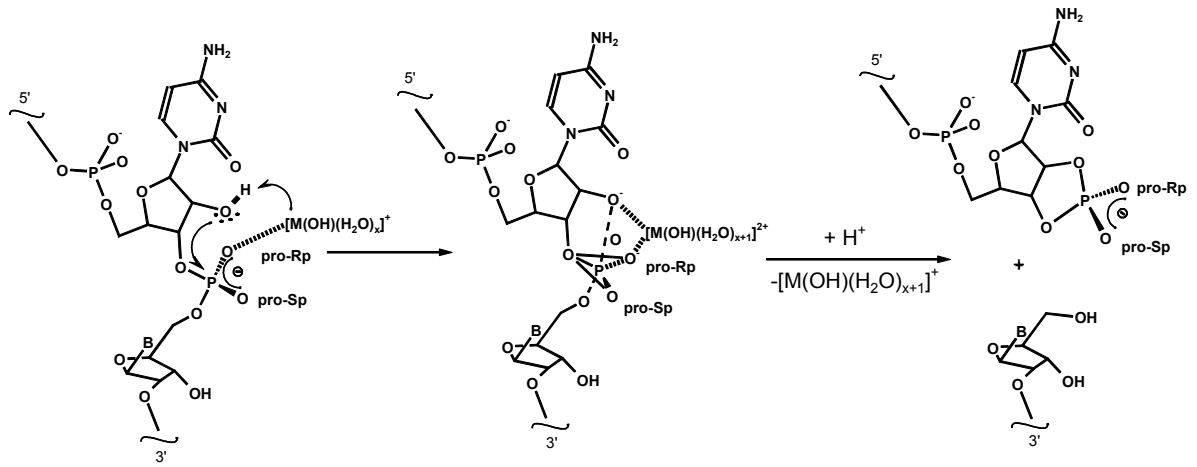


Abb. 7 Spaltung der Phosphodiester Bindung durch das Hammerhead Ribozym (Birikh et al. 1997).

Die Reaktionskinetik der vom Hammerhead Ribozym katalysierten Reaktion verhält sich diese entsprechend der Michaelis-Menten Kinetik (Narlikar and Herschlag 1997). In einem minimalen kinetischen Ansatz (Abb. 8) ist die Substrat-RNA [S] durch das Ribozym [Rz] gebunden (k_1) und bildet damit den Ribozym-Substrat Komplex [RzS]. Dieser Komplex vollführt eine Veränderung der Konformation (k_{conf}), wodurch die folgende Katalyse (k_2) gegenüber der Ligationsreaktion (k_{-2}) bevorzugt wird. Durch die Katalyse (k_2) wird ein Komplex [RzP_1P_2] gebildet, in dem das 5'- und das 3'-Reaktionsprodukt (P1 und P2) noch an das Ribozym gebunden sind. Mit Beendigung der Gesamtreaktion dissoziieren diese vom Ribozym (k_3 und k_4). Diese Beschreibung der Kinetik ist allerdings auf solche Ribozyme beschränkt, welche die minimalen strukturellen Anforderungen erfüllen (Tuschl and Eckstein 1993), sowie auf kleine RNA-Substrate. Die Freisetzung der Reaktionsprodukte wird dagegen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wenn große, strukturierte RNA-Substrate umgesetzt werden sollen. In diesem Fall wird nur ein einzelner Umsatz je Ribozym erreicht (Abb. 9); die Reaktionsprodukte bleiben nach der Reaktion an das Ribozym gebunden und blockieren es so für weitere Reaktionen (Grassi et al. 2002). Die Restriktionsrate liegt für das Hammerhead Ribozym bei ~1 min^{-1} (25 °C, pH 7.5). Ohne Katalyse durch das Ribozym beträgt die Wechselzahl der natürlichen RNA-Hydrolyse dagegen nur ~10^{-6} min^{-1}(Blount and Uhlenbeck 2002).

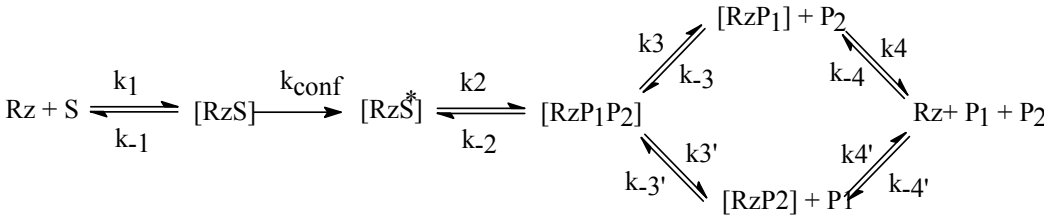


Abb. 8 Minimaler kinetischer Mechanismus der intermolekularen Katalyse durch das Hammerhead Ribozym (Rz: Ribozym; S: Substrat-mRNA; [RzS]: Ribozym-Substrat Komplex; [RzS*]: Ribozym-Substrat Komplex nach Änderung der Konformation; P_1 und P_2: Reaktionsprodukte; k_1 bis k_4: Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion; k_{-1} bis k_{-4}: Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion).

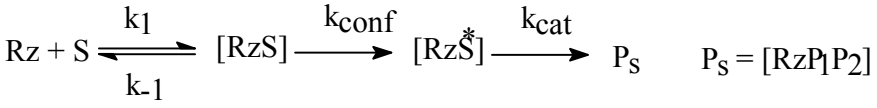


Abb. 9 Kinetischer Mechanismus Katalyse durch das Hammerhead Ribozym unter „single turnover" Bedingungen (Rz: Ribozym; S: Substrat-mRNA; [RzS]: Ribozym-Substrat Komplex; [RzS*]: Ribozym-Substrat Komplex nach Änderung der Konformation; P_1 und P_2: Reaktionsprodukte; k_1, k_2 und k_{cat}: Geschwindigkeitskonstanten).

Das Ribozym kann sein Substrat sowohl schneiden, als auch ligieren. Das Gleichgewicht zwischen Restriktion (Abb. 8, k_2) und Ligation (Abb. 8, k_{-2}) liegt dabei etwa 100-fach auf der

Seite der Restriktion (Hertel and Uhlenbeck 1995; Stage-Zimmermann and Uhlenbeck 1998). Um das Gleichgewicht in Richtung der Ligation zu verschieben, kann das Ribozym modifiziert werden. Durch Einfügen einer kovalenten Verbindung zwischen Helix I und Helix II konnte die gesamte Konformation verändert werden, was zu einer Verstärkung der Ligationsreaktion um das 25-fache bei konstanter Restriktionsrate führte (Stage-Zimmermann and Uhlenbeck 2001; Dunham et al. 2003).

Die Geschwindigkeit der Transesterifikation von RNA-Molekülen durch Ribozyme hat einen Einfluss auf die kommerzielle Anwendung von Ribozymen. Die Restriktion einer RNA durch ein Ribozym ist vergleichsweise langsam gegenüber einem Enzym wie z.B. der RNase A ($\sim 10^6$ min^{-1}, Raines 1998). Das Ribozym entwickelte sich im Laufe der Evolution nicht hingehend der Restriktionsgeschwindigkeit. Dieses konnte mit Hilfe der *in vitro* Selektion des Tetrahymena Ribozyms durch die Erhöhung der Schmelztemperatur (T_m) bei gleichzeitiger Steigerung der Umsatzrate gezeigt werden (Guo and Cech 2002). Die Geschwindigkeit des Hammerhead Ribozyms ist dagegen an die im Verhältnis zur Restriktion durch das Ribozym langsamere Replikation der viralen RNA angepasst, deren Bestandteil das Ribozym ist. Ein weiterer Selektionsdruck in Richtung einer gesteigerten Reaktionsgeschwindigkeit ist also nicht vorhanden.

Um die Reaktionsgeschwindigkeit für eine technische Anwendung zu steigern, wurden diverse Mutationen im ursprünglichen Ribozym Motiv eingeführt. So konnten Kasai et al. (2002) ein Ribozym namens R32 konstruieren, das eine Umsatzrate von 4 min^{-1} gegenüber der Umsatzrate von ~1 min^{-1} des natürlichen Hammerhead Ribozyms. Emilsson et al. (2003) sprachen sogar davon, dass im Laufe der Evolution Hochleistungsribozyme existiert haben, welche die Reaktionsrate der RNase A überstiegen haben, bzw. dass solche Ribozyme durch eingehende Forschung entwickelt werden können.

1.3.3 Das katalytische Zentrum des Hammerhead Ribozyms

Das katalytische Zentrum des Hammerhead Ribozyms wird von drei Helices umgeben. In zahlreichen Mutationsanalysen konnte für das katalytische Zentrum eine Konsensus Sequenz (Abb. 4) ermittelt werden (Haseloff and Gerlach 1988). Mit Ausnahme von Nukleotid 7 scheinen alle Positionen konserviert zu sein. Der Austausch eines der konservierten Nukleotide führt zu einem Verlust der katalytischen Aktivität. Position 7 zeigt ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität des Ribozyms. Bei Besetzung mit einem U werden 100 % Aktivität

erreicht, bei Austausch zu G, A und C werde jeweils nur noch 60 %, 50 % bzw. 20 % erreicht (Ruffner et al. 1990).

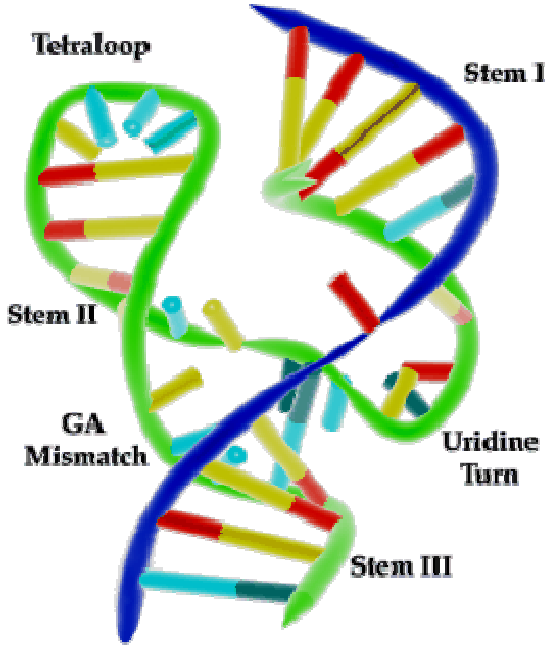


Abb. 10: Darstellung Hammerhead Ribozym anhand der Kristallstruktur des Moleküls. Das violette Band zeigt das RNA Ribozym, das gelbe Band repräsentiert einen DNA Strang (Struktur aus Pley et al. 1994).

Das konservierte katalytische Zentrum enthält zwei RNA Strukturmotive. Das erste Motiv beinhaltet die Nukleotide C3 bis A6, die einen „*uridine turn*“ oder auch „*U-turn*“ formen. Diese *U-turn* Konformation wird durch einige Wasserstoff bindende Interaktionen (U4 (2-OH) -A6 (N7), U4 (N3)-U7(P)) stabilisiert (Abb. 4 und Abb. 10). Das zweite Motiv im katalytischen Zentrum ist ein Duplex der falsch paarende Tandem GA Basenpaare (G8-A13, A9-G12) enthält. Die große Helix and der Drehwinkel zwischen den beiden GA Basenpaaren führt zu einem Aufstapeln von G8 auf G12 und A9 auf A13. In der Kristallstruktur (siehe auch http://chemistry.ucsc.edu/~wgscott/pubs/movies2.html) wird weiterhin deutlich, dass die GA Duplex Domäne über eine Position zur Bindung von divalenten Metallen verfügt. Es ist weithin akzeptiert, dass ungepaarte Regionen oftmals hoch strukturiert sind und bevorzugt Nicht-Watson-Crick Basenpaare bilden. Ein weiteres RNA faltendes Motiv ist ein GAAA Tetraloop. Dies ist zwar keine Konsensus-Struktur, dient aber als stabile Struktur am Ende von Helix II. Weiterführende Studien haben gezeigt, dass ein GNRA Tetraloop als Protein-bindende Position fungieren kann und an tertiären Interaktion beteiligt ist. Der GAAA Tetraloop kann zusätzlich eine intermolekulare Wechselwirkung mit CG Basenpaaren in Stamm II eingehen (Pardi 1994).

1.3.4 Helix I und Helix III

Die Länge der bindenden Arme I und III eines Ribozyms ist für die Affinität zur Zielsequenz von entscheidender Bedeutung (Lieber and Strauss 1995; Amarzguioui and Prydz 1998). Je länger die Arme sind, desto wahrscheinlicher ist eine spezifische Hybridisierung mit dem homologen Bereich des Zielmoleküls. Bei der Anwendung *in vivo* kann diese Bindung allerdings aufgrund der geringen Kultivierungstemperatur so stabil sein, dass nach erfolgter Restriktion der Ziel-mRNA die Freisetzung der Produkte erschwert wird. Somit kann es bei zu langen bindenden Armen zu einem reinen Antisense-Effekt kommen. Untersuchungen von Fedor und Uhlenbeck (1992) haben gezeigt, dass bei einer Erhöhung auf über fünf bindende Nukleotide je Arm nicht mehr die chemischen Trennung der Phosphodiester Bindung, sondern die Freisetzung der Produkte zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. Demgegenüber wird die Bindung bei nur wenigen bindenden Nukleotiden zunehmend instabil; zusätzlich erhöht sich die Gefahr unspezifischer Hybridisierungen.
Während für kurze Substrate eine Anzahl von insgesamt 10 – 12 bindenden Nukleotiden die höchste Aktivität gewährleistet (Fedor and Uhlenbeck 1990; Goodchild and Kohli 1991; Kitamoto et al. 1999), fanden Ellis und Rogers (1993) heraus, dass eine Verringerung der Anzahl bindender Nukleotide auf unter 14 zu einer starken Abnahme der Ribozymaktivität insbesondere bei langen Substraten führt. Zudem wird in eukaryotischen Zellen bei einer Homologie von 14 Nukleotiden statistisch nur eine mRNA-Spezies als Ziel erkannt, womit eine ausreichende Spezifität gewährleistet wird. Nach Hendry und McCall (1996) haben Ribozyme mit längerem Arm III als Arm I eine erhöhte Effizienz. Als optimale Länge der bindenden Arme geben sie 10 Basenpaare für Helix III und 5 Basenpaare für Helix I an. Eine obere Grenze für die Länge der Arme I und III ist nicht klar definiert und scheint spezifisch für jedes Ribozym zu sein (Herschlag 1991; Ellis and Rogers 1993); es ist hierbei allerdings zu berücksichtigen, dass mit steigender Länge der Arme I und III auch die Zahl möglicher intramolekularer Bindungen erhöht wird.

1.3.5 Helix II

Die Funktion von Helix II ist noch nicht abschließend geklärt. (Tuschl and Eckstein 1993) stellten fest, dass ein Stamm von zwei Basenpaaren Länge in Verbindung mit einer Schleife aus vier Nukleotiden die minimale Voraussetzung ist, um die für eine hohe katalytischen Aktivität notwendige Struktur des Ribozyms zu gewährleisten. Dagegen konnten McCall und

Kollegen (1992) durch die Synthese sogenannter „Minizyme“ zeigen, dass nur durch vollständiges Entfernen von Helix II und der anschließenden Schleife die Ribozymaktivität unterbunden werden kann. Eine Reduktion auf nur wenige Basen dagegen, welche zudem keine Watson-Crick Basenpaare sondern nur eine Schleife bilden, führt zu einer Verminderung der katalytischen Aktivität.

1.4 Anwendung der Ribozymtechnologie

Diverse wissenschaftliche und kommerzielle Anwendungen der Ribozymtechnologie sind derzeit bekannt. So wurden Ribozyme in der Aufklärung des Polyadenylierungskomplexes in *S. cerevisiae* eingesetzt. Die Polyadenylierung ist ein wichtiger Schritt in der Prozessierung der 3’ Enden von mRNAs. Das Anhängen des poly(A)-Schwanzes ist beschränkt auf mRNAs, die durch die RNA-Polymerase II transkribiert wurden. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Transkripte der tDNA und der rDNA, die durch die RNA-Polymerase I und II synthetisiert werden, ebenfalls durch die RNA-Polymerase II polyadenyliert werden können: Die Forscher fügten ein selbstschneidendes Hammerhead Ribozym in die zugehörigen tDNA bzw. rDNA Sequenz ein, das zwei stabile Reaktionsprodukte hervorbrachte (Duvel et al. 2003). Eine Analyse der 5’-Produkte zeigte, dass diese in beiden Fällen durch die RNA-Polymerase II polyadenyliert wurden. Somit konnte gezeigt werden, dass in *S. cerevisiae* die Polyadenylierung von der Restriktion und der Transkription durch die RNA-Polymerase II entkoppelt ist.

Ribozyme haben auch eine Anwendung als Pharmazeutika gefunden. Einige gegen Krebs wirkende Ribozyme sind derzeit in klinischen Testphasen befindlich, wie z.B. die Produkte Herazyme^{TM} und Angiozyme^{TM} (Sirna Therapeutics). Glioblastoma sind häufig vorkommende und sehr bösartige Hirntumore. Substanzen gegen diesen Krebs werden zum Teil von körpereigenen Resistenzmechanismen, wie dem „Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1)”, abgefangen, wodurch die Wirksamkeit dieser Medikamente vermindert wird. Osada und Kollegen (2003) konstruierten ein Hammerhead Ribozym, welches die mRNA des MRP1 angreift, in der Folge waren humane Glioblastoma-Zelllinien empfänglicher gegenüber Krebs bekämpfenden Substanzen. Ein ähnlicher Ansatz wurde verfolgt, um die Resistenz von Krebszellen in der Lunge und im Darm gegen Anti-Krebsmedikamente zu senken (Hatanaka et al. 2001; Nagata et al. 2002). Das *trans*-spleißende Gruppe I Ribozym aus *Tetrahymena* wurde genutzt, um Gendefekte im Säugerzellen auf der RNA-Ebene zu substituieren (Watanabe and Sullenger 2000; Byun et al.

2003). Die defekten Transkripte wurden von dem Gruppe I Ribozym abgefangen und an der Zielsequenz geschnitten. Das 3'-Reaktionsprodukt, welches die defekte Sequenz enthielt, wurde durch das 3'-Exon des Ribozyms mit einer korrekten Sequenz ersetzt. Ein Gruppe I Ribozym aus *Pneumocystis carinii* wurde in einem ähnlichen Ansatz benutzt, um *in vitro* Fragmente von 1 Nukleotid bis zu 28 Nukleotiden aus einem RNA-Substrat heraus zu schneiden (Bell et al. 2002).

Ein weiteres bedeutendes Anwendungsgebiet von Ribozymen ist die Bekämpfung von Virusinfektionen. Insbesondere als Agenzien gegen Retroviren, wie HIV (Chang et al. 2002) und Hepatitis (Hoeprich et al. 2003; Sriram et al. 2003), sind Ribozyme vielversprechend, da neben der mRNA auch das RNA-Genom des RNA-Virus als Substrat erkannt wird. Allosterische Ribozyme sind komplexe, modifizierte Ribozyme, die für technischen Anwendung interessant sind (Breaker 2002). Eine Anwendung finden sie z.B. als molekulare Schalter oder als zelluläre Biosensoren (Rajendran and Ellington 2002). Allosterische Ribozyme bestehen aus zwei unabhängigen Domänen. Eine Domäne bildet einen spezifischen Rezeptor, die andere besteht aus dem Ribozym. Durch die Bindung des Rezeptors an einen Effektor kommt es zu einer Änderung der Konformation der Ribozym-Domäne. Hierdurch wird die Restriktionsaktivität der Ribozym-Domäne beeinflusst, was sich in einer messbaren Änderung des Substratumsatzes niederschlägt (Burke et al. 2002; Vaish et al. 2002).

Das chemische Repertoire von Ribozymen ist nicht auf die Spaltung eines RNA-Substrats beschränkt. Intensive Forschung hat zur Entwicklung neuer Ribozyme geführt, die verschiedenste chemische Reaktionen katalysieren können. Eine wichtige Methode dabei ist die *vitro* Evolution. Hiermit können neue Funktionen von RNA oder DNA in einem schnellen und zielgerichteten Ansatz erforscht werden (Breaker 1999). Ausgehend von einem großen Pool synthetischer Moleküle mit variabler Sequenz und kurzen definierten Sequenzbereichen für eine Amplifikation wird ein Selektionsdruck hingehend der gewünschten Funktion angelegt. Nach mehreren Runden der Selektion und Amplifikation verbleiben nur jene DNA- oder RNA-Molküle, die die gewünschte Funktion ausüben können. Mit Hilfe der *in vitro* Evolution selektierten Johnston et al. (2001) eine RNA Polymerase, die eine "primer extension" Reaktion durchführt. Tsukiji et al. (2003) entwickelten ein Ribozym, dass durch Oxidation von Benzylalkoholen NAD^+ regeneriert, was die Existenz eines auf RNA basierenden metabolischen Systems unterstützt. Durch eine Kombination aus rationalem Design und *in vitro* Selektion entwickelten Baskerville und Bartel (2002) ein Ribozym, das RNA mit einem Protein durch Bildung einer Phosphoamidbindung ligiert.

Die meisten dieser neuen Reaktionen lassen sich in einen Zusammenhang mit der "RNA World" Hypothese setzen. Diese Hypothese propagiert ein präzelluläres Leben, in dem RNA als ein, wenn auch äußerst primitives, sich selbst replizierendes System sämtliche notwendigen katalytischen Funktionen ausübt, sowie auch als Speicher der genetischen Information fungiert (Burke 2003). Weitere Unterstützung erfährt die "RNA World" Hypothese durch die *in vitro* Produktion eines Nukleotid-Synthase Ribozyms, welches eine glykosidische Verbindung zwischen einem Zucker und einem Pyrimidin herstellt (Chapple et al. 2003). Kawasaki und Taira (2002) hängten eine 60 nt Poly(A)-Sequenz an ein Ribozym und waren mit dem so modifizierten Hybrid-Ribozym in der Lage, vorher unzugängliche Bindestellen auf der Substrat-RNA zu erreichen. Der Poly(A)-Schwanz interagiert mit der RNA Helikase eIF4AI über das Poly(A)-bindende Protein (PABP) sowie über das PABP-interagierende Protein-1. Hierdurch erhält das neue Hybrid-Ribozym die Fähigkeit, seine Substrat-RNA zu entwinden und zu schneiden. Somit lassen sich auch Substrate schneiden, deren Schnittstellen vorher für das Ribozym aufgrund sterischer Hindernisse nicht erreichbar waren.

1.5 RNA Interference (RNAi)

RNA Interferenz (RNAi) ist ein evolutionär konservierter Mechanismus, der die Zelle vor fremder oder eigener fehlerhafter RNA schützt. Diese RNA wird sequenzspezifisch mit Hilfe kurzer RNA-Fragmente abgedaut, die "short interfering RNAs" (siRNA) genannt werden. Erste Hinweise auf diesen Mechanismus wurden als „posttranscriptional gene silencing" (PTGS, Vaucheret et al. 2001) in transgenen Pflanzen und als "quelling" in filamentösen Pilzen bekannt (*Neurospora crassa*; Cogoni and Macino 1997). Den letztendlichen Anstoß zur Erforschung des Mechanismus gab die Entdeckung von Fire et al. (1998), dass es bei der Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Nemathoden *Caenorhabditis elegans* zur Beeinträchtigung von Genfunktionen kommen kann. Die Zahl an Organismen, in denen der RNAi-Mechanismus nachgewiesen werden kann, steigt stetig. Der größte Teil der Grundlagenforschung auf diesem Gebiet wurde in *C. elegans* (Grishok and Mello 2002) und *Drosophila melanogaster* (Kao and Megraw 2004) durchgeführt. Beispiele für erfolgreiche Anwendungen von RNAi finden sich aber auch in Säugerzellen (Paddison and Hannon 2003), Protozoen (Ullu et al. 2002), in *Schizosaccharomyces pombe* (Raponi and Arndt 2003), dem Mehlkäfer *Tribolium castaneum* (Brown et al. 1999), dem Zebrafisch (Wargelius et al. 1999) und der Maus (Wianny and Zernicka-Goetz 2000).

Die RNAi-Technologie basiert auf doppelsträngigen siRNA-Molekülen, welche eine Länge von 21-26 Nukleotiden haben. In Abbildung 11 ist der Abbau von RNA durch RNAi schematisch dargestellt. Das Enzym Dicer, eine der RNase III verwandte Nuklease, zerschneidet eine lange dsRNA in kurze dsRNA Fragmente konstanter Länge, die als ds-siRNA (double stranded siRNA) bezeichnet werden. Der Multiprotein-Komplex RISC (RNA-induced silencing complex) bindet die ds-siRNA und entwindet sie zu zwei ss-siRNA (single stranded siRNA). Eine der ss-siRNAs wird dann von RISC benutzt, um andere, homologe RNA-Moleküle zu finden und zu degradieren. Zusätzlich können die so entstandenen Einzelstränge als Primer einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) fungieren. Diese vervielfältigt die Ziel-RNA und verstärkt damit den RNAi-Effekt (Hammond et al. 2000). RNAi bewirkt somit eine drastische Reduktion des Levels an Ziel-mRNA, damit verbunden eine Reduktion oder ein vollständiges Abschalten der Translation dieser mRNA. Das Enzym Dicer ist eine dsRNA-spezifische Endonuklease, die eine lange dsRNA (trigger) in kurze siRNA Fragmente mit definierter Länge abbaut. Für den RNAi-Prozess in *C. elegans* wird das Dicer Homolog RDE-4 (RDE: RNAi defekt) benötigt, ein Enzym das über zwei RNA-Bindestellen verfügt, sowie zusätzlich ATP. Die durch Dicer produzierten siRNAs sind doppelsträngig und haben einen Überhang von zwei Nukleotiden auf der 3'-Seite. Die Phosphatgruppe am 5'-Ende wird durch eine spezifische Kinase bereitgestellt. Die freie 3'-Hydroxylgruppe ist essentiell für das Starten der nachfolgenden RdRP-Reaktion (Nishikura 2001).

Der RISC-Komplex hat eine Nuklease Funktion und degradiert mRNA-Moleküle, die homolog zum "trigger" sind. Hierzu bindet RISC die kurzen siRNA Fragmente, die aus der doppelsträngigen „trigger"-RNA gewonnen werden. In *D. melanogaster* besteht der aktive Teil aus einem ~500 kDa großen Ribonukleoprotein-Komplex. Ein Teil dieses Komplexes konnte als Mitglied der Argonaut Familie (AGO2) identifiziert werden, welche essentiell für das „Gene Silencing" in *C. elegans*, *N. crassa*, und *A. thaliana* ist. In einem neueren Modell wird vermutet, dass Dicer und AGO2 physikalisch interagieren, wobei Dicer als Teil des RISC-Komplexes für die Inkorporation von siRNAs in RISC verantwortlich ist. Anschließend dissoziiert RISC von Dicer und hybridisiert mit homologen mRNAs, um diese zu degradieren (Hammond et al. 2001).

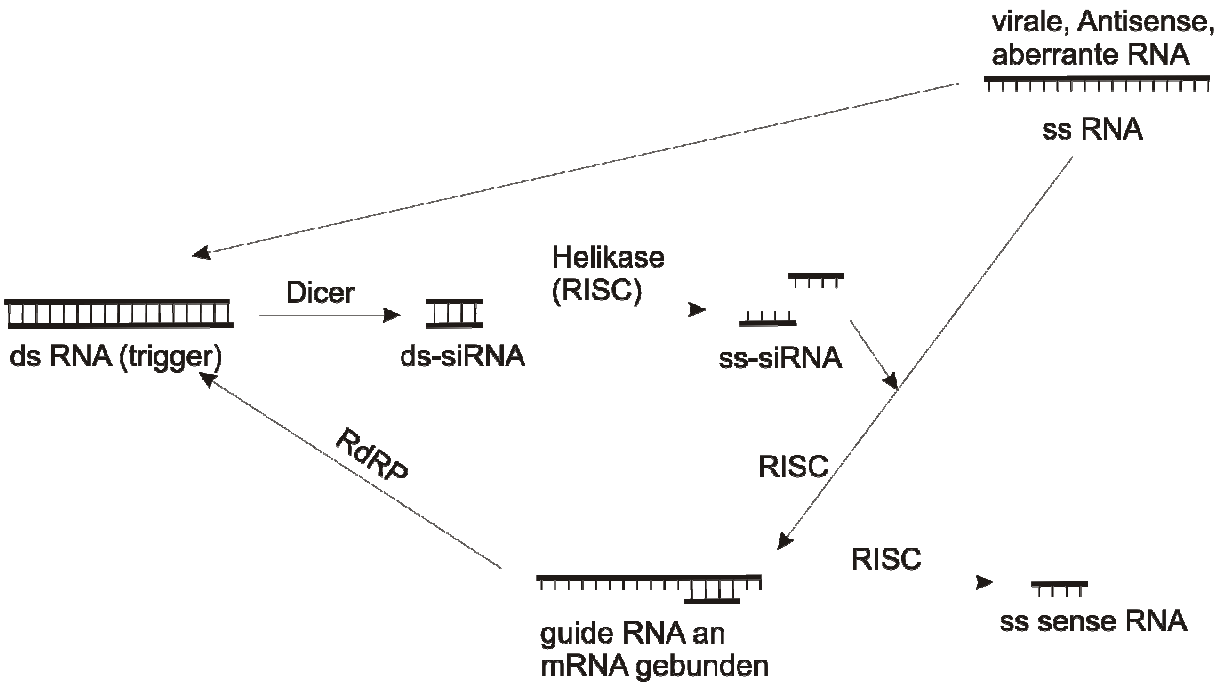


Abb. 11 Schematische Darstellung des RNAi Mechanismus (RISC: Random Induced Silencing Complex; RdRP: RNA-depended RNA Polymerase). Doppelsträngige RNA (trigger) wird durch Dicer in kurze doppelsträngige ds-siRNA Moleküle geschnitten und anschließend durch die Helikase Aktivität von RISC entwunden. Die so erzeugten einzelsträngigen ss-siRNA Moleküle werden von RISC als guide RNA an eine homologe mRNA gebunden und diese degradiert. Virale RNA, Antisense-RNA oder auch aberrante RNA wird nach Anlagerung eines ss-siRNA Moleküls durch eine RdRP repliziert und als trigger verwendet oder auch direkt als trigger verwendet.

Die Länge der "trigger" RNA ist von besonderer Bedeutung. Hammond et al. (2000) zeigten durch *in vitro* Experimente mit Zellextrakt von *D. melanogaster* einen direkten Zusammenhang zwischen der Länge der dsRNA und dem erzielten RNAi-Effekt. Die meisten RNAi Phänotypen konnten mit dsRNA einer Länge von 500 bp oder mehr erzielt werden. Kürzere dsRNA reduzierten den RNAi-Effekt drastisch, wobei dsRNA von 100 bp und weniger gar keinen Effekt mehr aufzeigten.

In Pflanzen konnten zwei Klassen von siRNAs mit unterschiedlicher Größe und Funktion gefunden werden (Hamilton et al. 2002; Tang et al. 2003). Die Klasse der langen siRNA (24-26 nt) konnte der systemischen Verbreitung des „Silencing"-Effekt sowie der Methylierung homologer DNA in Verbindung gebracht werden, eine sequenzspezifische Degradation von mRNA konnte nicht gezeigt werden. In *C. elegans* konnte so systemisch die Expression von Gene über verschiedene Gewebe hinweg unterdrückt werden, was beweist, dass RNAi nicht durch zelluläre Grenzen gestoppt wird (Winston et al. 2002). Dagegen fungiert die Klasse der kurzen siRNA (21-23 nt) anscheinend als Leitsystem für den RISC-Komplex und ist damit an der Degradation der mRNA direkt beteiligt, kann allerdings den RNAi-Effekt nicht, wie die Mitglieder der langen siRNA Klasse, über die Zellgrenze hinaus verbreiten. Die beiden

siRNA-Klassen werden dabei anscheinend von unterschiedlichen Mitgliedern der Dicer Familie produziert.

Die RNAi-Technologie hat eine wachsende Bedeutung als molekularbiologisches Werkzeug im Bereich der „functional genomics“. Hier seien nur einige Beispiel für den Einsatz von RNAi bei der Aufklärung von Genfunktionen in *C. elegans*, *D. melanogaster*, diversen Pflanzen und Säugern genannt (McManus and Sharp 2002; Kittler and Buchholz 2003): (Kamath et al. 2003) benutzten diese Technologie, um in einem genomweiten Ansatz Phänotypen von 1.722 Genen in *C. elegans* zu identifizieren. Lawrence und Pikaard (2003) beschäftigten sich mit der Herstellung rezessiver “loss-of-function” Allele für die genetische Analyse in polyploiden Spezies. Sie benutzten dazu ein einzelnes, durch RNAi induziertes Transgen, um multiple Orthologe in *A. thaliana* dominant zu reprimieren. In *A. thaliana* und *Nicotiana benthamiana* wurde ein chemisch induzierbares Cre/*lox*P Rekombinationssystem entwickelt, dass die Expression einer Intron-enthaltenden “inverted-repeat“-RNA steuert (Guo et al. 2003). Hiermit konnte die Expression von Transgenen und von endogenen Genen in verschiedenen Entwicklungsstadien ausgeschaltet werden.

Zusätzlich zur Analyse von Genfunktionen zeigt die RNAi-Technologie erhebliches Potential bei der Unterstützung von Therapien, welche die Expression von Virulenzfaktoren unterdrücken sollen (Dave and Pomerantz 2003). Der „knock-down“ einzelner oder mehrere Gene ist mit der RNAi-Technologie ist deutlich einfacher umzusetzen, als mit konventionellen Methoden. Bei allem Enthusiasmus aber, den die RNAi-Technologie geweckt hat, ist noch ein großer Forschungsbedarf vorhanden. Bevor an eine sinnvolle Anwendung als Therapeutikum gedacht werden kann, ist eine tiefergehende Erforschung des RNAi-Mechanismus unumgänglich, insbesondere wenn es um die systemische Verbreitung oder auch mögliche Nebenwirkungen geht.

Eine Immunantwort wird normalerweise durch virale dsRNA hervorgerufen. In der körpereigenen Verteidigung gegen virale und mikrobielle Infektionen spielen dabei Interferone eine wichtige Rolle. Ihre Signale werden über den Jak-Stat Signaltransduktionsweges (Janus kinase-Signal transducer and activator of transcription) transduziert, welcher auch von anderen Zytokinen und von Wachstumsfaktoren benutzt wird. Die Hauptbestandteile des Jak-Stat Weges sind Rezeptor-assoziierte Tyrosin-Kinasen, die so genannten Jaks, sowie Signal aktivierte Transkriptionsfaktoren, die Stats. Sledz et al. (2003) konnten zeigen, dass durch Transfektion mit einer 21 bp siRNA eine Interferon-vermittelte Aktivierung des Jak-Stat Wegs erfolgen kann. In den von ihnen durchgeführten Experimenten

führten verschiedene transfizierte siRNAs in einem Nebeneffekt zu einer konzentrationsabhängigen Hochregulierung der Stat1-Expression.

1.6 Fazit

Die Vorteile moderner RNA-Technologien gegenüber konventionellen Methoden zur Genregulation sind deutlich. Während die ungerichtete Mutagenese (z.B. UV-Mutagenese, chemische Mutagenese) zwar gewünschte Phänotypen erstellen kann, sind durch eine unbekannte Zahl an zusätzlichen eingefügten Mutationen nachteilige Effekte, wie z.B. eine Verlangsamung des Wachstums, häufig zu beobachten. Die gerichtete Mutagenese (z.B. „Knock-out“ und „loss-of-function“ Mutagenese, „knock-in“ und „gain-of-function“ Mutagenese) ist in vielen Bereichen etabliert, allerdings ist der Aufwand, z.B. bei der Erzeugung bestimmter Phänotypen einer Maus, erheblich. Zudem wird bei der gerichteten, wie auch bei der ungerichteten Mutagenese immer die DNA als Ziel für die Genregulation benutzt. RNA-Methoden dagegen greifen immer nur die RNA-Transkripte an, so dass eine Mutation im Gen oder in den regulatorischen Bereichen nicht erforderlich ist. Zudem ist es möglich, ein RNA-Agens von außen zu zugeben, so dass die genetische Identität des Organismus nicht verändert werden muss. Wird ein induzierbarer Promotor für die Expression des RNA-Agens *in vivo* benutzt oder das RNA-Agens von außen zugeführt, ist eine Genregulation in einem bestimmten Zeitfenstern möglich. So kann z.B. ein Produktionsorganismus zunächst bis zu einer bestimmten Wachstumsphase kultiviert werden. Erst durch Zugabe des RNA-Agens oder durch Aktivierung eines induzierbaren Promotors für die Expression eines Antisense-Moleküls, eines Ribozyms oder auch einer siRNA wird die Genexpression reduziert. Solch ein Verfahren ist insbesondere in der biotechnologischen Produktion von Metaboliten interessant. Hier ist der Herstellungsprozess oft in eine Wachstumsphase und eine Produktionsphase geteilt. Sekundärmetabolite, wie die von Pilzen gebildeten Antibiotika (z.B. Penicillin), werden erst in der stationären Wachstumsphase gebildet. Unter Zuhilfenahme der RNA-Technologie kann mit Erreichen der stationären Phase z.B. ein metabolischer Fluss umgelenkt und somit damit die Produktbildung erhöht werden.
Eine Feinregulierung der Genexpression ist durch Mutationen, z.B. in Promotorregionen, möglich. RNA-Methoden reduzieren den Arbeitsaufwand für solche eine Feinregulation erheblich, da ein RNA-Agens so konstruiert werden kann, dass eine bestimmte Effizienz in der Reduktion der Genregulation erreich wird.

Eine noch verhältnismäßig neue und noch weiter zu erforschende RNA-Technologie stellt RNAi dar, ein im Laufe der Evolution konservierter Mechanismus. RNAi nutzt die bereits in der Zelle vorhandenen Strukturen, was die erfolgreiche Anwendung dieser Methode sehr vereinfacht und zu vielen positiven Resultaten geführt hat. RNAi ist mittlerweile eine wertvolle Erweiterung des RNA-Methoden Spektrums geworden, allerdings sind Nebeneffekte gefunden worden, die zeigen, dass ein umfangreiches Verständnis des Mechanismus wie bei Antisense oder Ribozymen noch nicht gegeben ist.

Als molekularbiologische Werkzeuge lassen sich RNA-Methoden in verschiedenen Bereichen einsetzten. So wurde die Rolle der RNA im Laufe der Evolution vor allem durch die Analyse des Ribozym-Mechanismus weiterhin aufgeschlüsselt. Die "RNA World" Hypothese davon aus, dass die RNA das erste Molekül war, dass bereits vor dem Auftauchen von DNA und Proteinen vielfältigste Funktionen ausgeübt hat, darunter die Replikation und die Speicherung von Daten, sowie auch diverse katalytische Funktionen. Diese Hypothese findet zunehmende Bestätigung mit der wachsenden Erkenntnis, das viele zelluläre Vorgänge in der Tat durch RNA und nicht, wie vorher angenommen, durch Proteinen oder DNA ausgeführt werden. So konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Polypeptidketten an den Ribosomen, einer der grundlegenden Mechanismen in jeder Zelle, vom RNA-Anteil des Ribosomes durchgeführt wird. Im Laufe der Sequenzierung des humanen Genoms wurden viele Sequenzbereiche gefunden, die auf eine wichtige regulatorische Funktion von kurzen mRNA hinweisen.

In der pharmazeutischen Industrie finden sich weite Anwendungsgebiete, z.B. bei der Entdeckung und Validierung von Zielen für neue Medikamente. Die Entwicklung von Pharmazeutika stellt eine enorme wirtschaftliche Herausforderung dar. RNA-Technologien sind dabei zu einem wichtigen Hilfsmittel bei der „target-validation" geworden. Die im Rahmen des humanen Genomprojekts erzeugten Datenmengen, sowie die steigende Zahl an Proteinen, die mit Krankheitsbildern in Zusammenhang gebracht werden, erfordern zur Evaluation von Genfunktionen Verfahren mit ausgesprochen hohem Durchsatz. RNA-basierte Methoden entsprechen durch ihre hohe Spezifität und die einfach Anwendung den Anforderungen für das Screening. Darüber hinaus wird das Anwendungsspektrum von RNA-Methoden durch eine große Zahl möglicher Modifikation der RNA, wie z.B. die allosterischen Ribozyme oder auch die PNAs, erweitert.

Einer steigenden Weltbevölkerung müssen die Produktionskapazitäten der Nahrungsmittel produzierenden Industrie angepasst werden. Von besonderem Interesse für die Forschung in diesem Bereich ist einerseits die Vermeidung von Ernteverlusten durch Schädlinge, andererseits die Verbesserung der Ausbeute. Klassische Methoden der Züchtung können hier

durch RNA-Methoden sinnvoll ergänzt werden. Erste, durch RNA-Technologien optimiert Produkte, befinden sich bereits auf dem Markt (z.B. Flavr Savr Tomate).

In Pflanzen ist “RNA silencing” ein verbreiteter Mechanismus bei der Verteidigung gegen Viren. Die Erforschung und die Weiterentwicklung dieses Mechanismus könnte die Ausweitung dieser zelleigenen Verteidigungsstrategie auch auf andere Pflanzenschädlinge erweitern.

2 Aufgabenstellung

Durch den Einsatz der Ribozymtechnologie ist es möglich, gezielt die Expression einzelner Gene auf der post-transkriptionalen Ebene zu regulieren. Das bestcharakterisierte Ribozym ist das Hammerhead Ribozym (siehe auch 3.1). Es ist in seiner ursprünglichen Form Teil einer viralen RNA und an der Replikation des eigenen Genoms beteiligt ist (Haseloff and Symons 1982; Buzayan et al. 1986; Rubino et al. 1990; Miller et al. 1991). Das Hammerhead Ribozym kann sehr spezifisch nahezu jedes RNA-Substrat binden und dieses hinter der Erkennungssequenz (Abb. 4, Triplet „NHH“) schneiden.

Bis jetzt wurde das Hammerhead Ribozym zur Genregulation in verschiedenen Organismen eingesetzt, wie zum Beispiel in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Duvel et al. 2003), in humanen Zelllinien (Osada et al. 2003), in Zelllinien des Huhns (Lee et al. 1999) und der Maus (Larsson et al. 1994), in *Xenopus* (Cotten and Birnstiel 1989), in Pflanzen (Merlo et al. 1998) sowie in *Drosophila melanogaster* (Zhao and Pick 1993). Eine Anwendung von Ribozymen in Hyphenpilzen ist bisher nicht beschrieben.

Hyphenpilze sind bedeutende Produzenten einer Reihe von interessanten Proteinen sowie von primären und sekundären Metaboliten. Beispiele industriell bedeutender Enzyme, welche von Vertretern der Gattungen *Aspergillus* und *Trichoderma* produziert werden, sind Amylase, Glycoamylase, Pectinase und Phytase (Bennett 1998). Primäre Metabolite von Hyphenpilzen sind zumeinst organische Säure wie die Zitronensäure, die Itaconsäure und die Koji Säure (Grewal and Kalra 1995; Burdock et al. 2001; Willke and Vorlop 2001). Von pharmazeutischer Bedeutung sind sekundäre Metabolite, wie zum Beispiel Penicillin, Funicin und Lovastatin (Nakamura et al. 1983; Brakhage 1998; Bradamante et al. 2002). Obwohl bereits eine Vielzahl von Produkten durch Hyphenpilze hergestellt werden, ist ein hoher Bedarf an der Entwicklung weiterer Produkte sowie der Verbesserung der Produktionsstämme wie auch des Fermentationsprozesses vorhanden (Parekh et al. 2000). Herausforderungen hier liegen zum Beispiel bei der Produktion von Glycoamylase mit *A. niger* in der Beseitigung störender Nebenprodukte wie Polyolen (Röhr et al. 1987) und der Oxalsäure (Schrickx et al. 1995). Solche ungewollten Nebenprodukte müssen durch aufwendige „downstream“-Verfahren entfernt werden. Ein weiteres Beispiel für unerwünschte Produkte von Hyphenpilzen sind Mykotoxine (Bueno and Oliver 2004). Insbesondere *A. niger*, *A. oryzae* and *T. reesei* produzieren eine Reihe solcher Sekundärmetabolite wie die 3-Nitropropion Säure und das Ochratoxin A, die in Tieren und Menschen einen toxischen Effekt hervorrufen (Blumenthal 2004).

Eine Anwendung der Ribozymtechnologie als Werkzeug im „Metabolic Engineering“, z.B. zum Umleiten von metabolischen Flüssen, bietet interessante Möglichkeiten. Während konventionelle Methoden zur Regulation der Genexpression die DNA des Organismus irreversibel manipulieren, arbeitet die Ribozymtechnologie auf der RNA-Ebene, so dass die genetische Identität des Organismus nicht unbedingt verändert werden muss (Mueller and Stahl 2004).

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines sensitiven Reporter-basierten Modellsystems, das eine Funktionalität von Ribozymen in Hyphenpilzen („proof of concept“) zeigt. Als Modellorganismus dient der imperfekte Pilz *Aspergillus giganteus*, der für seine hohe Expressionsstärke und die effiziente Sekretion von Proteinen bekannt ist und somit für die biotechnologische Produktion von homologen und heterologen Proteinen genutzt werden kann (Olson and Goerner 1965; Wnendt et al. 1993; Wnendt et al. 1994; Meyer et al. 2002; Coelho and Carmona 2003). Neben einem verlässlichen Selektionssystem ist auch ein effizientes Transformationssystem für *A. giganteus* vorhanden (Wnendt et al. 1990; Meyer et al. 2002). Abbildung 12 zeigt die mRNA des Gens (*uidA* oder auch *gusA*) der β-Glukuronidase (GUS) aus *E. coli*, welche Zielgen und gleichzeitig als Reporter verwendet wird. Durch die Verwendung der β-Glukuronidase ist es möglich, eine Genaktivität qualitativ und quantitativ zu bestimmen (Jefferson et al. 1986; Flaherty et al. 1995; Gallagher 1995; Meyer et al. 2002). Ein Nachweis der Ribozymaktivität wird indirekt über die Aktivität der β-Glukuronidase mit dem GUS System geführt. Das GUS System (siehe Anhang, A6 und A7) wird als Reportersystem eingesetzt, da das Genprodukt des *uidA* Gens, die β-Glukuronidase, durch Umsatz eines chromogenen Substrates wie z.B. PNPG oder MUG einfach zu detektieren ist.

Die Arbeit gliedert sich in drei Teile. Im ersten Teil werden Ribozyme *in silico* entwickelt und in einem *in vitro* Assay getestet werden. Als Zielsequenz für die Ribozyme wird das Triplet „GUC“ ausgewählt, welches nach Literaturergebnissen die höchste Restriktions-Effizienz bietet (Ohkawa et al. 1995; Kore et al. 1998). Es soll zusätzlich ein Einfluss der Länge der bindenden Bereiche der Ribozyme überprüft werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wird *A. giganteus* mit Ribozym und Reporter exprimierenden Plasmiden transformiert. Positive Transformanten werden in einem GUS Assay auf eine Ribozym Aktivität untersucht.

Im dritten Teil werden die aus den *in vitro* und *in vivo* Analysen erhaltenen Daten verglichen um mögliche Regeln zu erstellen, nach denen Ribozyme für eine effiziente Genregulation in Hyphenpilzen konstruiert und eingesetzt werden können.

2.1 Expressionsanalyse mit Hilfe des Reporters ß-Glukuronidase

Das ß-Glukuronidase Gen *uidA* aus *E. coli* wurde erstmals 1986 von Jefferson et al. (1986) isoliert und als Reportergen für die Erforschung der Genexpression in Pflanzenzellen genutzt. In höheren Pflanzen wie auch in anderen Organismen, z.B. in vielen Hefen, Pilzen, Insekten und einigen agrarwirtschaftlich wichtigen Bakterien, konnte bislang keine aktive endogene ß-Glukuronidase nachgewiesen werden, welche sich störend auf ein extern eingebrachtes GUS System auswirken würden.
Eine Spezifität für eine große Anzahl an chromogenen ß-konjugierten Glukuroniden ermöglicht die Aktivität der ß-Glukuronidase mit Hilfe von spektrophotometrischen, fluorometrischen oder histochemischen Nachweismethoden zu verfolgen. Die Enzymaktivität kann auch durch Zugabe von Substraten direkt in das Medium *in situ* sichtbar gemacht werden.

2.2 Ansprüche an das in vivo *Ribozymsystem*

Für den Nachweis der Funktionalität von Ribozymen in Hyphenpilzen soll ein Modelsystem etabliert werden, das verschiedene Kriterien erfüllt.
Ein wichtiger Faktor für den Einsatz von Ribozymen *in vivo* ist deren intrazelluläre Stabilität. Eine Zufuhr von stabilen, modifizierten Oligonukleotiden z.B. durch Endozytose, wie es bei der Transfektion von Säugerzellen zum Standard geworden ist (Smyth Templeton 2002), konnte bei Hyphenpilzen noch nicht gezeigt werde. Somit ist der Einsatz von chemisch modifizierten oder synthetischen Nukleotiden mit erhöhter Stabilität nicht möglich. Das anzuwendende Ribozym unterliegt daher wie jede andere RNA den zellulären RNA Degradationsmechanismen (Hentze and Kulozik 1999). Cotten et al. (1989) konnten zeigen, dass in nuklearem Zellextrakt ein Überschuss an Ribozym gegenüber der Ziel-mRNA von über dem 1000fachen notwendig ist. Um einen ausreichenden Ribozym Level zu gewährleisten, muss der induzierbare Promotor also zusätzlich eine hohe Expressionsrate gewährleisten. Zudem soll der Promotor induzierbare sein, um den Ribozymeinsatz auch im

Hinblick auf spätere technische Anwendungen möglichst variabel zu gestalten. Für die Expression des Reportergens soll dagegen ein schwacher Promotor ausgewählt werden, so dass auch die Reduktion der Reporteraktivität durch nur schwach aktive Ribozym noch gemessen werden kann.

Ein weiterer Faktor, der die Effizienz von Ribozymen beeinflusst, ist die Zugänglichkeit des mRNA-Substrates *in vivo*. Im Gegensatz zu den Bedingungen *in vitro* ist die freie Diffusion in dem komplexen zellulären Umfeld kaum möglich. Daher sollten Ribozym und Substrat kolokalisiert vorliegen, so dass das Ribozym die Substrat-mRNA erreichen und mit ihr hybridisieren kann (Castanotto et al. 2002).

Die folgenden Anforderungen sollen zum einen eine hohe Flexibilität des Modellsystems gewährleisten, andererseits mögliche negative Einflüsse auf die Ribozymaktivität reduzieren:

- Starker und induzierbarer Promotor für die Expression der Ribozyme
- Schwacher Promotor für die Expression des Zielgens *uidA*
- Kolokalisierung von Ribozym und Substrat

Der induzierbare *alcA* aus *A. nidulans* Promotor zur Steuerung der Ribozym Expression

Der *alcA* Promotor aus *Aspergillus nidulans* ist als einer der stärksten induzierbaren Pilzpromotoren bekannt und gewährleistet einen hohen Expressionslevel für die Expression der Ribozyme (Felenbok 1991; Felenbok and Sealy-Lewis 1994). Der *alcA* Promotor wird durch primäre Alkohole, primäre Monoamine oder auch L-Threonin induziert. Diese Substanzen werden in ein aliphatisches Aldehyd umgewandelt, zumeist Acetaldehyd, welches dann als eigentlicher Induktor fungiert (Flipphi et al. 2002).

Aufgrund der Induzierbarkeit und der Expressionsstärke soll der *alcA* Promotor für die Steuerung der Transkription der Ribozyme in dem zu erstellenden Modellsystem benutzt und daher zunächst auf seine Funktionalität in *A. giganteus* getestet werden.

Der *pah4* Promotor aus *Podospora anserina*

Ein stark exprimiertes Ribozym kann unter Umständen nicht zu einer ausreichenden Reduktion der Konzentration an Ziel-mRNA führen, wenn das Zielgen ebenfalls über eine sehr hohe Expression verfügt (z.B. bei Genen der Glykolyse, C. Vilches, pers. Mitteilung). Um die Funktionalität von Ribozymen in *A. giganteus* nachzuweisen, soll geringe Konzentration an Ziel-mRNA in der Zelle vorliegen. Der *pah4* Promotor steuert die Expression der α-Helikase 4 in *Podospora anserina* und wird als schwacher Promotor beschrieben (Lüking 1997). Da es sich hier um einen Pilzpromotor handelt, ist eine

Funktionalität in *A. giganteus* wahrscheinlich. Es soll zunächst die Funktionalität des *pah4* Promotors in *A. giganteus* sowie die geforderte schwache Expression des *uidA* Gens überprüft werden.

Kolokalisation von Ribozym und Zielgen

Um die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion von Ribozym und Substrat mRNA innerhalb der Zelle zu erhöhen sollen diese in räumlicher Nähe transkribiert werden (Castanotto et al. 2002). Daher werden Ribozym und Substrat gemeinsam auf einem Plasmid lokalisiert. Als Selektionsmarker soll die Hygromycin Resistenz benutzt werden, die bereits erfolgreich in *A. giganteus* Anwendung gefunden hat (Wnendt et al. 1990). Der *gpdA* Promotor aus *A. nidulans* steuert die Expression des Hygromycin Resistenzgens *hph*, zur Termination wird der *bt* Terminator aus *Neurospora crassa* benutzt.

Eine homologe Integration in *A. giganteus* ist bis jetzt nicht beschrieben. Es ist daher von einer ektopischen Integration von Fremd-DNA auszugehen. Hierbei sind unvorhersehbare Rekombinationsereignisse nicht auszuschließen. Des Weiteren ist eine Integration in weniger stark transkribierte Bereiche des Genoms möglich. Eine Kontrolle der Transformanten soll ausschließlich über die Selektion durch Hygromycin erfolgen, da weitere Kontrollen der Integrität transferierter Plasmide (PCR Analysen, Sequenzierung) einen zu hohen Aufwand erfordern. Um diese verschiedenen, nicht vorhersehbaren Faktoren zu berücksichtigen, sollen etwa 20 Transformanten für jedes Ribozym hergestellt und analysiert werden, um eine statistische Absicherung zu erzielen. Somit können neben Transformanten mit Integrationen, die zur Rekombination essentieller Sequenzen führen oder in transkriptionell ungünstigen Regionen erfolgen, auch solche Transformanten erhalten werden, die die Ribozym- und die Reporterkassette unverändert integriert haben und in ausreichender Stärke exprimieren.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Autoklav:	165 l, Fedegari-Pavia, Italien
Brutschrank:	Typ 5050, Heraeus, Hanau
Dismembrator:	Mikro-Dismembrator, B.Braun, Melsungen
Elektrophoresekammern:	Midi, AGS, Heidelberg; Mini/Maxi, Renner, Dannstadt
FastPrep®	QBiogene
Geltrockner	Zabona AG, Basel
Gel Photodokumentation	INTAS, Göttingen
Hybridisierungsofen	Biometra OV1, Biometra, Freiburg Mini Oven MKII, MWG-Biotech
Kontaminationsmonitore:	LB 1210B, Berthold, Wildbad Series 900 mini-monitor, Mini-instruments Ltd., Essex, England
Mikroskop:	Leitz, Wetzlar
PCR-Geräte:	T-Gradient Whatman, Biometra, Göttingen, FTS-4000 Capillary, Fast Thermal Sequencer, Fröbel
Pipetten:	P20, P200, P1000, Gilson, Frankreich
posi-blot Apparatur	Stratagene GmbH, Heidelberg
Rotoren:	SS34 u. GSA, Festwinkelrotoren, DuPont, Bad Homburg
Röntgenfilmbelichtungskassetten:	Kodak X-Omatic mit Regular-Verstärkerfolien
Szintillationszähler	Wallac 1409 DSA, Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg
Software:	DNASTAR, Lasergene, USA, Clustal, EMBL, Heidelberg, RNAdraw, Stockholm, Schweden
Spannungsgeber:	Phero-Stab 500, Biotec-Fischer, Reiskirchen, Consort E752
Spektrophotometer:	Uvikon XS mit Thermopack, Bio-Tek, Italien
Speed Vac	Speed Vac Concentrator; Savant
Sterilbank	uvub 1200 Uniflow, Martinsried
Ultraschallbad:	Sonorex TK52, Bandelin, Berlin
UV-Crosslinker:	UV StratalinkerTM 1800, Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator:	Intas, Göttingen, TF-35-C, Vilber Lourmat
Videodokumentation:	Intas, Göttingen
Waagen:	Typ 1907 und Typ 2462, Sartorius, Göttingen
Wasserbäder:	GFL-Typ 1083 und 5001,GFL, Burgwedel RM6, Lauda, Deutschland, Julabo SW-20C, Thermed 5001, GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	Sorvall RC-5B, DuPont, Bad Homburg Mikrorapid K, Hettich, Tuttlingen

3.2 Anzuchtmedien, Puffer und Lösungen

2x B&W Puffer	10 mM Tris/HCL, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2 M NaCl
5x TBE	45 mM Tris-Borat; 1 mM EDTA
20xSSC	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, pH 7,0
20xTAE-Stammlösung	20 mM Natriumacetat (wasserfrei), 40 mM Tris-Base, 2 mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 8,3
50x TAE	50 mM Na-Acetat.3 H_2O; 100 mM Tris; 5 mM EDTA
Acrylamidgel	6 %ig (Sequenzierung): 20 mg Harnstoff, 6,3 ml 40 % Acrylamid / Bisacrylamid (38:2), 8 ml 5x TBE ad 40 ml H2O 5 %ig (DNA-GEL): 5,26 ml 40 % Acrylamid / Bisacrylamid (38:2), 8 ml 5x TBE ad 40 ml H_2O
Acrylamidlösung	40 % Acrylamid/Bisacrylamid (38:2)
AN-Prot-Ex-buffer	25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM KCl 5 mM MgCl2, 0,1 mM EDTA pH 8.0, 10% Glycerin, Autoklavieren. Frisch zugeben: 7 µl β-Mercaptoethanol und 100 µl 100 mM PMSF auf 10 ml AN-Prot-Ex-buffer
DEPC H_2O	0,1 % DEPC in 1 l H2O

DNA Probenpuffer	60 % Saccharose, 20 mM EDTA, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylene Cyanol
DNA-Extraktionspuffer	10 mM Tris/HCl, 0,1 M EDTA, 0,5 % SDS, pH 8,0
EtBr-Färbelösung	0,3 µg/ml EtBr in entionisiertem H_2O
Formamid-Lösung	10 mM EDTA, pH 8,2; 95 % Formamid
GUS-Assaypuffer	50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, 0,1 % Triton X-100, 10 mM ß-Mercaptoethanol, pH 7,0
GUS-Extraktionspuffer	50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, 0,1% Triton X-100, 0,1 % Sarkosyl, 10 mM EDTA, 10 mM ß-Mercaptoethanol, pH 7,0
LB-Medium	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro Liter mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
Luminol-Lösung	250 mM Luminol in 5 ml DMSO
MOPS, 10x	0,2 M Mops (N-Morpholino Propansulfon Säure), 0,05 M NaOAcetat ($3H_2O$), 0,05 M NaOAcetat (wasserfrei), 0,01 M EDTA, ad 1l H_2O
M-Medium	nach Cove 1966: 20 ml Salzlösung, 10 ml 1M $NaNO_3$, 10 g Glukose pro Liter (für Protoplastenregeneration 0,8M Sorbit zufügen), Salzlösung: 26 g KCl, 26 g MgSO4 · $7H_2O$, 76 gKH_2PO_4, 20 ml Spurenelement-Lösung pro Liter (Spurenelement-Lösung: 26 mg H_3BO_3, 400 mg$CuSO_4{\cdot}5H_2O$, 1200 mg $FeSO_4{\cdot}7H_2O$, 800 mg $MnSO_4{\cdot}2H_2O$, 8 g $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ pro Liter)
MUG Assay Extraktionspuffer	50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.0; 0,1 % Trition X-100; 0,1 % Sarkosyl; 10 mM EDTA; 10 mM β-Mercaptoethanol (7 µl auf 10 ml Extraktionspuffer, frisch zugeben)
MUG Assay Assay-Puffer	Extraktionspuffer incl. 2 mM MUG
p-Coumarsäurelösung	90 mM p-Coumarsäure in 5 ml DMSO
PEG-Lösung	8 % PEG 2000; 1 mM EDTA; 0,2 M NaCl; 10 mM Tris/HCl, pH 7,6
Prä-/Hybridisierungspuffer	50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, 7 % SDS,
nach Church & Gilbert	0,1 % $Na_4O_7P_2$, 2 mM EDTA, pH 7,0
Rapid-hyb Puffer-System	Amersham, ohne Angaben
RNA Denaturierungs-Lösung	250 g Guanidinisothiocyanat, 293 ml DEPC H_2O, 17,6 ml 0,75 M Na-Citrat, 26,4 ml 10% N-Laurylsarcosine
RNA Probenpuffer	80 % Formamid; 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylene Cyanol
RNA Loading buffer	720 µl Formamid, 160 µl 10x Mops, 260 µl Formaldehyd (37%), 220 µl DEPC H_2O, 100 µl 80 % Glycerin, 40 µl Bromphenolblau (gesättigte Lösung), 7,5 µl EtBr (10 mg/ml), ad 2 ml H_2O
RNA-Stopppuffer	8 M Urea, 50 mM EDTA, 7,5 % Glycerin, 0,05 % Bromophenol Blau und 0,05 % Xylene Xylanol Blue
SMC-Puffer	20 mM MES/NaOH, 50 mM $CaCl_2$, 0,8 M Sorbit, pH 5,8
STC-Puffer	10 mM Tris/HCl, 50 mM $CaCl_2$, 0,8 M Sorbit, pH 7,5
TBS-T Puffer	20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,6
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA
TFBI	30 mM KoAc, 50 mM $MnCl_2$,100 mM RbCl,10 mM $CaCl_2$, 15 % Glycerol, pH 5,8 mit 2 N Essigsäure, Sterilfiltrieren
TFBII	10 mM NaMOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2$, 15 % Glycerol, pH 7 mit 2 N NaOH, Sterilfiltrieren
YPG-Medium	3 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 20 g Glukose pro Liter mit Essigsäure auf pH 4,5 einstellen

3.3 Enzyme, Chemikalien und Kits

[α-^{32}P]UTP, [α-^{35}S]ATP, [γ-^{35}S]ATP	Hartmann, Braunschweig
γ-Globulin, Agarose Seakem LE	BMA, USA
Ampicillin, IPTG, PNPG, Phenol	BioMol, Hamburg
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Chromatographie-Papier	Whatman, 3MM Chr, England
DIG-DNA Labeling Mix	Roche, Mannheim
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim
Streptavidin Beads	Promega, Mannheim
Dynabeads Separator	MPC-E-1, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg
FMC-Agarose	Seakem, Biozyme, Hameln
GeneRuler™, Taq Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Glucanex	GW Biotechnologie, Bad Kreuznach
LigaFast™ Rapid DNA Ligation System, Streptavidin Magnesphere Paramagnetic Particles	Promega, Mannheim
Hybond N Membranen	Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig
Hygromycin B, Novozym 234	Calbiochem, Frankfurt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Nylonmembran Hybond N	Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
MES, Tris, Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Quarzwolle (1mm), Sorbit, X-Gluc	Roth, Karlsruhe
QIAGEN Midi/Maxi Plasmid Preparation Kit, QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Düsseldorf
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Röntgenfilme NewRX	Fuji, Japan
Röntgenfilmentwickler	Kodak, Stuttgart
T7 Sequencing Kit	Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig

In dieser Liste nicht aufgeführte Substanzen oder Produkte wurden in der Regel von den Firmen Serva, Merck, Boehringer-Mannheim, MBI Fermentas oder Sigma bezogen. Alle Chemikalien waren von Per-Analysis-Qualität oder höherem Reinheitsgrad

3.4 Stämme

E. coli JM 110	*rpsL(Str^r), thr, leu, thi-1, lacY, galK, galT, ara tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ(lac-proAB)[F´ traD36, proAB, lacIq, lacZ*ΔM15]; Stratagene, Heidelberg
E.coli XL1-blue	*supE44, hsdR17 (r_{k-}, rk_+), recA1, endA1, thi, gyr A46, relA1, lac$^-$*, F$^-$ *(proAB$^+$, lacI^q, lacZΔM15, tn10(tet^r))*, Stratagene, Heidelberg
A. giganteus 0903	identisch mit Stamm Kraepelin; Stammsammlung des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin
A. nidulans 1701	Stammsammlung des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin
A. nidulans 1702	Stammsammlung des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin
A. nidulans 1704	Stammsammlung des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin
A. nidulans 1709	Stammsammlung des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin
A. nidulans 1711	Stammsammlung des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin

3.5 Plasmide

pAlcAmut	Mutierte Version des *alcA* Promoters aus *A. nidulans* 1711 in pGEM®-T Easy
pAN7-1	pUC18-Derivat, Hygromycin-B Resistenz-Gen aus *E. coli* unter Kontrolle des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Gen Promotors (*gpdA*) und des *trpC*-Terminators (Punt et al. 1987)
pBT6	pUC12 Derivat, enthält β-Tubulin Gen aus *Neurospora crassa* (Orbach et al. 1986)
pGEM®-T Easy	lineares Plasmid mit *E. coli lacZ* Gen (Promega)
pGEM-T Easy self	Durch Selbstligation gewonnene zirkuläre Variante des Vektors
pHAU1	pNOM102 Derivat, *gpdA* Promotor gegen *alcA* Promoter aus *A. nidulans* 1711 ausgetauscht, Hygromycin-B Resistenz-Kassette
pHAU2	*alcAmut* Promoter aus pAlcAmut in die Position des *alcA* Promoters aus pHAU1 ligiert
pHah4uidA	pHNOM102-Derivat, der *gpdA* Promoter wurde gegen den α–Helikase Promotor (*pah4*) aus *Podospora anserina* ausgetauscht
pHNOM102	pNOM102-Derivat mit eingefügter Hygromycin-B Resistenz - Kassette
pNOM102	pUC18-Derivat, *uidA* Gen aus *E. coli* unter Kontrolle des *gpdA* Promotors und des *trpC* Terminators ebenfalls aus *Aspergillus nidulans* (Roberts et al. 1989)
pRx-yVz	pNOM102 Derivat, *gpdA* Promotor gegen *pah4* Promotor ausgetauscht, hph Gen aus pAN7-1, x-y: Nummer des Ribozyms, z: Einbaurichtung der hph Kassette
pSUB1-1	pGEM-T easy self, in den das β-Glukuronidase Gen *uidA* aus pNOM102 in die *NcoI* Schnittstelle eingebaut wurde
pU-H4	

3.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried synthetisiert

Oligonukleotid	Sequenz
GEMseqI	5'-CCCATATGGTCGACCTGC-3'
GEMseqII	5'-AAAGGAGCGGGCGCTAGG-3'
T7 Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
uid1	5'-ATATCTGCATCGGCGAACTG-3'
uid3	5'-TCGATAACGTGCTGATGGTG-3'
uid4	5'-AACGTATCCACGCCGTATTC-3'
uid5	5'-TCATCAATCACCACGATGCC-3'
alcAmut1	5'-AAACGAGCGGGGCCTCGTAC-3´
alcAmut2	5'-GAGGCCCCGCTCGTTTGTG-3´
alcAmut3	5'-GGGCCCTGCAGGTAAGTCCCTTCGTATTTCTCCG-3´
3'alcA-ApaI	5'-GGGGGCCCATTTTGAGGCGAGGTG-3´
5'tef-SphI	5'-TTTGCATGCTCAGTACTGACAATAAAAAGATTC-3´
3'tefSS	5'-CGAGCATGCCTGCAGGGTTCTCGAGAGCTCG-3'
a4asym	5'-TACAGGACGGACCAT-3'
a5asym	5'-ATCCAGACTGAATGCC-3'
5'btter-Sal	5'-CATTCCAGTCGACATTCAGG-3´
3'btter-Sac	5'-GAGCTCGGCCAGCAGTAG-3´
5'alcA	5'-TGTGTGGAGCTACCATCC-3´
3'alcA-Bam	5'-GGATCCTTGGTTGATGATGTTGG-3´
3'alcA-NcoI	5'-TGCCCATGGTGAGGCGAGGTGATAGG-3´
5'alcA-ApaI	5'-TAGGGCCCTTCGTATTTCTCCGCCTG-3´
5'alcA-EcoRI	5'-AGTGAATTCGTATTTCTCCGCCTGTG-3´
5'-alcASbfI	5'-CCTGCAGGTAAGTCCCTTCGTATTTCTCCG-3´
3'alcA-ApaI	5'-GGGGGCCCATTTTGAGGCGAGGTG-3´
ah4EcoRI5'	5'-ATAGAATTCCACCTCGAAAAGTCGCAGG- 3´
ah4NcoI3'	5'-TATCCATGGGCCGCCGCTGAGTTGATCGG-3´
hyg1	5'-TCAGCTTCGATGTAGGAGGG-3´
hyg2	5'-TGTATTGACCGATTCCTTGCG-3´

Oligonukleotid	Sequenz	Ribozym Name
rz4sym_u	5'-CGTTTCTACAGCTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACGGACCATGCATG-3'	rz4sym
rz4sym_l	5'-CATGGTCCGTTTCGGCCTTTCGGCCTCATCAGCTGTAGAAACGGGCC-3'	
rz4asym_u	5'-CTACAGCTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACGGACCATGCATG-3'	rz4asym
rz4asym_l	5'-CATGGTCCGTTTCGGCCTTTCGGCCTCATCAGCTGTAGGGCC-3'	
rz5sym_u	5'-CTCGCGATCCACTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACTGAATGCCGCATG-3'	rz5sym
rz5sym_l	5'-CGGCATTCAGTTTCGGCCTTTCGGCCTCATCAGTGGATCGCGAGGGCC -3'	
rz5asym_u	5'-CATCCACTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACTGAATGCCGCATG-3'	rz5asym
rz5asym_l	5'-CGGCATTCAGTTTCGGCCTTTCGGCCTCATCAGTGGATGGGCC-3'	
rz6u	5'-CACATTCTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACGCAGGTGAGCATG-3'	rz6asym
rz6l	5'-CTCACCTGCGTTTCGGCCTTTCGGCCTCATCAGAATGTGGGCC-3'	
rz7u	5'-CATAAACTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACTTCGCGCTGCATG-3'	rz7asym
rz7l	5'-CAGCGCGAAGTTTCGGCCTTTCGGCCTCATCAGTTTATGGGCC-3'	
rz8u	5'-CTTATTCTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACCCACACTTGCATG-3'	rz8asym
rz8l	5'-CAAGTGTGGGTTTCGGCCTTTCGGCCTCATCAGAATAAGGGCC-3'	
rz9u	5'-CAGTAACTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACTGCTTTTTGCATG-3'	rz9asym
rz9l	5'-CAAAAAGCAGTTTCGGCCTTTCGGCCTCATCAGTTACTGGGCC-3'	
rz10u	5'-CGCTGTCTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACGCACAGTTGCATG-3'	rz10asym
rz10l	5'-CAACTGTGCGTTTCGGCCTTTCGGCCTCATCAGACAGCGGGCC-3'	

3.7 Methoden

3.7.1 Anzucht von *E. coli*, *A. giganteus* und *A. nidulans*

E. coli wurde in 20 ml oder 100 ml LB-Medium bei 37 °C und 120 rpm kultiviert. Für die Anzucht von rekombinanten *E. coli* Stämmen, die ein plasmidkodiertes Ampicillin Resistenzgen tragen, wurde das LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert.
A. giganteus und *A. nidulans* wurden in YPG- oder M-Medium (Cove 1966) bei 28 °C kultiviert. Für DNA- oder Proteinextraktionen wurden 40 ml Kulturen in 100 ml Erlenmeyerkolben eingesetzt. Zum Beimpfen wurden Sporen mit 5 µl einer 0,05 % Triton X-100 Lösung von einem Myzelrasen abgenommen und auf dem neuen Medium ausplattiert. Für die Kultivierung von Transformanten wurde dem Medium (M-Medium) 75 µg/ml Hygromycin B bzw. 40 µg/ml X-Gluc (YPG-Medium) zugesetzt.

3.7.2 Transformationsmethoden

Transformation von *E. coli* JM 110
Vorkultur von *E. coli* wurde in 20 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 120 rpm angezogen. Hieraus wurde eine Hauptkultur mit 100 ml LB-Medium 1%ig angeimpft und bei 37 °C und 120 rpm bis zu einer optischen Dichte OD_{610} von 0,4 - 0.5 bebrütet. Anschließend wurden die Zellen in GSA Becher überführt und für 10 min auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min. Das Pellet wurde vorsichtig auf Eis in 15 ml TFBI Puffer resuspendiert und in ein SS34 Röhrchen überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C. Das resultierende Pellet wurde vorsichtig auf Eis in 4 ml TFBII Puffer resuspendiert und Aliquots zu 120 µl abgefüllt und bei –70 °C gelagert.
Für die Transformation von *E. coli* JM 110 wurden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Es wurden 100 µl PEG-Lösung und 10 µl Ligationsansatz dazugegeben. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich geschüttelt. Anschließend erfolgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Zur Regeneration wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 90 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit 0,01 % Ampicillin als Selektionsdruck ausplattiert und für 24 h bei 37 °C bebrütet.

Transformation von *Aspergillus giganteus* 0903
Aspergillus giganteus 0903 wurde nach einer Methode von Meyer et al. (2002) protoplastiert und transformiert, welche auf von Yelton et al. (1984) und Wnendt et al. (1991) beschrieben Methode basiert,. Die Transformation basiert auf der Herstellung von Protoplasten aus ausgekeimten Konidien und der Aufnahme der DNA in Gegenwart von Polyethylenglycol.
Für die Protoplastierung wurden 108 frisch geerntete Konidien in 200 ml YPG-Medium in einem 1l Fernbachkolben ohne Schütteln für 22 h bei 28 °C kultiviert. Dieses junge Myzel wurde über einen sterilen Kaffeefilter abfiltriert, mit SMC-Puffer gewaschen und in 30 ml SMC-Puffer resuspendiert. Die Protoplastierung erfolgte in Gegenwart von 500 mg Glucanex ohne Schütteln für 4 h bei 28 °C. Anschließend wurde die Suspension über Quarzwolle in SS34 Zentrifugenröhrchen filtriert und für 10 min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert (SS34 Rotor). Nach der Resuspendierung in 5 ml STC-Puffer und erneuter Zentrifugation wurden die Protoplasten schließlich in 500 µl STC aufgenommen und direkt für die Transformation eingesetzt.
Die Transformation wurde in einem 2 ml Eppendorfgefäß durchgeführt. Dabei wurden 85 µl der Protoplastensuspension ($2x10^6$/ml - $7x10^6$/ml) mit etwa 5-10 µg Plasmid-DNA (in 20 µl H_2O) und 330 µl PEG-Lösung (60 % (w/v) Polyethylenglycol 4000, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 50 mM $CaCl_2$) versetzt, vorsichtig vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 min und 20 min wurden jeweils weitere 330 µl PEG-Lösung zugefügt. Nach 30 min wurde das Reaktionsgemisch mit 1 ml STC-Puffer auf ein Endvolumen von 2 ml aufgefüllt. Aliquots von 500 µl wurden mit 5 ml flüssigem und auf 47 °C temperiertem 0,75 % Top-Agar (M-Medium mit Sorbit) vermischt und auf 20 ml 1,5 % Basis-Agar der gleichen Zusammensetzung ausplattiert. Nach einer Regenerationszeit von 16-18 h bei 28 °C wurden die Platten mit jeweils 5 ml 0,75 % Top-Agar (M-Medium mit Sorbit) mit Hygromycin-B überschichtet, so dass die Konzentration des Antibiotikums bezogen auf das Gesamtvolumen des Mediums bei 75 µg/ml liegt. Nach 4-5 Tagen Inkubation bei 28 °C erscheinen hygromycinresistente Kolonien. Um homokaryotische Sporen zu erhalten, wurden die Transformanten vereinzelt, indem sie wiederholt (5x) auf M-Medium zuzüglich Hygromycin B ausplattiert wurden.

Passagieren von positiven Transformanten und Überprüfung auf homokaryotische Konidien
Um homokaryotische Transformanten von *A. giganteus* zu erhalten wurden die Konidien von Primärtransformanten mittels Ultraschall in Lösung (0,05 % Triton-X100) gebracht und auf frische Medium Platten mit Hygromycin B inokuliert. Nach der Sporulation wurden wiederum Sporen einer einzelnen Kolonie gelöst und auf M-Medium Platten mit Hygromycin B ausgekeimt. Durch fünfmaliges Wiederholen dieser Prozedur wurden ausschließlich homokaryotische Konidien selektiert. Dies wurde durch Ausplattieren der passagierten Konidien auf M-Medium Platten mit bzw. ohne Hygromycin B überprüft.

3.7.3 Konstruktion der Plasmide

Plasmid pGEM-T Easy self
Für eine Selbstligation wurden 1 µl des Plasmids pGEM®-T Easy in einem 10 µl Ligationsansatz mit dem Rapid Ligase System (Promega) nach Angaben des Herstellers ligiert. Dies ergab das Plasmid pGEM-T Easy self.

Plasmide pRZx
Die Plasmide pRZx wurden für die *in vitro* Transkription der Ribozyme eingesetzt. Jeweils 5 µl (10 pmol/µl) des oberen und unteren Strangs eines synthetischen Oligonukleotids (z.B. rz4asym_u und rz4asym_l) wurden in einem Eppendorfgefäß vereint und für eine Minute bei 95 °C denaturiert. Eine anschließende Inkubation bei RT für 15 min erlaubte die Hybridisierung der homologen Bereiche. Der so entstandene Ribozym Doppelstrang besitzt 5’ und 3’ überhängende Enden, über welche Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Apa*I und *Sph*I eingeführt wurden (Abb. A1). Diese Schnittstellen wurden für die orientierte Ligation in das Plasmid pGEM-T Easy self benötigt. Der Vektor pGEM®-T Easy self wurde mit den Restriktionsenzymen *Apa*I und *Sph*I restringiert, was eine Ligation des Ribozym Doppelstranges 25 nt abwärts vom Startpunkt der Transkription des T7 Promoters (Chapman and Wells 1982) erlaubte. Die konstruierten Plasmide wurden in einer Sequenzierung auf eine korrekte Ribozymsequenz überprüft.

Plasmid pSUB1-1
Aus dem Plasmid pNOM102 (Roberts et al. 1989) wurde mit dem Restriktionsenzym *Nco*I das 1878 bp große *uidA* Gene ausgeschnitten und nach gelelektrophoretischer Auftrennung eluiert (Abb. a3). Das eluierte Fragment wurde in den vorher mit *Nco*I geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pGEM-T easy self ligiert, das resultierende Plasmid pSUB1-1 daraufhin in *E. coli* JM110 transferiert.

Plasmid pPRZTx
Der *tef* (*Ashbya gossipi*)Terminator aus dem Plasmid pUG6 wurde mit dem Primerpaar 5'tef-SphI/3'tefSS amplifiziert, mit *Sph*I geschnitten. und in den mit *Sph*I linearisierten pRZx ligiert (Abb. A2). Das so entstandene Plasmid pRZTx wurde mit *Apa*I linearisiert und der mit *Apa*I aus pHAU2 ausgeschnittene Promoter *alcAmut* einligiert, um das Plasmid pPRZTx zu ergeben. Parallel wurde der *gpd*A Promoter aus dem Plasmid pNOM102 durch Restriktion mit *Eco*RI und *Nco*I entfernt und durch den aus einer PCR mit dem Plasmid pU-H4 und dem Primerpaar ah4EcoRI5'/ah4NcoI3' gewonnenen und ebenfalls mit *Eco*RI und *Nco*I geschnittenen *pah4* Promoter ersetzt (Abb. a4). Das resultierende Plasmid pah4uidA wurde mit *Hind*III linearisiert und die mit *Hind*III aus pGH3 (Meyer 2001) ausgeschnittene Hygromycin Expressionskassette einligiert. Das resultierende Plasmid trägt den Namen pHah4uidA. Die Ribozym Expressionskassette wurde mit *Sbf*I aus pPRZTx ausgeschnitten und in die *Sbf*I Schnittstelle von pHah4uidA ligiert. Das resultierende Plasmid pRx (z.B. pR4) wurde mit *Ehe*I linearisiert und in *A. giganteus* transferiert.

Plasmid pHAU2
Der gpdA Promotor wurde mit *Eco*RI und *Nco*I aus dem Plasmid pNOM102 (Roberts et al. 1989). Der *alcA* Promotor wurde mittels PCR mit dem Primerpaar 5’alcA-EcoRI/3’alcA-NcoI aus *A. nidulans* 1709 amplifiziert. Über die eingefügten *Eco*RI und *Nco*I Schnittstellen wurde der *alcA* Promotor in das vorher linearisierte Plasmid eingefügt, was das Plasmid pAU1 ergab. In die *Hind*III von pAU1 wurde die mit *Hind*III aus pGH3 (Meyer 2001) ausgeschnittene Hygromycin Expressionskassette einligiert; das resultierende Plasmid wurde pHAU1 genannt. Über eine Restriktion mit *Eco*RI und *Nco*I wurde dann der Promotor *alcA* durch den Promotor *alcAmut* ausgetauscht, was das Plasmid pHAU2 ergab.

3.7.4 DNA Methoden

Plasmidisolation aus E. coli
Minipräparation:
Die *E. coli* Transformanten wurden über Nacht in 1,5 ml LB-Medium mit 0,01 % Ampicillin in einem 2 ml Eppendorfgefäß bei 37 °C mit 120 rpm inkubiert. Die Zellen wurden für 3 sek bei 12000 rpm und Raumtemperatur pelletiert und das Pellet in 100 µl TE/RNase (90 µl TE Puffer + 10 µl RNase A, 1µg/µl) aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer (0,1 % SDS, NaOH) wurde die Lösung kurz vorsichtig gemischt und für 3 - 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl eiskaltem 3 M NaOAc, pH 4,8 gestoppt und danach für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur und 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 400 µl Isopropanol und Mischen für 15 min bei 4 °C mit 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes in der speed vac getrocknet, in 20 µl TE Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst.
Midipräparation:
Für präparative Zwecke wurden Kulturen in 100 ml Medium über Nacht mit Zugabe des entsprechenden Selektionsmittels bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Die Plasmid Isolation erfolgte mit dem Qiagen Pack 100/500 nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Düsseldorf). Qualität und Konzentration wurden anschließend durch Agarose Gelelektrophorese und Spektrophotometrie bestimmt (Sambrook et al. 1989).

DNA Extraktion aus *A. giganteus*
DNA aus Transformanten von *A. giganteus* wurde nach einer Methode von Meyer (2001), welche auf einer Methode von Yelton et al. (1984) basiert, gewonnen: Myzel wurde für 2-3 Tage in 40 ml YPG Medium als Schüttelkultur angezogen, anschließend durch Filtration über sterile Kaffeefilter abgetrennt und mit sterilem H_2O gewaschen. Es wurden 300-500 mg Myzel in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zum tiefgefrorenen Myzel wurden 700 µl DNA-Extraktionspuffer hinzugefügt und anschließend die Zellen in einem Dismembrator für 2 min aufgeschlossen. Anschließend wurde das Homogenisat bei Raumtemperatur aufgetaut und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Endvolumen von 1,0 ml wurde durch Auffüllen mit DNA Extraktionspuffer erreicht.
Dem Ansatz wurden 10 µl RNaseA (10 µg/µl) hinzugefügt, gefolgte von einer Inkubation für 10 min bei 37 °C. Die Proteine wurden mit Hilfe von 20 µl Proteinase K (10µg/µl) bei einer Inkubationszeit von 30 min bei 50 °C unter gelegentlichem Schütteln abgedaut. Die DNA wurde einmal mit gleichem Volumen von TE-gesättigtem Phenol und einmal mit gleichem Volumen von Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Aus der wässrigen Phase wurde die DNA mittels gleichem Volumen an Isopropanol ausgefällt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde die DNA in 100 µl H_2O gelöst und für 10 min bei 65 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

DNA Schnellaufarbeitung
Insbesondere für die PCR Analyse wurde eine Schnellaufarbeitung zur DNA Extraktion genutzt (Meyer 2001). Sporen des zu analysierenden Klons wurden mit 4 µl 0,05 % Triton X-100 abgenommen und zu 700 µl YPG Medium im Eppendorfgefäß gegeben. Nach einer 36 h Inkubation bei 28 °C und 120 rpm wurde die Kultur für 5 min bei 12000 rpm und abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml H_2O gewaschen und der Überstand bis auf ca. 600 µl verworfen. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem N_2 und anschließendem Auftauen für 5 min bei 65 °C wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden eine Phenolextraktion sowie eine Chloroformextraktion durchgeführt, danach durch Zugabe von 2 Vol 96 % EtOH und 1/25 Vol 3 M NaOAc und einer Inkubation auf Eis für 1 h die DNA gefällt. Die Lösung wurde für 15 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das Pellet anschließend in 70 % EtOH gewaschen und in 20 µl H_2O resuspendiert. Für eine PCR wurde 1 µl aus dieser Lösung eingesetzt.

Phenol Chloroform Extraktion von DNA
Aufgeschlossenes Myzel wurde mit einem Vol Phenol und einem Vol Chloroform versetzt, für 60 s gemixt und bei 12000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bei weiterhin vorhandener Verschmutzung der Phasen wurde dieser Schritt wiederholt. Abschließend wurde die wässrige Phase mit einem Vol Chloroform ausgeschüttelt und erneut durch Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm, 4 °C, eine Phasentrennung herbeigeführt. Die DNA enthaltende wässrige Phase wurde abgenommen und für weitere Versuche gelagert.

Restriktionsanalyse
Der Standard Restriktionsansatz wurde in einem 20 µl Volumen durchgeführt. Es wurden 2 µl 10fach Reaktionspuffer, 2 µl konzentriertes Restriktionsenzym (5-10 U/µl), bis zu 5 µg DNA und bei Bedarf 1 µl RNase A (1 µg/ml) verwendet. Der Ansatz wurde dann bei der für das Restriktionsenzym nach Herstellerangabe

optimalen Temperatur für 1 – 2 h inkubiert. Durch Zugabe von 4 µl DNA Stopppuffer wurde die Reaktion abgestoppt.

Ligation
Ligationen wurden mit dem LigaFast™ Rapid DNA Ligation System (Promega) durchgeführt. In einem Eppendorfgefäß wurden 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer mit 50 ng des geschnittenen Vektors, ein Überschuss an dem zu integrierendem Insert und 1 µl T4 DNA Ligase gemischt. Der Ansatz wurde auf ein Volumen von 10 µl mit Aqua dest. aufgefüllt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss direkt in einer Transformation eingesetzt.

Dephosphorylierung von DNA
Linearisierte Plasmide wurden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu verhindern. In einem 50 µl Volumen wurden 1 µg lineares Plasmid, 5 µl 10fach SAP Puffer und 1 µl alkalischer Phosphatase aus Krabben (Promega) vereint und bei 37 °C für 1h inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase durch eine Inkubation für 20 min bei 70 °C inaktiviert und eine EtOH Fällung durchgeführt. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen aufgenommen

3.7.5 RNA Methoden

RNA Extraktion aus *A. giganteus*
Aspergillus giganteus wurde in 100 ml YPG Medium für 48 h bei 28 °C und 120 rpm angezogen. Das Myzel wurde mit einem Filtrationsgerät durch einen sterilen Kaffee Filter abfiltriert. Etwa 200 mg Myzel wurden sofort in mit flüssigem N_2 vorgekühlte Teflon Gefäße überführt. Nach Zugabe von 1 ml Denaturierungs-Lösung wurden die Zellen für 2 min im Dismembrator aufgeschlossen. Das aufgetaute Zellhomogenisat wurde in 2 ml Eppendorf Gefäße überführt und für 10 sec auf dem Vortexer gemischt. Feststoffe wurden für 10 min bei 10000 rpm und 4 °C pelletiert und der Überstand großzügig abgenommen (ca. 800 µl). Nacheinander wurden 1 Vol NaOAc pH 4.0 (80 µl), 800 µl Phenol und 150 µl Chloroform zugegeben, wobei nach jeder Zugabe das Volumen auf dem Vortexer homogenisiert wurde. Die Lösung wurde für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei 10000 rpm und RT abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit 1 Vol Isopropanol versetzt und die enthaltene RNA bei - 20 °C für 1 h bis über Nacht gefällt. Die RNA wurde dann für 20 min bei 10000 rpm und 4 °C pelletiert und das Pellet mit 1 ml 80% EtOH gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das RNA Pellet an der Luft getrocknet und in 100 µl DEPC H_2O lösen. Von der gelösten RNA wurden Aliquots bei –20 °C aliquotiert.

***In vitro* Transkription**
RNA Transkripte wurden durch *in vitro* Transkription mit der T7 Polymerase hergestellt. Für die Transkription von kurzen Transkripten (Ribozyme und SUB1-1short) wurde das T7-MEGAshortscrip™ kit entsprechend der Herstellerangaben benutzt (Ambion). Für die *in vitro* Transkription von langen Substraten (SUB1-1med und SUB1-1long) wurden bei Raumtemperatur 4 µl 5fach Transkriptionspuffer (MBI), 1 µl RNase Inhibitor (RNAsin), 4 µl eines NTP Mixes (MBI; je 500 µM ATP, GTP, CTP, TTP), bis zu 2 µg DNA Template und 1 µl T7 Polymerase (MBI Fermentas, St-Leon-Roth) vereint und mit DEPC H_2O oder HPLC gereinigtem H_2O auf 20 µl aufgefüllt. Bei der Transkription von *uidA* Substraten wurde zusätzlich 1 µl α^{32}P-UTP oder α^{35}S-ATP zugefügt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 5 µl Stopppuffer (8 M Urea, 50 mM EDTA, 7,5 % Glycerin, 0,05 % Bromophenol Blau und 0,05 % Xylene Xylanol Blue).

Fällung *in vitro* transkribierter RNA
RNA wurde gefällt, um für nachfolgende Reaktionen störende Reste aus dem Transkriptionspuffer zu entfernen. Der Transkriptionsansatz wurde auf 100 µl mit DEPC behandeltem H_2O aufgefüllt. Dann wurden 10 µl 8 M LiCl dazu pipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 300 µl 99,8 % Ethanol langsam den Rand entlang ins Eppendorfgefäß laufen gelassen, so dass sich zwei Phasen bildeten. Dieser Ansatz wurde über Nacht oder länger bei -20 °C inkubiert.
Anschließend wurde die RNA für 30 min bei 4 °C mit 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl 80 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C mit 12000 rpm für 15 min wurde das Pellet in einer geeigneten Menge (10 - 40 µl) DEPC behandeltem H_2O aufgenommen. Die Transkripte wurden mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese (5 %, denaturierend) aufgetrennt und die Masse abgeschätzt.

***In vitro* Ribozym Assay**
Ribozym und RNA-Substrat (SUB1-1short, SUB1-1med, SUB1-1long) wurden in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 für 2 min bei 95 °C aufgekocht, anschließend anzentrifugiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. In Negativkontrollen wurde das Ribozym durch ein entsprechendes Volumen an DEPC H_2O oder HPLC gereinigtem H_2O ersetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM $MgCl_2$ gestartet. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und abschließend durch Zugabe von 5 µl Stopppuffer (8 M Urea, 50 mM EDTA, 7,5 % Glycerin, 0,05 % Bromophenol Blau und 0,05 % Xylene Xylanol Blue) gestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese (5 %, denaturierend) aufgetrennt und das Gel nach Trocknen auf Whatman Filterpapier auf Röntgenfilm exponiert. Für die Ermittlung der Umsatzrate wurden Reaktionsprodukte aus dem Gel ausgeschnitten und der Beta-Zerfall in einem Beckmann Coulter LS6500 gemessen.

RNase H Assay
In einem 10 µl Volumen wurden 50 ng ^{32}P gelabeltes *uidA* RNA Transkript, 50 nM Oligodesoxynukleotid, 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT und 5 Units RNase H gemischt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1 min inkubiert und anschließend mit Stopppuffer (8 M Urea, 50 mM EDTA, 7,5 % Glycerin, 0,05 % Bromophenol Blau und 0,05 % Xylene Xylanol Blue) versetzt. Die Produkte wurden auf einem denaturierenden PAA Gel (5 %) aufgetrennt und nach Trocknung auf Whatman Filterpapier auf Röntgenfilm exponiert.

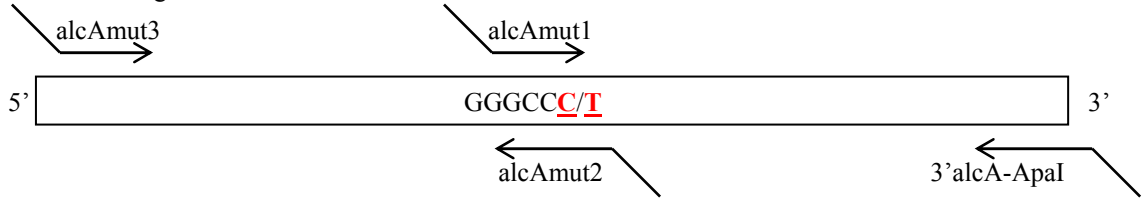
3.7.6 PCR Methoden

PCR Standard Ansatz
In einem 20 µl Ansatz wurden 1 µl DNA Template (10 - 100 ng), 4 µl 5x PCR-Puffer (MBI), 2 µl dNTP's (2,5 mM), 9,8 µl H_2O, 1 µl jedes Primers (10 pmol/µl), 0,2 µl Taq DNA-Polymerase (0,15 U) vereint.

PCR Standard Programm
Der Standardreaktionsansatz wurde zunächst für 1 min bei 94 °C denaturiert. Anschließend erfolgte ein erstes Annealing für 1 min bei der optimalen Temperatur (Oligonukleotide wurden in der Regel so ausgewählt, dass die optimale Temperatur bei 60 °C liegt) sowie eine Strangverlängerung für 1 min bei 72 °C (Die Elongationszeit wurde entsprechend der Größe der Amplifikate reduziert oder verlängert). Danach durchlief der Ansatz 29-mal einen Zyklus beginnend mit einer Denaturierung für 30 s bei 94 °C, einem anschließenden Annealing für 30 s bei optimal Temperatur und einer abschließenden Strangverlängerung für 30 s bei 72 °C. Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine letzte Elongation für 5 min bei 72 °C. Die Endelongation wurde auf 30 min verlängert, wenn das PCR Produkt für eine TA Klonierung eingesetzt werden sollte.

Kolonie PCR
Zur Kontrolle von *E. coli* Transformationen wurde eine Kolonie PCR durchgeführt. Transformanten wurden mit sterilen Zahnstochern auf eine LB Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) überpickt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Zellmaterial von diesen Kolonien wurde mit sterilen Zahnstochern in 50 µl TE Puffer überführt und 1 µl dieser Lösung in einer PCR eingesetzt. Das PCR Programm basierte auf dem Standardprogramm, wobei die initiale Denaturierung auf 3 Minuten bei 94 °C verlängert wurde.

Mutagenese mittels Assembly PCR
Aus *A. nidulans* 1711 wurde durch eine Standard PCR (20 Zyklen) mit dem Primerpaar alcAmut3/alcAmut2 der 5'-Bereich des *alcA* Promotors amplifiziert und im 5' Bereich eine *Apa*I und eine *Sda*I Schnittstelle eingeführt. In einer zweiten Standard PCR (20 Zyklen) mit dem Primerpaar alcAmut1/3'alcA-ApaI wurde der 3' Bereich des *alcA* Promoters amplifiziert und eine 3'-*Apa*I Schnittstelle eingeführt. Beide PCR Reaktionen mutierten die interne *Apa*I Schnittstelle des *alcA* Promotors von GGGCCC zu GGGCCT. In einer anschließenden Assembly PCR wurden je 10 µl aus den vorhergehenden PCR Reaktionen vereint und in fünf PCR Zyklen (2 min bei 94 °C, 30 sec bei 60 °C und 30 sec bei 72 °C) verbunden. Abschließend wurde die Reaktion für 5 min bei 72 °C einer Endelongation unterzogen. Die PCR Produkte wurden in einem 1 %igen Agarose Gel aufgetrennt und ein 800 bp großes Zielfragment eluiert. Das eluierte Fragment wurde in pGEM®-T Easy ligiert. Eine Sequenzierung verifizierte die Integrität des so konstruierten *alcAmut* Promotors.



3.7.7 Aufreinigung von PCR Produkten

PCR Produkte wurden aufgereinigt um PCR Puffer Bestandteile zu entfernen, die in folgenden Reaktionen störend wirken. Abhängig von der Spezifität der PCR und der Anzahl der resultierenden Banden konnten verschiedene Methoden zur Isolierung der gewünschten PCR Produktes gewählt werden.

Aufreinigung von PCR Produkten durch Gelelution
Für die selektive Isolation einer Bande aus einem Gemisch an Banden wurde nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung die Gelelution verwendet. Die PCR Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem 0,7 %igem bis 1,5 %igem Agarose Gel aufgetrennt. Die Zielbande wurde unter UV Licht markiert und ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA aus dem Gelfragment mit dem QIAgen PCR Purification Kit eluiert.

Aufreinigung von PCR Produkten mit dem QIAgen PCR Purification Kit (Quiagen)
PCR Produkte aus einer spezifischen PCR wurden mit dem mit dem QIAgen PCR Purification Kit nach Angabe des Herstellers aufgereinigt.

3.7.8 Gelelektrophorese

Agarose Gelelektrophorese
Zur Auftrennung von DNA Proben wurden horizontale Agarosegele im Format Midi-Gel (B x L x S: 12 x 14 x 0,5 cm) oder Mini-Gel (7,9 x 8,8 x 0,5 cm) mit 0.5x TAE-Puffer verwandt (Sambrook et al. 1989). Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Agarose Konzentrationen zwischen 0,7 % und 1,5 % gewählt. Die Proben wurden auf den Midi-Gelen mit 2 V/cm für etwa 14 h oder mit 12,5 V/cm für etwa 1 h aufgetrennt. Bei den Mini-Gelen wurde für 30 min eine Spannung von 16 V/cm angelegt. Als Größenstandard wurden 2 µl bis 4 µl GeneRuler R eingesetzt. Die DNA-Banden wurden nach Färbung mit Ethidiumbromid auf dem UV-Transilluminator detektiert.

Polyacrylamid (PAA) Gelelektrophorese
12 g Harnstoff wurden zu 5 ml Acrylamid (24:1), mit 5x TE Puffer auf 25 ml aufgefüllt und bei 50 °C gelöst. Nach Abkühlen auf RT wurde das Gel in einer horizontalen Gelapparatur gegossen. Die RNA Proben wurden in 10 µl Stopppuffer aufgekocht und zügig aufgetragen. Die RNA wurde für 45 min bei 50 mA aufgetrennt.

Formaldehyd Agarose Gel

Für Northern Analysen wurden 2,25 g Agarose in 128 ml H_2O aufgekocht. Nach Abkühlen auf 70 °C wurden 15 ml 10x MOPS zugegeben. Nach weiterem Abkühlen auf 50 °C wurden 7,4 ml 37 % Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen. 10 µl RNA wurden mit 20 µl RNA Loading buffer versetzt und für 2 min aufgekocht. Anschließend wurden die Proben zügig aufgetragen und in 1x Mops Puffer bei 120 V für 2-3 h aufgetrennt.

Größenabschätzung bei radioaktiven Gelen
Die Größenbestimmung von radioaktiv markierten RNA-Molekülen auf PAA-Gelen wurde mit einem nicht-radioaktiven Größenmarker durchgeführt. Der Marker wurde nach dem Gellauf vom dem restlichen Gel, welches die radioaktiv markierten Proben enthielt, getrennt und separat gefärbt. Ein Vergleich der Lauflänge dieses Markers mit der Lage der Signale auf Röntgenfilm ergab Aufschluss über die Größe der radioaktiv markierten Proben.

3.7.9 Northern und Southern Analyse

Transformanten von *A. giganteus* wurden in 50 ml YPG Medium (0,3 % Hefe Extrakt, 1 % Pepton, 2 % Glukose, pH 4,5) für 65 h bei 28 °C inkubiert. Genomische DNA und RNA wurden entsprechend Meyer et al. (2002) isoliert. Southern und Northern Analyse wurden gemäß (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Die Primer uid3 und uid4 wurden für die Amplifikation eines 613 bp Fragment des *uid*A Gens aus pNOM102 benutzt, welches die Nukleotide 917 to 1529 des *uidA* Gens umspannt. Das Fragment wurde mittels "random primer labelling" mit ^{32}P-dATP markiert und als Sonde für die Hybridisierung benutzt. Die Hybridisierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers (Amersham) durchgeführt.

3.7.10 GUS Extraktion und GUS Assay

5 x 10^6 Konidien wurden im Doppelansatz für vier Tage in 8 ml Minimal Medium (Cove 1966; mit 2 % Glukose als C-Quelle) bei 28°C und 160 rpm inkubiert. Die Myzelien wurden geerntet, gewaschen und in 5 ml Minimal Medium mit 0.1 % Fruktose als C-Quelle resuspendiert. Um den *alcAmut* Promoter und somit auch die Ribozyme Expression zu induzieren wurde einem der Doppelansätze 1% EtOH zugegeben. Nach 4 h Inkubation bei 28°C mit160 rpm wurden die Myzelien geerntet und Proteine extrahiert entsprechend (Meyer et al. 2002). Die Protein Konzentration wurde gemäß (Bradford 1976) ermittelt.

Die GUS Aktivität wurden mit 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glukuronid (4-MUG) als Substrat (Endkonzentration von 1 mM) bestimmt. 100 µl der extrahierten Proteinproben wurden zu 100 µl Assay Puffer (50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, 0,1 % Triton X-100, 0,1 % N-Lauryl-Sarkosin, 10 mM EDTA, 10 mM ß-Mercaptoethanol, 2 mM MUG, pH 7,0) in einer Mikrotiterplatte gegeben und bei 37 °C inkubiert. Aliquots von 25 µl wurden abgenommen und auf eine zweite Mikrotiterplatte übertragen, die 120 µl Stopppuffer (1 M Na_2CO_3) in jedem Slot enthielt. Die Fluoreszenz des freigesetzten 4-MU wurde nach einer Inkubation von 1 min bis zu 16 h mit einem CytoFluor 2350 Fluoreszenz Mikrotiterplatten Lesegerät (Millipore) bei einer Anregungs-Wellenlänge von 365 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 455 nm gemessen. Die Reduktion der GUS Aktivität wurde durch Vergleich der Fluoreszenzwerte von induzierten und nicht induzierten Proben berechnet. Alle Experimente wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 In silico *Analyse der* uidA *mRNA*

Um eine Substrat-RNA durch ein Ribozym schneiden zu können, müssen zunächst die Arme I und III des Ribozyms eine Bindung mit komplementären Substrat-Nukleotiden eingehen, die das Zieltriplet „GUC“ umgeben (Campbell et al. 1997, siehe auch 3.1). Intramolekulare Bindungen im Bereich des Zieltriplet können ein sterisches Hindernis für die Hybridisierung mit dem Ribozym darstellen. Bei der Suche nach Zielstrukturen müssen daher einzelsträngige Bereiche im Substrat identifiziert werden, die für ein Ribozym zugänglich sind.

Verschiedene experimentelle Ansätze wie die kristallographischen Analyse der räumlichen Struktur eines Moleküls oder auch die Zugänglichkeit für chemische Modifizierungen bieten sich für eine Identifikation einzelsträngiger Bereiche an (Wedekind and McKay 1998). Eine Alternative zu diesen sehr aufwendigen Methoden ist eine computergestützte Berechnung der zweidimensionalen Struktur des Substrat-Moleküls (Heus et al. 1990; Pley et al. 1994; Scott et al. 1995; Chetouani et al. 1997; Conn and Draper 1998; Zuker et al. 1999; Major and Griffey 2001). In dieser Arbeit wurde das Programm RNAdraw (Matzura and Wennborg 1996) benutzt, um bei einer Temperatur von 28 °C die zweidimensionale Struktur der *uidA* mRNA zu berechnen (Abb. 12).

Die *uidA* mRNA enthält 30 „GUC“ Tripletts, die als ein Ziel für eine Restriktion durch ein Ribozym ausgewählt werden können (Abb. 13). Anhand der berechneten Struktur wurden sieben Bereiche ausgewählt, in denen das Triplet „GUC“ und die angrenzenden Nukleotide in verschiedenen intramolekularen Zuständen vorliegen.

Abb. 12 Zweidimensionale Struktur der *uidA* mRNA (1812 nt) berechnet mit der Software RNADRAW (28 °C). Das 5'- und das 3'-Ende des Moleküls sind gekennzeichnet.

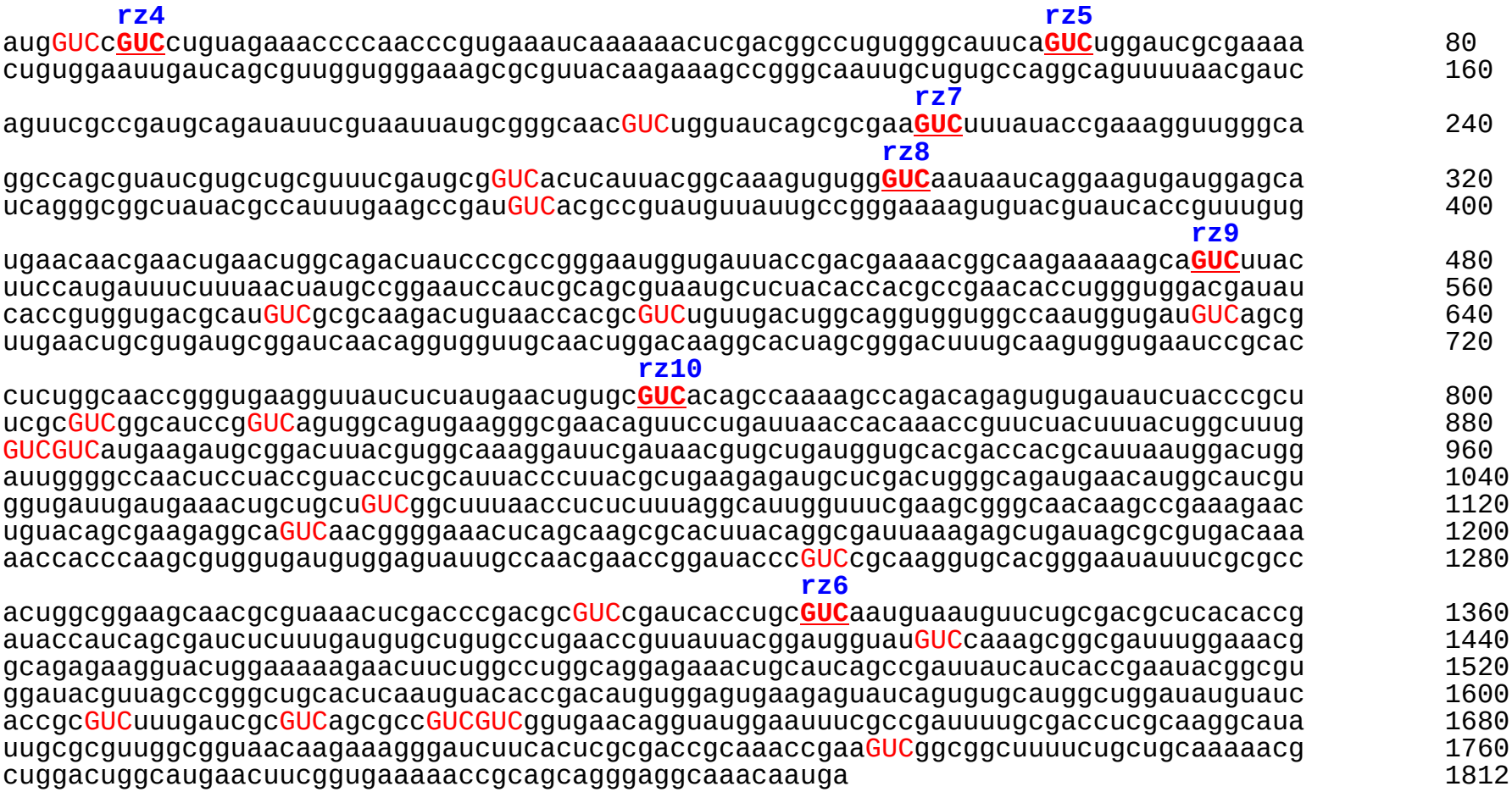


Abb. 13 Sequenz der *uidA* mRNA. Die möglichen Restriktionssequenzen „GUC“ für die Ribozyme sind in rot gekennzeichnet. Die als Ziel für ein Ribozym ausgewählte Restriktionssequenzen sind fett rot und unterstrichen dargestellt. Der Name des Ribozyms ist darüber in blauer Farbe vermerkt.

In den folgenden Abbildungen 14 bis 19 werden die ausgewählten Ribozym Schnittstellen in einer Ausschnittsvergrößerung dargestellt. Zielsequenzen im 5'-Bereich (z.B. Initiationsstellen für die Translation, Spleißstellen) erscheinen besonders geeignet für eine Hybridisierung von Substrat-RNA und Ribozym, da hier die Notwendigkeit einer relativ offenen Struktur für die Bindung der Translationsmaschine, sowie das Spleissosoms besteht. Demgegenüber sind 3'-Bereiche weniger attraktiv, da hier durch die Translationsmaschine langsam restringierende Ribozyme abgelöst werden können (Amarzguioui and Prydz 1998).

Drei Ribozyme (rz4, rz5 und rz7) wurden in den 5' Bereich gelegt, um zu überprüfen, ob in dieser Region eine Bindung der Ribozyme erleichtert ist (Abb. 14). Die bindenden Bereiche von Ribozym rz4 liegen zum großen Teil in einem vorhergesagten Doppelstrang. Hier wäre aufgrund der schlechten Erreichbarkeit der Region für eine Hybridisierung mit rz4 eine nur geringe Ribozymaktivität *in vitro* zu erwarten, wogegen *in vivo* durch die Lokalisierung im 5'-Bereich von einer hohen Aktivität dieses Ribozyms auszugehen ist. Die anderen beiden im 5'-Bereich lokalisierten Ribozyme, rz5 (Abb. 14) und rz7 (Abb. 16), können mit zum Teil einzelsträngigen Bereich hybridisieren.

Im mittleren Bereich der *uidA* mRNA wurden drei „GUC"-Triplets als Zielsequenz ausgewählt (Ribozyme rz8, rz9 und rz10). Die Zieltriplets der Ribozyme rz8 (Abb. 16) und rz9 (Abb. 17) sind dabei von einzelsträngigen Bereichen umgeben, die für eine Hybridisierung zwischen Ribozym und *uidA* mRNA eine ausreichende Vorraussetzung schaffen. Dagegen liegen die Bindestellen für Ribozym rz10 (Abb. 18) weitgehend im Bereich eines Substrat-Doppelstranges.

Im 3'-Bereich der *uidA* mRNA wurde nur eine „GUC"-Zielsequenz ausgewählt. Ribozym rz6 (Abb. 15) stehen nur ein einzelnes ungepaartes Nukleotid für die Bindung mit Arm III und zwei einzelne ungepaarte Nukleotide für Arm I zur Verfügung.

Die Länge der bindenden Arme I und III ist für die Spezifität der Bindung an die Ziel-mRNA und die Restriktionsaktivität eines Ribozyms von Bedeutung. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine kürzerer Arm I als Arm III (asymmetrisches Ribozym) ein eine Erhöhung der Restriktionsaktivität des Ribozyms zur Folge hat (Hendry and McCall 1996). Es wurden daher für eine spezifische Bindung an die Zielsequenz in der *uidA* RNA Ribozyme mit einer Länge von fünf Nukleotiden für Arm I und zehn Nukleotiden für Arm III konstruiert (rz4asym, rz5asym, rz6asym, rz7asym, rz8asym, rz9asym und rz10asym). Um den Einfluss der Länge der bindenden Arme zu testen, wurden die Ribozyme rz4 und rz5 zusätzlich in der Version rz4sym und rz5sym mit symmetrischen Armen von zehn Nukleotide Länge erstellt

(rz4sym konstruktionsbedingt nur 9 Nukleotide in Arm I). Eine Übersicht über die ausgewählten Ribozyme ist in Tabelle 4 gegeben.

Tab. 4 *In silico* ausgewählte Schnittstellen für Ribozyme (rz) auf der *uidA* mRNA. In der zweiten Spalte ist die Position des letzten Nukleotides des „GUC“ Triplets auf der *uidA* mRNA angegeben, hinter dem die Restriktion durch das Ribozym erfolgt.

Ribozym	Position der Schnittstelle hinter dem “GUC” Triplet [nt]
rz4	**10**
rz5	**67**
rz6	**1332**
rz7	**219**
rz8	**297**
rz9	**476**
rz10	**762**

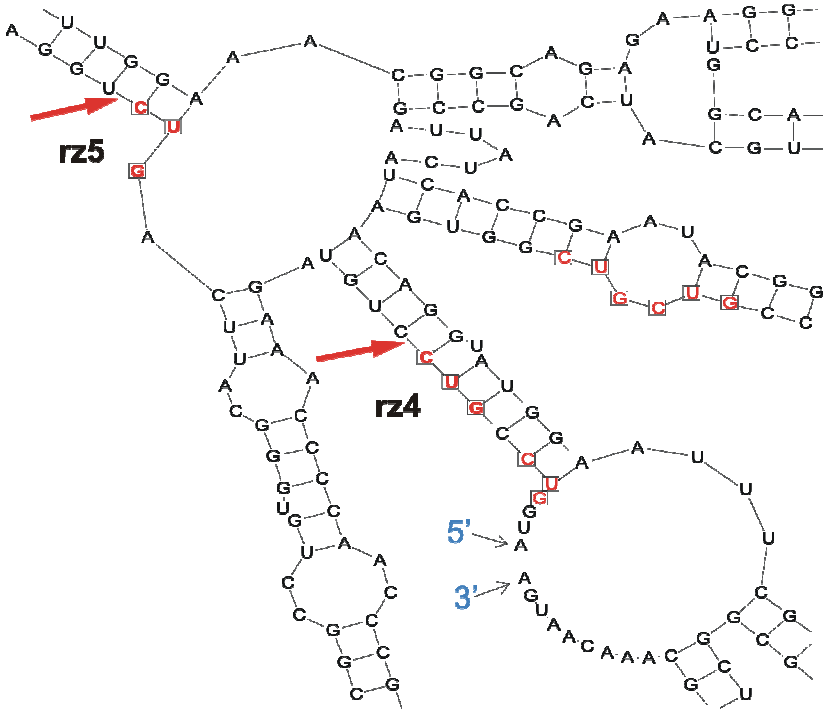


Abb. 14 Zielsequenz der Ribozyme rz4 (schneidet bei nt 10) und rz5 (schneidet theoretisch bei nt 67) in der *uidA* mRNA. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Abb. 12 der mit RNADRAW bei 28 °C berechneten Struktur der uidA mRNA. Die Zielsequenz „GUC“ ist in roter Farbe in Kästchen dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle des Ribozyms. Das 5’- und das 3’-Ende der mRNA ist gekennzeichnet. (Ausschnitt aus Abb. 13, RNADRAW, 28 °C)

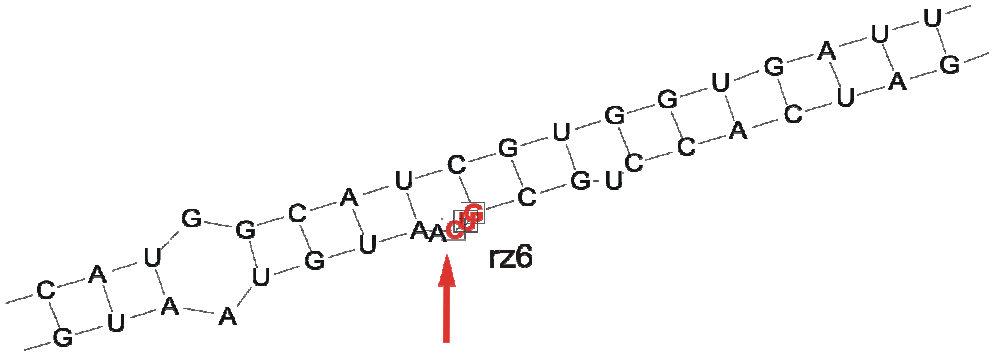


Abb. 15 Zielsequenz des Ribozyms rz6 (schneidet theoretisch bei nt 1332) in der *uidA* mRNA. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Abb. 12 der mit RNADRAW bei 28 °C berechneten Struktur der uidA mRNA. Die Zielsequenz „GUC“ ist in roter Farbe in Kästchen dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle des Ribozyms. (Ausschnitt aus Abb. 13, RNADRAW, 28 °C)

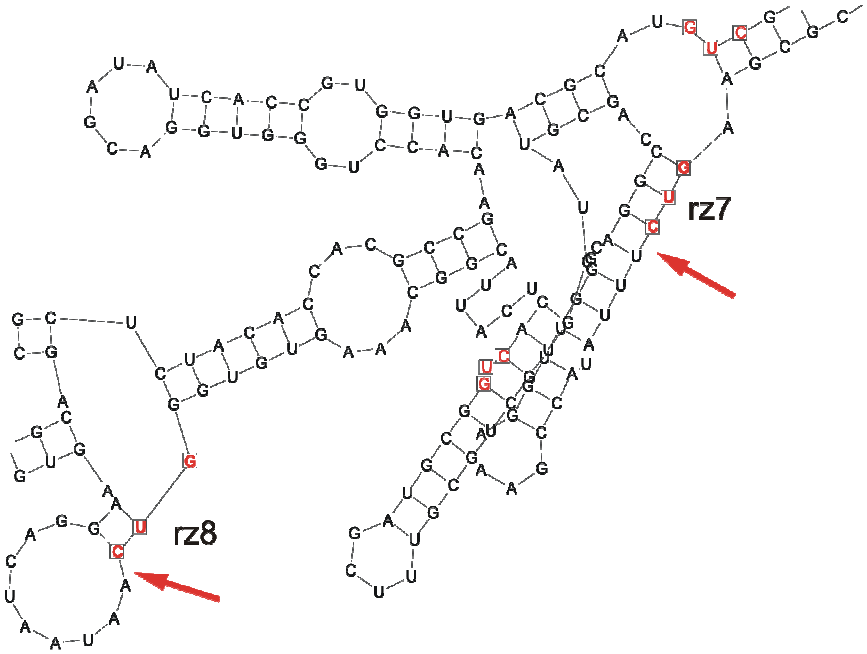


Abb. 16 Zielsequenz der Ribozyme rz7 (schneidet theoretisch bei nt 219) und rz8 (schneidet theoretisch bei nt 297) in der *uidA* mRNA. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Abb. 12 der mit RNADRAW bei 28 °C berechneten Struktur der uidA mRNA. Die Zielsequenz „GUC“ ist in roter Farbe in Kästchen dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle des Ribozyms. (Ausschnitt aus Abb. 13, RNADRAW, 28 °C)

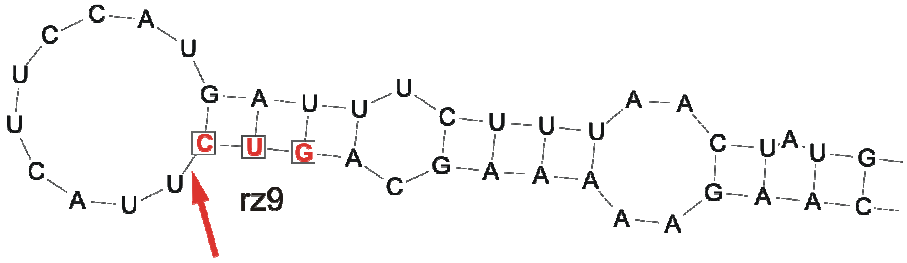


Abb. 17 Zielsequenz des Ribozyms rz9 (schneidet theoretisch bei nt 476) in der *uidA* mRNA. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Abb. 12 der mit RNADRAW bei 28 °C berechneten Struktur der uidA mRNA. Die Zielsequenz „GUC“ ist in roter Farbe in Kästchen dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle des Ribozyms. (Ausschnitt aus Abb. 13, RNADRAW, 28 °C)

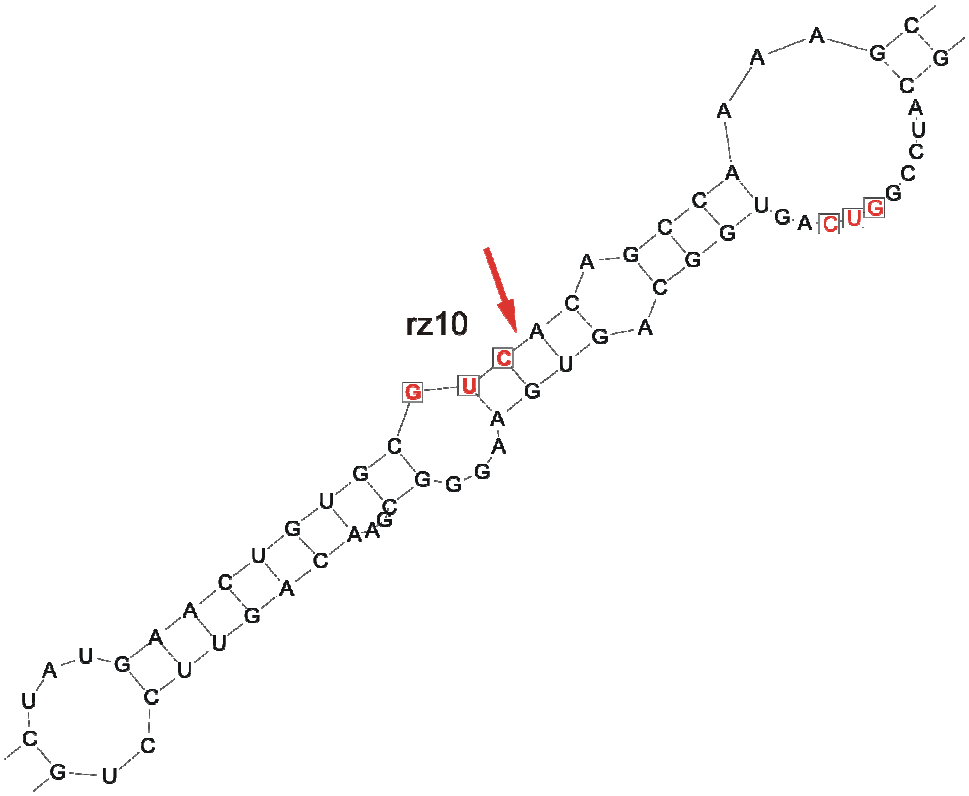


Abb. 18 Zielsequenz des Ribozyms rz10 (schneidet theoretisch bei nt 762) in der *uidA* mRNA. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Abb. 12 der mit RNADRAW bei 28 °C berechneten Struktur der uidA mRNA. Die Zielsequenz „GUC“ ist in roter Farbe in Kästchen dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle des Ribozyms. (Ausschnitt aus Abb. 13, RNADRAW, 28 °C)

4.2 In vitro *Analyse der Ribozyme*

Für die Konstruktion der Ribozyme wurden synthetische Oligonukleotide hybridisiert und in das pGEM®-T Easy Plasmidsystem (Promega) hinter den T7 Promotor (Chapman and Wells 1982) eingeführt (siehe 3.6 und 3.7.3). Die so entstandenen Ribozymplasmide wurde als pRZx bezeichnet, wobei „x“ für die Nummer des Ribozyms steht, also pRZ4asym für ein

einligiertes Ribozym rz4asym. Das Zielgen *uidA* aus dem Plasmid pNOM102 ausgeschnitten und ebenfalls in ein pGEM®-T Easy Plasmid hinter den T7 Promotor ligiert. Dieses Substratplasmid wurde als pSUB1-1 bezeichnet. Der Transkriptionsstart auf diesen Plasmiden liegt 38 nt im 5'-Bereich vor dem „ATG" des *uidA* Gens.

RNA Transkripte wurden in einer „run off" Transkription hergestellt (siehe 3.7.5). Dabei fällt die T7 RNA-Polymerase am 3'-Ende des Templates ab und produziert so ein Transkript definierter Länge. Die Templates für die *in vitro* Transkription wurden durch eine PCR (siehe 3.7.6) vermehrt (Tab. 5).

In Tabelle 5 sind die Transkriptgrößen aus der *in vitro* Transkription sowie die verwendeten Templates und Primer aufgelistet. Unspezifische RNA-Degradationsprodukte, welche durch die abnehmende Stabilität großer RNA-Moleküle auftreten, sowie auch RNA-Fragmente aus Abbrüchen der Transkription können in einem *in vitro* Ribozym Assay die erwarteten Abbauprodukte überlagern. Daher wurden durch die Auswahl der PCR Primer drei Substrat-Templates von unterschiedlicher Länge hergestellt. Die hiervon transkribierten RNAs wurden als kurze Version SUB1-1short (217 nt), mittlere Version SUB1-1med (1090 nt) und Volllänge Version SUB1-1long (1963 nt), jeweils beginnend mit dem 5'-Ende des *uidA* Gens, bezeichnet.

Tab. 5 Theoretisch berechnete Transkriptgrößen der verschiedenen Versionen des *uidA* Gens und der Ribozyme (rz). Die Templates für die *in vitro* Transkription wurden in einer PCR mit den jeweils angegebenen Primern aus dem Plasmid pSUB1-1 bzw. dem entsprechenden Ribozym Plasmid pRZx vervielfältigt. x: Nummer des Ribozyms, z.B. rz4.

Template	Transkript	PCR Primer	Template Größe	Transkript Größe
pSUB1-1	SUB1-1long	GEMseqI/GEMseqI	2237 bp	1963 nt
pSUB1-1	SUB1-1med	GEMseqII/uid5	1364 bp	1090 nt
pSUB1-1	SUB1-1short	GemSeqII/uid1	491 bp	217 nt
pRZx	rzx	GEMseqII/rzxl	336 bp	61 nt – 66 nt

4.2.1 *In vitro* Ribozym Assay mit *uidA* Substraten

Die Ribozyme wurden auf ihre Fähigkeit hin überprüft, *in vitro* das RNA-Transkript des *uidA* Gens zu schneiden. In dem Ribozym Assay (siehe 3.7.5) wurden dazu die Ribozyme (soweit nicht anders vermerkt ~50 ng) und das radioaktiv markierte RNA-Substrat (soweit nicht anders vermerkt ~50 ng) in 50 mM Tris/HCl bei pH 7,5 zunächst für zwei Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend 15 min bei 37 °C inkubiert, so dass die Ribozyme mit den homologen Bereichen der *uidA* Transkripte hybridisieren konnten. Die Ribozymreaktion wurde durch Zugabe von 10 mM $MgCl_2$ gestartet und bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Ansätze mit RNA-Stopppuffer gestoppt. In den Negativkontrollen

wurde an Stelle des Substrates DEPC H_2O oder HPLC gereinigtes H_2O eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAA) in einem 5 %igen PAA-Gel aufgetrennt und das Gel auf einen Röntgenfilm exponiert. Die Größe der Signale wurde anhand eines RNA-Markers abgeschätzt.

Tabelle 6 zeigt die anhand der *in silico* Analyse erwarteten Produkte der Ribozyme mit den drei zur Verfügung stehenden Versionen des *uidA* Substrates. In allen Versuchen wurde das Ribozym in 50- bis 100-fachem Überschuss zugegeben, um so eine hohe Umsatzrate zu erreichen. Der *in vitro* Assay wurde durch Zugabe von 10 mM $MgCl_2$ gestartet. Da RNA-Moleküle relativ instabil sind, konnten auf einem Großteil der Gele unspezifische Zerfallsprodukte der jeweiligen RNA-Substrate festgestellt werden. Diese Signale, die nicht mit der Ribozymaktivität in Verbindung gebracht werden konnten, sind auf den Röntgenfilmen in der Regel in jeder Spur und auf jeweils gleicher Höhe zu erkennen.

Tab. 6 Theoretische berechnete Größen der Reaktionsprodukte für den *in vitro* Ribozym Assay mit den verschiedenen *uidA* Transkripten. Der Transkriptionsstart auf dem Template Plasmid pSUB1-1 liegt 38 nt im 5'-Bereich vor dem ATG. 5'-Produkte sind fett hervorgehoben. Außerhalb: in den Substratversionen SUB1-1short und SUB1-1med sind nicht alle Zielsequenzen enthalten.

Ribozym	SUB1-1short	SUB1-1med	SUB1-1long
rz4sym	**48** + 169	**48** + 1042	**48** + 1915
rz4asym	**48** + 169	**48** + 1042	**48** + 1915
rz5sym	**105** + 112	**105** + 985	**105** + 1858
rz5asym	**105** + 112	**105** + 985	**105** + 1858
rz6asym	außerhalb	außerhalb	**1370** + 593
rz7asym	außerhalb	**257** + 833	**257** + 1706
rz8asym	außerhalb	**335** + 755	**335** + 1666
rz9asym	außerhalb	**515** + 575	**515** + 1487
rz10asym	außerhalb	**800** + 290	**800** + 1201

4.2.1.1 Ribozym Assay mit dem Substrat SUB1-1short

Für die Tests der Ribozyme rz4sym/asym und rz5sym/asym wurde zunächst das Substrat SUB1-1short benutzt, da hier die Abbauprodukte durch Größe und Signalstärke leichter vom Substrat zu unterscheiden waren. Die Ribozyme rz6asym bis rz10asym können nicht mit dem kurzen Substrat überprüft werden, da ihre Zielsequenzen außerhalb von SUB1-1short liegen.

Ribozym rz4sym / rz4asym

Um die Theorie zu überprüfen, dass asymmetrische Ribozyme eine erhöhte Ribozymaktivität haben, wurden zwei Varianten des Ribozyms rz4 gestestet. Ribozym rz4sym besitzt zehn bindende Nukleotide in Arm I und neun in Arm III. Das Ribozym rz4asym dagegen ist mit

zehn bindenden Nukleotiden in Arm I und fünf bindenden Nukleotiden in Arm III konstruiert worden. Die mRNA des *uidA* Gens wird an Position 10 geschnitten. Das erwartete 5' Produkt hat eine Länge von 48 nt, das 3'-Produkt eine Länge von 169 nt.

Es wurde zunächst in einer Zeitreihe die für eine Produktbildung benötigte Reaktionszeit ermittelt (Abb. 19). Aliquots der Reaktion wurden nach 1, 30, 60, 120 bzw. 240 min abgestoppt. Während nach 1 min noch kein erwartetes Produkt zu erkennen war, konnten nach 30 min die Abbauprodukte als schwache Signale detektiert werden. Nach 240 min wurde zwar der Größte Teil des Substrates umgesetzt, allerdings sind gleichzeitig mit den erwarteten Produkten die Signale von vermutlichen Degradationsprodukten stärker geworden.

Für alle folgenden Assays wurde eine Reaktionszeit von 30 Minuten benutzt, da nach dieser Zeit die Reaktionsprodukte bereits ausreichend zu detektieren waren.

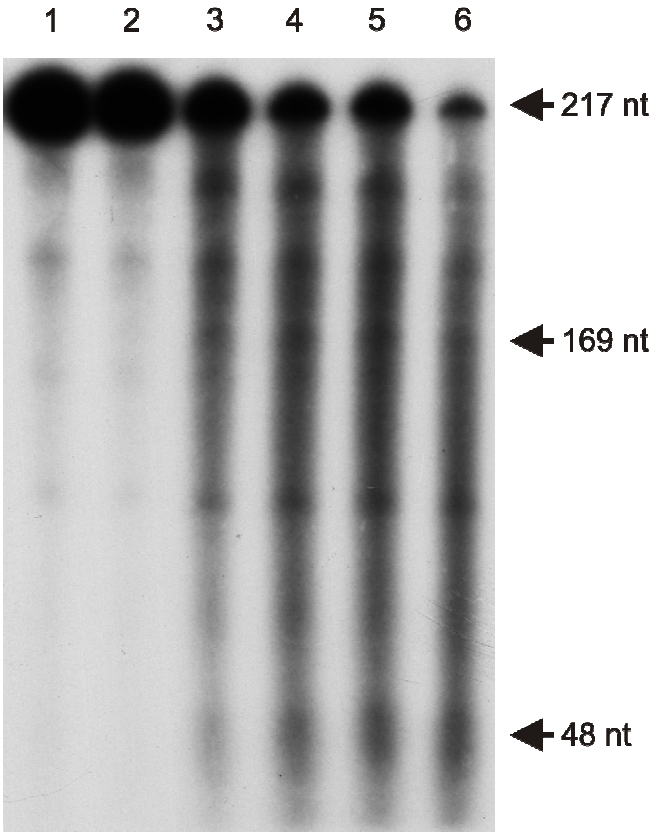


Abb. 19 Zeitreihe eines Ribozym Assays mit dem Substrat SUB1-1short und Ribozym rz4sym. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert. Ribozym und das radioaktiv markierte Substrat wurden jeweils in einer Konzentration von ca. 50 ng eingesetzt. Die erwarteten Reaktionsprodukte sind durch Pfeile markiert, die Größenangaben erfolgten nach einem Vergleich mit einem Größenmarker. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten sind weitere Banden, vermutlich Zerfallsprodukte des *uidA* Substrates, zu erkennen. Spur 1: Kontrolle ohne Ribozym (240 min); 2: 1 min; 3: 30 min; 4: 60 min; 5: 120 min; 6: 240 min

Abbildung 20 zeigt einen Ribozym Assay mit dem Ribozym rz4sym und SUB1-1short, in dem eine Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Ribozymkonzentration überprüft werden soll. Das größere der beiden erwarteten Produkte in einer Höhe von 169 nt ist als schwaches Signal zu erkennen. Die Ribozymaktivität ist anscheinend zu gering, um das bei 48 nt erwartete Signal auf dem Röntgenfilm zu detektieren. Das Signal des 169 nt Fragmentes ist bei erhöhter Ribozymkonzentration zwar geringfügig verstärkt, allerdings erscheint auch das Substratsignal kräftiger, so dass hier nicht von einem erhöhten Umsatz durch eine Erhöhung der Ribozymkonzentration ausgegangen werden kann.

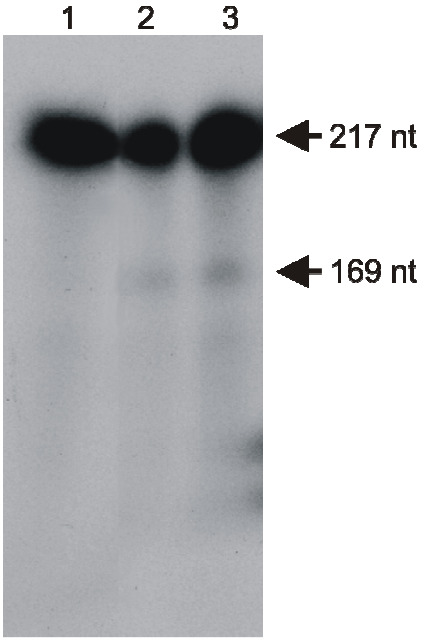


Abb. 20 Ribozym Assay mit SUB1-1short und rz4sym. Die Ribozyme und das radioaktiv markierte Substrat wurden jeweils in einer Konzentration von ca. 50 ng eingesetzt und die Reaktion nach 30 min abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert. Die erwarteten Reaktionsprodukte sind durch Pfeile markiert, die Größenangaben erfolgten nach einem Vergleich mit einem Größenmarker. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten sind weitere Banden, vermutlich Zerfallsprodukte des *uidA* Substrates, zu erkennen. Spur 1: Kontrolle ohne Ribozym; 2: rz4sym (50 ng); 3: rz4sym (250 ng)

Analog des vorhergehenden Versuches wurde der Konzentrationseffekt von Ribozym rz4asym auf die Restriktion des *uidA* Substrates analysiert. Die beiden erwarteten Reaktionsprodukte sind als starke Signale bei 169 nt und 48 nt zu erkennen (Abb. 21). Eine wesentliche Verstärkung des Substratumsatzes konnte, wie auch bei Ribozym rz4sym, nicht beobachtet werden.

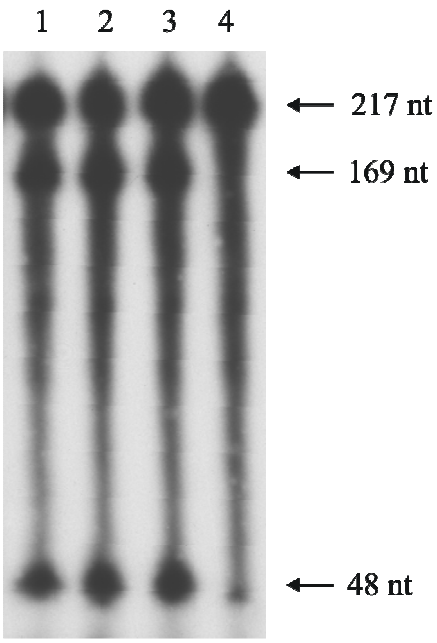


Abb. 21 Einfluss der Konzentration von rz4asym auf die Restriktion der radioaktiv markierten SUB1-1short RNA *in vitro*. Die Reaktion wurde nach 30 min abgestoppt, die Reaktionsprodukte auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert. Die erwarteten Reaktionsprodukte sind durch Pfeile markiert, die Größenangaben erfolgten nach einem Vergleich mit einem Größenmarker. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten sind weitere Banden, vermutlich Zerfallsprodukte des *uidA* Substrates, zu erkennen. Spur 1: rz4asym (50 ng); 2: rz4asym (200 ng); 3: rz4asym (350 ng); Spur 4: Kontrolle ohne Ribozym

Ribozym rz5sym / rz5asym

Ribozym rz5 wurde ebenfalls in zwei Varianten mit unterschiedlich langen Armen konstruiert, um eine verbesserte Aktivität der asymmetrischen Version zu überprüfen. Beide Arme von rz5sym haben eine Länge von zehn Nukleotiden, rz5asym verfügt über zehn bindende Nukleotide in Arm I und fünf bindende Nukleotide in Arm III. Es wurde zunächst eine Zeitreihe mit Ribozym rz5sym erstellt, um eine für die Detektion der Produkte ausreichenden Reaktionszeit zu ermitteln (Abb. 22). Die erwarteten Abbaubanden mit der Größe 112 nt und 105 nt sind bereits nach 1 min zu erkennen. Nach 240 Minuten konnten ca. 90 % des Substrats SUB1-1short umgesetzt werden. Neben den erwarteten Produkten sind in der Substratspur und den anderen Spuren wiederum Fragmente zu beobachten, die vermutlich aus der Degradation des Substrates hervorgehen. Die Anhäufung von kurzen Degradationsprodukten im Verlauf der Reaktion lässt vermuten, dass diese ebenfalls von dem Ribozym als Substrat erkannt und umgesetzt wurden. Dagegen waren in der Substratspur nach 240 min Inkubation vornehmlich die größeren Degradationsprodukte zu erkennen.

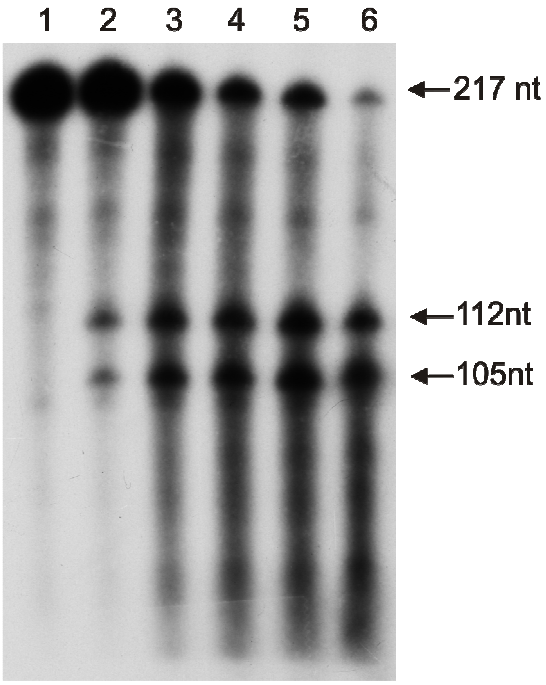


Abb. 22 Zeitreihe des Ribozym Assay mit SUB1-1short und rz5sym. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert. Die Ribozyme und das radioaktiv markierte Substrat wurden jeweils in einer Konzentration von ca. 50 ng eingesetzt. Die erwarteten Reaktionsprodukte sind durch Pfeile markiert, die Größenangaben erfolgten nach einem Vergleich mit einem Größenmarker. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten sind weitere Banden, vermutlich Zerfallsprodukte des *uidA* Substrates, zu erkennen. Spur 1: Kontrolle ohne Ribozym (240 min); 2: 1 min; 3: 30 min; 4: 60 min; 5: 120 min; 6: 240 min

In einem weiteren Versuch sollte der Effekt erhöhter Ribozymkonzentration auf die Abbaurate bei verschiedenen Reaktionszeiten ermittelt werden. Der Ribozym Assay wurde für 30 min bzw. 240 min inkubiert (Abb. 23). Zu beiden Zeitpunkten bewirkt eine höhere Ribozym Konzentration einen verstärkten Abbau des Substrates. Die Messung der Aktivität von Substrat und Produkten im Szintillationszähler (siehe 3.7.5) ergab einen Umsatz von ca. 60 % bei Erhöhung der Ribozymkonzentration im Ansatz von 100 ng auf 500 ng und einer Inkubationszeit von 240 min.

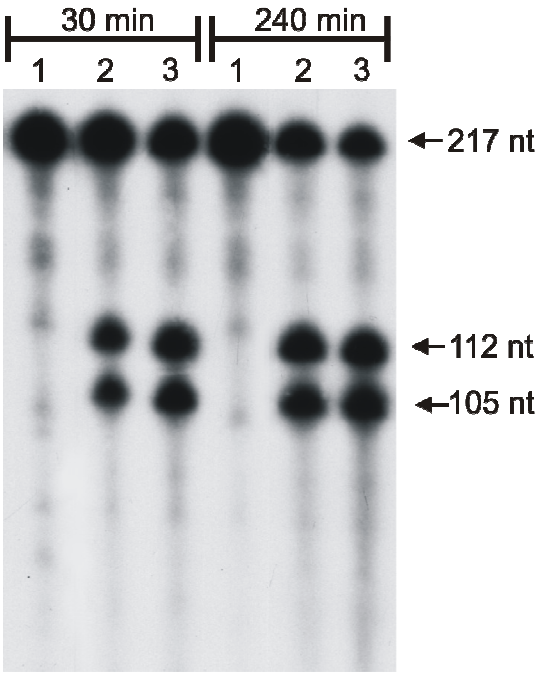


Abb. 23 Vergleich des Einflusses der Ribozymkonzentration auf den Umsatz des radioaktiv markierten Substrates SUB1-1short bei einer Inkubation von 30 min und 240 min. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert. Die erwarteten Reaktionsprodukte sind durch Pfeile markiert, die Größenangaben erfolgten nach einem Vergleich mit einem Größenmarker. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten sind weitere Banden, vermutlich Zerfallsprodukte des *uidA* Substrates, zu erkennen. Spur 1: Kontrolle ohne Ribozym; 2: rz5sym (50 ng); 3: rz5sym (250 ng)

Vergleich der Ribozyme rz4 und rz5

Abbildung 24 zeigt einen direkten Vergleich der Ribozyme rz4sym, rz4asym, rz5sym und rz5asym. Der Substratumsatz durch die vier Ribozyme ist anhand der Signalstärken auf dem Röntgenfilm annähernd gleich. Ribozym rz4sym hat einen etwas geringeren Substratumsatz als rz4asym, wogegen die Ribozyme rz5sym und rz5asym keinen Unterschied in ihrer Effizienz aufweisen. Ein deutlicher Unterschied Aktivität der Ribozyme mit unterschiedlich langen bindenden Armen ist hier nicht zu erkennen.

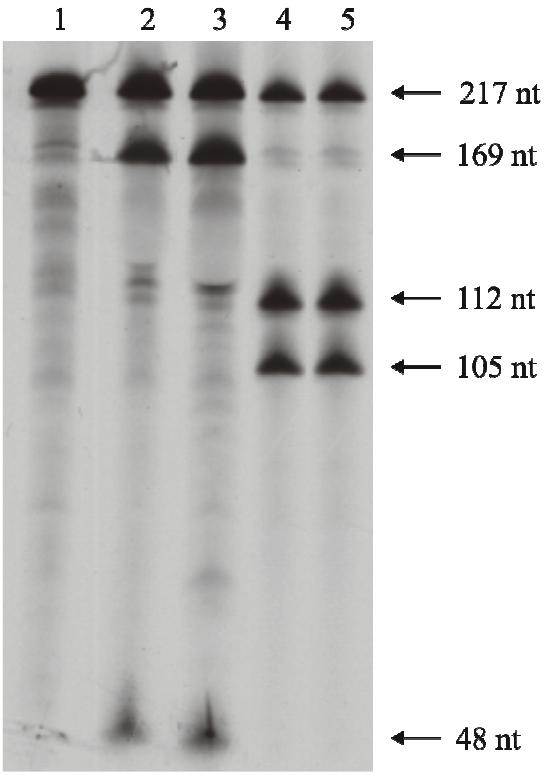


Abb. 24 Vergleich der Aktivität der Ribozyme rz4sym, rz4asym, rz5sym und rz5asym in einem Ribozym Assay mit dem Substrat SUB1-1short. Die Ribozyme und das radioaktiv markierte Substrat wurden jeweils in einer Konzentration von ca. 50 ng eingesetzt und die Reaktion nach 30 min abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert. Die erwarteten Reaktionsprodukte sind durch Pfeile markiert, die Größenangaben erfolgten nach einem Vergleich mit einem Größenmarker. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten sind weitere Banden, vermutlich Zerfallsprodukte des *uidA* Substrates, zu erkennen. Spur 1: Kontrolle ohne Ribozym; 2: rz4sym; 3: rz4asym; 4: rz5sym; 5: rz5asym

4.2.1.2 Ribozym Assay mit Substrat SUB1-1med

Das Substrat SUB1-1med mit einer Größe von 1090 erlaubt die Überprüfung aller Ribozyme mit Ausnahme von rz6asym, welches eine Zielsequenz im 3' Bereich von SUB1-1long erkennt, die nicht mehr in SUB1-1med zu finden ist.

Abbildung 25a zeigt einen Ribozym Assay mit dem Substrat SUB1-1med. Außer der Substratkontrolle zeigen alle Spuren zwei unspezifische Bande auf Höhe ca. 300 nt und ca. 400 nt. Die Substratkontrolle in Spur 6 zeigt keine Abbaubanden. Ribozym rz5asym in Spur 1 zeigt entgegen den erwarteten Signalen bei 105 nt und 985 nt eine Abbaubande in Höhe von 270 Basen. In Spur 2 ist für Ribozym rz7asym ein unspezifisches Signal bei 100 nt und ein starkes Signal bei ca. 300 nt zu erkennen. Letzteres resultiert möglicherweise aus einer Überlagerung der erwarteten Produkte mit den in allen Spuren auftretenden Zerfallsprodukten des Substrates. In Spur 3 zeigt der Assay mit Ribozym rz8asym außer den in allen Spuren auftretenden unspezifischen Banden keines der erwarteten Produkte. Die Abbauprodukte von

Ribozym rz9asym in Spur 4 sind in der Ausschnittsvergrößerung (Abb. 25b) auf Höhe 515 nt und 575 nt deutlich zu erkennen. Ribozym rz10asym in Spur 5 zeigt wie rz7asym in Spur 2 ein Signal bei ca. 100 nt sowie ein starkes Signal bei ca. 300 nt, welches wiederum eine Überlagerung des spezifischen 289 nt Signals mit dem unspezifisch auftretenden 300 nt Signal sein kann. Die Ausschnittsvergrößerung in Abbildung 25a zeigt in der Spur von Ribozym rz10asym eine diffuse Substratbande, die das Produkt in Höhe 800 nt überlagert.

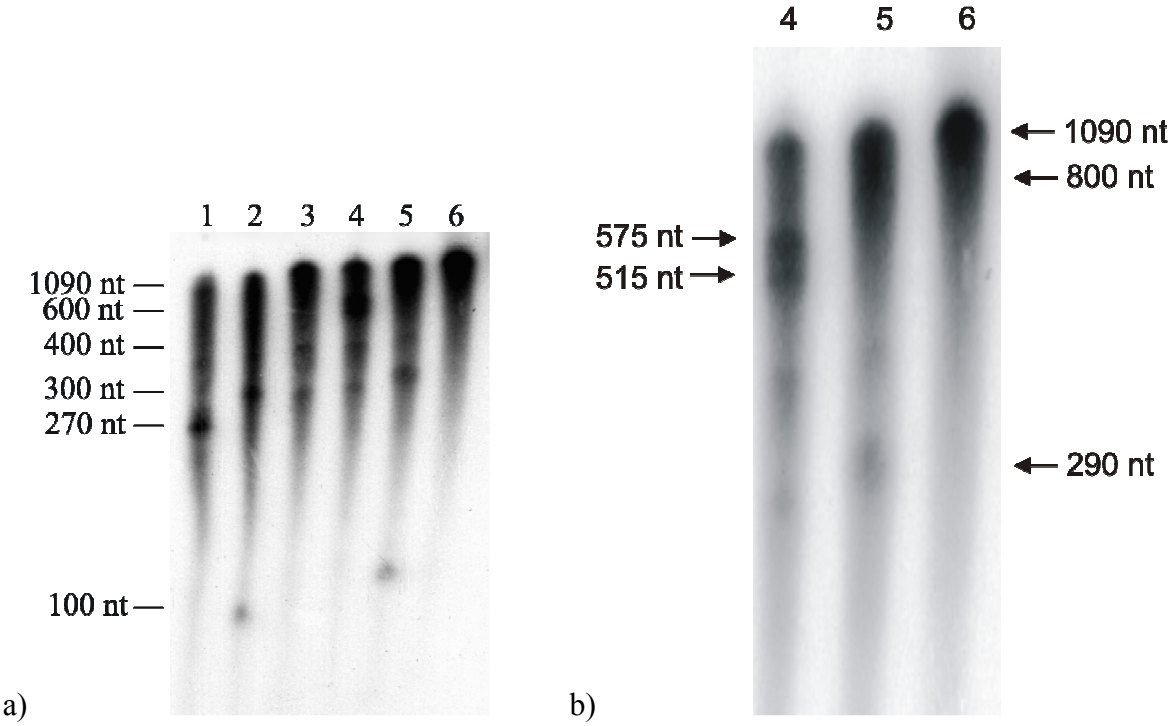


Abb. 25 Ribozym Assay mit dem SUB1-1med. Die Ribozyme und das radioaktiv markierte Substrat wurden jeweils in einer Konzentration von ca. 50 ng eingesetzt und die Reaktion nach 30 min abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert. Die erwarteten Reaktionsprodukte sind durch Pfeile markiert, die Größenangaben erfolgten nach einem Vergleich mit einem Größenmarker. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten sind weitere Banden, vermutlich Zerfallsprodukte des *uidA* Substrates, zu erkennen. a) Spur 1: rz5asym; 2: rz7asym; 3: rz8asym; 4: rz9asym; 5: rz10asym; 6: Kontrolle ohne Ribozym. b) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 25a

4.2.3.3 Ribozym Assay mit Substrat SUB1-1 long

Abbildung 26 zeigt die Produkte eines Ribozym Assay mit den Ribozymen rz6asym, rz7asym, rz8asym, rz9asym und rz10asym mit dem Substrat SUB1-1long. Die Substratkontrolle in Spur 6 zeigt keine der erwarteten Abbaubanden. In Spur 3, 4 und 5 ist eine schwache unerwartete Bande in Höhe von 400 Nukleotiden zu erkennen. Deutlich zu erkennen sind die Abbaubanden in Spur 2 (rz7asym) und 5 (rz10asym) auf Höhe von etwa 100 Basen, die bereits beim Assay mit SUB1-1med sichtbar waren. In Spur 1 kann man keine distinkten Abbaubanden erkennen. In Spur 3 zeigt der Assay mit rz8asym eine unerwartete

Abbaubande bei ca. 400 nt sowie eine Bande, die allerdings dem erwarteten Fragment bei 335 nt entsprechen könnte. Das Ribozym rz9asym in Spur 4 führt zu zwei Produkten, ein unerwartetes Produkt bei etwa 400 nt sowie ein Produkt, das etwa mit dem erwarteten 515 nt Fragment übereinstimmt. In Spur 5 sind für die Restriktion mit rz10asym drei unerwartete Banden in Höhe von 100, 300 und 400 Nukleotiden zu erkennen.

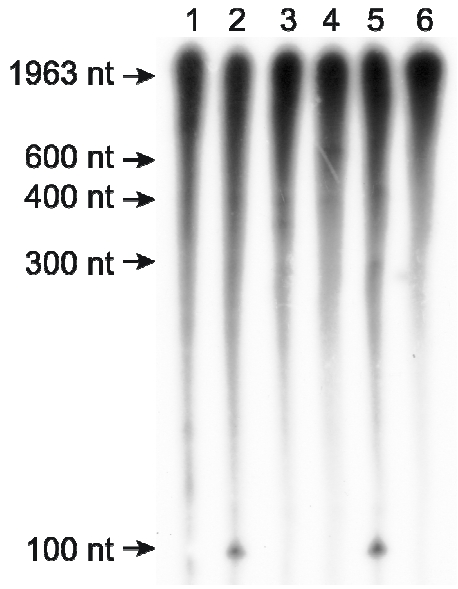


Abb. 26 Ribozym Assay mit dem RNA-Substrat SUB1-1long. Die Ribozyme und das radioaktiv markierte Substrat wurden jeweils in einer Konzentration von ca. 50 ng eingesetzt und die Reaktion nach 30 min abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf einen Röntgenfilm exponiert. Die erwarteten Reaktionsprodukte sind durch Pfeile markiert, die Größenangaben erfolgten nach einem Vergleich mit einem Größenmarker. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten sind auf dem Röntgenfilm weitere Banden, vermutlich Zerfallsprodukte des *uidA* Substrates, zu erkennen. Spur 1: rz6asym; 2: rz7asym; 3: rz8asym; 4: rz9asym; 5: rz10asym; 6: Kontrolle ohne Ribozym

4.2.1.4 Zusammenfassung der *in vitro* Ribozym Assays

Eine Übersicht der aufgrund der *in silico* Analyse zu erwartenden und den *in vitro* detektierten Reaktionsprodukten der Ribozyme mit den drei unterschiedlichen *uidA* Transkripten ist in Tabelle 7 dargestellt. Dabei wird deutlich, dass in Abhängigkeit von der Größe des eingesetzten Substrates durch die Ribozyme unterschiedliche Produkte hergestellt werden. Während die Ribozyme rz4 und rz5 in beiden Versionen mit dem kurzen Substrat SUB1-1short die erwarteten Abbauprodukte ergaben, waren bei Verwendung der größeren Substratversionen entweder keine oder unerwartete Produkte zu erkennen. Die Ribozyme rz7asym, rz8asym, rz9asym und rz10asym zeigten ein insgesamt inkonsistentes Bild. Zum Teil konnten die erwarteten Produkte detektiert werden, allerdings waren auch zusätzliche

unerwartete Nebenprodukte zu erkennen. Die Detektion der Produkte wurde zudem durch die schlechte Auftrennung der Signale auf dem PAA-Gel erschwert. Insbesondere große Abbauprodukte konnten von der Substratbande überlagert und somit in der Auswertung nicht erfasst werden.

Tab. 7 Vergleich der theoretisch erwarteten Produkte des Ribozym Assay mit den *uidA* Substraten mit den tatsächlich beobachteten Produkten. Die theoretischen Größen ergeben sich aus der *in silico* Analyse der *uidA* mRNA. Die tatsächlichen Größen wurden anhand eines Markers zugeordnet. Alle Größen sind in „nt" angegeben. Die Transkripte beginnen 38 nt aufwärts des ATG, die 5'-Produkte sind fett hervorgehoben. Außerhalb: In den verkürzten Substratversionen sind nicht alle Zielsequenzen enthalten. Nicht detektierbar: Mögliche Reaktionsprodukte der Ribozymreaktion überlagert sind durch Zerfallsprodukte der *uidA* mRNA.

Ribozym	**SUB1-1short**		**SUB1-1med**		**SUB1-1long**	
	theoretisch	tatsächlich	theoretisch	tatsächlich	theoretisch	tatsächlich
rz4sym	**48** + 169	48, 169	**48** + 1042	kein Produkt	**48** + 1915	nicht detektierbar
rz4asym	**48** + 169	48, 169	**48** + 1042	kein Produkt	**48** + 1915	nicht detektierbar
rz5sym	**105** + 112	105, 112	**105** + 985	kein Produkt	**105** + 1858	nicht detektierbar
rz5asym	**105** + 112	105, 112	**105** + 985	270, 400	**105** + 1858	nicht detektierbar
rz6asym	außerhalb	außerhalb	außerhalb	außerhalb	**1370** + 593	nicht detektierbar
rz7asym	außerhalb	außerhalb	**257** + 833	100, 300	**257** + 1706	100
rz8asym	außerhalb	außerhalb	**335** + 755	300, 400	**335** + 1666	335 + 400
rz9asym	außerhalb	außerhalb	**515** + 575	300, 400, 515, 575	**515** + 1487	400, 515
rz10asym	außerhalb	außerhalb	**801** + 290	100, 289, 400	**801** + 1201	100, 300, 400

4.3 In vivo Analyse der Ribozyme

Im folgenden Teil der Arbeit wurden die *in silico* ausgewählten Ribozyme auf ihre Fähigkeit getestet, die Aktivität der β-Glukuronidase in *A. giganteus* zu reduzieren. Hierzu wurden zunächst geeignete Promotoren für die Steuerung der Transkription der Ribozyme und des *uidA* Gens ausgewählt und auf ihre Funktionalität in *A. giganteus* überprüft. Anschließend wurde ein Vektorsystem erstellt, mit dem die Ribozyme und das Zielgen gemeinsam mit einem Selektionsmarker in *A. giganteus* 0903 transferiert wurden. Positive Transformanten wurden selektiert und im GUS Assay auf eine Reduktion der β-Glukuronidase Aktivität nach Induktion der Ribozyme überprüft. Hierbei wurden auch die in den *in vitro* Analysen negativen Ribozyme berücksichtigt, um so einen Zusammenhang zwischen der Aktivität *in vitro* und *in vivo* überprüfen zu können.

4.3.1 Ribozymplasmide für die Transformation von *A. giganteus* 0903

4.3.1.1 Evaluierung und Optimierung des *alcA* Promotors für die Steuerung der Transkription des *uidA* Gens in *A. giganteus* 0903

Isolation des *alcA* Promotors aus *Aspergillus nidulans*

Die Funktionalität des Aldehyd Dehydrogenase Promotors (*alcA*) aus *A. nidulans* sollte durch einen GUS Reporter Assay in *A. giganteus* getestet werden. Der *alcA* Promotor wurde in einer PCR (siehe 3.6 und 3.7.6) aus *A. nidulans* 1709 isoliert und mit diesem der *gpdA* Promotor in pNOM102 ausgetauscht (ergibt Plasmid pAU1, Abb. A5). Zusätzlich wurde die Hygromycin Resistenz Kassette aus dem Plasmid pGH3 (Meyer et al. 2002) isoliert und in das entstandene Plasmid pAU1 eingefügt. Das resultierende Plasmid pHAU1 wurde in *A. giganteus* 0903 transferiert und fünf in einer PCR Kontrolle positive Transformanten auf Minimalmedium mit X-Gluc nach Induktion durch 1 % EtOH qualitativ auf ihre Glukuronidaseaktivität überprüft. Keine der Transformanten zeigte eine Blaufärbung durch Umsetzung von X-Gluc. Eine Erklärung für die fehlende Aktivität der β-Glukuronidase ist eine Mutation im *alcA* Promotor des verwendeten *A. nidulans* Stammes 1709, wodurch eine ausreichend starke Expression der Glukuronidase verhindert wird. Um dies zu überprüfen wurde der *alcA* Promotor aus *A. nidulans* 1709 isoliert und sequenziert. Es konnten 7 Mutationen im Vergleich mit der *alcA* Sequenz aus GenBank-Referenzstamm (GenBank Ref. Nr. S47331) festgestellt werden (Abb. A8), die möglicherweise für die fehlende Aktivität verantwortlich sind.

Die in der Stammsammlung des Institutes für Gärungsgewerbe vorhandenen *Aspergillus nidulans* Stämme wurden nun auf ihre Fähigkeit überprüft, auf Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Hierzu wurden Konidiensuspensionen der Stämme *A. nidulans* 1701, 1702, 1704, 1709 und 1711 (RKI) auf modifizierten Minimalmedium nach Cove (1966) mit 1% EtOH als einziger C-Quelle ausplattiert. Nach vier Tagen Inkubation bei 28 °C zeigten die Stämme 1701 ein gutes und 1711 ein sehr gutes Wachstum, sowie Konidienbildung. Die *A. nidulans* Stämme 1702 und 1709 wiesen dagegen nur ein sehr schwaches Wachstum ohne Konidienbildung auf. Der Stamm 1704 Wachstum auf diesem Medium nicht an. Es ist möglich, dass der *alcA* Promotor oder andere für das *alcA* Regulon notwendige Faktoren in den nicht oder nur schlecht auf EtOH als einziger C-Quelle wachsenden Stämme mutiert oder nicht vorhanden sind. Für weitere Arbeiten wurde daher der *alcA* Promotor aus *Aspergillus nidulans* 1711 ausgewählt und durch eine PCR isoliert (siehe 3.6 und 3.7.6).

Mutagenese des *alcA* Promotors aus *A. nidulans* 1711

Die Klonierungsstrategie beinhaltet die Integration des *alcA* Promotors zwischen das Ribozym und den für die *in vitro* Versuche notwendigen T7 Promotor in das Plasmid pRZTx-y (Abb. A2). Dieses wurde durch eine Ligation über die vorhandene *ApaI* Schnittstelle erreicht. Hierfür musste die im *alcA* Promotor an Position –165 vorhandene *Apa*I Schnittstelle entfernt werden. Durch PCR Mutagenese (siehe 3.7.6) wurde die *Apa*I Erkennungssequenz GGGCCC im *alcA* Promotor zu GGGCCT mutiert. Gleichzeitig wurden am 5'-Ende eine *Apa*I und eine *Sph*I, sowie am 3'-Ende eine *Apa*I Schnittstelle eingeführt. Der resultierende Promotor wurde *alcAmut* genannt.

Test des Promotors *alcAmut* auf Funktionalität in *Aspergillus giganteus*

Der für die Expression der Ribozyme *in vivo* vorgesehene Promotor *alcAmut* wurde auf seine Funktionalität in *A. giganteus* 0903 überprüft. In vorhergehenden Versuchen wurde bereits der *gpdA* Promotor aus dem Plasmid pNOM102 mit *Nco*I und *EcoR*I ausgeschnitten und durch den *alcA* Promotor aus *A. nidulans* 1709 ersetzt, was das Plasmid pAU1 ergab (Abb. A5). Dieser *alcA* Promotor wurde aus pAU1 durch Restriktion mit *Nco*I und EcoRI entfernt. In einer PCR mit dem Plasmid p*AlcA*mut2 und den Primern 5'*alcA*-EcoRI und 3'*alcA*-NcoI wurde der Promotor *alcAmut* aus pAlcAmut amplifiziert und anschließend in das vorher linearisierte Plasmid pAU1 ligiert, hieraus ergab sich das Plasmid pAU2. Dieses Plasmid wurde zusammen mit pAN7-1 in einer Kotransformation in *A. giganteus* 0903 transferiert und positive Transformanten qualitativ in einem GUS Platten-Assay überprüft. Die getesteten Transformanten zeigten eine starke Blaufärbung nach Induktion mit EtOH, was auf eine aktive β-Glukuronidase hinwies, respektive einen in *A. giganteus* 0903 funktionellen *alcAmut* Promotor. Gleichzeitig wurde die Katabolitrepression des *alcAmut* Promotors durch Glukose überprüft (Tab. 8). Während bei Wachstum auf Glukose, wie auch von anderen Gruppen schon gezeigt (Creaser et al. 1985), eine deutliche GUS Aktivität nur bei den Glukose Konzentrationen von 0,05 % und 0,1 % sichtbar war, führte Fruktose als C-Quelle zu einer starken GUS Aktivität. Ohne Induktion durch EtOH war eine sehr schwache Blaufärbung zu erkennen, was auf eine geringe basale Aktivität des *alcAmut* Promotors hinweist. Induktionsversuche mit Ethylmethylketon (EMK, 50 mM), welches ebenfalls als Induktor des *alcA* Promotors Anwendung findet, verhinderten das Wachstum von *A. giganteus* vollständig. Diese Versuche zeigten, dass der *alcA* Promotor aus *A. nidulans* 1711 für die induzierbare Genexpression in *A. giganteus* verwendet werden kann. Als C-Quelle wurde für folgende

Induktionsversuche 0,1 % Fruktose ausgewählt, da hier ein ausreichendes Wachstum bei einer hohen GUS Aktivität nach Induktion durch EtOH beobachtet wurde.

Tab. 8 Wachstum von *A. giganteus* transformiert mit pHAU2. 10^4 Konidien wurden auf Agarplatten mit Minimal Medium (als C-Quelle Glukose bzw. Fruktose entsprechend Tabelle in steigenden Konzentrationen von 0,05 % bis 5 %; 40 µg/ml X-Gluc, Induktion durch 1 % EtOH) ausplattiert und bei 28 °C für 3-5 Tage inkubiert. GUS Aktivität wurde bestimmt anhand der Blaufärbung des Myzels. Wachstum bzw. GUS-Aktivität: sehr schwach -; schwach +/-; gut +; sehr gut ++

C-Quelle	**Glukose**		**Glukose + EtOH**		**Fruktose**		**Fruktose + EtOH**	
Konz.	Wachstum	GUS	Wachstum	GUS	Wachstum	GUS	Wachstum	GUS
0,05 %	+	-	+/-	+/-	-	-	+	++
0,1 %	+	-	+/-	+/-	-	-	+	++
1 %	+	-	+	-	++	-	+	+
2 %	++	-	++	-	++	-	++	+
3 %	++	-	++	-	++	-	++	+
5 %	++	-	++	-	++	-	++	+

4.3.1.2 Der *pah4* Promotor zur Steuerung der Expression der β-Glukuronidase

Um in dem zu erstellenden Modellsystem Ribozyme *in vivo* zu testen, soll das Zielgen *uidA* nur schwach exprimiert werden. Somit kann eine Reduktion der *uidA* mRNA-Konzentration durch Ribozyme nicht von einer zu starken Expression des Zielgens überlagert werden. Der als schwacher Promotor beschriebene *pah4* Promotor aus *Podospora anserina* wurde für die Steuerung der Transkription des *uidA* Gens ausgewählt (Lüking 1997). Die Funktionalität dieses Promotors wurde zunächst in *A. giganteus* überprüft und die Expressionsstärke im Vergleich zum starken *gpdA* Promotor untersucht. Um auf Kotransformationen von Reporterplasmiden mit den Resistenzmarker tragenden Plasmiden verzichten zu können, wurde zunächst die Hygromycin Resistenzkassette aus pAN7-1 ausgeschnitten und in die Plasmide pNOM102 bzw. pah4uidA integriert (Abb. A4). Die so entstandenen Plasmide pHNOM 102 bzw. pHah4uidA wurden in *A. giganteus* 0903 transferiert. Positive Transformanten wurden in einem GUS Assay analysiert (Abb. 27). Ein untransformierter *A. giganteus* Wildtyp zeigte keine GUS Aktivität. Die Aktivität des *pah4* Promotors im GUS Assay liegt bei 12 % der Aktivität des *gpdA* Promotors. Somit erfüllt der *pah4* Promotor die Vorraussetzung eines geringen Expressionslevels für die Kontrolle der Transkription des *uidA* Gens. In einem Plattentest mit X-Gluc zeigten die pHah4uidA Transformanten zudem eine nur sehr schwache Blaufärbung.

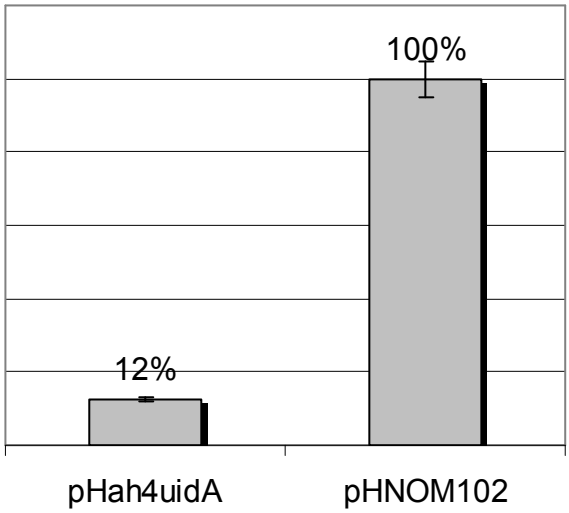


Abb. 27 Vergleich der GUS Aktivität von *A. giganteus* Transformanten, die das Plasmid pHah4uidA bzw. pHNOM102 genomisch integriert haben. Die Transformanten wurden bei 28 °C für 3 Tage in YPG Medium inkubiert und anschließend die Proteine extrahiert. GUS Bestimmung mit PNPG als Substrat als Mittelwert aus 15 – 20 Transformanten in Doppelbestimmung. Der Durchschnitt der GUS Werte für Transformanten mit Plasmid pHNOM102 wurde als 100 % gesetzt. Ein ebenfalls untersuchter *A. giganteus* 0903 Wildtyp zeigte keine GUS Aktivität.

4.3.1.3 Konstruktion der Plasmide pRxsym/asym und Transfer in *A. giganteus*

Basierend auf den Plasmiden pRZx wurden der Promotor *alcAmut* und der *tef* Terminator aus *Ashbya gossypii* für die Expressionskontrolle der Ribozyme eingeführt (Abb. A2). Die so entstandenen Ribozymkassetten wurden ausgeschnitten und in das Plasmid pHah4uidA ligiert (Abb. A4). Das daraus resultierende Plasmid pRx (Abb. 28) wurde für die Transformation von *A. giganteus* 0903 nach der Protoplastenmethode verwendet (siehe 3.7.2). Da Konidien von *A. giganteus* heterokaryotisch sind, mussten die Transformanten auf Medium mit Hygromycin passagiert werden. Nach fünf Durchläufen keimte aus den unter selektiven Bedingungen isolierten Konidien homokaryotisches Myzel aus. Die Nomenklatur der Transformanten (auch als Ribozymtransformanten bezeichnet) folgt der Bezeichnung der transferierten Plasmide, z.B. R4sym für *A. giganteus* transformiert mit pR4sym. Transformanten, in die das gleiche Plasmid transferiert wurde, im Folgenden als Transformationsserie bezeichnet.

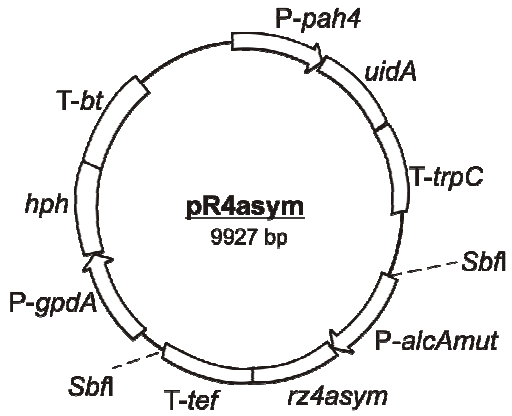


Abb. 28 Schematische Darstellung von Plasmid pR4asym. Das Plasmid enthält die GUS Reporterkassette, die Hygromycin Resistenzkassette und die Ribozymkassette mit dem Ribozym r4asym.

4.3.2 Protein Extraktion und GUS Assay von Ribozymtransformanten

A. giganteus wurde mit den verschiedenen Versionen der Plasmide pRxsym/pRxasym transformiert (siehe 3.7.2), welche die entsprechende Ribozym Expressionskassette, die Expressionskassette für das *uidA* Gen sowie die Hygromycin Resistenzkassette tragen (Abb. 28). Von jedem transferierten Ribozym sollten bis zu 40 Transformanten untersucht werden. Allerdings war die Transformationseffizienz mit R4asysm, R9asym und R10asym unerwartet gering, so dass hier die gewünschte Zahl an Transformanten nicht erreicht wurde (Tab. 9). Die Stabilität der Transformanten wurde durch Anzucht auf selektivem und nicht selektivem Medium überprüft. Zur Bestimmung der GUS Aktivität wurde ein Proteinextrakt hergestellt und die Fluoreszenz nach Umsatz des Substrates MUG in das Fluorophor MU bestimmt (siehe 3.7.10; Gallagher 1995). Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (siehe 3.7.10; Bradford 1976). Zur Berechnung der GUS Aktivität wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte mit dem Proteingehalt normalisiert. Als Negativkontrolle dienten Transformanten, in die das Plasmid pHah4uidA transferiert wurde. Diese Transformanten zeigten nach Induktion mit EtOH keine Reduktion der GUS Aktivität.

Die Mehrzahl der analysierten Ribozymtransformanten ergab keine auswertbare Aktivität im GUS Assay. So zeigte nur je ein Transformant der Serien R4sym und R8asym eine messbare GUS Aktivität. Bei den Ribozym Transformationsserien R6asym, R9saym und R10asym konnte in jeweils zwei Fällen eine GUS Aktivität festgestellt werden. Die Transformanten mit messbarer GUS Aktivität wiesen eine entsprechend der geringen Expressionsstärke des *pah4* Promotors niedrige GUS Aktivität auf.

Die Transformanten, die eine GUS Aktivität aufwiesen, wurden in flüssigem Minimalmedium (Cove 1966, mit 2 % Glukose als C-Quelle) für vier Tage angezogen und anschließend in ein Minimalmedium (mit 0,1 % Fruktose als C-Quelle), entweder mit oder ohne Zugabe von 1 %

EtOH zur Induktion der Ribozym Transkription, überführt. Nach vierstündiger Inkubation wurden die Myzelien einer Proteinextraktion unterzogen und die Extrakte mit Hilfe des GUS Assay auf β-Glukuronidase Aktivität hin überprüft. In den Transformanten wurde nach Induktion der Ribozymexpression die GUS Aktivität im Vergleich mit nicht induzierten Proben reduziert (Tabelle 8, Spalten 4 und 5). In Transformanten der Transformationsserien R4sym, R4asym, R5sym, R5asym und R7asym konnte eine maximale Reduktion der *uidA* Expression von 100 % bestimmt werden. Die Zielsequenzen dieser Ribozyme liegen im 5'-Bereich des *uidA* Gens, was auf eine erhöhte Effizienz von Ribozymen mit einer Zielsequenz in diesem Bereich der Substrat-RNA hinweist. Für Transformanten der Serien R6asym, R8asym und R9asym wurde eine maximale Reduktion der GUS Aktivität von 75 %, 69 %, sowie 56 % ermittelt. Die niedrigsten Reduktionswerte wurden bei Transformanten der Serie R10asym mit einer maximalen Reduktion von 24 % gemessen.

Da nur ein einzelner Transformant aus der R4sym Serie eine GUS Aktivität zeigte, konnte der Einfluss der Länge der bindenden Arme auf die Ribozymaktivität nur für Transformanten der Serie R5sym und R5asym festgestellt werden. Für die zwölf R5sym Transformanten wurde eine GUS Reduktion von 98 % ermittelt, wogegen in den acht R5asym Transformanten eine durchschnittliche Reduktion von 70 % erreicht wurde. Dieses deutet auf eine erhöhte Aktivität von Ribozymen mit symmetrischen Armen im Gegensatz Ribozymen mit asymmetrischen Armen hin.

Tab. 9 GUS Assay der Ribozym Transformanten. Die GUS Aktivität von Rohextrakt wurde im Doppelansatz mit dem Substrat MUG bestimmt und auf den Proteingehalt der Proben normiert. Die Reduktion der GUS Aktivität variiert innerhalb einer Transformationsserie. Die Messungen der GUS Aktivität einzelner Transformanten einer Serie sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Die durchschnittliche GUS Aktivität ist nur auf die Transformanten mit messbarer Aktivität bezogen. Als Negativkontrolle wurden die GUS Aktivität in Transformanten mit dem Plasmid pHah4uidA bestimmt. Nach Induktion mit EtOH änderte sich die GUS Aktivität in den Negativkontrollen nicht. Die Standardabweichung ist in Klammern angegeben.

Ribozym Transformanten	**Zahl der getesteten Transformanten**	**Zahl der Transformanten mit messbarer GUS Aktivität**	**Durchschnittliche Reduktion der GUS Aktivität in %**	**Maximale Reduktion der GUS Aktivität in %**
R4sym	27	1	100	100
R4asym	20	7	25 (34)	100
R5sym	40	12	98 (6)	100
R5asym	36	8	71 (24)	100
R6asym	40	2	58 (24)	75
R7asym	40	10	81 (29)	100
R8asym	39	1	70	70
R9asym	18	2	52 (5)	56
R10asym	12	2	18 (10)	24

4.3.3 Analyse der Integrationsereignisse in den Ribozym Transformanten

Die hohe Zahl an Transformanten ohne messbare GUS Aktivität, wie auch die Varianz in der Reduktion der GUS Aktivität lassen vermuten, dass hier eine Integration in stille Bereiche oder auch eine Rekombination der transferierten Plasmide stattgefunden hat (Murnane et al. 1990). Es wurden exemplarisch Transformanten ausgewählt und in einer Southern Analyse (siehe 3.7.9) auf Integrationsereignisse untersucht. Die genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Cla*I (Abb. 29 a) bzw. *Apa*I (Abb. 29 b) restringiert.

Die ca. 10 kb großen Ribozymplasmide verfügen über keine Restriktionsschnittstelle für *Cla*I. Somit beträgt die minimale Größe von Signalen bei der Restriktion mit *Cla*I 10 kb, wenn das 5'- und das 3'-Ende des integrierten Plasmids von *Cla*I Schnittstellen flankiert ist. Die nach der Restriktion mit *Cla*I erhaltenen Signale der Klone 5, 2 und 10 der Transformationsserie R7asym und Klon 10 der Transformationsserie R4asym mit einer Größe von etwa 23 kb (Abb. 29a, Spuren 1-3 und Spur 5) können Mehrfach- oder Einzelintegrationen sein. Klon 2 der Transformationsserie R7asym (Abb. 29a, Spuren 4) zeigt ein Signal auf der Höhe 10 kb, was einer Einzelintegration entspricht. Diese Klone waren alle in der Lage, die GUS Aktivität nach Induktion der Ribozyme mit EtOH zu reduzieren, wobei aus der Serie R7asym Klon 5 eine Reduktion von 21 %, Klon 2 von 41 % und Klon 10 eine Reduktion um 100 % erreichte (Tab. A1). Für das Restriktionsenzym *Apa*I enthalten die Ribozymplasmide eine einzige Schnittstelle. Sind *Apa*I Schnittstellen vorhandenen, welche das integrierte Plasmid flankierenden, so ergibt sich ein Signal von weniger als 10 kb Größe. Für eine Tandemintegration war ein Fragment mit der exakten Größe des Ribozymplasmides zu erwarten. Die Signale auf der Höhe von ca. 10 kb für die Klone 17 und 10 der Transformationsserie R4asym deutet auf eine Tandemintegration hin (Abb. 29b, Spur 1 und 2). Klon 17 der Transformationsserie Rz4sym zeigte als einziger Transformant dieser Serie eine messbare GUS Aktivität.

Es wird an diesen Beispielen deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen messbarer GUS Aktivität bzw. der Reduktion der GUS Aktivität und den aufgezeigten Integrationsereignissen nicht gegeben ist.

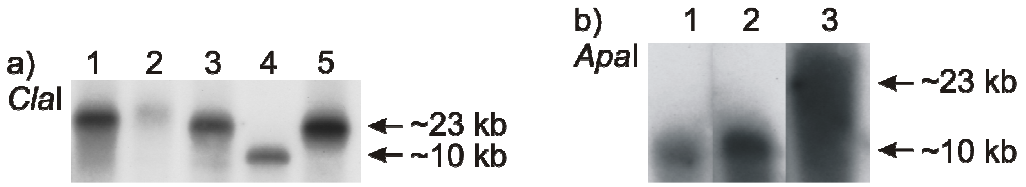


Abb. 29 Southern Analyse von *Aspergillus giganteus* Ribozym Transformanten mit einer PCR Sonde. Genomische DNA wurde mit den Ribozymen *Cla*I (a) bzw. *Apa*I (b) geschnitten, durch Elektrophorese auf einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembran geblotet. Die PCR Sonde wurde mit dem Primerpaar uid3/uid4 amplifiziert und endgelabelt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C über Nacht. Die Größe der Signale wurde anhand eines Größenmarkers abgeschätzt. a) Restriktion mit *Cla*I. Spur 1: R7asym Klon 5; 2: R7asym Klon 2; 3:R7asym Klon 10; 4: R4asym Klon 10; 5: R4asym Klon 2. b) Restriktion mit *Apa*I. Spur 1: R4sym Klon 17; 2: R4asym Klon 10; 3: R4sym Klon 10.

4.3.4 Analyse von Ribozym Transformanten auf Spaltprodukte der *in vivo* Ribozymreaktion

Der Nachweis einer Reduktion der β-Glukuronidase Aktivität ist nur ein indirekter Beweis für eine Ribozymaktivität. Ein Ribozym kann die Genexpression auch durch einen reinen Antisense-Effekt reduzieren, ohne dabei die Substrat-mRNA zu schneiden. In einer Northern Analyse können die Spaltprodukte aus der Restriktion der *uidA* mRNA durch die Ribozyme detektiert werden. Exemplarisch wurde je ein Transformant aus den Transformationsserien R4asym, R5asym und R6asym ausgewählt und in einer Northern Analyse (siehe 3.7.9) auf das Vorhandensein von Reaktionsprodukten untersucht. Da das *uidA* Gen unter der Expressionskontrolle des schwachen *pah4* Promotors stand, wurde ein nur sehr geringer Level an *uidA* mRNA erwartet. Trotzdem konnten sowohl die *uidA* mRNA, als auch Reaktionsprodukte detektiert werden (Abb. 30). Der R4asym Transformant zeigt ein Reaktionsprodukt bei ~ 500 nt, der R5asym Transformant bei ~ 1000 nt und der R6asym Transformant bei ~ 1400 nt. Die ungeschnittene *uidA* mRNA konnte in diesen Transformanten nicht nachgewiesen werden, was auf eine effiziente Restriktion durch das Ribozym hinweist. Während das Signal bei ~ 1400 nt dem erwarteten Produkt von 1370 nt bei r6asym entspricht, stimmen die detektierten Produktgrößen von R4asym und R5asym nicht mit den theoretisch erwarteten Größen von 8 nt bzw. 1877 nt für R4asym, sowie 67 nt bzw. 1820 nt für R5asym überein. Diese Unterschiede zwischen den erwarteten und den detektierten Produktgrößen lassen sich durch einen zusätzlichen Bruch in der *uidA* mRNA oder eine unspezifische Bindung durch das Ribozym mit anschließender Restriktion der *uidA* mRNA erklären. Letzteres ist aufgrund der unspezifischen Ergebnisse aus den *in vitro* Untersuchungen mit den Substraten SUB1-1med und SUB1-1long durchaus wahrscheinlich.

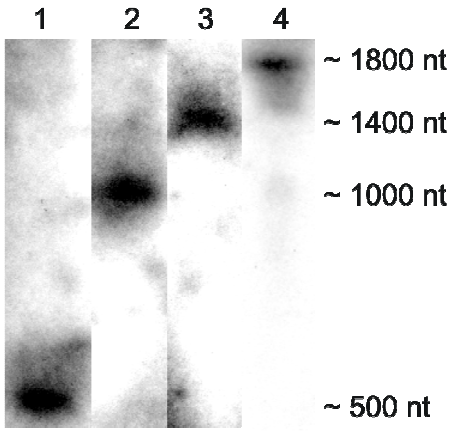


Abb. 30 Northern Analyse von Spaltprodukten der *uidA* mRNA in *Aspergillus giganteus* Transformanten. Die Transformanten wurden wie unter Material und Methoden beschrieben kultiviert, die Ribozym Expression wurde durch Zugabe von 1 % EtOH induziert. Als Negativ Kontrolle dient ein *A. giganteus* Transformant, der das Plasmid pHah4uidA enthält, welches nur die *uidA* Expressionskassette enthält. Gesamte RNA von Transformanten R4asym, R5asym, and R6asym auf einem Formamid-Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran geblottet. Die RNA wurde mit einer α-^{32}P-markierten 613 bp großen PCR Sonde des *uid*A Gens hybridisiert. Die Größen der Signale wurden mit Hilfe eines RNA-Markers abgeschätzt. Spur 1: R4asym; 2: R5asym; 3: R6asym; 4: *A. giganteus* Transformante mit Plasmid pHah4uidA.

4.3.5 *In vitro* Analyse von Antisense-Konstrukten gegen die *uidA* mRNA

Fehlende oder unerwartete Produkte bzw. eine Reduktion der Genexpression in einem Ribozym Assay können unterschiedliche Gründe haben:

- Das Ribozym kann trotz homologer Sequenz der bindenden Arme aufgrund der topologischen Struktur nicht an die Zielsequenz binden.
- Die Bindung erfolgt an einer unspezifischen Stelle im Substrat mit bzw. ohne nachfolgende Restriktion.
- Es findet eine spezifische Bindung statt, allerdings kommt es nicht zur Restriktion der Zielsequenz.

In den beiden letzen Fällen wirkt das Ribozym wie ein Antisense-Molekül. Da die in der Northern Analyse getesteten Ribozyme zum Teil unspezifische Produkte zeigten, wurde in einem weiteren Ansatz die Spezifität der Bindung an die Zielsequenz überprüft. Zu diesem Zweck wurden Antisense Oligodesoxynukleotide (aODN) konstruiert, die den bindenden Armen I und III der Ribozyme rzxasym entsprechen (Tab. 10). Die konstruierten aODNs tragen analog zu den Ribozymen die Bezeichnung axasym. In einem RNase H Assay wurde die Spezifität der Hybridisierung untersucht (Mir et al. 2001; Nadal et al. 2003). Bindet das aODN an den homologen Bereich der RNA, so entsteht ein DNA-RNA-Hybrid. Dieses wird von der Endoribonuklease RNase H erkannt, die spezifisch die Phosphodiester Bindung des RNA-Anteils im DNA-RNA-Hybrid spaltet. Die eingesetzte Substrat-RNA wird dadurch in

zwei kleinere RNA-Produkte aufgespalten, die nach gelelektrophoretischer Auftrennung Aufschluss über den Bindungsort des aODN geben.

In Tabelle 10 wird einen Vergleich der theoretisch erwarteten Fragmente mit den im RNase H Assay erhaltenen Reaktionsprodukten erstellt.

Tab. 10 Vergleich von theoretisch erwarteten mit den in einem RNase H Assay mit den drei *uidA* Substraten detektierten Produkten. Angabe der Fragmentgrößen in nt. Die Transkripte beginnen 38 nt aufwärts des ATG, 5'-Produkte sind fett hervorgehoben. Unerw.: Durch starke Degradation des SUB1-1long sind unerwartete Banden aufgetreten, die zum Teil die erwarteten Banden überlagern können. Keine Produkt: Es waren keine Reaktionsprodukte zu erkennen. Außerhalb: Die Zielsequenz des aODN befindet sich nicht auf in der jeweiligen *uidA* Substrat Version.

Antisense	**SUB1-1short**		**SUB1-1med**		**SUB1-1long**	
	theoretisch	tatsächlich	theoretisch	tatsächlich	theoretisch	tatsächlich
a4asym	**37** + 164	**37** + 164	**37** + 1042	kein Produkt	**37** + 1915	unerw.
a5asym	**94** + 107	**94** + 107	**94** + 985	>800 + ~1000	**94** + 1858	unerw.
a6asym	außerhalb	außerhalb	außerhalb	außerhalb	**1359** + 588	~600
a7asym	außerhalb	außerhalb	**246** + 828	**246** + 828	**246** + 1701	**246** + unerw.
a8asym	außerhalb	außerhalb	**335** + 750	**335** + 750	**324** + 1661	**324** + unerw.
a9asym	außerhalb	außerhalb	**503** + 570	**503** + 570	**503**+ 1482	**503** + unerw.
a10asym	außerhalb	außerhalb	**789** + 285	kein Produkt	**789** + 1196	**789** + unerw.

Die Antisense-Moleküle a4asym und a5asym wurden mit allen Substratversionen getestet. Während der RNase H Assay mit SUB1-1short (Abb. 32) die erwarteten Abbauprodukte lieferte, war der Nachweis von Abbauprodukten mit den anderen beiden Substraten nicht erfolgreich. Im Assay mit dem Substrat SUB1-1med (Abb. 32) ist das 3'-Produkt von a4asym zu groß, als dass es von der Substratbande unterschieden werden könnte, ein 5' Produkt ist nicht sichtbar. In der Spur von a5asym sind zwei Abbaubanden bei >800 nt bzw. ~1000 nt zu erkennen, wobei die größere dieser Banden dem erwarteten spezifischen 3'-Produkt von 985 nt entsprechen könnte. Das 5'-Produkt ist wiederum nicht sichtbar. Der Assay mit SUB1-1long (Abb. 33) zeigt eine starke Degradation des Substrates, spezifische Banden sind für die beiden aODN a4asym und a5asym nicht zu erkennen. Das aODN a6asym konnte nur mit SUB1-1long getestet werden. Eine prominente Bande ist bei <600 nt zu erkennen, die mit dem 3'-Produkt identisch ist; das größere 5'-Produkt ist aufgrund der starken Degradation des Substrates nicht zu identifizieren. Die aODNs a7asym, a8asym, a9asym und a10asym wurden mit SUB1-1med und SUB1-1long getestet. Während a10asym im Assay mit dem mittleren Substrat keine Produkte ergab, sind die spezifischen Produkte der aODNs a7asym (Abb. 32 Spur 4), a8asym (Abb. 32 Spur 5) und a9asym (Abb. 32 Spur 6) als starke Bande zu erkennen. Der Assay mit SUB1-1long ist auch für diese aODNs durch die starke Degradation des Substrates nur erschwert auszuwerten (Abb. 33). Vornehmlich die kleineren 5'-Produkte sind bei a7asym, a8asym und a9asym zu erkennen, die größeren 3'-Produkte sind zwischen den

unspezifischen Banden nicht zu identifizieren (Abb. 33 Spur 5 bis 7). In der Spur von a10asym (Abb. 33 Spur 8) ist knapp unterhalb 800 nt ein starkes Signal zu erkennen, das dem theoretisch erwarteten 5'-Produkt entsprechen könnte. Eine Unterscheidung zwischen dem 3'-Produkt und der Substratbande ist aufgrund der starken Degradation der Substrat-RNA und der schwierigen Auflösung in diesem Größenbereich nicht möglich.

Ein Vergleich der theoretischen mit den tatsächlich erhaltenen Produkten zeigt insbesondere für die aODNs a7asym, a8asym und a9asym eine hohe Spezifität der Bindung. Die schlechte Auftrennung großer Fragmente auf dem PAA-Gel erschwert, wie auch im *in vitro* Ribozym Assay, die Identifikation großer Produkte, da diese leicht von der Substratbande überdeckt werden. Dies erschwert vor allem eine Aussage über die Spezifität der Bindung von a4asym und a5asym an das große Substrat SUB1-1long. Der Anitsense Assay zeigt, dass nicht alle *in silico* selektierten Zielsequenzen für Ribozyme für die entsprechenden Oligonukleotide erreichbar sind. Vor allem die Bindestellen für die Ribozyme r4sym/r4asym und r5sym/r5asym sind in der mittleren und der großen Substratversion nicht zugänglich. Die in diesem Versuch auftretenden unspezifischen Signale weisen auf Homologien zwischen den verwendeten Ribozymsequenzen und der *uidA* mRNA hin, die ausreichend für eine solche unspezifische Hybridisierung unter den gewählten Versuchsbedingungen waren.

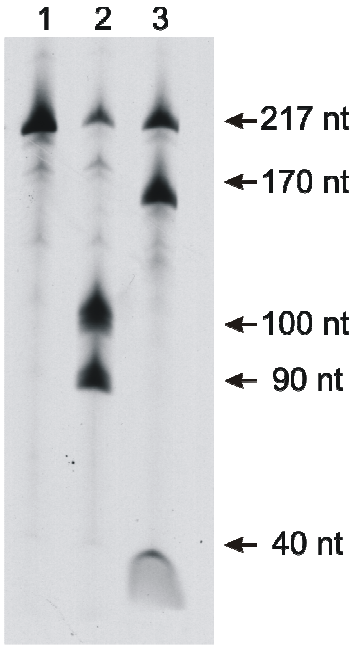


Abb. 31 RNaseH Assay mit SUB1-1short und den synthetisierten aODN's. Der Reaktionsansatz enthielt 50 ng radioaktiv markierten Substrates, 50 nM der aODN sowie 5 Units RNase H. Der Ansatz wurde für 1 min bei 37 °C inkubiert und nach abstoppen auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde dann auf einen Röntgenfilm exponiert. Die Größen wurden anhand eines Markers abgeschätzt. Spur 1: Kontrolle ohne aODN; Spur 2: a5asym; Spur 3: a4asym

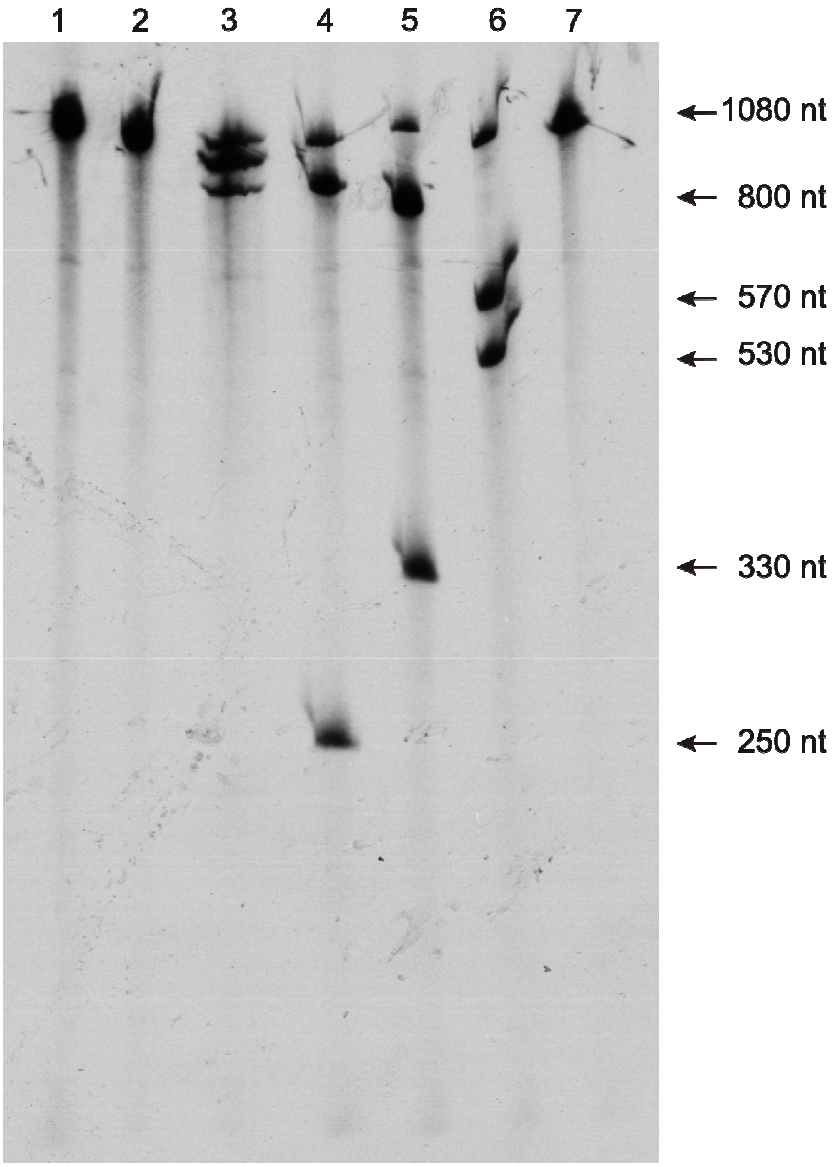


Abb. 32 RNaseH Assay und den synthetisierten aODN's. Der Reaktionsansatz enthielt 50 ng radioaktiv markierten Substrates, 50 nM der aODN sowie 5 Units RNase H. Der Ansatz wurde für 1 min bei 37 °C inkubiert und nach abstoppen auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde dann auf einen Röntgenfilm exponiert. Die Größen wurden anhand eines Markers abgeschätzt. Spur 1: Kontrolle ohne aODN; Spur 2: a4asym; Spur 3: a5asym; Spur 4: a7asym; Spur 5: a8asym; Spur 6: a9asym; Spur 7: a10asym

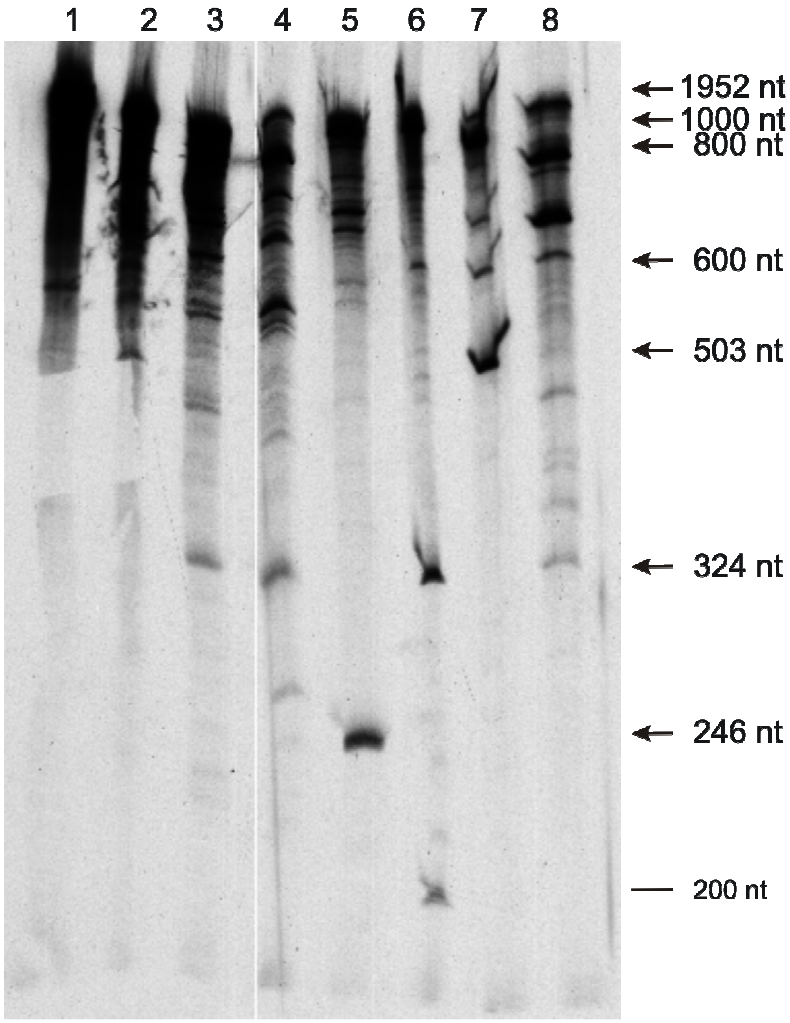


Abb. 33 RNaseH Assay mit SUB1-1long und den synthetisierten aODN's. Der Reaktionsansatz enthielt 50 ng radioaktiv markierten Substrates, 50 nM der aODN sowie 5 Units RNase H. Der Ansatz wurde für 1 min bei 37 °C inkubiert und nach abstoppen auf einem 5 % PAA-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde dann auf einen Röntgenfilm exponiert. Die Größen wurden anhand eines Markers abgeschätzt. Spur 1: Kontrolle ohne aODN; Spur 2: a4asym; Spur 3: a5asym; Spur 4: a6asym; Spur 5: a7asym; Spur 6: a8asym; Spur 7: a9asym; Spur 8: a10asym

5 Diskussion

In dieser Arbeit wird die Anwendung von Ribozymen zur Genregulation in Hyphenpilzen auf der post-transkriptionaler Ebene untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Reportersystem in *Aspergillus giganteus* etabliert, bestehend aus dem Reportergen β-Glukuronidase (*uidA*) unter der Kontrolle des *pah4* Promotors (schwacher Promotor), sowie Ribozymkonstrukten, deren Transkription durch den induzierbaren Promotor *alcA* aus *A. nidulans* gesteuert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass *in silico* entworfene Ribozyme *in vivo* die GUS-Aktivität reduzieren konnten. Ein Vergleich zwischen den *in vitro* und *in vivo* erhaltenen Daten deutet darauf hin, dass eine Auswahl von Ribozymen durch eine zusätzliche *in vitro* Selektion weniger

zielführend ist, als eine ausschließliche Selektion durch eine *in silico* Vorhersage von Ribozymschnittstellen.

5.1 In vitro *Restriktion von* uidA *Transkripten durch* in silico *entwickelte spezifische Ribozyme*

Sieben Ribozyme wurden anhand einer *in silico* Strukturanalyse der *uidA* mRNA hergestellt (siehe 4.1) und anschließend *in vitro* auf ihre Fähigkeit getestet, drei verschiedene *uidA* RNA-Transkripte zu restringieren (siehe 4.2). Als Zielsequenz für die Ribozyme wurde das Triplet „GUC“ ausgewählt, das nach Literaturergebnissen eine maximale Restriktionsaktivität gewährleistet (Kore et al. 1998). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde die Spezifität der Bindung an die *in silico* vorhergesagten Bindestellen und die folgende Restriktion der Zielsequenz überprüft.

In Zeitreihen mit den Ribozymen rz4sym und rz5sym wurde Reaktionszeit von 30 Minuten als geeignete für die Detektion von Reaktionsprodukten ermittelt (Abb. 19 und Abb. 22). Die Zeitreihe mit Ribozym r5sym und dem Substrat SUB1-1short zeigte, dass der Substratumsatz auch nach einer Reaktionszeit von 240 Minuten nicht vollständig war; ca. 90 % des Substrates wurden von dem Ribozym umgesetzt (Abb. 22).

Trotz der zu erwartenden spezifischen Bindung der transkribierten Ribozyme an die *uidA* RNA-Transkripte wurden abhängig von der Größe des Substrates in einigen Ribozym Assays unerwartete Reaktionsprodukte detektiert.

Eine besonders gute Zugänglichkeit für Zielsequenzen im 5’-Bereich der Substrat-RNA schein anhand der *in vitro* Ergebnisse nicht gegeben zu sein. So können die Ribozyme r4sym/r4asym und r5sym/r5asym zwar das Substrat SUB-1-short effektiv spalten (Abb. 24), allerdings produzieren sie keine erwarteten Fragmente mit den größeren Substratversionen. Ein Ribozym Assay mit Ribozym r7asym und den Substraten SUB1-1med und SUB1-1long ergab ausschließlich unerwartete Produkte (Abb. 25 und 26).

Von anderen Autoren wurde bereits eine starke Reduktion der Aktivität von Ribozymen *in vivo* bei steigender Länge des Substrates beobachtet, was auf eine zunehmende Behinderung durch sekundäre und tertiäre Überstrukturen des Substrates zurückgeführt wurde (Ellis and Rogers 1993; Bertrand et al. 1994). In den hier ermittelten Daten ist eine solche Veränderung der Restriktionsaktivität mit steigender Substratlänge *in vitro* nicht nachvollziehbar. Vielmehr konnte bei vielen der hier getesteten Ribozyme eine Abhängigkeit von der Spezifität der Erkennung der vorhergesagten Zielsequenz von der Länge der eingesetzten Substratversion

beobachtet werden. So konnten die Ribozyme mit Zielsequenzen im 5'-Bereich der *uidA* mRNA, mit Ausnahme von rz7asym, nur das kurze Substrat mit den vorhergesagten Produkten schneiden. Dagegen ergaben die Ribozyme mit Zielsequenzen im mittleren Bereich der *uidA* mRNA (rz8asym, rz9asym und rz10asym, Abb. 25 und 26) die erwarteten Produkte nur mit dem mittleren Substrat (rz10asym) oder dem langen Substrat (rz8asym). Einzig rz9asym konnte die vorhergesagten Schnittstellen auf beiden getesteten Substratversionen erkennen und die entsprechenden Reaktionsprodukte produzieren.

Das einzige Ribozym mit einer vorhergesagten Zielsequenz im 3'-Bereich der *uidA* mRNA, Ribozym rz6asym, ergab keine detektierbaren Produkte.

In dieser Arbeit wurden drei verschieden große RNA-Substrate verwendet, um die experimentellen Probleme durch unspezifische RNA-Degradationsprodukte, welche bei zunehmender Größe des RNA-Moleküls vermehrt auftreten, zu berücksichtigen. Diese unerwarteten Zerfallsprodukte können die erwarteten Produkte aus der Ribozymreaktion überlagern und somit die Auswertung eines *in vitro* Assay verfälschen. Es muss in diesem Zusammenhang aber darauf verwiesen werden, dass sich durch die Änderung der Länge der *uidA* mRNA auch die intramolekularen Bindungsverhältnisse verändern können. Somit kann eine Zielsequenz, die als zugänglich in der langen Substratversion vorhergesagt ist, in einer kürzeren Substratversion durch eine veränderte Auffaltung nicht mehr zugänglich sein. Es wurde beispielhaft die Struktur des Substrates SUB1-1short berechnet, um eine derartige Veränderung der Zugänglichkeit für die Ribozyme rz4sym/asym und rz5sym/asym zu untersuchen (Abb. 34). Die kalkulierte Struktur hat eine deutlich veränderte Auffaltung, als die Volllänge *uidA* mRNA (Abb. 12), allerdings sind auch hier Bereiche um die Zielsequenzen der Ribozyme frei zugänglich für eine Hybridisierung.

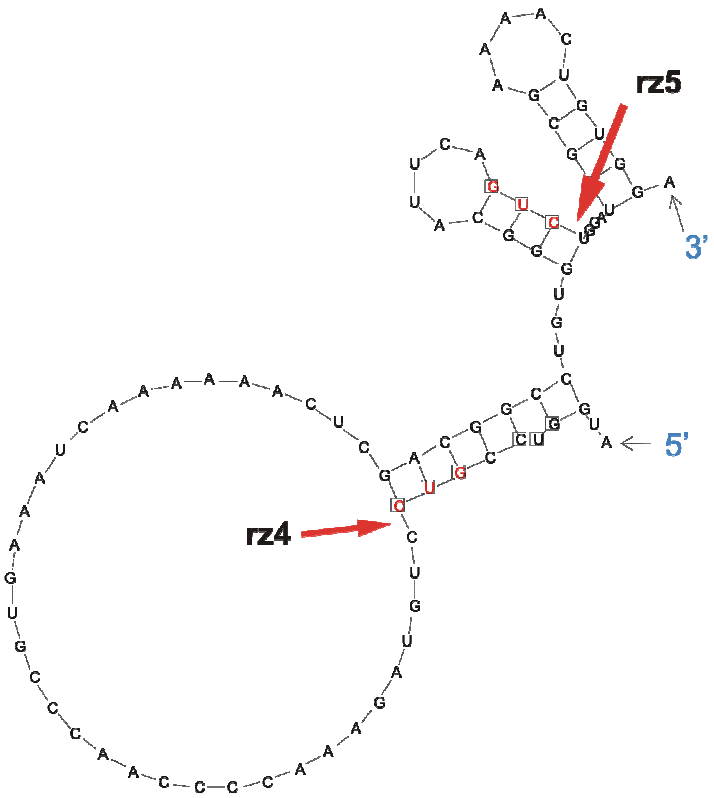


Abb. 34 Auffaltung der RNA des Substrates SUB1-1short, berechnet mit dem Programm RNADRAW für eine Temperatur von 28 °C. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des 217 nt großen Moleküls beginnend mit dem 5'-Ende, der 3'-Bereich wurde für eine übersichtliche Darstellung abgeschnitten. Die Erkennungssequenzen der Ribozyme rz4 und rz5 sind in rot hervorgehoben, der rote Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle für die Ribozyme. Eine Berechnung für eine Temperatur von 37 °C ergab keine veränderte Struktur der RNA.

Unter Berücksichtigung der optimalen Inkubationstemperatur für das Wachstum von *A. giganteus* wurde die Struktur der *uidA* mRNA für die *in silico* Selektion der Ribozyme bei einer Temperatur von 28 °C berechnet. Dagegen wurden die *in vitro* Assays bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt, was den allgemein gebräuchlichen Bedingungen für einen Ribozym Assay entspricht. Verschiedene Arbeitsgruppen stellten bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur *in vitro* keinen Einfluss auf die Erkennung der vorhergesagten Zielsequenz des Ribozyms, sonder ausschließlich eine Steigerung der Ribozymaktivität mit einem Optimum von 50 °C fest (Grassi et al. 1997; Xu et al. 2000; Lin et al. 2003). Um eine Veränderung der topologische Struktur der *uidA* mRNA im bindenden Bereich der Ribozyme bei 28 °C bzw. 37 °C zu untersuchen, wurde die Struktur des Substrates SUB1-1short erneut bei einer Temperatur von 37 °C kalkuliert. Die so ermittelte Struktur zeigte keine Veränderung zu der bei 28 °C kalkulierten Struktur (Abb. 34).

Das Auftreten von unerwarteten Produkten kann unterschiedliche Gründe haben. Neben einem von Bestandteilen der Reaktionslösung bewirkten Strangbruch ist eine unspezifische Bindung an eine partiell homologe Sequenz möglich (AbouHaidar and Ivanov 1999; Kierzek

2001). Weist ein nur partiell homologes Hybrid eine entsprechende Ribozymschnittstelle auf oder dirigiert das katalytische Zentrum an eine derartige Sequenz, so kann hier eine Restriktion erfolgen und unerwartete Reaktionsprodukte hervorbringen (Hertel et al. 1996). Letztendlich kann die Schlussfolgerung getroffen werden, dass eine Korrelation zwischen den *in silico* selektierten Ribozymen und der Spezifität dieser Ribozyme *in vitro* nicht gegeben ist.

5.2 Mutagenese des alcA *Promotors aus* A. nidulans *1711*

Für die *in vivo* Transkription der Ribozyme wurde der Alkohol Dehydrogenase Promotor *alcA* aus *A. nidulans* verwendet, der als einer der stärksten induzierbaren Pilzpromotoren gilt und bereits erfolgreich in Hyphenpilzen der Gattung *Aspergillus* eingesetzt wurde (Felenbok 1991; Felenbok and Sealy-Lewis 1994). *A. nidulans* kann auf EtOH als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen. Dabei wird der Alkohol über Acetaldehyd zum Acetat oxidiert, das innerhalb der Zelle in aktivierter Form als Acetyl-CoA vorliegt. Diese Oxidationsschritte werden von den Enzymen Alkohol Dehydrogenase I (*alcA*) und Aldehyd Dehydrogenase (*aldA*) katalysiert. Eine Reihe chemischer Verbindungen (primäre Alkohole, primäre Monoamine, L-Threonin) eignet sich als Induktor des Ethanol-Katabolismus. Diese Verbindungen werden in eine Aldehydform umgewandelt, zumeist Acetaldehyd, welche als eigentlicher Induktor des *alcA* Promotors fungiert (Flipphi et al. 2002). In Gegenwart leicht metabolisierbarer Energiequellen wie Glukose wird das Ethanol-Regulon in *A. nidulans* durch Katabolitrepression auf transkriptioneller Ebene vom DNA-bindenden Protein CreA reprimiert (Mathieu and Felenbok 1994). CreA hemmt dabei sowohl das *alcA*, als auch das *alcR* Gen, so dass es zu einer schnellen und effizienten Hemmung des Ethanol-Katabolismus kommt. Der *alcA* Promotor verfügt über drei Bindestellen für den Aktivator AlcR sowie über zwei Bindestellen für das reprimierende Protein CreA (Panozzo et al. 1998).

Der *alcA* Promotor aus genomischer DNA von *A. nidulans* 1709 in einer PCR amplifiziert und vor das *uidA* Gen kloniert (Plasmid pHAU1, Abb. A5). Nach Transfer in *A. giganteus* zeigten die Transformanten allerdings keine GUS-Aktivität auf Minimalmedium mit X-Gluc als chromogenem Substrat. In einem Wachstumstest aller *A. nidulans* Stämme des Instituts für Gärungsgewerbe zeigte sich, dass einige Stämme, darunter auch *A. nidulans* 1709, nicht auf Ethanol als alleiniger C-Quelle wachsen konnten. Um mögliche Mutationen, insbesondere im Promotorbereich, festzustellen, wurden die *alcA* Promotoren von A. *nidulans* 1709 sowie *A. nidulans* 1711, welcher ein gutes Wachstum auf EtOH als einziger C-Quelle aufwies, isoliert und sequenziert (Abb. A8). In einem Sequenzvergleich zeigte *A. nidulans* 1709 gegenüber

dem GenBank-Referenzstamm (GenBank Ref. Nr. S47331) vier Konversionen, zwei Deletionen, sowie die Deletion eines 10 Basen umfassenden Bereichs (Abb. A8). Keine dieser Mutationen lag in einer Region, die an der Regulation durch CreA oder AlcR beteiligt ist (Kulmburg et al. 1992, Panozzo et al. 1998, Gwynne et al. 1987). *A. nidulans* 1711 trägt zusätzlich zu den in *A. nidulans* 1709 vorhanden Unterschieden zum GenBank-Referenzstamm weitere fünf Konversionen. Diese zusätzlichen Mutationen scheinen aufgrund des sehr guten Wachstums auf EtOH als alleiniger C-Quelle keinen negativen Einfluss auf die Steuerung der Transkription des *alcA* Gens zu haben. Daher wurde *A. nidulans* 1711 für die weiteren Versuche ausgewählt.

Der *alcA* Promotor wurde mittels Assambly-PCR aus *A. nidulans* 1711 isoliert und dabei gleichzeitig eine für nachfolgende Ligationen störende, interne *Apa*I Schnittstelle eliminiert. Zur Überprüfung der Funktionalität des mutierten Alkohol Promotors *alcAmut* in *A. giganteus* wurde dieser zunächst vor das *uidA* Gen ligiert (Plasmid pHAU2, Abb. A5) und in *A. giganteus* 0903 transferiert. Ein qualitativer GUS Platten-Assay zeigte eine starke Blaufärbung nach Induktion des *alcAmut* Promotors mit EtOH (Tab. 8), was die Funktionalität des *alcAmut* Promotors in *A. giganteus* beweist. Auch ohne Induktion war eine, wenn auch äußerst schwache, Blaufärbung zu erkennen. Dieses deutete auf eine geringe basale Aktivität des *alcAmut* Promotors hin, wie dieses zuvor schon bei einer Verwendung des *alcA* Promotors für die Genexpression in *A. niger* beobachtet wurde (Nikolaev et al. 2002). Eine solche basale Aktivität könnte Folge von zusätzlichen Mutationen im *alcA* Promotor sein, die der *alcA* Promotor des Referenzstamms aus GenBank nicht enthält.

5.3 Expression des uidA *Gens durch den* pah4 *Promotor aus* Podospora anserina

Aufgrund der Forderung nach einem geringen zellulären Level an Substrat-mRNA wurde der *pah4* Promotor aus *P. anserina* für die Expression der β-Glukuronidase ausgewählt (Lüking 1997). In *P. anserina* ist dieser Promotor für die sehr schwache Expression der RNA Helikase PAH-4 verantwortlich. Der *pah4* Promotor wurde aus dem Plasmid pU-H4 isoliert und vor das *uidA* Gen kloniert (Plasmid pHah4uidA). Die Funktionalität des *pah4* Promotors in *A. giganteus* wurde in einem vergleichenden GUS-Assay nachgewiesen (Abb. 27). Transformanten, in die das Plasmid pHah4uidA transferiert wurde, zeigten nur 12 % der GUS-Aktivität von Transformanten, in denen die β-Glukuronidase Expression durch den *gpdA* Promotor gesteuert wird (Plasmid pHNOM102). Der *pah4* Promotor ist somit geeignet,

die Transkription des *uidA* Gens in *A. giganteus* mit dem geforderten geringen Level zu steuern.

5.4 Transformation von A. giganteus *0903 mit den Ribozymplasmiden*

Für die *in vivo* Analyse der Ribozyme wurden Plasmide erstellt, welche die Ribozym-Expressionskassette (*alcAmut* Promotor, Ribozym und *tef* Terminator), die β-Glukuronidase-Expressionskassette (*pah4* Promotor, *uidA* Gen und *trpC* Terminator), sowie der Hygromycin-Expressionskassette (*gpdA* Promotor, *hph* Gen und *bt* Terminator) enthalten (Abb. A4). *A. giganteus* 0903 wurde mit diesen Plasmiden transformiert und positive Transformanten auf Hygromycin enthaltendem Minimalmedium selektiert. Da die mehrkernigen Konidien von *A. giganteus* zu einem heterokaryotischen Myzel auskeimen, mussten die Transformanten mehrfach auf Selektivmedium passagiert werden, bis ein ausschließlich homokaryotisches Myzel nachzuweisen war. Homokaryotische Myzelien konnten durch vergleichende Inkubation auf Minimalmedium mit bzw. ohne Selektionsdruck überprüft werden.

Die Transformationsraten schwankten zwischen 0,1 bis 7 Transformanten je µg eingesetztem Plasmid, was unter den üblichen Transformationsraten für die protoplastenbasierte Transformation von *A. giganteus* lag (Meyer et al. 2003). Im Gegensatz zu der Methode von Meyer et al. (2003) wurde für die Erzeugung von Protolasten nicht Novozym 234 (Calbiochem), sondern der Enzymmix Glucanex (GW Biotechnologie) verwendet. Da Novozym234 nicht mehr kommerzielle erhältlich ist, wurden in vorhergehenden Versuchen verschiedene protoplastierende Enzymmixe auf damit zu erzielende Transformationsraten untersucht. Dabei wurde Glucanex bei einer etwas geringeren Transformationseffizienz als Novozym 234 aufgrund des besseren Preis-Leistungs-Verhältnisses ausgewählt. Des Weiteren sind die hier transferierten Ribozymplasmide pRx mit ca. 10 kb deutlich größer als die von Meyer et al. (2003) transferierten Plasmide, was nach Untersuchungen von Siguret et al. 1994) ebenfalls zu einer Verringerung der Transformationseffizienz führen kann. Zusätzlich kann es zu Rekombinationsereignissen innerhalb der Zelle oder auch zur Integration in stille Bereiche des Genoms gekommen sein (Murnane et al. 1990).

Um Integrationsereignisse wie Tandemintegrationen und multiple Integrationen zu überprüfen, wurden einzelne Transformanten in einer Southern Analyse untersucht. Dabei

wurden Einzel- und Tandem-Integrationen nachgewiesen, wobei jedoch kein Zusammenhang zwischen der GUS-Aktivität dieser Klone und der Art der Integration bestand.

5.5 GUS-Assay mit Proteinextrakten der Ribozymtransformanten

Die Ribozymtransformanten wurden in einem Parallelansatz unter induzierenden und unter nicht-induzierenden Bedingungen inkubiert und anschließend die Proteine extrahiert. Die auf den Proteingehalt der Proteinrohextraktes bezogene β-Glukuronidase Aktivität wurde durch den Umsatz des Substrates MUG in das Fluorophor MU gemessen (Gallagher 1995). Nur ein Teil der positiven Transformanten zeigte dabei eine messbare GUS-Aktivität (Tab. 9). Das Wachstum von Transformanten auf Selektivmedium mit Hygromycin weist auf eine intakte Hygromycinkassette des transferierten Plasmides nach der Integration in das Genom von *A. giganteus* hin. Eine fehlende GUS-Aktivität deutet auf eine Rekombination der β-Glukuronidase Expressionskassette während der heterologen Integration hin. Positionseffekte, wie sie auch von Kleinjan und van Heyningen (1998) für humane Virulenzgene beschrieben werden, können in Verbindung mit der geringen Expressionsstärke des *pah4* Promotors zu einer derart schwache Transkription der *uidA* mRNA führen, dass die β-Glukuronidase Aktivität unterhalb der Nachweisgrenze des benutzten Fluorometers liegt. Ein weiterer Grund könnte in der basalen Expression des *alcA* Promotors liegen. Ein geringer Level an Ribozymen könnte schon ausreichen, um eine schwach transkribierte *uidA* mRNA soweit abzubauen, dass eine β-Glukuronidase Aktivität nicht mehr zu messen ist. Da eine experimentelle Untersuchung dieser Phänomene zu aufwendig erschien, wurden in den weiteren Versuchen nur die Ribozymtransformanten mit einer messbaren GUS Aktivität berücksichtigt.

GUS Assays mit den Transformanten, die eine messbare GUS-Aktivität aufwiesen, ergaben, dass durch alle Ribozyme nach Induktion durch EtOH die Reporteraktivität reduziert wurde (Tab. 9). Auffälligerweise liegen die Zielsequenzen der Ribozyme, mit denen eine maximale Reduktion der GUS-Aktivität von 100 % erreichten wurde (R4sym, R4asym, R5sym, R5asym, R7asym), im 5'-Bereich der *uidA* mRNA. Dieses lässt auf eine besonders gute Zugänglichkeit zur Zielsequenz „GUC" der Ribozyme im 5'-Bereich schließen. Es ist in diesem Zusammenhang bekannt, dass in der 5'-Region einer mRNA die Signale für die Initiation der Translation sowie Spleißstellen lokalisiert sind. Um die Zugänglichkeit für die Translationsmaschinerie bzw. das Spleissosom zu gewährleisten, ist eine verhältnismäßig offene räumliche Struktur notwendig (Heidenreich et al. 1995; Amarzguioui and Prydz 1998; Zhao and Lemke 1998). Da allerdings bei den meisten Ribozymserien mit Zielsequenzen im

5'-Bereich nur wenige Transformanten mit messbarer GUS-Aktivität erhalten wurden, ist eine besonders gute Zugänglichkeit der 5'-Zielsequenzen hier eher als eine Tendenz zu bewertet.
Während die Klone der Transformationsserie R10asym mit einer durchschnittlichen Reduktion der Reporter Aktivität von 24 % das Ribozym mit der geringsten *in vivo* Aktivität trugen, zeigte die Transformationsserie R5sym mit einer durchschnittlichen GUS-Reduktion von 98 % bei zwölf gemessenen Klonen die höchste Aktivität.
Verschiedene Transformanten innerhalb einer Transformationsserie zeigten zum Teil unterschiedliche Aktivitäten in der GUS-Reduktion. So schwankten die Reduktionswerte von Klonen der Serie R4asym von 2 % bis zu 100 % (Tab. A1). Diese Unterschiede könnten sich durch Positions- und Titrationseffekte erklären, durch die Integration unterschiedlicher Kopiezahlen an verschiedenen chromosomalen Orten oder auch durch chromosomale Reorganisation begründet sein (Jarai 1997; Minetoki et al. 1998). So stellten Thompson und Gasson (2001) einen bis um das 14-fache variierenden Expressionslevel für ein Reportergen als Folge einer heterologen Integration in *S. cerevisiae* fest. Die Ergebnisse der Southern Analyse (siehe 4.3.3) deuteten dagegen nicht auf einen Zusammenhang zwischen der Ribozymaktivität und den Integrationsereignissen hin.
Anderer Arbeitsgruppen konnten in der Maus (Alami et al. 1999), in humanen Zelllinien (Bramlage et al. 1999; Kuwabara et al. 2001) und in *S. cerevisiae* (Samarsky et al. 1999) eine Reduktion der Genexpression durch Ribozyme von 50 % bis zu 90 % erreichen. Ein hoher Überschuss an Ribozym durch den starken *alcAmut* Promotor in Kombination mit einer schwachen Reporterexpression durch den Promotor *pah4* erklären das nahezu komplette Abschalten der β-Glukuronidase Aktivität bei einigen der untersuchten Transformanten. Es wäre zu untersuchen, ob eine ähnliche hohe Aktivität erreicht wird, wenn ein stärkerer Promotor für die Steuerung der Transkription des *uidA* Gens verwendet wird.

5.6 Effizienz und Spezifität von Ribozymen mit symmetrischen und mit asymmetrischen bindenden Armen

Hendry and McCall (1996) konnten mittels *in vitro* Experimenten zeigen, dass asymmetrische Ribozyme eine höhere Aktivität als symmetrische Ribozyme aufweisen. Um den Einfluss der Länge der bindenden Arme auf die Aktivität der Ribozyme zu testen, wurden die Ribozyme rz4 und rz5 in zwei verschiedenen Armlängen konstruiert. Bei den Ribozymen rz4sym und rz5sym beträgt die Länge der Arme I und III jeweils 10 Nukleotide, wobei Arm I von rz4sym aufgrund der Position direkt am 3'-Ende des *uidA* Gens nur 9 Nukleotide aufweist. Bei den

Ribozymen rz4asym und rz5asym besteht Arm I dagegen aus nur fünf bindenden Nukleotiden.

Die *in vitro* Analysen dieser Ribozymvarianten zeigten praktisch keinen Unterschied in der Spezifität der Bindung an die ausgewählte Zielsequenz oder in der Aktivität der Ribozymreaktion. Im Ribozym Assay mit SUB1-1short konnten beide Ribozymvarianten die Zielsequenz restringieren und die erwarteten Produkte liefern. Mit der Ausnahme von rz5asym, welches mit SUB1-1med zwei unspezifische Produkte erzeugte, konnten die Substrate SUB1-1med und SUB1-1long nicht restringiert werden. Da bei der *in vivo* Analyse der Ribozymtransformanten nur ein einzelner Transformant der Serie R4sym eine messbare GUS-Aktivität aufwies, kann eine verlässliche Aussage über den Effekt der Länge der bindenden Arme nur für die Transformationsserien R5sym und R5asym getroffen werden. Hier zeigten beide Varianten eine maximale GUS-Reduktion von 100 %, jedoch war die durchschnittliche Reduktion bei R5sym mit 98 % höher als bei R5asym mit 71 %.

Im Gegensatz zu den Schlussfolgerungen von Hendry and McCall (1996) lässt sich aus diesen Daten schließen, dass asymmetrische Ribozyme *in vivo* eine leicht verringerte Effizienz im Vergleich zu symmetrischen Ribozymen haben.

Bei einer für die Ribozymaktivität optimalen Länge der bindenden Arme erfolgt die Dissoziation des Ribozyms vom Substrat direkt nach der Restriktion der Zielsequenz (Hertel et al. 1996). Möglicherweise ist aufgrund des einen kürzeren bindenden Arms die Dissoziationsgeschwindigkeit der asymmetrischen Ribozyme größer als die der symmetrischen Ribozyme. So kommt es unter den *in vivo* herrschenden Bedingungen vermutlich dazu, dass das asymmetrische Ribozym sich bereits von der Zielsequenz löst, bevor eine Restriktion stattgefunden hat.

5.7 Analyse der in vivo *detektierten Reaktionsprodukte*

Ein Nachweis für die Reduktion der Genexpression durch ein Ribozym sollte idealerweise durch den Nachweis der Reaktionsprodukte geführt werden. Drei mögliche Wirkungen der Ribozyme, die zur Reduktion der Reporterexpression führen, sind folgende:

i) Das Ribozym bindet an die Ziel-mRNA und wirkt dort wie eine Antisense RNA.

ii) Da Ribozym bindet an die Ziel-mRNA und spaltet sie, aber dissoziiert nicht von den Reaktionsprodukten.

iii) Das Ribozym restringiert die Ziel-mRNA nach der Hybridisierung und kann nach Dissoziation der Produkte einen neuen Zyklus eingehen.

Der letzte Fall stellt den für ein Ribozym gewünschten „turn over“ dar (Jankowsky and Schwenzer 1998). Um zu zeigen, dass die beobachtete Reduktion der GUS-Aktivität nicht Folge einer Antisense Wirkung ist, sondern tatsächlich auf der Restriktion der *uidA* mRNA beruht, wurde die RNA ausgewählter Transformanten untersucht. Obwohl die *uidA* mRNA nur mit geringer Stärke transkribiert wurde, konnte in der Northern Analyse ein spezifisches Reaktionsprodukt für R6asym und jeweils unspezifische Produkte für den *in vivo* Assay mit R4asym und R5asym nachgewissen werden.

Wie lässt sich das Auftreten dieser unspezifischen Reaktionsprodukte erklären? Bei der Bebrütung von *A. giganteus* wurde eine Reaktionstemperatur von 28 °C gewählt, die wahrscheinlich zur Bildung von Hybriden mit weniger als 100 % Homologie ausreichte. Ein gebundenes Transkript wird aufgrund des Antisense-Effektes nicht translatiert, sondern der post-transkriptionalen Degradation unterworfen (Crooke 1999; Dias and Stein 2002). Wird bei dieser Hybridisierung das Ribozym in die katalytisch aktive Form gebracht und ist zudem ein für die Restriktion durch das Ribozym notwendiges „NHH“ Triplet an geeigneter Position vorhanden (Shimayama et al. 1995; Kore et al. 1998), so kann die Restriktion dieser mRNA erfolgen und es könnten die unerwarteten Abbauprodukte entstehen. Hierdurch könnten auch die unerwarteten Signale in den *in vitro* Experimenten erklärt werden, wobei die Reaktionstemperatur in den *in vitro* Experimenten mit 37 °C allerdings deutlich stringentere Bedingungen für eine Hybridisierung darstellten (Tab. 7).

Die Spezifität der Bindung der Ribozyme an die *uidA* mRNA wurde in einem RNase H Assay überprüft. Den Ribozymsequenzen entsprechend wurden Antisense-Moleküle synthetisiert und *in vitro* mit den drei unterschiedlich langen *uidA* Substraten getestet. Die aODNs a4asym und a5asym zeigten, analog den zugehörigen Ribozymen, die erwarteten Produkte mit Substrat SUB1-1short, aber nicht erwartete oder kein Produkte mit den anderen beiden Substraten. Dagegen waren bei allen anderen getesteten Antisense-Molekülen die erwarteten Fragmente zu erkennen, was auf eine hohe Spezifität der Bindung hinweist.

In einer DotPlot Analyse (DNASTAR Modul MegAlign, Abb. 35) wurde überprüft, ob es homologe Bereiche auf der *uidA* mRNA zu den aODNs a4asym und a5asym mit einer Ähnlichkeit von über 50 % gibt, die zudem eine Ribozymbindestelle aufweisen. Das ca. 500 nt große Fragment in der Northern Analyse mit R4asym wird bei einer Hybridisierung mit dem Sequenzbereich um das „GTT“ Triplet bei Position 1341 nt mit einer 57,1 %gen Homologie erzeugt (Abb. 35a). Eine Restriktion hinter diesem Triplet ergibt Fragmente der Größe 1343 nt und 469 nt. Abbildungen 35b und 35c zeigen Hybride zwischen dem Antisense-Molekül a5asym und der *uidA* mRNA mit einer Homologie von 53,3 % bzw. 60 %.

In beiden Fällen liegt ein „GTC“ Triplet an der für die Restriktion durch das Ribozym r5asym erforderlichen Position, wodurch ein in der Northern Analyse von R5asym detektiertes ~ 1000 nt Fragment erzeugt wird. Eine derartige unspezifische Hybridisierung kann das Auftreten der unspezifischen Reaktionsprodukte in der Northern Analyse der untersuchten Klone aus den Serien R4asym und R5asym erklären. Eine ähnliche unspezifische Restriktion eines Substrates konnte von Hertel et al. (1996) durch *in vitro* Experimente gezeigt werden. Dabei wurde dem getesteten Ribozym ein Substrat ohne Fehlpaarungen und ein Substrat mit einer Fehlpaarung im bindenden Arm angeboten. Beide Substrate wurden mit vergleichbarer Effizienz von dem Ribozym gebunden und restringiert.

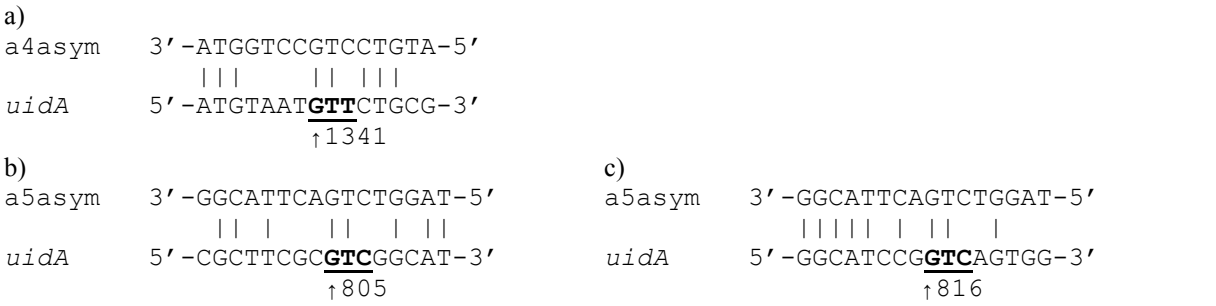


Abb. 35 DotPlot Analyse der *uidA* mRNA mit dem Antisense Molekül a) a4sym und b, c) a5asym (DNASTAR Modul MegAlign). Die Erkennungssequenz der Ribozyme in der *uidA* mRNA ist fett und unterstrichen markiert. a) Restriktion hinter dem Triplet „GTT“ Produkte der Größe ~ 1343 nt und ~ 469 nt. Der „Ähnlichkeits-Index“ beträgt 57,1. b) Durch Restriktion hinter dem Triplet „GTC“ entstehen Produkte der Größe ~ 1007 nt und ~ 805 nt bei einem „Ähnlichkeits-Index“ von 53,3.c) Eine Restriktion hinter dem Triplet „GTC“ ergibt Produkte der Größe ~ 993 nt und ~ 819 nt. Der „Ähnlichkeits-Index“ beträgt 60.

5.8 Eignung der in silico *Selektion für* in vivo *aktive Ribozyme*

Sieben Ribozyme wurden anhand einer *in silico* Strukturanalyse des *uidA* Gens entwickelt und anschließend *in vitro* und *in vivo* auf ihre Fähigkeit hin getestet, die *uidA* mRNA zu restringieren.

Innerhalb der Zelle führen verschiedene zusätzliche Faktoren wie eine 5’-Leitsequenz, ein 3’-polyA-Schwanz und auch die Bindung an Ribonukleoproteine zu einem topologisch veränderten RNA-Molekül (Shatkin and Manley 2000). Eine *in silico* Berechnung der Sekundärstruktur einer mRNA ist also nur als ungefähre Annäherung an die tatsächlich *in vivo* vorliegende Struktur zu sehen. Trotzdem ist die Strukturvorhersage durch computergestützte Methoden ein sehr wertvolles Hilfsmittel. Insbesondere bei großen RNAs können aber lokale Faltungen eine eigentlich energetisch günstigere Faltung zwischen entfernten Regionen verhindern (Amarzguioui et al. 2000). Ähnliche Ergebnisse erzielten andere Arbeitsgruppen mit *in silico* entwickelten Ribozymen, die in einem *in vitro* Test eine

geringere Effizienz zeigten, als im *in vivo* Test, was durch eine andere Faltung des Substrates *in vitro* als *in vivo* begründet wird (L'Huillier et al. 1992; Domi et al. 1996). Demzufolge bevorzugen einige Autoren die ausschließliche *in silico* Auswahl von Ribozymen und Zielbereichen gegenüber einer *in vitro* Selektion von aktiven Ribozymen (Patzel et al. 1999; Amarzguioui et al. 2000; Scherr et al. 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten unterstützen eine solche Herangehensweise, da alle nach der *in silico* Strukturvorhersage entwickelten Ribozyme im GUS-Assay *in vivo* zu einer Reduktion der β-Glukuronidase Aktivität führten, wogegen *in vitro* insbesondere die vollständige *uidA* mRNA (SUB1-1long) nur teilweise als Substrat erkannt wurde.

Tabelle 11 zeigt einen Vergleich der Resultate aus den *in vitro* und den *in vivo* Analysen. Während die Ribozyme r4sym/r4asym und r5sym/r5asym nur die kurze Substratvariante SUB1-1short *in vitro* spezifisch restringieren konnten, zeigten sie eine effiziente Reduktion des Reporters *in vivo* mit bis zu 100 %. Ribozym r7asym produzierte *in vitro* mit allen Substratversionen ausschließlich unspezifische Produkte, die Transformante der Serie R7asym zeigten dagegen eine maximale GUS-Reduktion von 100 % *in vivo*. Der *in vitro* Assay mit Ribozym rz6asym ergab keine detektierbaren Produkte, *in vivo* allerdings konnten R6asym Transformanten eine GUS-Reduktion von bis zu 75 % erreichen. Die Ribozymtransformanten R10asym zeigten *in vivo* die geringste Aktivität mit einem Maximum von 24 %. Abhängig von der eingesetzten Substratversion wurden die erwarteten oder auch unerwarteten Produkte in dem *in vitro* Assay mit rz10asym *in vitro* beobachtet. Einzig die Ribozyme rz8asym und rz9asym restringierten alle getesteten *uidA* Substrate *in vitro* an der vorhergesagten Zielsequenz, gleichzeitig konnten die zugehörigen Transformationsserien R8asym und R9asym die Reporter Expression *in vivo* mit 70 % bzw. 56 % unterdrücken.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Ribozymaktivität *in vitro* und der GUS-Reduktion *in vivo* ist anhand der hier ermittelten Daten nicht gegeben. Auffällig ist, dass die Ribozymtransformanten R4sym/R4asym, R5sym/R5asym sowie R7asym, deren vorhergesagte Zieltripletts im 5'-Bereich der *uidA* mRNA lokalisiert sind, eine maximale Reduktion des Reporters *in vivo* von 100 % erreichten. Somit scheinen Zielsequenzen für die Ribozyme im 5'-Bereich der mRNA für eine Restriktion durch das Ribozym *in vivo* leichter zugänglich zu sein. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch andere Arbeitsgruppen (Liu et al. 2000). Dagegen sprechen allerdings die Resultate der Northern Analyse, wonach anscheinend bei den Ribozymtransformanten R4asym und R5asym die Restriktion an einem nicht vorhergesagten „GUC"-Triplet im mittleren Bereich der *uidA* mRNA stattgefunden hat. Offensichtlich verhinderte hier die Faltung der *uidA* mRNA *in vivo* in den Bereichen der

vorhergesagten Zielsequenzen eine Hybridisierung mit dem jeweiligen Ribozymen. Eine Bindung an alternative Sequenzbereiche der *uidA* mRNA mit geringerer Homologie führte sehr wahrscheinlich zu den beobachteten Reaktionsprodukten.

Tab. 11 Vergleich der Ergebnisse der *in vitro* Ribozym Assays mit der maximal erreichten Reduktion der GUS-Aktivität in *A. giganteus* Ribozymtransformanten *in vivo*.

Ribozyme / Transformante	**Restriktion der *uidA* mRNA Versionen *in vitro***	**maximale GUS-Reduktion *in vivo***
rz4sym/R4sym	Erwartete Produkte mit SUB1-1short, keine detektierbaren Produkte mit SUB1-1med und SUB1-1long	**100 %**
rz4asym/R4asym		**100 %**
rz5sym/R5sym		**100 %**
rz5asym/R5asym	Erwartete Produkte mit SUB1-1short, unerwartete Produkte mit SUB1-1med, keine Produkte mit SUB1-1long	**100 %**
rz6asym/R6asym	Keine Produkte	75 %
rz7asym/R7asym	Unerwartete Produkte mit SUB1-1med und SUB1-1long	**100 %**
rz8asym/R8asym	Unerwartete Produkte mit SUB1-1med und erwartete Produkte mit SUB1-1long	70 %
rz9asym/R9asym	Erwartete Produkte mit SUB1-1med und SUB1-1long	56 %
rz10asym/R10asym	Erwartete Produkte mit SUB1-1med, unerwartete Produkte mit SUB1-1long	24 %

5.9 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Anwendung der Ribozymtechnologie für eine effiziente, post-transkriptionale Unterdrückung der Genexpression in *A. giganteus* ein vielversprechendes molekularbiologisches Werkzeug darstellt. Die *in silico* Selektion von Ribozymschnittstellen liefert Ribozyme, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ziel-mRNA auch *in vivo* erkennen und somit die Genexpression reduzieren können. Allerdings kann eine hohe Aktivität *in vivo* nur unvollständig vorhergesagt werden, so dass hocheffiziente Ribozyme erst *in vivo* abschließend ausgewählt werden können. Eine Vorauswahl von Ribozymen durch eine *in vitro* Selektion erscheint dagegen nicht sinnvoll, da keine direkte Korrelation zwischen den Ergebnissen der Ribozym Assays *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden konnte. Auffällig ist eine anscheinend gute Zugänglichkeit von Zielsequenzen im 5'-Bereich der *uidA* mRNA *in vivo*.

Die Reduktion der Reporteraktivität von bis zu 100 % zeigt die hohe Effizienz der Ribozymtechnologie. Allerdings darf hier nicht außer Acht gelassen werden, dass die Bedingungen durch die Wahl der Promotoren eine derartige Reduktion der Reporteraktivität begünstigten. Soll die Expression eines Gens reprimiert werden, das unter der Kontrolle eines starken Promotors steht, so ist wiederum ein ausgesprochen starker Promotor für die

Ribozymexpression notwendig, der dann einen entsprechenden Ribozym-Überschuss gewährleisten kann.

Nur im Fall eines Ribozyms konnten spezifische Reaktionsprodukte *in vivo* nachgewiesen werden. Bei zwei weiteren Ribozymen waren zwar Reaktionsprodukte zu erkennen, allerdings beruhend auf einer unspezifischen Restriktion der *uidA* mRNA. In weiterführenden Versuchen sollten alle Ribozymtransformanten auf Reaktionsprodukte untersucht werden, so dass eine abschließende Aussage über die Spezifität der Ribozyme *in vivo* getroffen werden kann.

Zusammenfassung

Hyphenpilze sind wirtschaftlich bedeutende Produzenten von primären und sekundären Metaboliten. Durch gerichtete Beeinflussung von Stoffwechselflüssen (Metabolic Engineering) kann die Produktbildung in industriell genutzten Pilzstämmen verbessert bzw. die Produktion von unerwünschten Nebenprodukten vermindert werden. Häufig sind Produktbildungs- und Wachstumsphase zeitlich getrennt. Es ist daher oftmals notwendig, die nötigen Eingriffe in den Pilzstoffwechsel zeitlich steuerbar zu gestalten. Ein viel versprechendes Werkzeug für diesen Zweck könnte die posttranskriptionale Regulation der Genexpression mit Hilfe der Ribozymtechnologie darstellen.

Da es bisher keine Beispiele für die Verwendung von Ribozymen in Hyphenpilzen gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modellsystem (GUS-Reportersystems aus *E. coli*, *uidA* Gen unter der Kontrolle des *pah4*-Promoter) etabliert, mit dessen Hilfe die *in vivo* Aktivität von Ribozymen in dem Hyphenpilz *Aspergillus giganteus* untersucht werden konnte.

Basierend auf einer *in silico* Strukturvorhersage der *uidA* RNA wurden sieben Ribozym Zielsequenzen („GUC“) identifiziert. Von den anschließend entwickelten, im Bereich der Zielsequenzen bindenden Ribozyme wurden unterschiedliche Versionen generiert, um u.a. den Einfluss der Länge der bindenden Arme auf die Ribozymaktivität zu testen.

Die Aktivität der unterschiedlichen Ribozyme und der Einfluss der Größe des Substrats auf die Ribozym-katalysierte Spaltung wurde durch die Verwendung unterschiedlich großer 5’-Fragmente der *uidA* mRNA *in vitro* untersucht.

Anschließend wurden Ribozym-kodierende Plasmide nach *A. giganteus* transferiert und über das Reportersystem auf RNA und Proteinlevel deren Funtkionalität gezeigt.

Alle *in silico* entwickelten Ribozyme reduzierten die Reporteraktivität *in vivo*. Eine vollständige Repression der GUS-Aktivität erreichten Ribozyme mit Zielsequenzen im 5’-Bereich der *uidA* mRNA, was auf eine besonders gute Zugänglichkeit dieser Region hinweist. Ribozyme mit symmetrischen Bindungsarmen zeigten *in vivo* eine höhere Aktivität als Ribozyme mit asymmetrischen Bindungsarmen. Die Untersuchung der *in vivo* Spaltprodukte zeigte neben den erwarteten auch unerwartete Abbauprodukte, welche in einer DotPlot Analyse auf die Restriktion alternativer Zielsequenzen zurückgeführt werden konnten.

Die vorliegende Arbeit ist die erfolgreiche Anwendung von Ribozymen zur Genregulation in Hyphenpilzen. Die Ribozymtechnologie ist deshalb als Werkzeug für das Metabolic Engineering in industriell und auch wissenschaftlich interessanten Hyphenpilzen denkbar, und eine interessante Alternative zu den konventionellen Methoden.

6 Literaturverzeichnis

AbouHaidar, M. G. and I. G. Ivanov (1999). "Non-enzymatic RNA hydrolysis promoted by the combined catalytic activity of buffers and magnesium ions." Z Naturforsch [C] **54**(7-8): 542-548.

Alami, R., J. G. Gilman, Y. Q. Feng, A. Marmorato, I. Rochlin, S. M. Suzuka, M. E. Fabry, R. L. Nagel and E. E. Bouhassira (1999). "Anti-beta s-ribozyme reduces beta s mRNA levels in transgenic mice: potential application to the gene therapy of sickle cell anemia." Blood Cells Mol Dis **25**(2): 110-119.

Amarzguioui, M., G. Brede, E. Babaie, M. Grotli, B. Sproat and H. Prydz (2000). "Secondary structure prediction and in vitro accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes." Nucl Acid Res **28**(21): 4113-4124.

Amarzguioui, M. and H. Prydz (1998). "Hammerhead ribozyme design and application." Cell Mol Life Sci **54**(11): 1175-1202.

Banerjee, D. (2001). "Genasense (Genta Inc)." Curr Opin Investig Drugs **2**(4): 574-80.

Baskerville, S. and D. P. Bartel (2002). "A ribozyme that ligates RNA to protein." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9154-9159.

Bell, M. A., A. K. Johnson and S. M. Testa (2002). "Ribozyme-catalyzed excision of targeted sequences from within RNAs." Biochemistry **41**(51): 15327-15333.

Bennett, J. W. (1998). "Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology." J Biotechnol **66**(2-3): 101-7.

Bertrand, E., R. Pictet and T. Grange (1994). "Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function?" Nucleic Acids Res **22**(3): 293-300.

Birikh, K. R., P. A. Heaton and F. Eckstein (1997). "The structure, function and application of the hammerhead ribozyme." Eur J Biochem **245**(1): 1-16.

Blount, K. F. and O. C. Uhlenbeck (2002). "The hammerhead ribozyme." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 1119-1122.

Blumenthal, C. Z. (2004). "Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi." Regul Toxicol Pharmacol **39**(2): 214-228.

Braasch, D. A. and D. R. Corey (2002). "Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression." Biochemistry **41**(14): 4503-10.

Bradamante, S., L. Barenghi, G. Beretta, M. Bonfa, M. Rollini and M. Manzoni (2002). "Production of lovastatin examined by an integrated approach based on chemometrics and DOSY-NMR." Biotechnol Bioeng **80**(5): 589-593.

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

Brakhage, A. A. (1998). "Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 547.

Bramlage, B., S. Alefelder, P. Marschall and F. Eckstein (1999). "Inhibition of luciferase expression by synthetic hammerhead ribozymes and their cellular uptake." Nucl Acid Res **27**(15): 3159-3167.

Brantl, S. (2002). "Antisense RNAs in plasmids: control of replication and maintenance." Plasmid **48**(3): 165-173.

Breaker, R. R. (1999). Principles and Protocols. Intracellular Ribozyme Applications. J. Rossi. Norfolk, Horizon Scientific Press**:** 1-19.

Breaker, R. R. (2002). "Engineered allosteric ribozymes as biosensor components." Curr Opin Biotechnol **13**(1): 31-39.

Brown, S. J., J. P. Mahaffey, M. D. Lorenzen, R. E. Denell and J. W. Mahaffey (1999). "Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects." Evol Dev **1**(1): 11-15.

Bueno, D. J. and G. Oliver (2004). "Determination of aflatoxins and zearalenone in different culture media." Methods Mol Biol **268**: 133-138.

Burdock, G. A., M. G. Soni and I. G. Carabin (2001). "Evaluation of health aspects of kojic acid in food." Regul Toxicol Pharmacol **33**(1): 80-101.

Burke, D. H. (2003). Ribozyme-catalyzed Genetics. The Genetic Code and the Origin of Life. L. R. D. Pouplana. Houston, Eurekah.com, Incorporated.

Burke, D. H., N. D. Ozerova and M. Nilsen-Hamilton (2002). "Allosteric hammerhead ribozyme TRAPs." Biochemistry **41**(21): 6588-6594.

Buzayan, J. M., A. Hampel and G. Bruening (1986). "Nucleotide sequence and newly formed phosphodiester bond of spontaneously ligated satellite tobacco ringspot virus RNA." Nucleic Acids Res **14**(24): 9729-9743.

Byun, J., N. Lan, M. Long and B. A. Sullenger (2003). "Efficient and specific repair of sickle beta-globin RNA by trans-splicing ribozymes." Rna **9**(10): 1254-1263.

Campbell, T. B., C. K. McDonald and M. Hagen (1997). "The effect of structure in a long target RNA on ribozyme cleavage efficiency." Nucleic Acids Res **25**(24): 4985-4993.

Castanotto, D., J. R. Li, A. Michienzi, M. A. Langlois, N. S. Lee, J. Puymirat and J. J. Rossi (2002). "Intracellular ribozyme applications." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 1140-1145.

Cech, T. R. (1990). "Self-splicing of group I introns." Annu Rev Biochem **59**: 543-68.

Chang, Z., S. Westaway, S. Li, J. A. Zaia, J. J. Rossi and L. J. Scherer (2002). "Enhanced expression and HIV-1 inhibition of chimeric tRNA(Lys3)-ribozymes under dual U6 snRNA and tRNA promoters." Mol Ther **6**(4): 481-489.

Chapman, K. A. and R. D. Wells (1982). "Bacteriophage T7 late promoters: construction and in vitro transcription properties of deletion mutants." Nucleic Acids Res **10**(20): 6331-40.

Chapple, K. E., D. P. Bartel and P. J. Unrau (2003). "Combinatorial minimization and secondary structure determination of a nucleotide synthase ribozyme." Rna **9**(10): 1208-1220.

Chen, W., C. F. Bennett, T. P. Condon, K. Stecker, L. Tian, B. D. Kahan and S. M. Stepkowski (2001). "Methoxyethyl modification of phosphorothioate ICAM-1 antisense oligonucleotides improves prevention of ischemic/reperfusion injury." Transplant Proc **33**(1-2): 854.

Chetouani, F., P. Monestie, P. Thebault, C. Gaspin and B. Michot (1997). "ESSA: an integrated and interactive computer tool for analysing RNA secondary structure." Nucleic Acids Res **25**(17): 3514-3522.

Chu, J. and B. J. Dolnick (2002). "Natural antisense (rTSalpha) RNA induces site-specific cleavage of thymidylate synthase mRNA." Biochim Biophys Acta **1587**(2-3): 183-93.

Coelho, G. D. and E. C. Carmona (2003). "Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization." J Basic Microbiol **43**(4): 269-277.

Cogoni, C. and G. Macino (1997). "Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in Neurospora crassa." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10233-10238.

Collins, R. A. (2002). "The Neurospora Varkud satellite ribozyme." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 1122-1126.

Conn, G. L. and D. E. Draper (1998). "RNA structure." Curr Opin Struct Biol **8**(3): 278-85.

Cotten, M. and M. L. Birnstiel (1989). "Ribozyme mediated destruction of RNA in vivo." EMBO J **8**(12): 3861-3866.

Cotten, M., G. Schaffner and M. L. Birnstiel (1989). "Ribozyme, antisense RNA, and antisense DNA inhibition of U7 small nuclear ribonucleoprotein-mediated histone pre-mRNA processing in vitro." Mol Cell Biol **9**(10): 4479-4487.

Cove, D. J. (1966). "The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*." Biochim Biophys Acta **113**(1): 51-56.

Creaser, E. H., R. L. Porter, K. A. Britt, J. A. Pateman and C. H. Doy (1985). "Purification and preliminary characterization of alcohol dehydrogenase from Aspergillus nidulans." Biochem J **225**(2): 449-454.

Crooke, S. T. (1999). "Molecular mechanisms of action of antisense drugs." Bba Gene Struct Express **1489**(1): 31-44.

Dave, R. S. and R. J. Pomerantz (2003). "RNA interference: on the road to an alternate therapeutic strategy!" Rev Med Virol **13**(6): 373-385.

DeRose, V. J. (2003). "Metal ion binding to catalytic RNA molecules." Curr Opin Struct Biol **13**(3): 317-324.

Dias, N. and C. A. Stein (2002). "Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms." Mol Cancer Ther **1**(5): 347-355.

Domi, A., G. Beaud and A. Favre (1996). "Transcripts containing a small anti-HIV hammerhead ribozyme that are active in the cell cytoplasm but inactive in vitro as free RNAs." Biochimie **78**(7): 654-662.

Doudna, J. A. and T. R. Cech (2002). "The chemical repertoire of natural ribozymes." Nature **418**(6894): 222-228.

Doyle, D. F., D. A. Braasch, C. G. Simmons, B. A. Janowski and D. R. Corey (2001). "Inhibition of gene expression inside cells by peptide nucleic acids: effect of mRNA target sequence, mismatched bases, and PNA length." Biochemistry **40**(1): 53-64.

Dunham, C. M., J. B. Murray and W. G. Scott (2003). "A helical twist-induced conformational switch activates cleavage in the hammerhead ribozyme." J Mol Biol **332**(2): 327-336.

Duvel, K., R. Pries and G. H. Braus (2003). "Polyadenylation of rRNA- and tRNA-based yeast transcripts cleaved by internal ribozyme activity." Curr Genet **43**(4): 255-62.

Ellis, J. and J. Rogers (1993). "Design and specificity of hammerhead ribozymes against calretinin mRNA." Nucleic Acids Res **21**(22): 5171-5178.

Emilsson, G. M., S. Nakamura, A. Roth and R. R. Breaker (2003). "Ribozyme speed limits." Rna **9**(8): 907-918.

Fedor, M. J. (2000). "Structure and function of the hairpin ribozyme." J Mol Biol **297**(2): 269-291.

Fedor, M. J. and O. C. Uhlenbeck (1990). "Substrate sequence effects on "hammerhead" RNA catalytic efficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1668-1672.

Fedor, M. J. and O. C. Uhlenbeck (1992). "Kinetics of intermolecular cleavage by hammerhead ribozymes." Biochemistry **31**(48): 12042-12054.

Felenbok, B. (1991). "The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA-alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins." J Biotechnol **17**(1): 11-17.

Felenbok, B. and H. M. Sealy-Lewis (1994). "Alcohol metabolism." Prog Ind Microbiol **29**: 141-179.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." Nature **391**(6669): 806-811.

Flaherty, J. E., M. A. Weaver, G. A. Payne and C. P. Woloshuk (1995). "A beta-glucuronidase reporter gene construct for monitoring aflatoxin biosynthesis in Aspergillus flavus." Appl Environ Microbiol **61**(7): 2482-2486.

Flipphi, M., J. Kocialkowska and B. Felenbok (2002). "Characteristics of physiological inducers of the ethanol utilization (alc) pathway in Aspergillus nidulans." Biochem J **364**(Pt 1): 25-31.

Gallagher, S. R. (1995). GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression. San Diego, Academic Press.

Goodchild, J. and V. Kohli (1991). "Ribozymes that cleave an RNA sequence from human immunodeficiency virus: the effect of flanking sequence on rate." Arch Biochem Biophys **284**(2): 386-391.

Grassi, G., A. Forlino and J. C. Marini (1997). "Cleavage of collagen RNA transcripts by hammerhead ribozymes in vitro is mutation-specific and shows competitive binding effects." Nucleic Acids Res **25**(17): 3451-3458.

Grassi, G., M. Grassi, A. Kuhn and R. Kandolf (2002). "Determination of hammerhead ribozyme kinetic constants at high molar ratio ribozyme-substrate." J Math Biol **45**(3): 261-277.

Grewal, H. S. and K. L. Kalra (1995). "Fungal production of citric acid." Biotechnol Adv **13**(2): 209-234.

Grishok, A. and C. C. Mello (2002). "RNAi (Nematodes: Caenorhabditis elegans)." Adv Genet **46**: 339-360.

Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman (1983). "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme." Cell **35**(3): 849-57.

Guo, F. and T. R. Cech (2002). "Evolution of Tetrahymena ribozyme mutants with increased structural stability." Nat Struct Biol **9**(11): 855-861.

Guo, H. C. and R. A. Collins (1995). "Efficient trans-cleavage of a stem-loop RNA substrate by a ribozyme derived from neurospora VS RNA." EMBO J **14**(2): 368-376.

Guo, H. S., J. F. Fei, Q. Xie and N. H. Chua (2003). "A chemical-regulated inducible RNAi system in plants." Plant J **34**(3): 383-392.

Hamilton, A., O. Voinnet, L. Chappell and D. Baulcombe (2002). "Two classes of short interfering RNA in RNA silencing." EMBO J **21**(17): 4671-4679.

Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach and G. J. Hannon (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells." Nature **404**(6775): 293-296.

Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi and G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." Science **293**(5532): 1146-1150.

Hampel, K. J. and J. M. Burke (2003). "Solvent protection of the hammerhead ribozyme in the ground state: evidence for a cation-assisted conformational change leading to catalysis." Biochemistry **42**(15): 4421-4429.

Haseloff, J. and W. L. Gerlach (1988). "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities." Nature **334**(6183): 585-591.

Haseloff, J. and R. H. Symons (1982). "Comparative sequence and structure of viroid-like RNAs of two plant viruses." Nucleic Acids Res **10**(12): 3681-3691.

Hatanaka, H., Y. Abe, M. Naruke, S. Asai, H. Miyachi, T. Kawakami, J. Nagata, J. Kamochi, H. Kijima, H. Yamazaki, K. J. Scanlon, Y. Ueyama and M. Nakamura (2001). "Modulation of multidrug resistance in a cancer cell line by anti-multidrug resistance-associated protein (MRP) ribozyme." Anticancer Res **21**(2A): 879-885.

Heidenreich, O., S. H. Kang, D. A. Brown, X. Xu, P. Swiderski, J. J. Rossi, F. Eckstein and M. Nerenberg (1995). "Ribozyme-mediated RNA degradation in nuclei suspension." Nucleic Acids Res **23**(12): 2223-2228.

Hendry, P. and M. McCall (1996). "Unexpected anisotropy in substrate cleavage rates by asymmetric hammerhead ribozymes." Nucleic Acids Res **24**(14): 2679-2684.

Hentze, M. W. and A. E. Kulozik (1999). "A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay." Cell **96**(3): 307-310.

Herschlag, D. (1991). "Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules in vivo: more isn't always better." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 6921-6925.

Hertel, K. J., D. Herschlag and O. C. Uhlenbeck (1996). "Specificity of hammerhead ribozyme cleavage." EMBO J **15**(14): 3751-3757.

Hertel, K. J., A. Pardi, O. C. Uhlenbeck, M. Koizumi, E. Ohtsuka, S. Uesugi, R. Cedergren, F. Eckstein, W. L. Gerlach, R. Hodgson and et al. (1992). "Numbering system for the hammerhead." Nucleic Acids Res **20**(12): 3252.

Hertel, K. J. and O. C. Uhlenbeck (1995). "The internal equilibrium of the hammerhead ribozyme reaction." Biochemistry **34**(5): 1744-1749.

Heus, H. A., O. C. Uhlenbeck and A. Pardi (1990). "Sequence-dependent structural variations of hammerhead RNA enzymes." Nucleic Acids Res **18**(5): 1103-1108.

Hoeprich, S., Q. Zhou, S. Guo, D. Shu, G. Qi, Y. Wang and P. Guo (2003). "Bacterial virus phi29 pRNA as a hammerhead ribozyme escort to destroy hepatitis B virus." Gene Ther **10**(15): 1258-1267.

Jankowsky, E. and B. Schwenzer (1998). "Oligonucleotide facilitators enable a hammerhead ribozyme to cleave long RNA substrates with multiple-turnover activity." Eur J Biochem **254**(1): 129-134.

Jarai, G. (1997). Heterologous gene expression in filamentous fungi. Weinheim, Chapman & Hall.

Jefferson, R. A., S. M. Burgess and D. Hirsh (1986). "beta-Glucuronidase from Escherichia coli as a gene-fusion marker." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(22): 8447-8451.

Johnston, W. K., P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner and D. P. Bartel (2001). "RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension." Science **292**(5520): 1319-1325.

Kamath, R. S., A. G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D. P. Welchman, P. Zipperlen and J. Ahringer (2003). "Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi." Nature **421**(6920): 231-237.

Kao, L. R. and T. L. Megraw (2004). "RNAi in Cultured Drosophila Cells." Methods Mol Biol **247**: 443-458.

Kasai, Y., H. Shizuku, Y. Takagi, M. Warashina and K. Taira (2002). "Measurements of weak interactions between truncated substrates and a hammerhead ribozyme by competitive kinetic analyses: implications for the design of new and efficient ribozymes with high sequence specificity." Nucleic Acids Res **30**(11): 2383-2389.

Kawasaki, H. and K. Taira (2002). "Identification of genes by hybrid ribozymes that couple cleavage activity with the unwinding activity of an endogenous RNA helicase." EMBO Rep **3**(5): 443-450.

Kierzek, R. (2001). "Nonenzymatic cleavage of oligoribonucleotides." Methods Enzymol **341**: 657-675.

Kirsebom, L. A. (2002). "RNase P RNA-mediated catalysis." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 1153-1158.

Kitamoto, N., S. Yoshino, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi (1999). "Sequence analysis, overexpression, and antisense inhibition of a beta- xylosidase gene, xylA, from Aspergillus oryzae KBN616." Appl Environ Microbiol **65**(1): 20-4.

Kittler, R. and F. Buchholz (2003). "RNA interference: gene silencing in the fast lane." Semin Cancer Biol **13**(4): 259-265.

Kleinjan, D. J. and V. van Heyningen (1998). "Position effect in human genetic disease." Hum Mol Genet **7**(10): 1611-1618.

Kore, A. R., N. K. Vaish, U. Kutzke and F. Eckstein (1998). "Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule." Nucleic Acids Res **26**(18): 4116-4120.

Kruger, K., P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech (1982). "Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena." Cell **31**(1): 147-157.

Kuwabara, T., M. Warashina, S. Koseki, M. Sano, J. Ohkawa, K. Nakayama and K. Taira (2001). "Significantly higher activity of a cytoplasmic hammerhead ribozyme than a corresponding nuclear counterpart: engineered tRNAs with an extended 3' end can be exported efficiently and specifically to the cytoplasm in mammalian cells." Nucleic Acids Res **29**(13): 2780-2788.

Larsson, S., G. Hotchkiss, M. Andang, T. Nyholm, J. Inzunza, I. Jansson and L. Ahrlund-Richter (1994). "Reduced beta 2-microglobulin mRNA levels in transgenic mice expressing a designed hammerhead ribozyme." Nucleic Acids Res **22**(12): 2242-2248.

Lawrence, R. J. and C. S. Pikaard (2003). "Transgene-induced RNA interference: a strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations." Plant J **36**(1): 114-121.

Lee, N. S., E. Bertrand and J. Rossi (1999). "mRNA localization signals can enhance the intracellular effectiveness sf hammerhead ribozymes." RNA **5**(9): 1200-1209.

Lehmann, K. and U. Schmidt (2003). "Group II introns: structure and catalytic versatility of large natural ribozymes." Crit Rev Biochem Mol Biol **38**(3): 249-303.

Lehmann, M. J., V. Patzel and G. Sczakiel (2000). "Theoretical design of antisense genes with statistically increased efficacy." Nucleic Acids Res **28**(13): 2597-2604.

L'Huillier, P. J., S. R. Davis and A. R. Bellamy (1992). "Cytoplasmic delivery of ribozymes leads to efficient reduction in alpha-lactalbumin mRNA levels in C127I mouse cells." EMBO J **11**(12): 4411-4418.

Lieber, A. and M. Strauss (1995). "Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library." Mol Cell Biol **15**(1): 540-551.

Lilley, D. M. (2001). "The ribosome functions as a ribozyme." Chembiochem **2**(1): 31-35.

Lin, J. S., Y. H. Song, X. J. Kong, B. Li, N. Z. Liu, X. L. Wu and Y. X. Jin (2003). "Preparation and identification of anti-transforming growth factor beta1 U1 small nuclear RNA chimeric ribozyme in vitro." World J Gastroenterol **9**(3): 572-577.

Liu, R., W. Li, N. J. Karin, J. J. Bergh, K. Adler-Storthz and M. C. Farach-Carson (2000). "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 **275**(12): 8711-8718.

Liu, Z., D. B. Batt and G. G. Carmichael (1994). "Targeted nuclear antisense RNA mimics natural antisense-induced degradation of polyoma virus early RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4258-4262.

Lüking, A. (1997). Beteiligung kernkodierter Proteine am Spleißprozeß eines Introns der Gruppe II in den Mitochondrien des Ascomyceten *Podospora anserina*. D-52013 Aachen, Shaker Verlag.

Major, F. and R. Griffey (2001). "Computational methods for RNA structure determination." Curr Opin Struct Biol **11**(3): 282-286.

Mathieu, M. and B. Felenbok (1994). "The Aspergillus nidulans CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR- specific transactivator." Embo J **13**(17): 4022-4027.

Matzura, O. and A. Wennborg (1996). "RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows." Comput Appl Biosci **12**(3): 247-249.

McCall, M. J., P. Hendry and P. A. Jennings (1992). "Minimal sequence requirements for ribozyme activity." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5710-5714.

McManus, M. T. and P. A. Sharp (2002). "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs." Nat Rev Genet **3**(10): 737-747.

Merlo, A. O., N. Cowen, T. Delate, B. Edington, O. Folkerts, N. Hopkins, C. Lemeiux, T. Skokut, K. Smith, A. Woosley, Y. Yang, S. Young and M. Zwick (1998). "Ribozymes targeted to stearoyl-ACP delta9 desaturase mRNA produce heritable increases of stearic acid in transgenic maize leaves." Plant Cell **10**(10): 1603-1622.

Meyer, V. (2001). Transcriptional regulation of the afp gene encoding the Antifungal Protein of *Aspergillus giganteus*. Fakultät für Prozesswissenschaften. Berlin, Technische Universität Berlin**:** 125.

Meyer, V., D. Mueller, T. Strowig and U. Stahl (2003). "Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*." Curr Genet **43**(5): 371-7.

Meyer, V., M. Wedde and U. Stahl (2002). "Transcriptional regulation of the Antifungal Protein in *Aspergillus giganteus*." Mol Genet Genomics **266**(5): 747-757.

Miller, W. A., T. Hercus, P. M. Waterhouse and W. L. Gerlach (1991). "A satellite RNA of barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in the self-cleavage domain." Virology **183**(2): 711-720.

Minetoki, T., C. Kumagai, K. Gomi, K. Kitamoto and K. Takahashi (1998). "Improvement of promoter activity by the introduction of multiple copies of the conserved region III sequence, involved in the efficient expression of *Aspergillus oryzae* amylase-encoding genes." Appl Microbiol Biotechnol **50**(4): 459-467.

Mir, A. A., T. J. Lockett and P. Hendry (2001). "Identifying ribozyme-accessible sites using NUH triplet-targeting gapmers." Nucleic Acids Res **29**(9): 1906-1914.

Misra, V. K. and D. E. Draper (2002). "The linkage between magnesium binding and RNA folding." J Mol Biol **317**(4): 507-521.

Moore, P. B. and T. A. Steitz (2003). "After the ribosome structures: how does peptidyl transferase work?" Rna **9**(2): 155-159.

Mueller, D. and U. Stahl (2004). "RNA: a powerful tool for recombination and regulated expression of genes." Progress in Botany **in press**.

Murnane, J. P., M. J. Yezzi and B. R. Young (1990). "Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells." Nucleic Acids Res **18**(9): 2733-2738.

Murray, J. B., A. A. Seyhan, N. G. Walter, J. M. Burke and W. G. Scott (1998). "The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone." Chem Biol **5**(10): 587-595.

Nadal, A., H. D. Robertson, J. Guardia and J. Gomez (2003). "Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting." J Gen Virol **84**(Pt 6): 1545-1548.

Nagata, J., H. Kijima, H. Hatanaka, S. Asai, H. Miyachi, Y. Abe, H. Yamazaki, M. Nakamura, N. Watanabe, T. Mine, T. Kondo, K. J. Scanlon and Y. Ueyama (2002). "Reversal of drug resistance using hammerhead ribozymes against multidrug resistance-associated protein and multidrug resistance 1 gene." Int J Oncol **21**(5): 1021-1026.

Nakamura, M., K. Fukuyama, T. Tsukihara, Y. Katsube and T. Hamasaki (1983). "Structure of funicin, antimicrobial substance from *Aspergillus funiculosus*, C17H18O5." Acta Crystallographica Section C **39**(2): 268-270.

Naleway, J. (1995). "Histochemical, Spectrophotometric and Fluorometric GUS Substrates."

Narlikar, G. J. and D. Herschlag (1997). "Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: lessons from comparison of RNA and protein enzymes." Annu Rev Biochem **66**: 19-59.

Nikolaev, I., M. Mathieu, P. van de Vondervoort, J. Visser and B. Felenbok (2002). "Heterologous expression of the Aspergillus nidulans alcR-alcA system in Aspergillus niger." Fungal Genet Biol **37**(1): 89-97.

Nishikura, K. (2001). "A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst." Cell **107**(4): 415-418.

Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz (2000). "The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis." Science **289**(5481): 920-930.

Ohkawa, J., T. Koguma, T. Kohda and K. Taira (1995). "Ribozymes: from mechanistic studies to applications in vivo." J Biochem (Tokyo) **118**(2): 251-258.

Olson, B. H. and G. L. Goerner (1965). "Alpha Sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition, and thei Identity of a new amino acid." Appl Microbiol **13**: 314-321.

Osada, H., T. Tokunaga, Y. Abe, S. Asai, H. Miyachi, H. Hatanaka, A. Tsugu, H. Kijima, H. Yamazaki, K. Shima, Y. Ueyama, Y. Osamura and M. Nakamura (2003). "Reversal of drug resistance mediated by hammerhead ribozyme against multidrug resistance-associated protein 1 in a human glioma cell line." Int J Oncol **22**(4): 823-827.

Paddison, P. J. and G. J. Hannon (2003). "siRNAs and shRNAs: skeleton keys to the human genome." Curr Opin Mol Ther **5**(3): 217-224.

Panozzo, C., E. Cornillot and B. Felenbok (1998). "The CreA repressor is the sole DNA-binding protein responsible for carbon catabolite repression of the alcA gene in Aspergillus nidulans via its binding to a couple of specific sites." J Biol Chem **273**(11): 6367-6372.

Pardi, A. (1994). "Ribozyme revealed." Nat Struct Biol **1**(12): 846-849.

Parekh, S., V. A. Vinci and R. J. Strobel (2000). "Improvement of microbial strains and fermentation processes." Appl Microbiol Biotechnol **54**(3): 287-301.

Patzel, V. and G. Sczakiel (1998). "Theoretical design of antisense RNA structures substantially improves annealing kinetics and efficacy in human cells." Nat Biotechnol **16**(1): 64-68.

Patzel, V., U. Steidl, R. Kronenwett, R. Haas and G. Sczakiel (1999). "A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability." Nucleic Acids Res **27**(22): 4328-4334.

Perrotta, A. T. and M. D. Been (1990). "The self-cleaving domain from the genomic RNA of hepatitis delta virus: sequence requirements and the effects of denaturant." Nucleic Acids Res **18**(23): 6821-6827.

Perrotta, A. T. and M. D. Been (1991). "A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA." Nature **350**(6317): 434-436.

Pley, H. W., K. M. Flaherty and D. B. McKay (1994). "Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme." Nature **372**(6501): 68-74.

Pyle, A. M. (2002). "Metal ions in the structure and function of RNA." J Biol Inorg Chem **7**(7-8): 679-690.

Raines, R. T. (1998). "Ribonuclease A." Chem Rev **98**(3): 1045-1066.

Rajendran, M. and A. D. Ellington (2002). "Selecting nucleic acids for biosensor applications." Comb Chem High Throughput Screen **5**(4): 263-270.

Raponi, M. and G. M. Arndt (2003). "Double-stranded RNA-mediated gene silencing in fission yeast." Nucleic Acids Res **31**(15): 4481-4489.

Roberts, I. N., R. P. Oliver, P. J. Punt and C. A. van den Hondel (1989). "Expression of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase gene in industrial and phytopathogenic filamentous fungi." Curr Genet **15**(3): 177-180.

Röhr, M., C. P. Kubicek, O. Zehentgruber and R. Orthofer (1987). "Accumulation and partial reconsumption of polyols and partial reconsumption of polyols during citric acid

fermentation by *Aspergillus niger*." Applied Microbiology and Biotechnology **27**: 235-239.

Rubino, L., M. E. Tousignant, G. Steger and J. M. Kaper (1990). "Nucleotide sequence and structural analysis of two satellite RNAs associated with chicory yellow mottle virus." J Gen Virol **71 (Pt 9)**: 1897-1903.

Ruffner, D. E., G. D. Stormo and O. C. Uhlenbeck (1990). "Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction." Biochemistry **29**(47): 10695-10702.

Samarsky, D. A., G. Ferbeyre, E. Bertrand, R. H. Singer, R. Cedergren and M. J. Fournier (1999). "A small nucleolar RNA:ribozyme hybrid cleaves a nucleolar RNA target in vivo with near-perfect efficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6609-6614.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour, USA, Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Scherr, M., J. J. Rossi, G. Sczakiel and V. Patzel (2000). "RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts." Nucleic Acids Res **28**(13): 2455-61.

Schmidt, U., E. Budde and U. Stahl (1992). "Self-splicing of a mitochondrial group I intron from the cytochrome b gene of the ascomycete Podospora anserina." Mol Gen Genet **233**(1-2): 71-80.

Schon, A. (1999). "Ribonuclease P: the diversity of a ubiquitous RNA processing enzyme." FEMS Microbiol Rev **23**(3): 391-406.

Schrickx, J. M., M. J. Raedts, A. H. Stouthamer and H. W. van Verseveld (1995). "Organic acid production by *Aspergillus niger* in recycling culture analyzed by capillary electrophoresis." Anal Biochem **231**(1): 175-181.

Scott, W. G., J. T. Finch and A. Klug (1995). "The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage." Cell **81**(7): 991-1002.

Sczakiel, G. (2000). "Theoretical and experimental approaches to design effective antisense oligonucleotides." Front Biosci **5**: D194-201.

Sczakiel, G. and R. K. Far (2002). "The role of target accessibility for antisense inhibition." Curr Opin Mol Ther **4**(2): 149-153.

Shatkin, A. J. and J. L. Manley (2000). "The ends of the affair: capping and polyadenylation." Nat Struct Biol **7**(10): 838-842.

Shih, I. H. and M. D. Been (2002). "Catalytic strategies of the hepatitis delta virus ribozymes." Annu Rev Biochem **71**: 887-917.

Shimayama, T., S. Nishikawa and K. Taira (1995). "Generality of the NUX rule: kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes." Biochemistry **34**(11): 3649-3654.

Siguret, V., A. S. Ribba, G. Cherel, D. Meyer and G. Pietu (1994). "Effect of plasmid size on transformation efficiency by electroporation of Escherichia coli DH5 alpha." Biotechniques **16**(3): 422-426.

Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman and B. R. Williams (2003). "Activation of the interferon system by short-interfering RNAs." Nat Cell Biol **5**(9): 834-839.

Smyth Templeton, N. (2002). "Liposomal delivery of nucleic acids in vivo." DNA Cell Biol **21**(12): 857-867.

Sohail, M. and E. M. Southern (2000). "Hybridization of antisense reagents to RNA." Curr Opin Mol Ther **2**(3): 264-271.

Sohail, M. and E. M. Southern (2000). "Selecting optimal antisense reagents." Adv Drug Deliv Rev **44**(1): 23-34.

Sriram, B., D. Thakral and S. K. Panda (2003). "Targeted cleavage of hepatitis E virus 3' end RNA mediated by hammerhead ribozymes inhibits viral RNA replication." Virology **312**(2): 350-358.

Stage-Zimmermann, T. K. and O. C. Uhlenbeck (1998). "Circular substrates of the hammerhead ribozyme shift the internal equilibrium further toward cleavage." Biochemistry **37**(26): 9386-9393.

Stage-Zimmermann, T. K. and O. C. Uhlenbeck (2001). "A covalent crosslink converts the hammerhead ribozyme from a ribonuclease to an RNA ligase." Nat Struct Biol **8**(10): 863-867.

Steitz, T. A. and P. B. Moore (2003). "RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme." Trends Biochem Sci **28**(8): 411-418.

Takagi, Y., M. Warashina, W. J. Stec, K. Yoshinari and K. Taira (2001). "Recent advances in the elucidation of the mechanisms of action of ribozymes." Nucleic Acids Res **29**(9): 1815-1834.

Tang, G., B. J. Reinhart, D. P. Bartel and P. D. Zamore (2003). "A biochemical framework for RNA silencing in plants." Genes Dev **17**(1): 49-63.

Thompson, A. and M. J. Gasson (2001). "Location effects of a reporter gene on expression levels and on native protein synthesis in Lactococcus lactis and Saccharomyces cerevisiae." Appl Environ Microbiol **67**(8): 3434-3439.

Tsukiji, S., S. B. Pattnaik and H. Suga (2003). "An alcohol dehydrogenase ribozyme." Nat Struct Biol **10**(9): 713-717.

Tuschl, T. and F. Eckstein (1993). "Hammerhead ribozymes: importance of stem-loop II for activity." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 6991-6994.

Ullu, E., A. Djikeng, H. Shi and C. Tschudi (2002). "RNA interference: advances and questions." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1417): 65-70.

Vaish, N. K., F. Dong, L. Andrews, R. E. Schweppe, N. G. Ahn, L. Blatt and S. D. Seiwert (2002). "Monitoring post-translational modification of proteins with allosteric ribozymes." Nat Biotechnol **20**(8): 810-815.

Vaucheret, H., C. Beclin and M. Fagard (2001). "Post-transcriptional gene silencing in plants." J Cell Sci **114**(Pt 17): 3083-3091.

Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F.

Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-1351.

Wagner, E. G., S. Altuvia and P. Romby (2002). "Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements." Adv Genet **46**: 361-398.

Wagner, E. G. H. and J. Vogel (2003). Noncoding RNAs encoded by becterial chromosomes. Noncoding RNAs. J. Barciszewski and V. A. Erdmann, Landes Bioscience.**:** 243-259.

Wahlestedt, C., P. Salmi, L. Good, J. Kela, T. Johnsson, T. Hokfelt, C. Broberger, F. Porreca, J. Lai, K. Ren, M. Ossipov, A. Koshkin, N. Jakobsen, J. Skouv, H. Oerum, M. H. Jacobsen and J. Wengel (2000). "Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5633-5638.

Warashina, M., Y. Takagi, W. J. Stec and K. Taira (2000). "Differences among mechanisms of ribozyme-catalyzed reactions." Curr Opin Biotechnol **11**(4): 354-362.

Wargelius, A., S. Ellingsen and A. Fjose (1999). "Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos." Biochem Biophys Res Commun **263**(1): 156-161.

Watanabe, T. and B. A. Sullenger (2000). "Induction of wild-type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8490-8494.

Wedekind, J. E. and D. B. McKay (1998). "Crystallographic structures of the hammerhead ribozyme: relationship to ribozyme folding and catalysis." Annu Rev Biophys Biomol Struct **27**: 475-502.

Wianny, F. and M. Zernicka-Goetz (2000). "Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development." Nat Cell Biol **2**(2): 70-5.

Willke, T. and K. D. Vorlop (2001). "Biotechnological production of itaconic acid." Appl Microbiol Biotechnol **56**(3-4): 289-295.

Winston, W. M., C. Molodowitch and C. P. Hunter (2002). "Systemic RNAi in C. elegans requires the putative transmembrane protein SID-1." Science **295**(5564): 2456-2459.

Wnendt, S., H. Felske-Zech, P. P. Henze, N. Ulbrich and U. Stahl (1993). "Characterization of the gene encoding alpha-sarcin, a ribosome-inactivating protein secreted by *Aspergillus giganteus*." Gene **124**(2): 239-244.

Wnendt, S., M. Jacobs and U. Stahl (1990). "Transformation of *Aspergillus giganteus* to hygromycin B resistance." Curr Genet **17**(1): 21-24.

Wnendt, S., N. Ulbrich and U. Stahl (1990). "Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the antifungal-protein of *Aspergillus giganteus* and preliminary characterization of the native gene." Nucleic Acids Res **18**(13): 3987.

Wnendt, S., N. Ulbrich and U. Stahl (1994). "Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*." Curr Genet **25**(6): 519-523.

Xiao, S., F. Scott, C. A. Fierke and D. R. Engelke (2002). "Eukaryotic ribonuclease P: a plurality of ribonucleoprotein enzymes." Annu Rev Biochem **71**: 165-189.

Xu, R., X. Zhou, Q. Xie, Y. Jin and D. Liao (2000). "[Preparation and identification of hammerhead ribozyme in vitro against rat caspase-3 mRNA fragment]." Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi **8**(6): 361-363.

Yelin, R., D. Dahary, R. Sorek, E. Y. Levanon, O. Goldstein, A. Shoshan, A. Diber, S. Biton, Y. Tamir, R. Khosravi, S. Nemzer, E. Pinner, S. Walach, J. Bernstein, K. Savitsky and G. Rotman (2003). "Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome." Nat Biotechnol **21**(4): 379-386.

Zhao, J. J. and G. Lemke (1998). "Rules for ribozymes." Mol Cell Neurosci **11**(1-2): 92-97.

Zhao, J. J. and L. Pick (1993). "Generating loss-of-function phenotypes of the fushi tarazu gene with a targeted ribozyme in Drosophila." Nature **365**(6445): 448-451.

Zuker, M., D. H. Mathews and D. H. Turner (1999). "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology."

Anhang

```
                    ↓ ApaI                    rz4asym_u
rz4-2asym_u    5′      CTACAGCTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACGGACCATGCATG 3′
rz4-2asym_l    3′ CCGGGATGTCGACTACTCCGGCTTTCCGGCTTTGCCTGGTAC      5′
                                         rz4asym_l          ↑ SphI
```

Abb. A1: Ribozyminsert für die Klonierung in Plasmid pRZx am Beispiel von Ribozym r4asym. Das Ribozyminsert setzt sich aus den beiden Oligonukleotiden rz4asym_u und rz4asym_l zusammen. Durch die Hybridisierung entstehen eine *Apa*I und eine *Sph*I Schnittstelle.

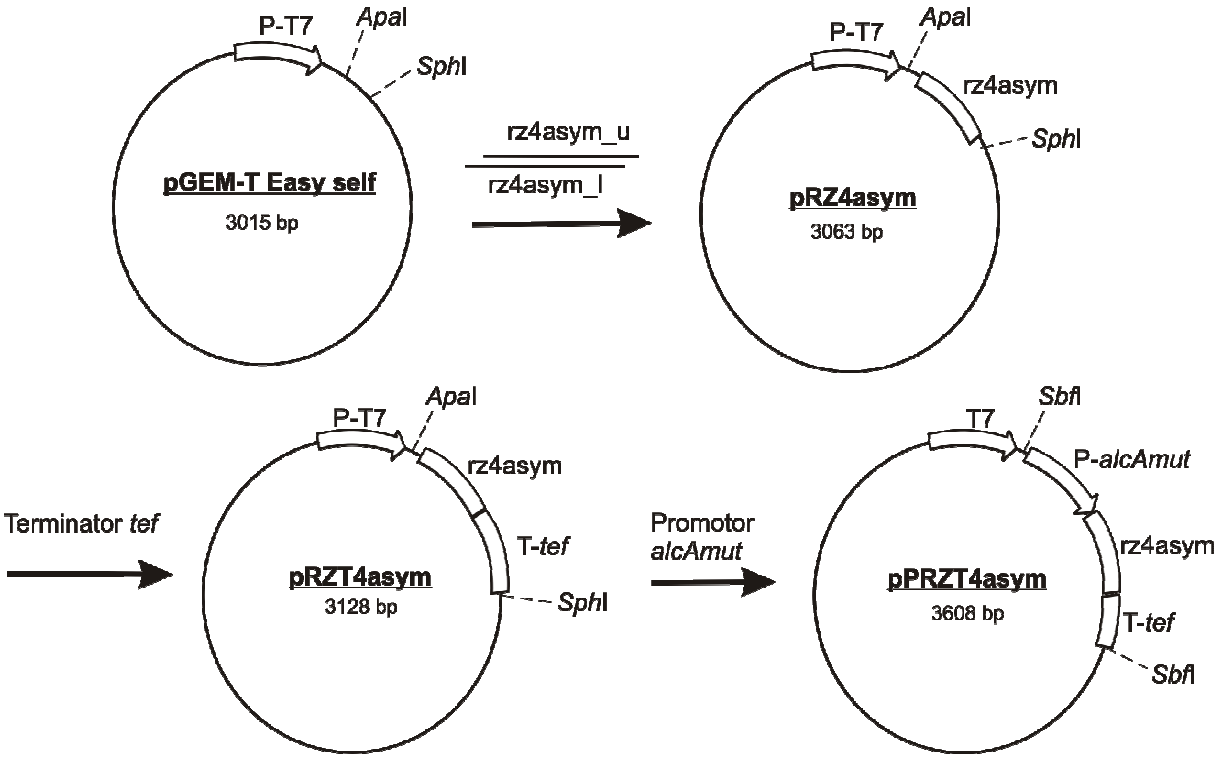


Abb. A2: Konstruktion der Plasmide pRZx (z.B. pRZ4asym) für die *in vitro* Transkription sowie der Plasmide mit der Ribozym Expressionskassette pPRZTx, (z.B. pPRZT4asym). Abkürzungen: P-*alcAmut*: *alcA* Promotor aus *A. nidulans* 1711 nach Mutation der internen *Apa*I Schnittstelle; rz4asym: Ribozym 4 in der asymmetrischen Version; T-*tef*: *tef* Terminator aus *Ashbya gossypii*.

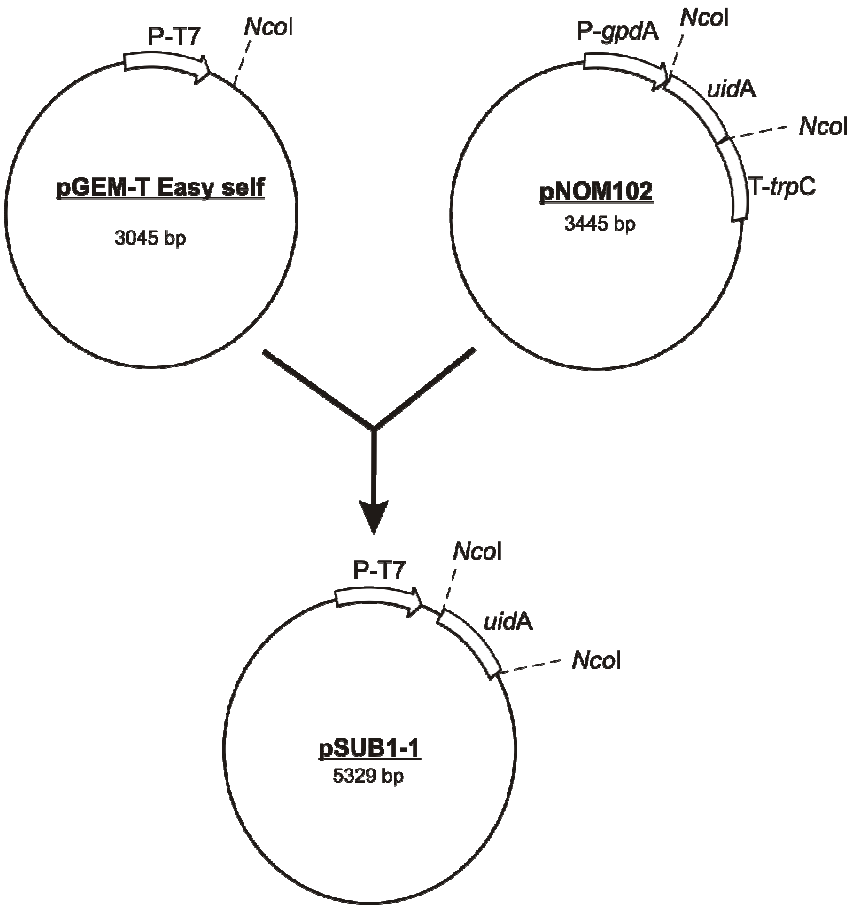


Abb. A3: Konstruktion des Plasmids pSUB1-1 für die *in vitro* Transkription des *uidA* Gens. Abkürzungen: P-T7 T7 Promotor des Phagen T7; *uidA*: Gen der β-Glukuronidase aus *E. coli*; P-*gpdA*: Promotor des *gpdA* Gens aus *A. nidulans*; T-*trpC*: Terminator des *trpC* Gens aus *A. nidulans*

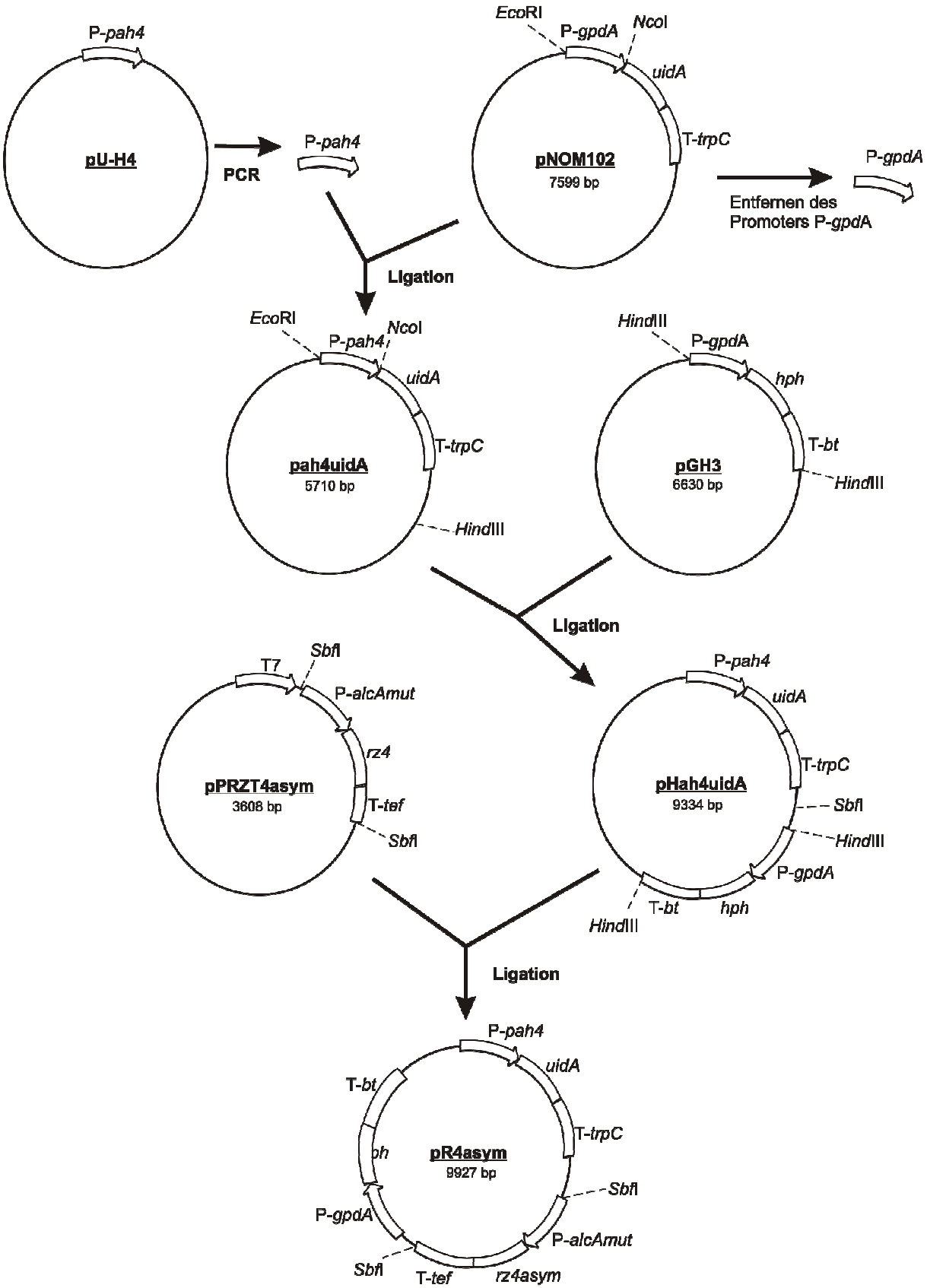


Abb. A4: Konstruktion des Plasmids pRx (z.B. pR4asym) für die Transformation von *A. giganteus*. Abkürzungen: P-*pah4*: Promotor der α-Helikase 4 aus *P. anserina*; *uidA*: Gen der β-Glukuronidase aus *E. coli*; T-*trpC*: Terminator des *trpC* Gens aus *A. nidulans*; P-*gpdA*: Promotor des *gpdA* Gens aus *A. nidulans*; T-*bt*: Terminator des Tubulin Gens aus *N. crassa*; *hph*: Gene aus *E. coli* für die Hygromycin B Resistenz in *A. giganteus*; *alcAmut*: *alcA* Promotor aus *A. nidulans* nach Mutation der internen *Apa*I Schnittstelle; rz4asym: Ribozym 4 in der asymmetrischen Version; T-*tef*: *tef* Terminator aus *Ashbya gossypii*.

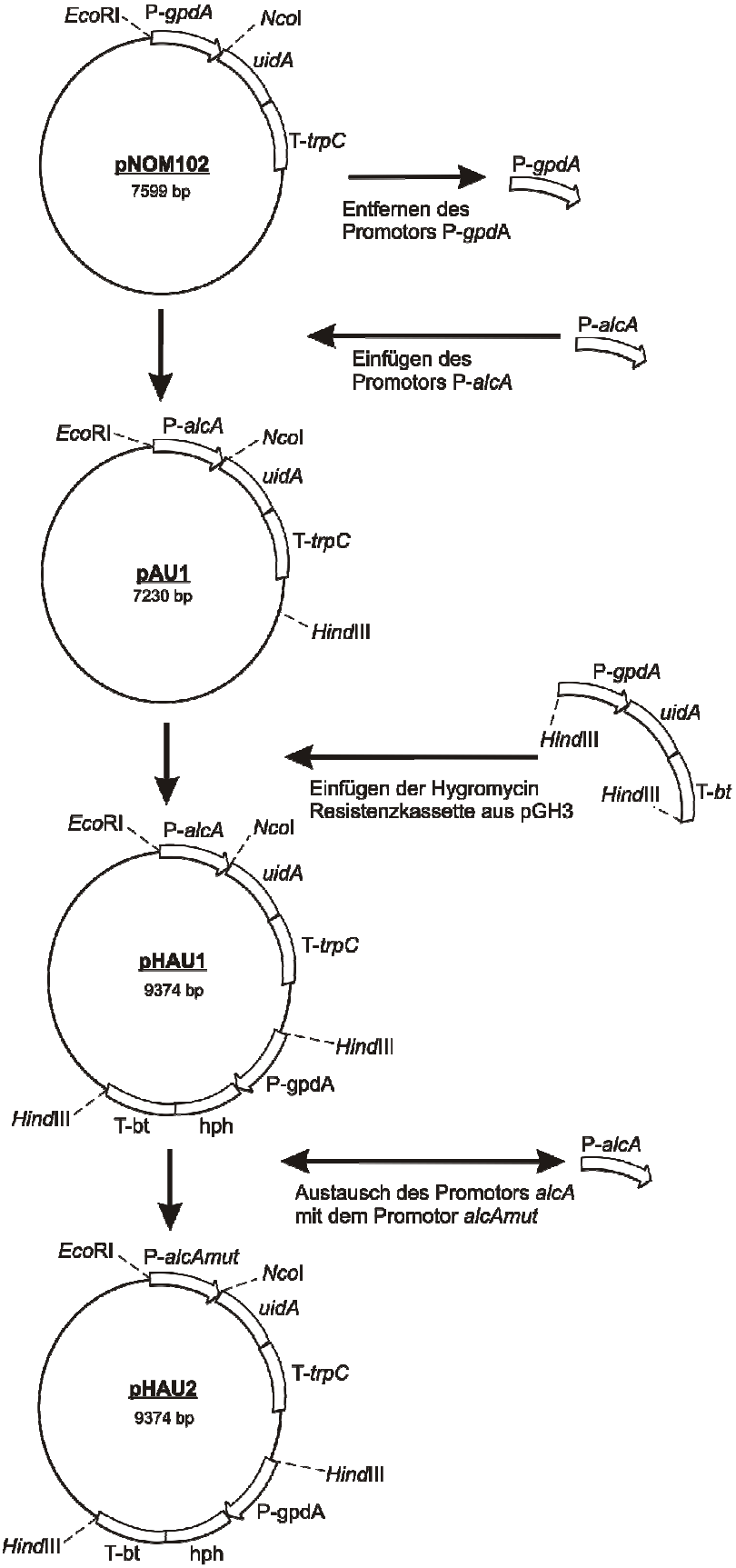
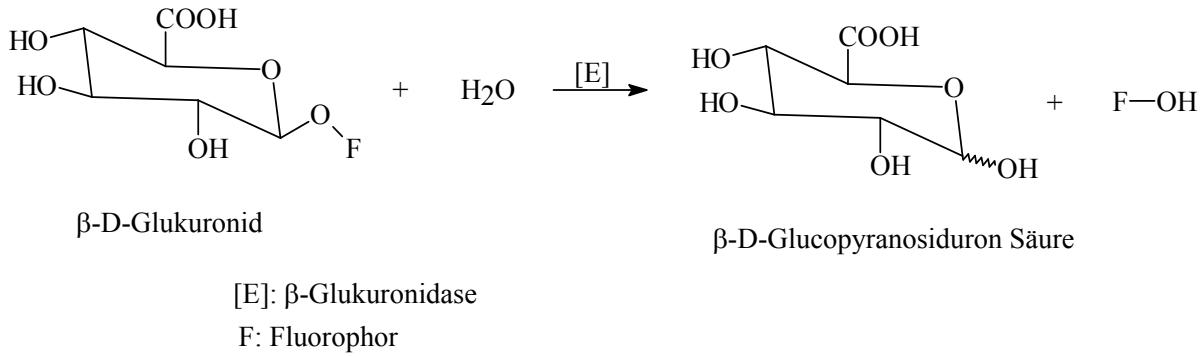


Abb. A5: Klonierungsstrategie für das Plasmid pHAU2. Abkürzungen: P-*gpdA*: Promotor des *gpdA* Gens aus *A. nidulans*; *uidA*: Gen der β-Glukuronidase aus *E. coli*; T-*trpC*: Terminator des *trpC* Gens aus *A. nidulans*; P-*pah4*: Promotor der α-Helikase 4 aus *P. anserina*; P-*alcA*: Alkohol Promotor *alcA* aus *A. nidulans*; *hph*: Gene aus *E. coli* für die Hygromycin B Resistenz in *A. giganteus*; T-*bt*: Terminator des Tubulin Gens aus *N. crassa*; *alcAmut*: *alcA* Promotor aus *A. nidulans* nach Mutation der internen *Apa*I Schnittstelle.

Das GUS System

Für die Detektion der GUS Expression *in vitro* und *in vivo* sind verschiedene Derivate der ß-Glukuronsäure verfügbar. Alle Substrate enthalten D-Glukopyranosiduronsäure, an die glykosidisch eine Hydroxylgruppe von einem chromogenen, fluoreszierenden oder anderweitig detektierbaren Molekül gebunden ist (Abb. A6).



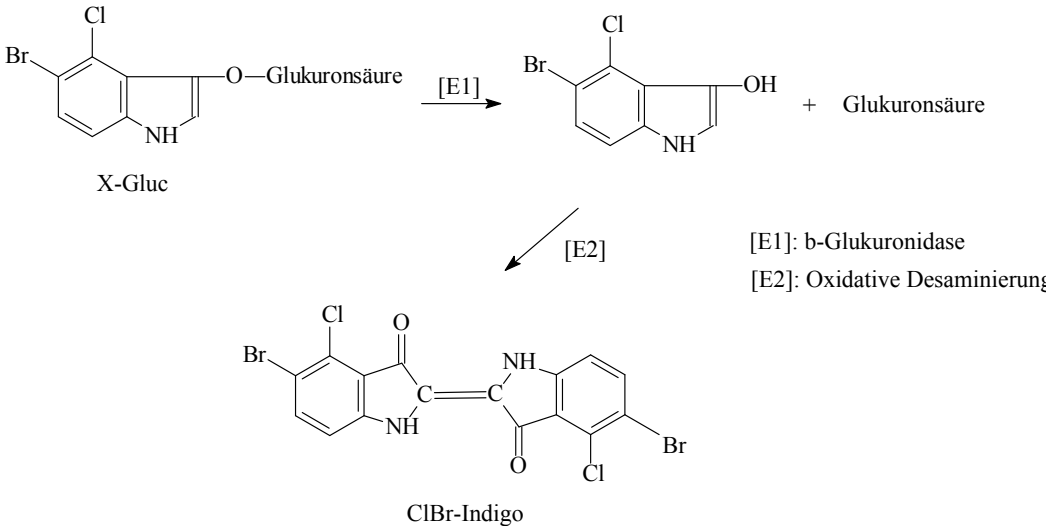
β-D-Glukuronid

β-D-Glucopyranosiduron Säure

[E]: β-Glukuronidase
F: Fluorophor

Abb. A6 GUS hydrolysiert spezifisch ß-D-Glukuronide zu D-Glukuronsäure und Aglykon (Naleway 1995)

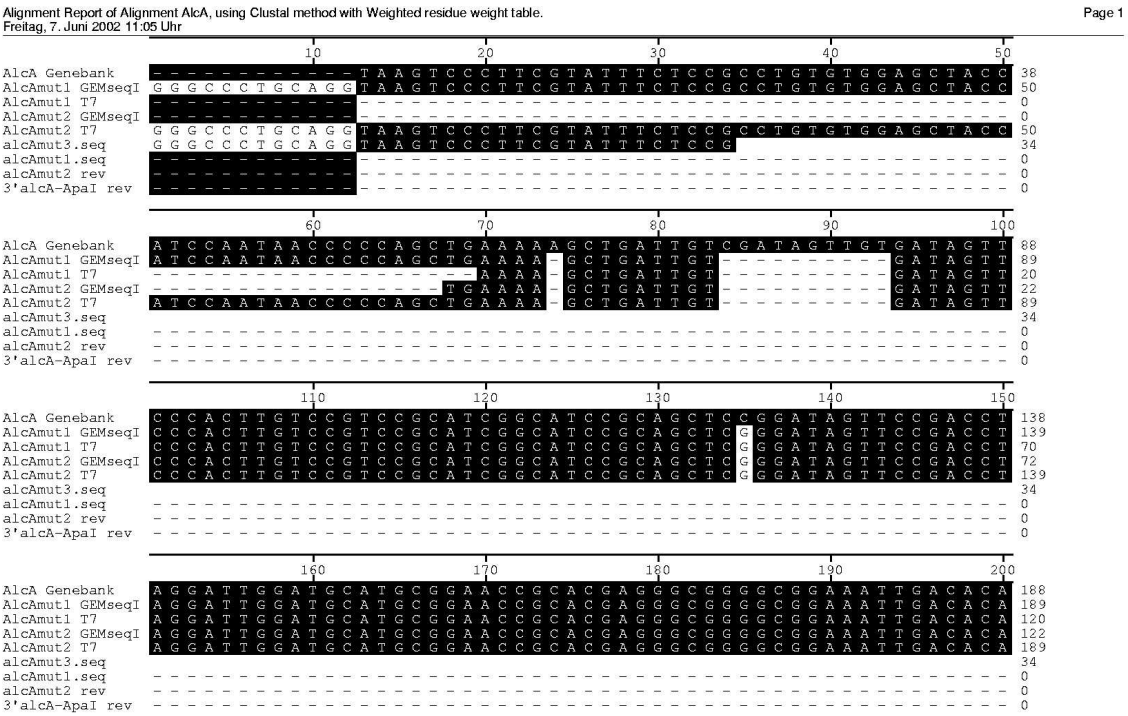
Für die histochemische Lokalisation der GUS Aktivität wird hauptsächlich das Substrat X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indol-ß-D-Glukuronsäure) verwendet. Durch Ausfällen des Produktes in wässrigen Lösungen ist es möglich, die Enzymaktivität auch *in vivo* zu lokalisieren. Dabei wird das farblose Substrat in drei separaten Reaktionen durch die ß-Glukuronidase in einen indigoblauen Farbstoff umgewandelt. Nach dem enzymatischen Umsatz wird das freigesetzte Indoxylderivat dimerisiert und letztlich zum Indigofarbstoff oxidiert (Abb. A7).

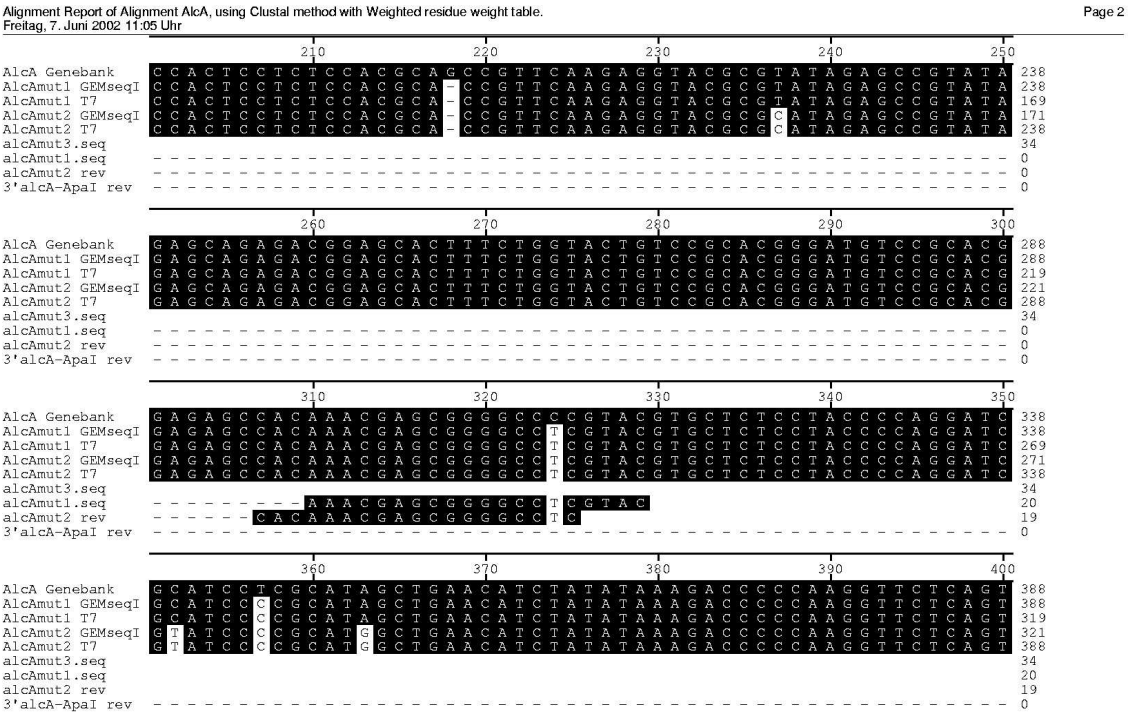


X-Gluc

ClBr-Indigo

Abb. A7 Bei dem Umsatz von X-Gluc entsteht der unlösliche Niederschlag di-Chlor-di-Bromindigo (ClBr-indigo; Naleway 1995)


Alignment Report of Alignment AlcA, using Clustal method with Weighted residue weight table.
Freitag, 7. Juni 2002 11:05 Uhr
Page 1
AlcA Genebank
AlcAmut1 GEMseqI
AlcAmut1 T7
AlcAmut2 GEMseqI
AlcAmut2 T7
alcAmut3.seq
alcAmut1.seq
alcAmut2 rev
3'alcA-ApaI rev


Alignment Report of Alignment AlcA, using Clustal method with Weighted residue weight table.
Freitag, 7. Juni 2002 11:05 Uhr
Page 2
AlcA Genebank
AlcAmut1 GEMseqI
AlcAmut1 T7
AlcAmut2 GEMseqI
AlcAmut2 T7
alcAmut3.seq
alcAmut1.seq
alcAmut2 rev
3'alcA-ApaI rev

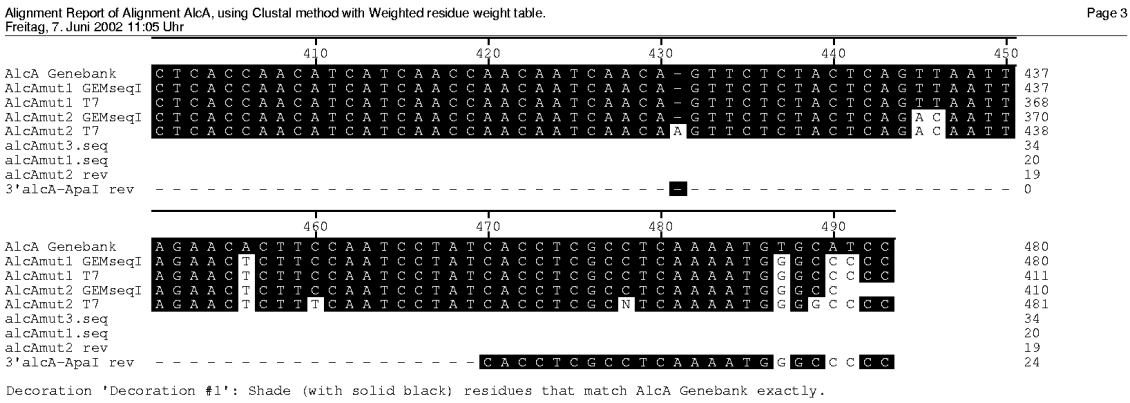


Abb A8 Alignment der *alcA* Promotors der *A. nidulans* Stämme 1709 und 1711. *alcA* Genbank: Sequenz aus GenBank (Ref. Nr. S47331); *AlcA*mut1 GEMseqI bzw. T7: *alcA* Promotor aus *A. nidulans* 1709; *AlcA*mut2 GEMseqI bzw. T7: *alcA* Promotor aus *A. nidulans* 1711 (RKI)

Tab. A1 GUS Assay der Ribozymtransformanten. Die GUS Aktivität von Rohextrakt wurde im Doppelansatz mit dem Substrat MUG bestimmt. Die Reduktion der GUS Aktivität variiert innerhalb einer Transformationsserie. Die durchschnittliche GUS Reduktion ist als Mittelwert angegeben. Die Nummer des jeweils gemessenen Klons ist in Klammern angegeben. Die Standardabweichung ist in Klammern angegeben.

Ribozym-transformant	Reduktion in % (Klon Nr.)												Mittel-Wert	Standard-Abweichung
pR4sym	100 (17)												100	
pR4asym	10 (1)	31 (2)	2 (6)	6 (7)	9 (8)	100 (9)	17 (10)						25	34
pR5sym	100 (1)	100 (3)	100 (8)	81 (9)	100 (13)	100 (16)	100 (17)	100 (18)	100 (19)	100 (20)	100 (21)	100 (22)	98	6
pR5asym	100 (6)	53 (7)	40 (8)	54 (9)	52 (11)	72 (11)	100 (13)	94 (16)					71	24
pR6asym	41 (2)	75 (7)											58	24
pR7asym	41 (2)	21 (5)	100 (7)	100 (8)	80 (9)	100 (10)	100 (13)	67 (15)	99 (19)	100 (20)			81	29
pR8asym	70 (6)												70	
pR9asym	50 (5)	57 (7)											53	5
pR10asym	11 (4)	24 (5)											18	10