(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 815 T2** 2006.02.02

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 662 137 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 815.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/08432**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 921 410.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/006916**
(86) PCT-Anmeldetag: **08.09.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **31.03.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **18.05.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.02.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/67*** (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
943812 **11.09.1992** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The University of Chicago, Chicago, Ill., US

(74) Vertreter:
Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler Wichmann Huhn, 81675 München

(72) Erfinder:
WEICHSELBAUM, R., Ralph, Chicago, US; HALLAHAN, E., Dennis, Park Ridge, US; SUKHATME, P., Vikas, Newton, US; KUFE, W., Donald, Wellesley, US

(54) Bezeichnung: **GENTRANSKRIPTION UND IONISIERENDE STRAHLUNG: METHODEN UND ZUSAMMENSETZUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Anmeldung ist eine Teilfortsetzung ("Continuation-in-Part") der U.S.-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/633,626, eingereicht am 20. Dezember 1990, deren Offenbarung hierin durch Verweis eingeschlossen ist.

[0002] Diese Erfindung bezieht sich auf Verfahren und Zusammensetzungen, die sich auf die Regulation der Gentranskription und der Polypeptidexpression durch ionisierende Strahlung beziehen.

[0003] Bestimmte Gene könnten eine Rolle bei der zellulären Antwort auf Stress oder DNA-schädigende Mittel spielen. Zum Beispiel werden das Metallothionein I und II, die Kollagenase und der Plasminogenaktivator nach UV-Bestrahlung induziert (Angel et al., 1986, 1987; Fornace et al., 1988a und b; Miskin et al., 1981). B2-Polymerase-III-Transkripte nehmen nach einer Behandlung mit Hitzeschock zu (Fornace et al., 1986, 1989a). Außerdem bleibt, obwohl der Spiegel der DNA-Polymerase-β-mRNA nach der Behandlung mit DNA-schädigenden Mitteln zunimmt, dieses Transkript nach einer Bestrahlung unverändert, was darauf hindeutet, dass spezifische DNA-schädigende Mittel die Genexpression differenziell regulieren (Fornace et al., 1989b). Die Spiegel der RNA des Protoonkogens c-fos sind nach der Behandlung mit UV, Hitzeschock oder chemischen Karzinogenen erhöht (Andrews et al., 1987; Hollander et al., 1989a). Diesbezüglich sind die relativen Raten der Transkription von fos während des Hitzeschocks unverändert, was darauf hindeutet, dass dieser Stress die c-fos-RNA durch posttranskriptionelle Mechanismen erhöhte (Hollander et al., 1989b).

[0004] Untersuchungen der zytotoxischen Wirkungen von ionisierender Strahlung haben sich auf die Reparatur der DNA-Schädigung oder die Veränderung der Strahlungsletalität durch Hypoxie konzentriert (Banura et al., 1976; Moulder et al., 1984). In Prokaryonten und niederen Eukaryonten wurde gezeigt, dass ionisierende Strahlung die Expression mehrerer DNA-Reparaturgene induziert (Little et al., 1982); jedoch wurde die Induktion der Genexpression durch ionisierende Strahlung in Säugerzellen nicht gezeigt. Andere DNA-schädigende Mittel als Röntgenstrahlung induzieren die Expression einer Vielzahl von Genen in höheren Eukaryonten (Fornace et al., 1988, 1989; Miskin et al., 1981).

[0005] Über die Wirkungen von ionisierender Strahlung ist bekannt, dass sie zur DNA-Schädigung und Abtötung von Zellen führt. In vielen Beispielen sind die Wirkungen proportional zu der Dosisrate. Es wurde postuliert, dass ionisierende Strahlung durch direkte Wechselwirkung mit DNA oder durch die Bildung von freien Radikalspezies, die zur DNA-Schädigung führen, mehrere biologische Wirkungen induziert (Hall 1988). Diese Wirkungen schließen Genmutationen, maligne Transformation und Abtöten von Zellen ein. Obwohl gezeigt wurde, dass ionisierende Strahlung die Expression bestimmter DNA-Reparaturgene in einigen prokaryontischen und niederen eukaryontischen Zellen induziert, ist wenig über die Wirkungen von ionisierender Strahlung auf die Regulation der Genexpression in Säugern bekannt (Borek 1985). Mehrere Studien haben Veränderungen in dem Muster der Proteinsynthese beschrieben, die nach der Bestrahlung von Säugerzellen beobachtet wurden. Zum Beispiel ist die Behandlung humaner maligner Melanomzellen mit ionisierender Strahlung mit der Induktion mehrerer nicht identifizierter Proteine assoziiert (Boothman et al., 1989). Die Synthese von Cyklin und von coregulierten Polypeptiden wird in REF52-Zellen aus Ratte, aber nicht in Onkogen-transformierten REF52-Zelllinien durch ionisierende Strahlung supprimiert (Lambert und Borek, 1988). Andere Studien haben gezeigt, dass bestimmte Wachstumsfaktoren oder Zytokine an der durch Röntgenstrahlung induzierten DNA-Schädigung beteiligt sein können. Diesbezüglich wird der Platelet-Derived-Growth-Factor nach der Bestrahlung aus Endothelzellen freigesetzt (Witte et al., 1989).

[0006] Die Initiation der mRNA-Synthese ist ein kritischer Kontrollpunkt bei der Regulation von zellulären Prozessen und hängt von der Bindung bestimmter transkriptionsregulatorischer Faktoren an spezifische DNA-Sequenzen ab. Es ist jedoch wenig über die Regulation der transkriptionellen Kontrolle durch die Exponierung an ionisierende Strahlung in eukaryontischen Zellen bekannt. Die Auswirkungen von ionisierender Strahlung auf die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression bei Säugern sind ebenfalls unbekannt.

[0007] Viele Erkrankungen, Zustände und Stoffwechselmangelzustände würden von der Zerstörung, Veränderung oder Inaktivierung von betroffenen Zellen oder von dem Ersetzen eines fehlenden oder anormalen Genprodukts profitieren. In bestimmten Situationen sind die betroffenen Zellen in einem erkennbaren Gewebe konzentriert. Die gegenwärtigen Therapieverfahren, die versuchen, diese Gewebe zu suchen und zu zerstören oder diesen die notwendigen Genprodukte zuzuführen, weisen starke Beschränkungen auf. Bei einigen Erkrankungen, z. B. Krebs, ist ionisierende Strahlung als eine Therapie nützlich. Verfahren zur Verstärkung der Wirkungen der Strahlung, die dadurch die notwendige Dosis verringern, würden Krebspatienten sehr zugute kommen. Deshalb wurde nach Verfahren und Zusammensetzungen gesucht, um die Wirkungen von Strahlung

zu verstärken, indem die Wirkungen von Strahlung auf die Genexpression untersucht wurden. Ein Ziel war es, neue Therapiearten unter Verwendung von Strahlung bereitzustellen und andere Verwendungen von Strahlung zu erforschen.

[0008] Gemäß einem Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein synthetisches DNA-Molekül, das einen auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor umfasst, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die wenigstens ein Polypeptid kodiert, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist.

[0009] Der auf Strahlung ansprechende Enhancer-Promotor umfasst eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel kodiert eine kodierende Region ein einzelnes Polypeptid. Ein von solch einer kodierenden Region kodiertes, bevorzugtes Polypeptid besitzt die Fähigkeit, das Wachstum einer Zelle und insbesondere einer Tumorzelle zu hemmen.

[0010] Ein beispielhaftes und bevorzugtes Polypeptid ist ein Zytokin, ein Dominant Negatives, ein Tumor-supprimierender Faktor, ein Angiogenesehemmer oder ein Monozyten-Chemoattraktor. In besondererer Weise ist solch ein bevorzugtes Polypeptid TNF-α, Interleukin-4, JE, Ricin, das PF4-Pseudomonastoxin, p53 und das Retinoblastom-Genprodukt oder das Wilms-Tumor-Genprodukt.

[0011] Ein weiteres bevorzugtes, von solch einer kodierenden Region kodiertes Polypeptid besitzt eine radioprotektive Wirkung gegenüber normalem Gewebe. Ein beispielhaftes und bevorzugtes solches Polypeptid, das eine radioprotektive Wirkung aufweist, ist Interleukin-1; TNF-α; ein Gewebe-Wachstumsfaktor, wie ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, ein Hepatozyten-Wachstumsfaktor, ein Nieren-Wachstumsfaktor, ein endothelialer Wachstumsfaktor oder ein Wachstumsfaktor für glatte Gefäßmuskulator; Interleukin-6; ein Fänger für freie Radikale oder ein Rezeptor für einen Gewebe-Wachstumsfaktor.

[0012] Vorzugsweise 1) ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor Interleukin-3 oder ein Kolonie-stimulierender Faktor (CSF), wie GM-CSF, G-CSF und M-CSF; 2) ist ein endothelialer Wachstumsfaktor der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF); 3) ist ein Wachstumsfaktor für glatte Gefäßmuskulatur der Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF); und 4) ist ein Fänger für freie Radikale die Mangan-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD).

[0013] Ein noch weiteres bevorzugtes, von solch einer kodierenden Region kodiertes Polypeptid besitzt eine antikoagulatorische, thrombolytische oder thrombotische Aktivität, wie zum Beispiel der Plasminogenaktivator, eine Streptokinase oder ein Inhibitor des Plasminogenaktivators.

[0014] Ein weiteres bevorzugtes, von solch einer kodierenden Region kodiertes Polypeptid besitzt die Fähigkeit, die Umwandlung eines Pro-Wirkstoffs in einen Wirkstoff zu katalysieren. Beispielhafte und bevorzugte derartige Polypeptide sind die Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase und eine Cytosin-Deaminase.

[0015] Ein weiteres bevorzugtes, von solch einer kodierenden Region kodiertes Polypeptid ist ein Oberflächenantigen, das ein Genprodukt eines Haupthistokompatibilitätskomplexes ist. Beispielhafte und bevorzugte derartige Polypeptide sind H2-Proteine und HLA-Protein.

[0016] Gemäß einem weiteren Aspekt kodiert eine kodierende Region eines DNA-Moleküls der vorliegenden Erfindung die Gesamtheit oder einen Teil von mehr als einem Polypeptid.

[0017] Vorzugsweise sind diese Polypeptide Transkriptionsfaktoren. In Übereinstimmung mit solch einem Ausführungsbeispiel umfasst eine kodierende Region:

(a) eine erste kodierende Sequenz, die eine DNA-Bindungsdomäne eines ersten Transkriptionsfaktors kodiert;

(b) eine zweite kodierende Sequenz, die eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne eines zweiten Transkriptionsfaktors kodiert;

(c) eine dritte kodierende Sequenz, die ein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert, wobei die ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen funktionell in einem Leserahmen in einer beliebigen Anordnung miteinander verbunden sind, mit der Maßgabe, dass die dritte kodierende Sequenz nur vorhanden sein muss, falls die erste oder zweite kodierende Sequenz nicht für ein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert; und

(d) eine Transkriptions-terminierende Region, die funktionell mit einer beliebigen der ersten, zweiten oder dritten kodierenden Sequenzen verbunden ist, so dass die Transkriptions-terminierende Region 3' zu allen der ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen angeordnet ist.

[0018] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel kodiert eine erste kodierende Sequenz eine DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4, eine zweite kodierende Sequenz kodiert die VP-16-Aktivierungsdomäne, die NF-κB-Aktivierungsdomäne, die Repressionsdomäne des Wilms-Tumor-Suppressorgens WT1 oder die Repressionsdomäne von Egr-1.

[0019] Gemäß einem noch weiteren Aspekt umfasst ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung eine Bindungsregion, die fähig ist, an eine DNA-bindende Domäne eines Transkriptionsfaktors zu binden, wobei die Bindungsregion funktionell mit einem Minimalpromotor verbunden ist, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist.

[0020] Vorzugsweise ist der Transkriptionsfaktor GAL4, und das Polypeptid ist das gleiche wie oben angegeben.

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung und einen physiologisch annehmbaren Träger umfasst.

[0022] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Zelle, die mit einem DNA-Molekül dieser Erfindung transformiert oder transfiziert ist, oder eine transgene Zelle, die von solch einer transformierten oder transfizierten Zelle abgeleitet ist. Vorzugsweise ist eine transformierte oder transgene Zelle der vorliegenden Erfindung ein Leukozyt, wie ein Tumor-infiltrierender Lymphozyt oder eine T-Zelle oder eine Tumorzelle.

[0023] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Regulation der Expression eines Polypeptids, umfassend die Schritte:

(a) funktionelles Verbinden eines auf Strahlung ansprechenden, wie in den Patentansprüchen definierten Enhancer-Promotors mit einer kodierenden Region, die das Polypeptid kodiert, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist, um ein DNA-Molekül herzustellen; und

(b) Exponieren des DNA-Moleküls an eine wirksame, Expressions-induzierende Dosis ionisierender Strahlung.

[0024] Gemäß einem alternativen Ausführungsbeispiel wird mehr als ein DNA-Molekül hergestellt. Vorzugsweise umfassen diese DNA-Moleküle:

(1) ein erstes DNA-Molekül, das einen auf Strahlung ansprechenden, wie in den Patentansprüchen definierten Enhancer-Promotor umfasst, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die umfasst:

(a) eine erste kodierende Sequenz, die eine DNA-Bindungsdomäne eines ersten Transkriptionsfaktors kodiert;

(b) eine zweite kodierende Sequenz, die eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne eines zweiten Transkriptionsfaktors kodiert;

(c) eine dritte kodierende Sequenz, die ein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert, wobei die ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen funktionell in einem Leserahmen in einer beliebigen Anordnung miteinander verbunden sind, mit der Maßgabe, dass die dritte kodierende Sequenz nur vorhanden sein muss, falls die erste oder zweite kodierende Sequenz kein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert; und

(d) eine Transkriptions-terminierende Region, die funktionell mit einer beliebigen der ersten, zweiten oder dritten kodierenden Sequenzen verbunden ist, so dass die Transkriptions-terminierende Region 3' zu allen der ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen angeordnet ist; und

(2) ein zweites DNA-Molekül, das eine Bindungsregion umfasst, die fähig ist, die DNA-Bindungsdomäne des ersten Transkriptionsfaktors zu binden, wobei die Bindungsregion funktionell mit einem Minimalpromotor verbunden ist, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist.

[0025] Ein auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor, ein Transkriptionsfaktor, eine Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors und eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne eines Transkriptionsfaktors sind vorzugsweise die oben angegebenen. Ein von einer kodierenden Region kodiertes Polypeptid ist ebenfalls vorzugsweise das gleiche wie oben angegeben.

[0026] Falls die Regulation hemmend ist, umfasst eine kodierende Region vorzugsweise:

(a) eine erste kodierende Sequenz, die eine DNA-Bindungsdomäne eines positiv wirkenden Transkriptions-

faktors für ein Gen kodiert, das das Polypeptid kodiert;
(b) eine zweite kodierende Sequenz, die eine Repressionsdomäne eines Transkriptionsfaktors kodiert;
(c) eine dritte kodierende Sequenz, die ein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert, wobei die ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen funktionell in einem Leserahmen in einer beliebigen Anordnung miteinander verbunden sind, mit der Maßgabe, dass die dritte kodierende Sequenz nur vorhanden sein muss, falls die erste oder zweite kodierende Sequenz kein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert; und
(d) eine Transkriptions-terminierende Region, die funktionell mit einer beliebigen der ersten, zweiten oder dritten kodierenden Sequenzen verbunden ist, so dass die Transkriptions-terminierende Region 3' zu allen der ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen angeordnet ist.

[0027] Vorzugsweise kodiert die zweite kodierende Sequenz die Repressionsdomäne des Wilms-Tumor-Supressorgens WT1 oder die Repressionsdomäne von Egr-1.

[0028] Gemäß einem noch weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Hemmung des Wachstums eines Tumors, umfassend die Schritte:
(a) Verabreichen an den Tumor einer therapeutisch wirksamen Menge eines DNA-Moleküls, das einen wie in den Patentansprüchen definierten, auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor umfasst, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert, das die Fähigkeit besitzt, das Wachstum einer Tumorzelle zu hemmen, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist; und
(b) Exponieren des Tumors an eine wirksame, Expressions-induzierende Dosis ionisierender Strahlung.

[0029] Ein auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor umfasst eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors und ein Polypeptid, das ein Zytokin, ein Dominant Negatives, ein Tumorsupprimierender Faktor oder ein Angiogenesehemmer ist.

[0030] Das Verabreichen erfolgt vorzugsweise durch Einführen des DNA-Moleküls in den Tumor. Falls der Tumor sich in einem Individuum befindet, besteht das Verabreichen in dem Verabreichen des DNA-Moleküls in das Kreislaufsystem des Individuums. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel umfasst Verabreichen die Schritte:
(a) Bereitstellen eines Vehikels, das das DNA-Molekül enthält; und
(b) Verabreichen des Vehikels an das Individuum.

[0031] Ein Vehikel ist vorzugsweise eine mit dem DNA-Molekül transformierte oder transfizierte Zelle. Eine beispielhafte und bevorzugte transformierte oder transfizierte Zelle ist ein Leukozyt, wie ein Tumor-infiltrierender Lymphozyt, oder eine T-Zelle oder eine Tumorzelle aus dem Tumor, der behandelt wird. Alternativ ist das Vehikel ein Virus oder ein Antikörper, der mit einem Antigen des Tumors immunreagiert.

[0032] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel umfasst Exponieren die Schritte:
(a) Bereitstellen eines radioaktiv markierten Antikörpers, der mit einem Antigen des Tumors immunreagiert; und
(b) Verabreichen einer wirksamen, Expressions-induzierenden Menge des radioaktiv markierten Antikörpers an den Tumor.

[0033] Alternativ umfasst ein Verfahren zur Hemmung des Wachstums eines Tumors die Schritte:
(a) Verabreichen an den Tumor einer therapeutisch wirksamen Menge
(1) eines ersten DNA-Moleküls, das einen wie in den Patentansprüchen definierten, auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor umfasst, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die umfasst:
(i) eine erste kodierende Sequenz, die eine DNA-Bindungsdomäne eines ersten Transkriptionsfaktors kodiert;
(ii) eine zweite kodierende Sequenz, die eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne eines zweiten Transkriptionsfaktors kodiert;
(iii) eine dritte kodierende Sequenz, die ein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert, wobei die ersten, zweiten und dritten kodierende Sequenzen funktionell in einem Leserahmen in einer beliebigen Anordnung miteinander verbunden sind, mit der Maßgabe, dass die dritte kodierende Sequenz nur vorhanden sein muss, falls die erste oder zweite kodierende Sequenz kein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert; und
(iv) eine Transkriptions-terminierende Region, die funktionell mit einer beliebigen der ersten, zweiten oder dritten kodierenden Sequenzen verbunden ist, so dass die Transkriptions-terminierende Region 3' zu allen der ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen angeordnet ist; und

(2) eines zweiten DNA-Moleküls, das eine Bindungsregion umfasst, die fähig ist, die DNA-Bindungsdomäne des ersten Transkriptionsfaktors zu binden, wobei die Bindungsregion funktionell mit einem Minimalpromotor verbunden ist, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert, das fähig ist, das Wachstum einer Tumorzelle zu hemmen, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist; und
(b) Exponieren der Zelle an eine wirksame, Expressions-induzierende Dosis ionisierender Strahlung.

[0034] Vorzugsweise sind ein auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor und ein Polypeptid die gleichen, wie oben angegeben. Die Verabreichung ist vorzugsweise die gleiche, wie oben angegeben.

[0035] In der Zeichnung, die einen Teil der Beschreibung bildet:
zeigt die **Fig. 1** den Einfluss von TNF-α auf die Strahlungsletalität von TNF-α produzierenden humanen Sarkomen und kein TNF-α produzierenden humanen Tumorzellen.

I. Die Erfindung

[0036] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Zusammensetzungen und Verfahren zur Regulation der Transkription einer kodierenden DNA-Sequenz und der Expression eines Polypeptids, das von dieser Sequenz kodiert wird. Eine Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung umfasst ein oder mehrere synthetische DNA-Moleküle, die eine Enhancer-Promotor-Region, die auf ionisierende Strahlung anspricht, und eine kodierende Region, die wenigstens ein Polypeptid kodiert, umfassen. In der vorliegenden Erfindung wird die Kontrolle über die Transkription einer kodierenden DNA-Sequenz durch eine Enhancer-Promotor-Region ausgeübt, die auf ionisierende Strahlung anspricht. Die Enhancer-Promotor-Region wird als ein Schalter verwendet, um die Expression eines von dieser Sequenz kodierten Polypeptids selektiv zu beeinflussen. Die Regulation der spezifischen Polypeptid-Expression in einer bestimmten Zielzelle oder Gewebe bietet Gelegenheiten für die therapeutische Zerstörung, Veränderung oder Inaktivierung dieser Zelle oder dieses Gewebes.

A. DNA-Moleküle

[0037] Gemäß einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein synthetisches DNA-Molekül, das einen auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor umfasst, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die wenigstens ein Polypeptid kodiert, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist. Wie hierin verwendet, zeigt der Ausdruck „synthetisch" an, dass ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung durch beliebige Mittel, einschließlich, aber nicht begrenzt auf de-novo-Synthese, durch Menschen hergestellt (nicht natürlicherweise vorkommend) ist. Vorzugsweise ist dieses synthetische DNA-Molekül isoliert und gereinigt und existiert im Wesentlichen frei von anderen Nukleinsäuren, Proteinen und dergleichen.

1. Auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor

[0038] Ein Promotor ist eine Region eines DNA-Moleküls, die typischerweise innerhalb von in etwa 100 Nukleotidpaaren vor (stromaufwärts von) dem Punkt, an dem die Transkription beginnt (d. h. einer Transkriptionsstartstelle), angeordnet ist. Diese Region enthält typischerweise mehrere Arten von DNA-Sequenzelementen, die in unterschiedlichen Genen an ähnlichen relativen Positionen angeordnet sind. Wie hierin verwendet, schließt der Ausdruck „Promotor" ein, was in der Technik als eine stromaufwärts gelegene Promotorregion, eine Promotorregion, oder ein Promotor einer verallgemeinerten eukaryontischen RNA-Polymerase-II-Transkriptionseinheit bezeichnet wird. Beispielhafte und bevorzugte Promotoren sind die TATA-Box, die CAAT-Box und GC-reiche Sequenzelemente.

[0039] Ein weiterer Typus eines diskreten transkriptionsregulatorischen Sequenzelements ist ein Enhancer. Ein Enhancer vermittelt Spezifität bezüglich der Zeit, des Ortes und des Expressionsspiegels für eine bestimmte kodierende Region (z. B. ein Gen). Eine Hauptfunktion eines Enhancers ist es, den Spiegel der Transkription einer kodierenden Region in einer Zelle zu erhöhen, die einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren enthält, die an diesen Enhancer binden. Im Unterschied zu einem Promotor kann ein Enhancer funktionieren, wenn er in variablen Abständen von Transkriptionsstartstellen angeordnet ist, solange ein Promotor vorhanden ist.

[0040] Wie hierin verwendet, bedeutet der Ausdruck „Enhancer-Promotor" eine zusammengesetzte Einheit, die sowohl Enhancer- als auch Promotorelemente enthält. Wie hierin verwendet, bezeichnet ein „auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor" einen Enhancer-Promotor, dessen die Transkription kontrollierende Funktion durch ionisierende Strahlung beeinflusst wird. Typischerweise stimuliert oder erhöht ein auf Strahlung

ansprechender Enhancer-Promotor der vorliegenden Erfindung bei der Exponierung an eine wirksame Dosis ionisierender Strahlung die Rate der Transkription einer kodierenden Region, die von diesem Enhancer-Promotor kontrolliert wird. Ein beispielhafter und bevorzugter Enhancer-Promotor für die Verwendung in einem DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung ist eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors, ein Promotor für das Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-(TNF-α-)Gen oder ein c-Jun-Promotor.

a. CArG-Domäne des Egr-1-Promotors

[0041] Die Exponierung von Säugerzellen an ionisierende Strahlung ist mit der Induktion der Expression des Egr-1-Gens verbunden. Das Egr-1-Gen (auch als zif/268, TIS-8, NFGI-A und Krox-24 bekannt; Sukhatme et al. 1988; Christy et al., 1988; Milbrandt 1987; Lemaire et al., 1988; Lim et al., 1987; Gessler 1990) kodiert ein 533-Aminosäuren-Zellkern-Phosphoprotein mit einer Cys_2-His_2-Zinkfinger-Domäne, die teilweise homolog zu der entsprechenden Domäne in dem Wilms-Tumor-Empfänglichkeitsgen ("Wilms' tumor-susceptibility gene") (Gessler 1990) ist. Das Egr-1-Protein bindet an die DNA-Sequenz CGCCCCCGC in einer von Zink abhängigen Weise und wirkt als ein Regulator der Gentranskription (Christy et al., 1989; Cao et al., 1990; Lau et al., 1987). Es wurde sowohl von mitogenen als auch von Differenzierungssignalen gezeigt, dass sie die schnelle und transiente Expression von Egr-1 in einer Vielzahl von Zelltypen induzieren. Die Exponierung von humanen HL-525-Zellen an Röntgenstrahlen war mit Zunahmen der Spiegel der Egr-1-mRNA assoziiert. Diese Zunahmen waren nach drei Stunden maximal und vorübergehend. Zellkern-Run-on-Tests zeigten, dass diese Wirkung zumindest zum Teil mit der Aktivierung der Transkription des Egr-1-Gens in Zusammenhang stand.

[0042] Sequenzen, die auf durch ionisierende Strahlung induzierte Signale ansprechen, wurden durch Deletionsanalyse des Egr-1-Promotors bestimmt. Die Induzierbarkeit des Egr-1-Gens durch Röntgenstrahlung wurde durch eine Region verliehen, die sechs Serumantwort- oder $CC(A/T)_6GG$-(CArG-)Domänen oder -Domänen enthielt.

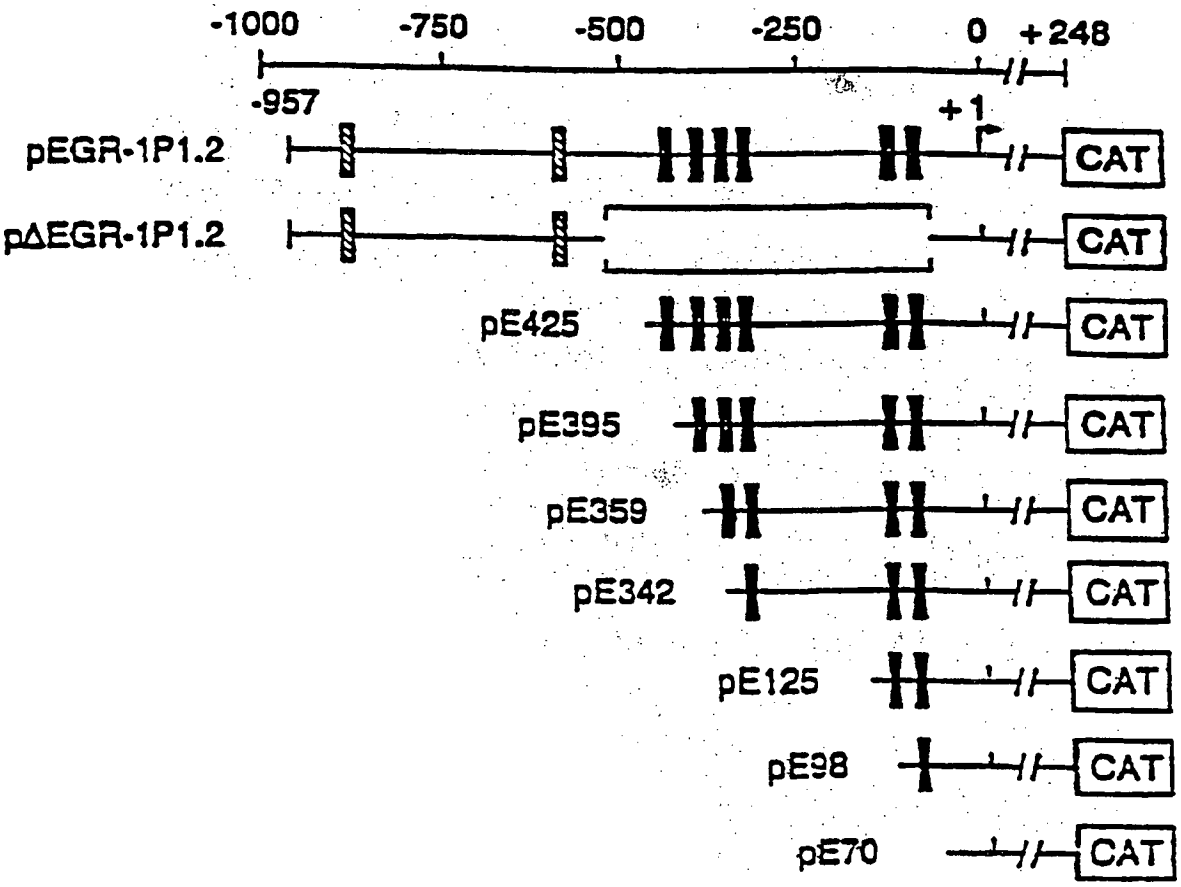
[0043] Eine Region, die die drei distalen oder stromaufwärts gelegenen CArG-Elemente umfasste, war bei der Antwort auf Röntgenstrahlung funktionsfähig, weil die schrittweise Deletion dieser drei CArG-Domänen die Antwort in zunehmendem Maße verringerte. Es wurde jedoch gefunden, dass jedoch eine einzige CArG-Domäne ausreichend ist, um eine Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung zu verleihen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ionisierende Strahlung die Transkription von Egr-1 durch eine oder mehrere CArG-Domänen induziert.

[0044] Um cis-Elemente zu identifizieren, die für die durch Röntgenstrahlung induzierte Transkription von Egr-1 verantwortlich sind, wurde die Egr-1-Promotorregion, die sich von der Position –957 stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle bis zu der Position +248 erstreckt, an ein Chloramphenicol-Acetyltransferase-(CAT-)Reportergen ligiert, um das Plasmid pEgr-1 P1.2 herzustellen. Die Egr-1-Promotorregion enthält mehrere vermutliche cis-Elemente, einschließlich sechs CArG-Domänen (Christy et al., 1989; Qureshi et al., 1991). Die Behandlung von mit pEgr-1 P1.2 transfizierten Zellen mit ionisierender Strahlung war mit einer 4,1 fachen Zunahme der CAT-Aktivität im Vergleich zu transfizierten, aber nicht bestrahlten Zellen assoziiert. Im Gegensatz dazu zeigten ähnliche Studien, die mit dem Plasmid pΔEgr-1 P1.2 (ähnlich zu pEgr-1 P1.2 mit der Ausnahme, dass die Nukleotide von der Position –550 bis –50 deletiert sind) durchgeführt wurden, zeigten eine allenfalls geringe Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlen. Somit wird die Induzierbarkeit von Egr-1 durch Röntgenstrahlung wahrscheinlich von Sequenzen vermittelt, die zwischen –550 und –50 des Egr-1-Promotors vorhanden sind.

[0045] Die Bestrahlung von Zellen, die mit dem Plasmid pE425 transfiziert waren, das eine Region von in etwa 491 Basenpaaren des Egr-1-Promotors mit sechs funktionell mit einem CAT-Gen verbundenen CArG-Domänen enthält, war mit einer 3,6fachen Induktion der CAT-Aktivität im Vergleich zu derjenigen in nicht-bestrahlten Zellen, die mit diesem Konstrukt transfiziert waren, assoziiert.

[0046] Als Nächstes wurde eine Serie von deletierten Egr-1-Promotorkonstrukten verwendet, um die auf Röntgenstrahlung ansprechenden Elemente in pE425 weiter zu definieren. Diese Konstrukte sind in schematischer Darstellung in dem Schema 1, unten, gezeigt.

SCHEMA 1



[0047] In Schema 1 zeigen vertikale schwarze Rechtecke CArG-Domänen des angegebenen Plasmids an. Eine kodierende Region für CAT ist an dem 3'-Ende jedes Moleküls gezeigt. Klammern zeigen Deletionen im Vergleich zu der Promotorregion von Egr-1 an, die in schematischer Darstellung am oberen Ende des Schemas gezeigt ist. Die Zahlen bezeichnen die Nukleotidpositionen relativ zu der Transkriptionsstartstelle (bezeichnet mit der Zahl 0).

[0048] Wenn Zellen mit Konstrukten transfiziert wurden, die eine schrittweise Deletion der drei distalen CArG-Domänen aufwiesen, nahm die Induzierbarkeit der CAT-Aktivität durch Röntgenstrahlung in zunehmendem Maße ab. Die Transfektion mit dem Plasmid pE395 (die erste CArG deletiert) verlieh in einem geringeren Maße ein Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung als die Transfektion mit pE425. Die Transfektion mit dem Plasmid pE359 (Deletion der ersten und zweiten CArG-Domänen) führte zu weiteren Abnahmen bei der induzierten CAT-Aktivität. Die Transfektion mit dem Plasmid pE342 (Deletion der ersten drei CArG-Domänen) war mit einer minimalen Induktion der CAT-Aktivität assoziiert.

[0049] Andere Studien wurden mit Fragmenten des Egr-1-Promotors durchgeführt, die mit Elementen eines Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase-(HSV-TK-)Gens und des CAT-Gens verbunden waren. Es gab keine nachweisbare Induzierbarkeit der CAT-Aktivität durch Röntgenstrahlung in Zellen, die mit dem Plasmid pTK35CAT (das einen Thymidin-Kinase-Promotor, aber keine Egr-1-Promotorregionen enthielt) transfiziert waren. Im Gegensatz dazu war die CAT-Aktivität in Zellen, die mit dem Plasmid pE425/250TK (das die vier distalen CArG-Domänen enthielt und den HSV-TK-Promotor verwendete) transfiziert, durch Röntgenstrahlen induzierbar. Die Region des Egr-1-Promotors, die sich von –395 bis –250 erstreckt, welche Region das erste CArG-Element ausschließt, war ebenfalls bei der Verleihung der Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung an den heterologen Promotor funktionsfähig.

[0050] Obwohl diese Ergebnisse eine weitere Stützung für die Beteiligung von CArG-Domänen an der durch Röntgenstrahlung induzierten Transkription von Egr-1 lieferten, könnten auch andere Sequenzen zwischen diesen Domänen als funktionelle cis-Elemente dienen. Die Transfektion von Zellen mit dem Plasmid pSRE1TK (das die erste CArG-Domäne enthielt, die sieben Basenpaare der 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen besaß) induzierte die Transkription von pTK35CAT.

[0051] Somit wird die Induzierbarkeit des Egr-1-Gens durch Röntgenstrahlung von einer Region des Egr-1-Promotors verliehen, die CArG-Domänen enthält. Die sechs CArG-Domänen des Egr-1-Promotors sind innerhalb einer Region des Egr-1-Promotors angeordnet, die in etwa 960 Nukleotidbasen stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle des Egr-1-Gens angeordnet ist (Referenz). Eine einzige CArG-Domäne reicht aus, um eine Induzierbarkeit durch Strahlung zu verleihen. Vorzugsweise umfasst ein auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor wenigstens eine der drei am meisten distal (d. h. stromaufwärts) gelegenen CArG-Domänen. Eine detaillierte Beschreibung der Induzierbarkeit des Egr-1-Gens durch Strahlung mittels CArG-Domänen stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle kann in Beispiel 4 hierin unten gefunden werden.

[0052] Studien mit dem c-fos-Promotor haben gezeigt, dass die CArG-Domäne oder das Serumantwort-Element bei der Induktion der Transkription dieses Gens in Antwort auf Serum und andere Signale funktionsfähig ist (Triesman 1990). Das CArG-Element ist für die c-fos-Induktion durch sowohl PKC-vermittelte Signalwege als auch durch von PKC unabhängige, Wachstumsfaktor-induzierte Signale erforderlich (Fisch et al., 1987; Gilman 1988; Buscher et al., 1988; Sheng et al., 1988; Stumpo et al., 1988; Graham et al., 1991). Die Kinetiken der Induktion, sowie der Repression der c-fos-Expression sind ähnlich zu denjenigen von Egr-1 in anderen Modellen (Sukhatme et al., 1988; Guis et al., 1990). Tatsächlich sind die durch Röntgenstrahlung induzierte Veränderungen von c-fos-Transkripten ähnlich zu denjenigen, die für Egr-1 in HL-525-Zellen erhalten werden, und die TPA-induzierte c-fos-Expression ist wie diejenige von Egr-1 in diesen Zellen abgeschwächt. Studien mit dem c-fos-Promotor haben gezeigt, dass die CArG-Domäne als eine Bindungsstelle für den Serumantwort-("serum response"-)Faktor (SRF) funktioniert (Treisman 1986; Prywes et al., 1988). SRF bindet, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität, an die verschiedenen CArG-Elemente in dem Egr-1-Promotor (Christy et al., 1989).

[0053] Frühere Studien haben gezeigt, dass die Bindung von SRF an CArG in dem c-fos-Promotor durch Serum und andere Bedingungen nicht in nachweisbarer Weise verändert wird (Treisman 1986; Prywes et al., 1986; Sheng et al., 1988). Zellkernproteine aus ruhenden und mit Serum stimulierten 3T3-Zellen haben ebenfalls einen allenfalls geringen Unterschied bei der Bindung an das erste CArG-Element des Egr-1-Promotors gezeigt (Gius et al., 1990). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ionisierende Strahlung, wie Serum, eine posttranskriptionale Modifikation von SRF induziert. Andere Studien haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von SRF für die Aktivierung oder Transkription erforderlich ist (Prywes et al., 1988). Die für diesen Effekt verantwortlichen Kinasen bleiben jedoch unklar.

[0054] Alternativ könnte ionisierende Strahlung zu der Modifikation von anderen Proteinen führen, die mit der SRF- oder CArG-Domäne interagieren. Sowohl SAP-1 als auch $p62^{TCF}$ (ternärer Komplexfaktor) erkennen SRF-DNA-Komplexe (Dalton et al., 1992; Shaw et al., 1989), während $p62^{DBF}$ (direkt bindender Faktor) direkt an das SRE bindet (Ryan et al., 1989; Walsh 1989). Andere Studien haben gezeigt, dass SRE-ZBP einer posttranslationalen Modifikation unterliegt und an dieses Element bindet (Attar et al., 1992). Eines oder mehrere dieser Proteine könnten deshalb an der durch Röntgenstrahlung induzierten Transkription von Egr-1 beteiligt sein.

2. Kodierende Region

[0055] Ein auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor ist funktionell mit einer kodierenden Region verbunden, die wenigstens ein Polypeptid kodiert. Wie hierin verwendet, bedeutet der Ausdruck „funktionell verbunden", dass ein Enhancer-Promotor mit einer kodierenden Region in solch einer Weise verbunden ist, dass die Transkription dieser kodierenden Region von diesem Enhancer-Promotor kontrolliert und reguliert wird. Mittel für das funktionelle Verbinden eines Enhancer-Promotors mit einer kodierenden Region sind in der Technik wohl bekannt. Wie ebenfalls in der Technik wohl bekannt ist, hängt die genaue Ausrichtung und Anordnung relativ zu einer kodierenden Region, deren Transkription kontrolliert wird, unter anderem von der spezifischen Natur des Enhancer-Promotors ab. So ist ein TATA-Box-Minimalpromotor typischerweise von in etwa 25 bis in etwa 30 Basenpaare stromaufwärts von einer Transkriptionsinitiationsstelle angeordnet, und ein stromaufwärts gelegenes Promotorelement ist typischerweise von in etwa 100 bis in etwa 200 Basenpaare stromaufwärts von einer Transkriptionsinitiationsstelle angeordnet. Im Gegensatz dazu kann ein Enhancer stromabwärts von der Initiationsstelle angeordnet sein und kann sich in einem beträchtlichen Abstand von dieser Stelle befinden.

a. Einzelnes Polypeptid

[0056] In einem Ausführungsbeispiel kodiert eine kodierende Region eines DNA-Moleküls der vorliegenden Erfindung ein einzelnes Polypeptid. Wie hierin verwendet, bedeutet der Ausdruck „Polypeptid" ein Polymer von

Aminosäuren, die durch Amidbindungen verbunden sind, worin die Anzahl von Aminosäureresten von in etwa 5 bis in etwa 1 Million umfassen kann. Vorzugsweise besitzt ein Polypeptid von in etwa 10 bis in etwa 1000 Aminosäurereste und noch mehr bevorzugt von in etwa 20 bis in etwa 500 Aminoreste. Somit schließt ein Polypeptid, wie hierin verwendet, ein, was in der Technik häufig als ein Oligopeptid (5–10 Aminosäurereste), ein Polypeptid (11–100 Aminosäurereste) und ein Protein (>100 Aminosäurereste) bezeichnet wird. Ein von einer kodierenden Region kodiertes Polypeptid kann einer posttranslationalen Modifizierung unterliegen, um Konjugate mit Kohlenhydraten, Lipiden, Nukleinsäuren und dergleichen zu bilden, um Glycopolypeptide (z. B. Glycoproteine), Lipopolypeptide (z. B. Lipoproteine) und andere ähnliche Konjugate zu bilden.

[0057] Ein beliebiges Polypeptid kann von einer kodierenden Region eines DNA-Moleküls der vorliegenden Erfindung kodiert sein. Eine kodierende Region kann Introns und Exons umfassen, solange die kodierende Region wenigstens einen offenen Leserahmen für die Transkription, Translation und Expression dieses Polypeptids umfasst. Somit kann eine kodierende Region ein Gen, ein geteiltes Gen oder ein cDNA-Molekül umfassen. In dem Fall, dass die kodierende Region ein geteiltes Gen umfasst (ein oder mehrere Introns enthält), muss eine Zelle, die mit einem DNA-Molekül, das dieses geteilte Gen enthält, transformiert oder transfiziert ist, Mittel für das Entfernen dieser Introns und das Zusammensplicen der Exons in dem RNA-Transkript von diesem DNA-Molekül besitzen, falls die Expression dieses Genprodukts erwünscht ist.

[0058] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel stört ein von einer kodierenden Region eines DNA-Moleküls der vorliegenden Erfindung kodiertes Polypeptid die strukturelle oder funktionelle Integrität einer Zelle, die diesem Polypeptid ausgesetzt wird. Solch ein Polypeptid besitzt die Fähigkeit, das Wachstum einer Zelle und insbesondere einer Tumorzelle zu hemmen. Ein Polypeptid ist vorzugsweise ein Zytokin, ein Dominant Negatives, ein Tumor-supprimierender Faktor, ein Angiogenesehemmer oder ein Monozyten-Chemoattraktor.

[0059] Dominant Negative für zelluläre Enzyme, wie die Raf-1-Kinase, sind für humane Tumorzellen zytotoxisch (Qureshi et al., 1991). Dominant Negative für Onkogene, wie N-myc, können wirksam bei der Behandlung von Krebs sein.

[0060] Die Expression von Tumor-Supressorgenen, wie p53, dem Retinoblastom-(Rb-)Empfänglichkeitsgen ("retinoblastoma (Rb) susceptibility gene"), dem Wilms-Tumor-Gen kann durch Strahlung kontrolliert werden. Die Transfektion von p53-defizienten Tumorzellen mit einem p53-Expressionsvektor setzt das Zellwachstum außer Kraft (Johnson et al., 1991).

[0061] Das Tumorwachstum hängt von der Angiogenese ab, und die Angiogenese wird direkt oder indirekt von dem Tumor induziert. Die Induktion der Angiogenese ist ein wichtiger Schritt bei der Karzinogenese und der metastatischen Entwicklung. Die Angiogenese wird während des Übergangs von der Hyperplasie zur Neoplasie induziert. Da die Angiogenese für das Tumorwachstum notwendig ist, kann jede beliebige natürliche oder synthetische antiangiogenetische Verbindung ein antineoplastisches Potenzial besitzen. Die Hemmung der Tumorangiogenese durch die kontrollierte Expression eines Antiangiogenese-Gens könnte eine wichtige Rolle bei der Krebsbehandlung spielen. Inhibitoren der Kapillarendothelzell-Proliferation und/oder der -Angiogenese sind ein von Knorpel abgeleiteter Inhibitor und der Plättchenfaktor 4 (PF4) (Übersichtsartikel bei Neta et al., 1991; Zucker et al., 1991).

[0062] Das Gen aus Maus-Fibroblasten wird durch PDGF induziert. Das Produkt des Fibroblastengens, JE oder das Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 (MCP-1), ist ein Mitglied einer Familie von Zytokin-ähnlichen Glycoproteinen, deren Expression durch ein mitogenes Signal in Monozyten, Makrophagen und T-Zellen induziert wird. JE wurde sowohl aus Maus- als auch aus humanen Fibroblasten identifiziert, charakterisiert und rekombinant produziert (Rollins et al., 1989). Die Maus- und humanen Fibroblasten-Genprodukte werden mit mJE bzw. hJE bezeichnet.

[0063] MCP-1 oder JE ist in vitro ein für Monozyten spezifischer Chemoattraktor, der strukturell mit einer Familie von proinflammatorischen Zytokinen, wie inflammatorischen Makrophagen-Proteinen, verwandt ist.

[0064] Beispielhafte und bevorzugte Polypeptide sind der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interleukin-4, JE, PF4-Ricin, ein bakterielles Toxin wie das Pseudomonas-Toxin, p53, das Retinoblastom-Genprodukt oder das Wilms-Tumor-Genprodukt.

[0065] In einem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel besitzt ein von einer kodierenden Region kodiertes Polypeptid eine radioprotektive Aktivität gegenüber normalen Zellen (d. h. das Polypeptid schützt eine normale Zelle oder Gewebe vor einer schädlichen Wirkung von Strahlung). Beispielhafte und bevorzugte Polypep-

tide, die eine radioprotektive Aktivität besitzen, sind Interleukin-1; Tumor-Nekrose-Faktor; ein Gewebe-Wachstumsfaktor, wie ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, ein Hepatozyten-Wachstumsfaktor, ein Nieren-Wachstumsfaktor, ein endothelialer Wachstumsfaktor oder ein Wachstumsfaktor für glatte Gefäßmuskulatur, Interleukin-6, ein Fänger für freie Radikale oder ein Rezeptor für einen Gewebe-Wachstumsfaktor.

[0066] Vorzugsweise 1) ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor ein Kolonie-stimulierender Faktor, wie GM-CSF, G-CSF, M-CSF oder Interleukin-3; 2) ist ein endothelialer Wachstumsfaktor der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor; 3) ist ein Wachstumsfaktor für glatte Gefäßmuskulatur der Platelet-Dervied-Growth-Factor (PDGF); und 4) ist ein Fänger für freie Radikale die Mangansuperoxid-Dismutase (MnSOD).

[0067] Die radioprotektive Wirkung von verabreichtem IL-1 und IL-6 wurde gezeigt (Neta et al., 1991; Neta et al., 1992). Der zusätzliche Vorteil der Radioprotektion von hämatopoetischen Zellen wurde gezeigt, indem exogenes TNF vor der Bestrahlung zugegeben wurde, von dem gezeigt wurde, dass es das hämatopoetische System in Tieren schützt (Neta et al., 1991).

[0068] Studien von Neta et al. haben gezeigt, dass IL-1 mehrere hämatopoetische Wachstumsfaktoren (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3 und IL-6) induziert, die eindeutig zu dem beschleunigten Wachstum und der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen beitragen (Neta et al., 1991). Uckun et al. haben die radioprotektiven Wirkungen der Konditionierung mit rekombinantem Granulozyten-Koloniestimulierendem Faktor (rG-CSF) und rekombinantem Granulozyten-Makrophagen-CSF (rGM-CSF) vor der Ganzkörperbestrahlung (TBI) in einer großen Serie von letal bestrahlten Mäusen untersucht (Uckun et al., 1989). Die Verabreichung von rG-CSF oder rGM-CSF vor der TBI schützt einen signifikanten Teil der Mäuse vor den letalen Wirkungen von LD 100/30 TBI (Waddick et al., 1991). Bei äquivalenten Dosen zeigte rG-CSF eine stärkere radioprotektive Aktivität als rGM-CSF. Die Überlebensrate nach einer letalen TBI war auch bei Mäusen, die optimale radioprotektive Dosen von rG-CSF enthielten, signifikant höher als im Vergleich bei Mäusen, die optimale radioprotektive Dosen von rGM-CSF erhielten. Die Vorbehandlung mit rG-CSF, gefolgt von rGM-CSF war in supraletal bestrahlten Mäusen, aber nicht in letal bestrahlten Mäusen, geringfügig wirksamer als rG-CSF alleine. Neta et al. haben auch gezeigt, dass die Verabreichung von suboptimalen, nicht-radioprotektiven Dosen von IL-1 außerdem ein Synergiewirkung mit GM-CSF oder G-CSF erzeugen, um eine optimale Radioprotektion zu verleihen (Neta et al., 1988), was darauf hindeutet, dass eine derartige Wechselwirkung für die Radioprotektion von hämatopoetischen Vorläuferzellen notwendig sein könnte.

[0069] TNF könnte die Radioprotektion durch die Produktion der Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) induzieren, von der gezeigt wurde, dass sie mit der Strahlungsresistenz in der T-Zelllinie HUT-78 assoziiert ist (Wong et al., 1991). C-met ist der Rezeptor für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor und wird während der Nieren- und Leberregeneration aktiviert. Diese Gene können verwendet werden, um die Strahlungsschädigung dieser Organe zu verhindern.

[0070] Arteriovenöse Fehlbildungen (AVMs) im Gehirn wurden mit Radiochirurgie behandelt. Bei dieser Technologie wird eine Bestrahlung mit einer hohen Dosis auf die AVM gerichtet. Die Intima der AVMs verdickt sich durch endotheliale Proliferation, und die Mikrovaskulatur wird vernichtet (Steiner 1984). Es wurde gezeigt, dass die endotheliale Proliferation und die Proliferation der glatten Muskulatur mit der Produktion von bFGF und PDGF assoziiert sind. Die klinischen Ergebnisse können durch die Zugabe von bFGF und PDGF verbessert werden.

[0071] In einem noch weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel besitzt das von der kodierenden Region kodierte Polypeptid eine antikoagulatorische, thrombolytische oder thrombotische Aktivität, wie sie durch den Plasminogenaktivator, eine Streptokinase oder einen Plasminogenaktivator-Inhibitor veranschaulicht wird.

[0072] Der Nutzen der Koronararterien-Reperfusion, die aus der pharmakologisch induzierten Fibrinolyse in Patienten mit entstehendem Myokardinfarkt folgt, wurde streng ausgewertet (Übersichtsartikel in Tiefenbrunn 1992; Becker et al., 1991). In kontrollierten Studien wurde auf konsistente Weise eine verbesserte Funktion des linken Ventrikels und sogar noch beeindruckendere Verbesserungen bei den Überlebensraten gezeigt. Die Verbesserung steht in Zusammenhang mit der Wiederherstellung des myokardiellen Blutflusses. Eine maximale Verbesserung wird mit einer frühzeitigen und anhaltenden Wiederherstellung der Öffnung der Koronararterien erreicht. Die Patienten müssen vor dem Beginn der Behandlung sorgfältig untersucht werden, speziell auf mögliche Blutungsrisiken, und eine geeignete fortgesetzte Beurteilung und begleitende Therapie müssen geplant werden. Jedoch sollte die Thrombolyse aufgrund der überwältigenden Datenfülle, die nun bezüglich ihrer Vorteile und relativen Sicherheit verfügbar ist, als eine herkömmliche Therapie für Patienten mit akutem entstehendem Myokardinfarkt angesehen werden.

[0073] Tierstudien des Gehirnschlags waren in Bezug auf die arterielle Rekanalisation und Sicherheit ermutigend (Übersichtsartikel in Brott 1991; Levine et al, 1992). Eine arterielle Rekanalisation wurde bei Patienten mit ischemischem Gehirnschlag nach der Verabreichung eines beliebigen von mehreren thrombolytischen Arzneimitteln gezeigt.

[0074] Versuche mit einer Placebo-Kontrolle wurden nicht zu Ende geführt, und deshalb wurde der klinische Vorteil nicht etabliert. Auch wenn die Entwicklung einer Hirnblutung eine seltene Komplikation war, waren die hohe Morbidität und Mortalität besorgniserregend. Ironischerweise verspricht die thrombolytische Therapie auch die Behandlung der subarachnoidalen Blutung und möglicherweise auch der spontanen intrazerebralen Blutung. Humane Studien waren begrenzt, aber die Komplikationen waren gering, und die klinischen Ergebnisse waren ermutigend.

[0075] In einem noch weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel besitzt ein von einer kodierenden Region kodiertes Polypeptid die Fähigkeit, die Umwandlung eines Pro-Wirkstoffs in einen Mittel zu katalysieren oder eine Zelle gegenüber einem therapeutischen Wirkstoff zu sensitivieren. Zum Beispiel werden Zellen, die manipuliert wurden, um ein Gen des Herpes simplex Virus (HSV) für die Thymidin-Kinase (tk) zu enthalten und HSV-tk zu exprimieren, sensitiv gegenüber der Wirkung des antiviralen Wirkstoffs Ganciclovir (GCV) (Culver et al., 1992). Als weiteres Beispiel können Zellen, die manipuliert wurden, um ein Gen für die bakterielle Cytosin-Deaminase zu enthalten, und dieses Enzym zu exprimieren, die Umwandlung von inaktivem, nicht-toxischem 5'-Fluorocytosin in das aktive Zytotoxin 5-Fluorouracil katalysieren (Culver et al., 1992).

[0076] Somit ist ein bevorzugtes Polypeptid, das die Fähigkeit besitzt, die Umwandlung eines Pro-Wirkstoffs in einen Wirkstoff zu katalysieren oder eine Zelle gegenüber einem therapeutischen Wirkstoff zu sensibilisieren, die Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase oder eine Cytosin-Deaminase.

[0077] Ein weiteres, von einer kodierenden Region kodiertes bevorzugtes Polypeptid ist ein Oberflächen-Antigen, das ein Genprodukt eines Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) ist. Wie in der Technik wohl bekannt ist, stellt MHC einen Satz von gekoppelten genetischen Loci dar, die an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind. MHC-Genprodukte kommen auf Zelloberflächen vor, wo sie als antigene Marker für die Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst dienen. Typischerweise werden MHC-Genprodukte abhängig von ihrer Funktion als zu der Klasse I oder der Klasse II zugehörig klassifiziert. MHCs von verschiedenen Tieren wurden verschiedene und entsprechende Bezeichnungen verliehen. Zum Beispiel werden humane MHC-Genprodukte durch die Vorsilbe HL gekennzeichnet; MHC-Genprodukte aus Maus werden durch die Vorsilbe H-2 gekennzeichnet; MHC-Genprodukte aus Ratte werden durch die Vorsilbe RT1 gekennzeichnet, und MHC-Genprodukte aus Schimpanse werden durch die Vorsilbe ChLA gekennzeichnet.

[0078] Beispielhafte und bevorzugte humane MHC-Genprodukte sind die Klasse-I-Antigene HLA-A, HLA-B und HLA-D und die Klasse-II-Antigene HLA-Dr und HLA-Dc.

b. Mehr als ein Polypeptid

[0079] Gemäß einem weiteren Aspekt kodiert eine kodierende Region eines DNA-Moleküls der vorliegenden Erfindung das gesamte oder einen Teil von mehr als einem Polypeptid. Vorzugsweise sind diese Polypeptide Transkriptionsfaktoren.

[0080] Ein Transkriptionsfaktor ist ein regulatorisches Protein, das an eine spezifische DNA-Sequenz (z. B. Promotoren und Enhancer) bindet und die Transkription einer kodierenden DNA-Region reguliert. Typischerweise umfasst ein Transkriptionsfaktor eine Bindungsdomäne, die an DNA bindet (eine DNA-Bindungsdomäne), und eine regulatorische Domäne, die die Transkription kontrolliert. Falls eine regulatorische Domäne die Transkription aktiviert, wird diese regulatorische Domäne als eine Aktivierungsdomäne bezeichnet. Falls die regulatorische Domäne die Transkription hemmt, wird diese regulatorische Domäne als eine Repressionsdomäne bezeichnet.

[0081] In Übereinstimmung mit solch einem Ausführungsbeispiel umfasst eine kodierende Region:

(a) eine erste kodierende Sequenz, die eine DNA-Bindungsdomäne eines ersten Transkriptionsfaktors kodiert;

(b) eine zweite kodierende Sequenz, die eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne eines zweiten Transkriptionsfaktors kodiert;

(c) eine dritte kodierende Sequenz, die ein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert, wobei die ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen funktionell in einem Leserahmen in einer beliebigen Anordnung mitein-

ander verbunden sind, mit der Maßgabe, dass die dritte kodierende Sequenz nur vorhanden sein muss, falls die erste oder zweite kodierende Sequenz kein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert; und
(d) eine Transkriptions-terminierende Region, die funktionell mit einer beliebigen der ersten, zweiten oder dritten kodierenden Sequenzen verbunden ist, so dass die Transkriptions-terminierende Region 3' zu allen der ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen angeordnet ist.

[0082] Wie hierin verwendet, bedeutet der Ausdruck „funktionell in einem Leserahmen verbunden", dass kodierende Sequenzen so miteinander verbunden sind, dass ein offener Leserahmen zwischen diesen Sequenzen aufrechterhalten wird. Mittel zum Verbinden von kodierenden DNA-Sequenzen in einem Leserahmen sind in der Technik wohl bekannt.

[0083] DNA-Bindungsdomänen von Transkriptionsfaktoren sind in der Technik wohl bekannt. Beispielhafte Transkriptionsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie eine DNA-Bindungsdomäne enthalten, sind die GAL4-, c-fos-, c-Jun-, lac1-, trpR-, CAP-, TFIID-, CTF-, Spl-, HSTF- und NF-κB-Proteine. Vorzugsweise ist eine DNA-Bindungsdomäne von dem GAL4-Protein abgeleitet.

[0084] Das GAL4-Protein ist ein Transkriptionsfaktor der Hefe, der 881 Aminosäurereste umfasst. Das Hefeprotein GAL4 aktiviert die Transkription von Genen, die für den Katabolismus von Galactose und Melibiose erforderlich sind. GAL4 umfasst zahlreiche diskrete Domänen, einschließlich einer DNA-Bindungsdomäne (Marmorstein et al., 1992).

[0085] Die von GAL4 erkannten DNA-Sequenzen umfassen 17 Basenpaare (bp) in der Länge, und jede Stelle bindet ein Dimer des Proteins. Vier solche Stellen, die bezüglich ihrer Sequenz ähnlich, aber nicht identisch sind, werden in der stromaufwärts gelegenen Aktivierungssequenz („upstream activating sequence") (UAS_G) gefunden, die die Aktivierung z. B. der GAL1- und GAL10-Gene durch GAL4 vermittelt (Marmorstein et al., 1992).

[0086] Verschiedenen Teilen des 881-Aminosäuren-GAL4-Proteins wurden Funktionen zugeordnet, einschließlich DNA-Bindung (Reste 1–65) und Dimerisierung (Reste 65–94). Außerdem wurden drei saure Aktivierungsregionen identifiziert (Reste 94–106; 148–196; 768–881), sowie eine Region nahe des Carboxyterminus, die das inhibitorische Protein GAL80 bindet (Marmorstein et al., 1992).

[0087] Die DNA-Bindungsregion von GAL4 besitzt sechs Cysteinreste, die in einem Satz homologer Proteine konserviert sind, die zwei Zn^{2+}-Ionen in einem Bimetall-Thiolat-Kluster koordinieren. Die Reste 10–40, die die metallbindende Domäne bilden, sind eine kompakte globuläre Einheit. Die Reste 1–9 und die Reste C-terminal von 41 sind ungeordnet (Marmorstein et al., 1992).

[0088] Das Proteinfragment bindet an seine DNA-Stelle als ein symmetrisches Dimer. Jede Untereinheit faltet sich in drei distinkte Module: eine kompakte, metallbindende Domäne (Reste 8–40), einen gestreckten Linker (Reste 41–49) und ein α-helikales Dimerisierungselement (Reste 50–64). Die metallbindende Domäne bildet Kontakte zu drei DNA-Basenpaaren in der großen Furche aus und wird deshalb als ein Erkennungsmodul bezeichnet (Marmorstein et al., 1992).

[0089] Das Erkennungsmodul wird von zwei Metallionen zusammengehalten, die von sechs Cysteinen tetraedrisch koordiniert sind. Das Erkennungsmodul von GAL4 definiert eine Klasse innerhalb der Gruppe von DNA-Bindungsdomänen, die Zn^{2+} als ein Strukturelement besitzen.

[0090] Die Reste 50–64 bilden eine amphipathische α-Helix. Das vollständige GAL4-Molekül enthält zusätzliche Reste zwischen 65 und 100, die zu den Dimer-Wechselwirkungen beitragen und das Protein als ein Dimer aufrechterhalten, auch wenn es nicht an DNA gebunden ist. Die Aminosäuresequenz von GAL4 ist in Übereinstimmung mit einem Coiled-Coil, das sich möglicherweise um eine Heptad-Wiederholung jenseits des C-Terminus von GAL4 (1–65) erstreckt. Außerdem schließen die Reste 79–99 drei potenzielle α-helikale Heptad-Sequenzen ein. Das dazwischen liegende Segment (Reste 72–78) enthält ein Prolin. Das vollständige Dimerisierungselement von GAL4 könnte deshalb einige Strukturmerkmale mit den „Helix-Loop-Helix"-Transkriptionsfaktoren gemeinsam haben.

[0091] Von wenigstens elf anderen DNA-Bindungsproteinen aus Pilzen ist bekannt, dass sie wiederholte CX_2CX_6C-Sequenzen aufweisen, wie diejenigen, die in dem GAL4-Erkennungsmodul gefunden werden: LAC9, PPR1, QA-1F, QUTA1, ARGRII, HAP1, MAL63, LEU3, PUT3 und AMDR. In den meisten von ihnen ist die „Schlaufe" zwischen den dritten und vierten Cysteinen sechs Reste lang, aber sie ist in MAL63, PDR1,

PUT3 und AMDR um einen Rest kürzer, und in LEU3 um mehrere Reste länger. Die Reste 15–20 von GAL4, die sich in dem Komplex in der nächsten Nachbarschaft zu der DNA befinden, sind bei diesen Homologen hochgradig konserviert. Arg 15 und Lys 20, die Phosphat-Salzbindungen bilden, die die erste Helix des Erkennungsmoduls an der DNA verankern, sind in allen außer AMDR konserviert, das an diesen Positionen His bzw. Arg besitzt. Der Rest 19 ist normalerweise hydrophob, und der Rest 17 ist basisch, außer in QA-1F und LEU3. Lys 18, das basenspezifische Kontakte in dem GAL4-Komplex ausbildet, ist in allen außer drei Fällen konserviert. In zwei der Ausnahmen (QA-1F und MAL63) ist es Arg; in dem anderen (PUT3) ist es His. Diese Konservierungen deuten darauf hin, dass die Erkennungsmodule dieser GAL4-Homologe sich der DNA alle auf ähnliche Weise annähern (Marmorstein et al., 1992).

[0092] Es gibt symmetrisch angeordnete CCG-Sequenzen an bekannten Stellen für LAC9, PPR1, LEU3 und PUT3. Charakteristische Heptad-Sequenzen deuten darauf hin, dass mehrere der Homologe (LAC9, QA-1F, QUTA1, PPR1) Coiled-Coil-Dimerisierungselemente enthalten, die ähnlich zu dem in GAL4 sind. In anderen, wie ARGRII, HAP1 und LEU3, gibt es keine offensichtlichen Heptad-Sequenzen in den 60 Resten, die sich unmittelbar C-terminal zu den Erkennungsmodulen befinden. In LEU3 liegen die Heptaden um einen Rest näher an dem Erkennungsmodul als in GAL4; in HAP1 scheinen sie um sieben Reste in Richtung zu dem C-Terminus verschoben zu sein. Diese Beobachtungen deuten auf eine gewisse Heterogenität von Dimerisierungsstrukturen und Längen von Linkern hin (Marmorstein et al., 1992).

[0093] Die nächsten Verwandten von GAL4 sind LAC9, das die gleiche Funktion in K. lactics erfüllt, und PPR1; das die Pyrimidin-Biosynthese in S. cerevisiae reguliert. GAL4 und LAC9 binden an die gleichen DNA-Stellen; PPR1 erkennt Stellen mit dem CCG-Triplet, die durch sechs anstatt durch 11 Basenpaare getrennt sind. GAL4 und LAC9 besitzen ähnliche Aminosäuresequenzen in ihren Linker- und Dimerisierungssegmenten; die Linker- und Dimerisierungselemente von PPR1 weisen keine Sequenzähnlichkeit zu denjenigen von GAL4 auf, mit Ausnahme der groben Charakteristika ihrer Heptad-Regionen (Marmorstein et al., 1992).

[0094] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel kodiert deshalb eine erste kodierende Sequenz eines DNA-Moleküls der vorliegenden Erfindung eine DNA-Bindungsdomäne von GAL4. Vorzugsweise umfasst diese Bindungsdomäne die Aminosäurerest-Sequenzen 1 bis in etwa 147 von GAL4, wobei sich die Zahlenbezeichnungen auf Aminosäurerest-Sequenzen beziehen, die beginnend an dem Aminoterminus fortlaufend nummeriert sind. Somit umfasst eine erste kodierende Sequenz in etwa 444 Nukleotid-Basenpaare des GAL4-Gens, welche Basenpaare die Aminosäurerest-Sequenzen 1–147 von GAL4 kodieren.

[0095] In einem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel kodiert eine erste kodierende Sequenz eines DNA-Moleküls der vorliegenden Erfindung eine DNA-Bindungsdomäne von GAL4, die die Aminosäurerest-Sequenzen 1 bis in etwa 65 von GAL4 umfasst, wobei die Zahlenbezeichnungen sich auf Aminosäurerest-Sequenzen beziehen, die beginnend an dem Aminoterminus fortlaufend nummeriert sind. Somit umfasst eine erste kodierende Sequenz in etwa 198 Nukleotid-Basenpaare des GAL4-Gens, wobei die Basenpaare die Aminosäurereste 1–65 von GAL4 kodieren.

[0096] Transkriptionsfaktoren, die Aktivierungs- oder Repressionsdomänen besitzen, sind in der Technik wohl bekannt. Beispielhafte Transkriptionsfaktoren, die Aktivierungsdomänen besitzen, sind GAL4, c-Jun, das virale Protein VP-16 und der Zellkernfaktor NF-κB.

[0097] Wie oben angegeben, aktiviert GAL4, ein Protein von 881 Aminosäureresten, die Transkription von Faktoren, die an dem Kohlenhydratstoffwechsel der Hefe beteiligt sind. Es gibt wahrscheinlich zwei oder drei saure Aktivierungsdomänen in dem GAL4-Protein.

[0098] Diese Aktivierungsdomänen umfassen (1) die Aminosäurereste 94 bis 106, (2) die Aminosäurereste 148 bis 196 und (3) die Aminosäurereste 768 bis 881, wobei die Aminosäurereste beginnend an dem Aminoterminus fortlaufend nummeriert sind (Marmorstein et al., 1992).

[0099] In einem Ausführungsbeispiel kodiert eine zweite kodierende Sequenz eine Aktivierungsdomäne von GAL4. Solch eine kodierende Sequenz umfasst Nukleotidbasen-Sequenzen von in etwa 69, 147 bzw. 342 Basenpaaren, die die oben angegebenen Aktivierungsdomänen kodieren.

[0100] C-Jun ist eine Hauptform des 40- bis 44-kD-Transkriptionsfaktors AP-1. In dem Jun-Protein existieren mehrere regulatorische und DNA-bindende Domänen. In der Nähe der DNA-Bindungsdomäne befindet sich eine als A_2 bezeichnete Region, die für die Aktivierung der Transkription erforderlich ist (Lewin 1991). A_1, eine zusätzliche Transkriptions-Aktivierungsdomäne, befindet sich in der Nähe des N-Terminus, benachbart zu ei-

ner Delta (Δ) genannten Region, für die vorgeschlagen wird, dass sie ein zelluläres Protein bindet, das die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von Jun hemmt (Baichwal 1990 und Baichwal 1991). Die transkriptionelle Aktivität von Jun kann durch eine oder beide Aktivierungsdomänen A_1 und A_2 verliehen werden.

[0101] Die verstärkte Bindung von Jun an AP-1-Sequenzen nach einer Bestrahlung deutet darauf hin, dass das Jun-Protein nach einer Bestrahlung modifiziert wird. Zusammengenommen mit den jüngsten Ergebnissen, dass die Proteinkinase C (PKC) nach einer Bestrahlung von Zellen aktiviert wird und dass die Depletierung von PKC die Induktion von c-Jun durch Bestrahlung unterdrückt (Hallahan 1992), ist es wahrscheinlich, dass die Bestrahlung Jun durch die MAP-K-Modifizierung der A_1-Domäne aktiviert (Binetruy 1991 und Pulverer 1991).

[0102] Die Fähigkeit einer Jun-Aktivierungsdomäne, die Transkription zu stimulieren, wurde in Studien an Zellen gezeigt, die mit DNA-Molekülen, die solche Domänen umfassen, transformiert oder transfiziert waren. HeLa- und RIT-3-Zellen wurden mit zwei Plasmiden transfiziert. Das Plasmid pSG-Jun5-253 enthielt den SV40-Promotor (auf Strahlung nicht transkriptionell ansprechend) stromaufwärts einer kodierenden Region, die ein chimäres Protein (GAL4-Jun) kodierte, das eine Sequenz für Δ, A_1 und A_2 (Baichwal 1990) und die DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Gens aus Hefe (die DNA-Bindungsdomäne von Jun wurde durch die DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Gens ersetzt, Baichwal 1990) umfasste. Ein zweites Plasmid, G5BCAT wurde so konstruiert, dass es die DNA-Sequenz, die das Gal4-Protein bindet, in einer Anordnung 5' der E1b-TATA-Box und stromaufwärts des CAT-Reportergens enthielt (Baichwal 1990).

[0103] Die transkriptionelle Aktivierung der Aktivierungsdomäne von Jun durch Bestrahlung von transfizierten Zellen stimulierte die Transkription und Expression des chimären Gal-Jun-Proteins, welches Protein an die GAL4-Bindungssequenz band und die Transkription und Expression von CAT initiierte. Die Bestrahlung von RIT-3-Zellen, die mit G5BCAT alleine transfiziert waren, zeigte keine Zunahme der CAT-Aktivität. Ähnliche Ergebnisse wurden in HeLa-Zellen erhalten, die den Jun-Inhibitor enthalten.

[0104] Jedoch zeigten Hep-G2-Zellen (die den Jun-Inhibitor nicht enthalten; Baichwal 1990), die mit pSG-Jun5-235 und G5BCAT transfiziert waren, keine durch Röntgenstrahlung induzierte Aktivierung des chimären GAL4-Jun-Proteins. Diese Daten deuten darauf hin, dass das chimäre GAL-Jun-Protein nach der Bestrahlung aktiviert wird, was zur DNA-Bindung führt, um die Transkription von CAT zu beschleunigen.

[0105] Weil die durch Röntgenstrahlung induzierte Expression des c-Jun-Gens abgeschwächt wird, wenn PKC depletiert oder gehemmt wird, wurde der PKC-Inhibitor H7 zu RIT-3-Zellen zugegeben, die mit pSG-Jun5-235 und G5BCAT transfiziert waren. Die Behandlung mit H7 setzte die durch Röntgenstrahlung induzierte Zunahme der CAT-Aktivität außer Kraft, was darauf hindeutete, dass die durch Bestrahlung induzierte PKC-Aktivierung für die Genexpression erforderlich ist (Hallahan 1991a; Hallahan 1991b). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Dissoziierung von dem Jun-Inhibitor ein Mechanismus der Regulation der durch Strahlung vermittelten Transkription sein könnte.

[0106] Gemäß einem noch weiteren Aspekt umfasst ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung eine Bindungsregion, die fähig ist, eine DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors zu binden, welche Bindungsregion funktionell mit einem Minimalpromotor verbunden ist, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist.

[0107] Vorzugsweise ist eine Bindungsregion fähig, die DNA-Bindungsdomäne des oben angegebenen ersten Transkriptionsfaktors zu binden. Falls zum Beispiel die Bindungsdomäne eine Gal4-Bindungsdomäne ist, bindet eine Bindungsregion eines DNA-Moleküls diese Gal4-Bindungsdomäne. Eine Bindungsregion ist funktionell mit einem Minimalpromotor (z. B. einer TATA-Box) verbunden, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert. Ein beispielhaftes bevorzugtes DNA-Molekül, das eine Bindungsregion, einen Minimalpromotor und eine kodierende Region umfasst, ist das Plasmid pG5BCAT. Das Plasmid pG5BCAT umfasst eine Bindungsregion, die die DNA-Bindungsdomäne von Gal4 (Aminosäurereste 1–147) bindet, die funktionell mit einer E1b-TATA-Box verbunden ist, die funktionell mit dem CAT-Gen verbunden ist (siehe Beispiel vv, hierin unten).

[0108] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist eine Aktivierungsdomäne eine Aktivierungsdomäne des viralen Proteins VP-16 oder des Zellkernfaktors NK-fB.

[0109] Das virale Protein VP-16 ist ein 65-kD-Polypeptid von in etwa 490 Aminosäureresten, das während der Immediate-Early-Phase einer Infektion mit dem Herpes simplex Virus exprimiert wird, und aktiviert die Trans-

kription und nachfolgende Expression von Proteinen einer infizierten Zelle („infected cell proteins") (ICP), wie ICP4 (Trienzenberg et al., 1988).

[0110] Die Aktivierungsdomäne von VP-16 umfasst eine Aminosäurerest-Sequenz von in etwa 78 an dem Carboxyterminus von VP16 angeordneten Aminosäureresten (Aminosäurereste 413 bis 490 in der Nummerierung von dem Aminoterminus aus). Die Aktivierungsdomäne von VP16 besitzt außerdem wahrscheinlich ihr Zentrum in einer 61-Aminosäurerest-Sequenz, die von in etwa Rest 429 bis in etwa Rest 456 angeordnet ist (Trienzenberg et al., 1988).

[0111] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel kodiert somit eine zweite kodierende Sequenz Aminosäurerest-Sequenzen von in etwa dem Rest Nummer 413 bis in etwa dem Rest Nummer 490 von VP16 und mehr bevorzugt von in etwa dem Rest Nummer 429 bis in etwa dem Rest Nummer 456 von VP16.

[0112] Der Zellkernfaktor NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor. Die Aktivierungsdomäne von NF-κB umfasst Aminosäurerest-Sequenzen von in etwa der Restposition 414 bis in etwa der Restposition 515, in der Nummerierung von dem Aminoterminus aus. Somit umfasst eine zweite kodierende Sequenz vorzugsweise Nukleotid-Basenpaare, die Aminosäurereste von in etwa der Restposition 414 bis in etwa der Restposition 515 von NF-κB kodieren (Ballard 1992).

c. Zellkern-Lokalisierungssignal

[0113] Wenigstens eine der kodierenden Sequenzen enthält ein Zellkern-Lokalisierungssignal. Solche ein Signal erlaubt es dem kodierten Transkriptionsfaktor, in den Zellkern einzudringen und mit der DNA in dem Zellkern zu interagieren. Vorzugsweise ist solch ein Zellkern-Lokalisierungssignal in der ersten oder zweiten kodierenden Sequenz enthalten. Falls kein Zellkern-Lokalisierungssignal in einer ersten oder zweiten kodierenden Sequenz enthalten ist, ist solch ein Signal in einer dritten kodierenden Sequenz enthalten.

[0114] Zellkern-Lokalisierungssignale sind in der Technik wohl bekannt. Ein beispielhaftes und bevorzugtes solches Signal ist von dem Simian-Virus-40-(SV40-)Large-T-Antigen abgeleitet. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel umfasst ein SV40-Zellkern-Lokalisierungssignal eine Aminosäurerest-Sequenz von in etwa 7 bis in etwa 15 Aminosäureresten rund um einen Lysin-(Lys-)Rest an der Position 128 des SV40-Large-T-Antigens (Kalderon et al., 1984). In einem mehr bevorzugten Ausführungsbeispiel umfasst ein Zellkern-Lokalisierungssignal die Aminosäurerest-Sequenz von SV40, die sich von in etwa der Restposition 128 bis in etwa der Restposition 132 erstreckt.

d. Transkriptions-terminierende Region

[0115] Die RNA-Polymerase transkribiert eine kodierende DNA-Sequenz durch eine Stelle hindurch, an der die Polyadenylierung erfolgt. Typischerweise dienen DNA-Sequenzen, die einige hundert Basenpaare stromabwärts der Polyadenylierungsstelle angeordnet sind, dazu, die Transkription zu beenden. Diese DNA-Sequenzen werden hierin als Transkriptions-terminierende Regionen bezeichnet. Diese Regionen sind für die effiziente Polyadenylierung der transkribierten Messenger-RNA (mRNA) erforderlich.

[0116] Transkriptions-terminierende Regionen sind in der Technik wohl bekannt. Eine in einem bevorzugten DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung verwendete Transkriptionsterminierende Region umfasst die Nukleotide 1533 bis in etwa 2157 des humanen Wachstumshormons (Seeburg 1982).

3. Herstellung eines DNA-Moleküls

[0117] Ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung wird gemäß Standardtechniken hergestellt, die dem Fachmann in der Technik wohl bekannt sind. Zunächst werden DNA-Fragmente, die verschiedene Regionen eines gewünschten DNA-Moleküls enthalten, hergestellt oder isoliert. Diese Regionen werden dann ligiert, um ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül herzustellen. Mittel für das Synthetisieren, Isolieren und Ligieren von DNA-Fragmenten sind in der Technik wohl bekannt.

[0118] DNA-Sequenzen von bis zu in etwa 200 Basenpaaren können unter Verwendung von wohl bekannten Festphase-Synthesetechniken hergestellt werden. Somit können z. B., falls ein auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors ist, eine oder mehrere dieser Domänen synthetisch hergestellt werden.

[0119] Falls eine gewünschte DNA-Sequenz in etwa 200 oder mehr Nukleotide umfasst, wird diese DNA-Sequenz typischerweise aus Geweben, Zellen oder kommerziell erhältlichen Konstrukten (z. B. Vektoren oder Plasmiden) erhalten, von denen bekannt ist, dass sie die gewünschte Sequenz enthalten.

[0120] Zum Beispiel wurde ein cDNA-Klon von Egr-1 aus Maus-Leber isoliert und sequenziert (Tsai-Morris 1988). Eine cDNA von c-Jun wurde aus Ratte isoliert und sequenziert (Hatori 1988 und Unlap 1992). Quellen, von denen bekannt ist, dass sie kodierende DNA-Regionen enthalten, die spezifische Polypeptide kodieren, sind in der Technik wohl bekannt. Die Tabelle 1 unten fasst Quellen zusammen, von denen bekannt ist, dass sie kodierende DNA-Sequenzen für beispielhafte Polypeptide enthalten.

Tabelle 1

Polypeptid	Quelle der kodierenden DNA
TNF	CETUS
Ricin	CETUS
p53	Dr. Vogelstein, John Hopkins University
MnSOD	Genentech
Pseudomonas-Exotoxin	Dr. Steve Lory, Univ. of Washington

[0121] Falls ein DNA-Fragment aus einer Zelle oder einem anderen Organismus erhalten wird, wird die Gesamt-DNA aus diesem Organismus oder dieser Zelle extrahiert und unter Verwendung von Restriktionsenzymen fragmentiert. Die Auswahl, welches/e Restriktionsenzym oder -enzyme verwendet werden sollen, hängt von der gewünschten DNA-Sequenz ab, die erhalten werden soll. Bestimmte DNA-Sequenzen von Interesse werden dann isoliert, identifiziert und gereinigt, wobei in der Technik wohl bekannte Standardtechniken verwendet werden. Falls erforderlich, kann eine kodierende DNA-Sequenz vor der Isolierung amplifiziert werden. Ein bevorzugtes Mittel zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz von Interesse ist die Polymerase-Kettenreaktion.

[0122] Eine große Vielfalt und Anzahl von DNA-Molekülen, die einen auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor und eine kodierende Region umfassen, wurden hergestellt (siehe Beispiele 1–6, hierin unten). Die Tabelle 2, unten, fasst die Zusammensetzung von beispielhaften derartigen DNA-Molekülen zusammen.

Tabelle 2

Bezeichnung des Plasmids	Enhancer-Promotor	Kodierende Region
pE425-TNF	CArG-Domäne von *Egr-1*	TNF
pE425-CAT	CArG-Domäne von *Egr-1*	CAT
pE425-p53	CArG-Domäne von *Egr-1*	p53
pE425-raf 301-1	CArG-Domäne von *Egr-1*	raf 301-1
pE425-MnSOD	CArG-Domäne von *Egr-1*	MnSOD
pE425Gal4/VP16	CArG-Domäne von *Egr-1*	Gal4/VP16
c-*Jun*-CAT	c-*Jun*-Promotor	CAT
AP-1CAT	AP-1	CAT

a. pE425-TNF

[0123] Das Plasmid pE425-TNF umfasst die Nukleotidbasen von der Nukleotidposition –425 bis zu der Nukleotidposition +65 (relativ zu der Transkriptionsstartstelle) des Egr-1-Gens, die funktionell mit einer kodierenden Region verbunden sind, die TNF-α kodiert. pE425-TNF wurde aus dem Plasmid pE-TNF, das die TNF-cDNA enthält, und dem Plasmid pE425-CAT, das das Egr-1-Segment enthält, einer Transkriptions-terminierenden Region und einem Polyadenylierungssegment von CAT hergestellt.

[0124] pE-TNF wurde mit dem Restriktionsenzym Pst I gespalten, um ein 1,1-Kilobasen-(-kb-)Fragment zu erhalten, das die TNF-cDNA enthält. pE425-CAT wurde mit dem Restriktionsenzym Hind III gespalten, um ein 3,3-kb-Fragment, das das CAT-Gen enthält, und ein 3,2-kb-Segment, das das Egr-1-Fragment und das Polyadenylierungssignal von CAT enthält, zu erhalten. Das 1,1-kb-Fragment von pE-TNF und das 3,2-kb-Fragment von pE425-CAT wurden an dem 3'-Überhang mit der T4-DNA-Polymerase und an dem 5'-Überhang mittels Klenow mit stumpfen Enden versehen, wobei in der Technik wohl bekannte Standardverfahren verwendet wurden.

[0125] Das resultierende pE425 und die resultierende TNF-cDNA wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase und der T4-RNA-Ligase mit stumpfen Enden ligiert, wobei in der Technik wohl bekannte Standardverfahren verwendet wurden, um pE425-TNF herzustellen. Die Spaltung von pE425-TNF mit BamHI und Hind II ergab 1,4-kb- und 4,5-kb-Segmente des Sinnkonstrukts und ein 0,9-kb-Segment des Antisense-Konstrukts, was die Sinn-Ausrichtung des Plasmids anzeigte.

[0126] Das Plasmid pE425-CAT wurde aus einem in etwa 491-Basenpaar-Fragment des Egr-1-Promotors hergestellt, wobei das Fragment von der Nukleotidbase –425 bis zu der Nukleotidbase +65 relativ zu der Transkriptionsstartstelle und dem Plasmid pCATm (Gius et al. 1990) angeordnet ist.

[0127] Ein 491-Basenpaar-Fragment von Egr-1 wurde aus dem Plasmid p2.4 erhalten, das ein 2,4-kb-Fragment der 5'-flankierenden Sequenz des Egr-1-Gens enthielt (Tsai-Morris 1988). Kurz gesagt, wurde Balb/c-3T3-Leber-DNA verwendet, um eine ΔFix-genomische Bibliothek unter Verwendung eines wohl bekannten, teilweisen Auffüll-("partial fillin")Klonierungsverfahrens herzustellen. Etwa 100.000 nicht-amplifizierte Klone in dem E.coli-Stamm JC7623 (rec B, rec C, sbc B; Winas et al., 1985) wurden mit einem ^{32}P-markierten Egr-1-Plasmid OC 3.1 (Sukhatme et al., 1988) gescreent, das ein 3,1-kb-cDNA-Insert mit voller Länge enthielt. Die Membranen (GeneScreenPlus, New England Nuclear) wurden für in etwa 16 Stunden bei in etwa 65 °C in 1 Prozent SDS, 10 Prozent Dextransulfat und 1 M NaCl hybridisiert. Die Filter wurden bis zu einer Endstringenz von 65 °C in 0,2 × SSC gewaschen. Autoradiogramme wurden durch Exponieren der Filter für in etwa 18 Stunden bei –70 °C mit einem Verstärkerschirm hergestellt. Ein einzelner Klon, genannt mgEgr-1.1, wurde erhalten, welcher mit dem äußeren 5'-120-bp-EcoRI-ApaI-Fragment des Plasmids OC 3.1 hybridisierte.

[0128] Ein 2,4-kb-PvuII-PvuII-Fragment und ein 6,6-kb-XbaI-XbaI-Fragment, die von mgEgr-1.1 abgeleitet waren, wurden in die SmaI- und XbaI-Stellen von pUC13 bzw. pUC18 (Promega Corp. Madison, WI) subkloniert, um die Plasmide p2.4 bzw. p6.6 zu erhalten.

[0129] Ein Fragment mit in etwa 1206 Basenpaaren (Nukleotidbasenposition –957 bis Nukleotidbasenposition +248 relativ zu der Transkriptionsstartstelle) wurde aus dem Plasmid p2.4 erhalten, um das Plasmid pEgr-1 P1.2 herzustellen. Eine Deletionsmutante wurde aus pEgr-1 P1.2 unter Verwendung von Oligomeren und der Polymerase-Kettenreaktion konstruiert, um das 491-Basenpaar-*Fragment herzustellen, das sich von der Nukleotidbasenposition –425 bis zu der Nukleotidbasenposition +65 erstreckt.

[0130] Das Plasmid pCAT3m wurde von Dr. Laimonis A. Laimins, Howard Hughes Medical Institute Research Laboratories, University of Chicago, Chicago, IL erhalten. Das Plasmid pE-TNF wurde in Übereinstimmung mit dem Verfahren von Wong (Wong 1985) hergestellt.

b. pE425-p53

[0131] Das Plasmid pE425-p53 umfasst ein Fragment von in etwa 491 Basenpaaren des Egr-1-Promotors, das funktionell mit einer kodierenden Region für den Tumor-supprimierenden Faktor p53 verbunden ist. pE425-p53 wurde aus einem Plasmid (pC53SN3; Diller 1990), das die p53-cDNA enthält, und dem Plasmid pE425-CAT hergestellt, das das Egr-1-Segment und eine Transkriptions-terminierende Region, das Polyadenylierungssegment von CAT enthält. Das Plasmid pE425-CAT wurde wie oben beschrieben hergestellt.

c. pE425-raf 301-1

[0132] Das Plasmid pE425-raf 301-1 umfasst ein Fragment von in etwa 491 Basenpaaren des Egr-1-Promotors, das funktionell mit einer kodierenden Region für ein Serin/Threonin-spezifisches Proteinkinaseprodukt eines Onkogens aus einer 3611-Maus-Sarcomzelle verbunden ist. pE425-raf 301-1 wurde aus dem Plasmid pMN301-1, das das dominant negative raf enthält (Kolch 1991) und pE425-CAT konstruiert, das das Egr-1-Segment und eine Transkriptions-terminierende Region, das Polyadenylierungssegment von CAT enthält.

d. pE425-MnSOD

[0133] Das Plasmid pE425-MnSOD umfasst ein Fragment von in etwa 491 Basenpaaren des Egr-1-Promotors, das funktionell mit einer kodierenden Region für den Fänger für freie Radikale Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) verbunden ist. pE425-MnSOD wurde aus einem Plasmid nMnSOD #0664 (Genentech) (Wong 1989), das die MnSOD-cDNA enthält, und pE425-CAT konstruiert, das das Egr-1-Segment und eine Transkriptionsterminierende Region, das Polyadenylierungssegment von CAT enthält.

e. G5-TNF

[0134] Das Plasmid G5-TNF umfasst die DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Gens aus Hefe und die E1b-Minimalpromotor-TATA-Box, die funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die TNF-α kodiert. pG5-TNF wurde aus dem Plasmid G5BCAT und dem Plasmid pE-TNF konstruiert.

[0135] Das Plasmid G5BCAT, das die DNA-Sequenz enthält, die das Gal4-Protein bindet, die 5' zu der E1b-TATA-Box stromaufwärts des CAT-Reportergens angeordnet ist (Baichwal 1990). Das G5BCAT-Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten. Das große Fragment wurde isoliert und an dem 3'-Überhang unter Verwendung der T4-DNA-Polymerase und an dem 5'-Überhang mittels Klenow mit stumpfen Enden versehen. Diese Spaltung entfernt den Minimalpromotor, aber behält das Poly-A-Ende bei.

[0136] Die TNF-cDNA wurde aus dem pE4-Plasmid unter Verwendung des Restriktionsenzyms PstI entfernt, und das 1,1-kb-Fragment, das die TNF-cDNA enthielt, wurde isoliert und an dem 3'-Überhang unter Verwendung der T4-DNA-Polymerase und an dem 5'-Überhang mittels Klenow mit stumpfen Enden versehen.

[0137] Die resultierende G5B- und TNF-cDNA wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase und der T4-RNA-Ligase mit stumpfen Enden ligiert. Das resultierende G5-TNF-Plasmid wurde einer Restriktionsenzym-Kartierung und einer DNA-Sequenzierung unterzogen, um die Sinn-Ausrichtung von TNF festzustellen. Das Plasmid G5BCAT wurde anhand des Verfahrens von Baichwal (Baichwal et al., 1990) hergestellt. Das Plasmid pE-TNF wurde wie oben angegeben hergestellt.

f. c-Jun-CAT

[0138] Das Plasmid c-Jun-CAT umfasst ein Fragment von in etwa 1100 Basenpaaren des c-Jun-Promotors, das funktionell mit einer für CAT kodierenden Region verbunden ist. Das Plasmid c-Jun-CAT wurde aus dem Plasmid h-jun-CAT in Übereistimmung mit dem Verfahren von Angel (Angel 1988) konstruiert.

g. pE25-Pseudomonas-Exotoxin

[0139] Ein Plasmid, das eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors und eine kodierende Region, die das Pseudomonas-Exotoxin kodiert, umfasst, wurde aus dem Plasmid PE425 und dem Plasmid pMS150A (Lory 1988), das die das Pseudomonas-Exotoxin kodierende Region enthält, hergestellt.

h. Andere Konstrukte

[0140] Andere DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung werden unter Verwendung von ähnlichen Techniken wie den oben angegeben hergestellt. Spezifische Beispiele der Herstellung von anderen DNA-Molekülen können in den Beispielen 1–6 hierin unten gefunden werden.

B. Pharmazeutische Zusammensetzung

[0141] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge wenigstens eines DNA-Moleküls der vorliegenden Erfindung und einen physiologisch annehmbaren Träger umfasst.

[0142] Eine therapeutisch wirksame Menge eines DNA-Moleküls, das mit einem Träger kombiniert wird, um eine Einzeldosisform herzustellen, variiert in Abhängigkeit von dem behandelten Wirt und der jeweiligen Art der Verabreichung.

[0143] Wie in der Technik wohl bekannt ist, hängt ein spezifischer Dosisspiegel für einen beliebigen jeweiligen Patienten von einer Vielzahl von Faktoren ab, einschließlich der Aktivität der verwendeten spezifischen Ver-

bindung, dem Alter, dem Körpergewicht, dem allgemeinen Gesundheitszustand, dem Geschlecht, der Ernährung, dem Zeitpunkt der Verabreichung, dem Verabreichungsweg, der Ausscheidungsrate, der Wirkstoffkombination und der Schwere der jeweiligen Erkrankung, die der Therapie unterliegt.

[0144] Eine Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird typischerweise oral oder parenteral in Einheitsdosierungs-Formulierungen verabreicht, die wohl bekannte, nichttoxische, physiologisch annehmbare Standardträger, -adjuvantien und -vehikel, wie gewünscht, enthalten. Der Ausdruck parenteral schließt, wie hierin verwendet, subkutane Injektionen, intravenöse, intramuskuläre, intraarterielle Injektion oder Infusionstechniken ein.

[0145] Injizierbare Zubereitungen, zum Beispiel sterile injizierbare, wässrige oder ölige Suspensionen, werden gemäß der bekannten Technik unter Verwendung geeigneter Dispergier- oder Benetzungsmittel und Suspendiermittel formuliert. Die sterile injizierbare Zubereitung kann auch eine sterile injizierbare Lösung oder Suspension in einem nichttoxischen, parenteral annehmbaren Verdünnungsmittel oder Lösungsmittel sein, wie z. B. eine Lösung in 1,3-Butandiol.

[0146] Unter den annehmbaren Vehikeln und Lösungsmitteln, die verwendet werden können, sind Wasser, Ringerlösung und isotonische Natriumchloridlösung. Außerdem werden sterile nichtflüssige Öle herkömmlicher Weise als ein Lösungsmittel oder Suspendiermedium verwendet. Zu diesem Zweck kann jedes harmlose nichtflüssige Öl verwendet werden, einschließlich synthetischer Mono- oder Diglyceride. Außerdem finden Fettsäuren, wie Ölsäure, Verwendung bei der Herstellung von Injectabilia.

[0147] Ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung kann auch mit einem poly(L-Lysin)-(PLL-)Proteinkonjugat, wie einem Transferrin-PLL-Konjugat oder einem Asialo-Orosomucoid-PLL-Konjugat, komplexiert sein.

[0148] Flüssige Dosierungsformen für die orale Verabreichung schließen pharmazeutisch annehmbare Emulsionen, Sirups, Lösungen, Suspensionen und Elixiere ein, die allgemein verwendete, inerte Verdünnungsmittel, wie Wasser, enthalten. Solche Zusammensetzungen können auch Hilfsstoffe, wie Benetzungsmittel, Emulgier- und Suspendiermittel und Süßungsmittel, Geschmacksstoffe und Duftstoffe umfassen.

C. Transformierte oder transfizierte und transgene Zellen

[0149] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Zelle bereit, die mit einem oder mehreren DNA-Molekülen der vorliegenden Erfindung transformiert oder transfiziert ist, sowie transgene Zellen, die von diesen transformierten oder transfizierten Zellen abgeleitet sind. Mittel für das Transformieren oder Transfizieren von Zellen mit exogenen DNA-Molekülen sind in der Technik wohl bekannt.

[0150] Ein DNA-Molekül wird in eine Zelle unter Verwendung von Standard-Transformations- oder -Transfektionstechniken eingeführt, die in der Technik wohl bekannt sind, wie die Kalziumphosphat- oder DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Protoblastenfusion, Elektroporation, Liposomen und direkte Mikroinjektion (Sambrook, Fritsch und Maniatis, 1989).

[0151] Das am häufigsten verwendete Verfahren ist die entweder durch Kalziumphosphat oder DEAE-Dextran vermittelte Transfektion. Obwohl der Mechanismus unklar bleibt, nimmt man an, dass die transfizierte DNA mittels Endocytose in das Zytoplasma der Zelle eintritt und in den Zellkern überführt wird. Abhängig von dem Zelltyp können bis zu 20 % einer Population von kultivierten Zellen zu einer beliebigen Zeit transfiziert werden. Aufgrund ihrer hohen Effizienz ist die durch Kalziumphosphat oder DEAE-Dextran vermittelte Transfektion das Verfahren der Wahl für Experimente, die eine transiente Expression der Fremd-DNA in großen Zellzahlen erfordern. Die durch Kalziumphosphat vermittelte Transfektion wird auch verwendet, um Zelllinien zu etablieren, die integrierte Kopien der Fremd-DNA, die gewöhnlich in Kopf-an-Schwanz-Tandemanordnungen angeordnet sind, tragen.

[0152] Bei dem Protoplasten-Fusionsverfahren werden Protoplasten, die von Bakterien abgeleitet sind, die eine große Zahl von Kopien eines Plasmids von Interesse tragen, direkt mit kultivierten Säugerzellen gemischt. Nach der Fusion der Zellmembranen (für gewöhnlich mit Polyethylenglykol) wird der Inhalt der Bakterien in das Zytoplasma der Säugerzellen überführt, und die Plasmid-DNA wird in den Zellkern überführt. Die Protoplastenfusion ist bei vielen Zelllinien, die allgemein für transiente Expressionstests verwendet werden, nicht so effizient wie die Transfektion, aber sie ist nützlich für Zelllinien, in denen die Endozytose von DNA ineffizient erfolgt. Die Protoplastenfusion ergibt häufig mehrere Kopien der Plasmid-DNA, die "tandomly" in das Wirtschromosom integriert sind.

[0153] Die Verabreichung kurzer elektrischer Pulse mit Hochspannung an eine Vielzahl von Säuger- und Pflanzenzellen führt zu der Bildung von Poren in Nanometergröße in der Plasmamembran. Die DNA wird entweder durch diese Poren oder als eine Folge der Umverteilung von Membrankomponenten, die das Schließen der Poren begleitet, direkt in das Zytoplasma der Zelle aufgenommen. Die Elektroporation kann extrem effizient sein und kann sowohl für die transiente Expression klonierter Gene als auch für die Etablierung von Zelllinien verwendet werden, die integrierte Kopien des Gens von Interesse tragen. Die Elektroporation liefert im Gegensatz zu der Kalziumphosphat-vermittelten Transfektion und der Protoplastenfusion häufig Zelllinien, die eine oder höchstens wenige integrierte Kopien der Fremd-DNA tragen.

[0154] Die Liposomen-Transformation schließt das Einkapseln von DNA und RNA innerhalb von Liposomen, gefolgt von der Fusion der Liposomen mit der Zellmembran ein. Außerdem kann DNA, die mit einem synthetischen kationischen Lipid beschichtet ist, mittels Fusion in Zellen eingeführt werden.

[0155] Die direkte Mikroinjektion eines DNA-Moleküls in Zellkerne besitzt den Vorteil, dass die DNA keinen zellulären Kompartimenten, wie Endosomen mit niedrigem pH, ausgesetzt wird. Die Mikroinjektion wird deshalb hauptsächlich als ein Verfahren zur Etablierung von Zelllinien verwendet, die integrierte Kopien der DNA von Interesse tragen.

D. Verfahren zur Regulation der Expression

[0156] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Regulation der Expression eines Polypeptids. Die Polypeptid-Expression wird durch Stimulieren oder Hemmen der Transkription einer kodierenden Region, die dieses Polypeptid kodiert, reguliert. In Übereinstimmung mit einem Ausführungsbeispiel umfasst ein Verfahren zur Regulation der Polypeptid-Expression die Schritte:

(a) funktionelles Verbinden eines wie in den Patentansprüchen definierten, auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotors mit einer kodierenden Region, die dieses Polypeptid kodiert, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptionsterminierenden Region verbunden wird, um ein DNA-Molekül zu bilden; und

(b) Exponieren des DNA-Moleküls an eine wirksame, die Expression induzierende Dosis ionisierender Strahlung.

[0157] Ein DNA-Molekül, das in solch einem Verfahren verwendet wird, ist ein wie oben angegebenes DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung.

[0158] Wie hierin verwendet, bedeutet der Ausdruck „wirksame, die Expression induzierende Dosis ionisierender Strahlung" diejenige Dosis ionisierender Strahlung, die erforderlich ist, um einen auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor der vorliegenden Erfindung zu stimulieren oder anzuschalten. Die in einer gegebenen Zelle erforderliche Menge an ionisierender Strahlung hängt unter anderem von der Natur dieser Zelle ab. Typischerweise ist eine wirksame, die Expression induzierende Dosis geringer als eine Dosis ionisierender Strahlung, die direkt eine Schädigung oder den Tod der Zelle verursacht. Mittel zur Bestimmung einer wirksamen, die Expression induzierenden Menge sind in der Technik wohl bekannt.

[0159] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel beträgt eine wirksame, die Expression induzierende Menge von in etwa 2 bis in etwa 20 Gray (Gy), die mit einer Rate von in etwa 0,5 bis in etwa 2 Gy/Minute verabreicht wird. In noch mehr bevorzugter Weise beträgt eine wirksame, die Expression induzierende Menge ionisierender Strahlung von in etwa 5 bis in etwa 15 Gy.

[0160] Wie hierin verwendet, bedeutet „ionisierende Strahlung" eine Strahlung, die Partikel oder Photonen umfasst, die eine ausreichende Energie besitzen, oder eine ausreichende Energie mittels nuklearer Wechselwirkungen erzeugen können, um eine Ionisierung (einen Gewinn oder Verlust von Elektronen) hervorzurufen. Eine beispielhafte und bevorzugte ionisierende Strahlung ist eine Röntgenstrahlung. Mittel zur Verabreichung von Röntgenstrahlung an ein Zielgewebe oder eine Zielzelle sind in der Technik wohl bekannt.

[0161] Zellen, die ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung enthalten, das ein bestimmtes Polypeptid kodiert, exprimieren dieses Polypeptid, wenn sie ionisierender Strahlung ausgesetzt werden.

[0162] Zum Beispiel war die Behandlung von mit dem Plasmid pEgr-1P1,2 transfizierten Zellen mit ionisierender Strahlung mit einer 4,1fachen Zunahme der CAT-Aktivität im Vergleich zu transfizierten, aber nicht bestrahlten Zellen assoziiert. Das Plasmid pEgr-1P1,2 umfasst einen auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor (die Egr-1-Promotorregion, die sich von der Position –957 stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle bis zu

der Position +248 erstreckt), der funktionell mit dem CAT-Reportergen verbunden ist. Tatsächlich war die Bestrahlung von mit pE425-CAT transfizierten Zellen mit einer 3,6fachen Induktion der CAT-Aktivität im Vergleich zu derjenigen in nicht bestrahlten Zellen, die mit diesem Konstrukt transfiziert waren, assoziiert.

[0163] Eine Serie von deletierten Egr-1-Promotorkonstrukten wurde als Nächstes verwendet, um die auf Röntgenstrahlung ansprechenden Elemente in pE425-CAT weiter zu definieren. Das schrittweise Deletieren der drei distalen CArGs verringerte in zunehmendem Maße die CAT-Aktivität. Das Plasmid pE395-CAT (erste CArG deletiert) verlieh in einem geringeren Ausmaß als pE425-CAT eine Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung. Die Deletion der ersten und zweiten CArG-Domänen (pE359-CAT) führte zu weiteren Abnahmen der CAT-Aktivität, während die Deletion der ersten drei CArG-Domänen (pE342-CAT) mit minimalen Zunahmen der CAT-Aktivität assoziiert war.

[0164] Andere Studien wurden mit Fragmenten des Egr-1-Promotors durchgeführt, die mit dem HSV-TK- und dem CAT-Gen verbunden waren. Es gab keine nachweisbare Induzierbarkeit von pTK35CAT (das keinerlei CArG-Domänen eines Egr-1-Promotors enthielt) durch Röntgenstrahlen. Im Gegensatz dazu sprachen Zellen, die mit dem Plasmid pE425/250TK (das die vier distalen Egr-1-CArG-Domänen enthielt) transfiziert waren, auf eine Behandlung mit Röntgenstrahlung an. Die Region des Egr-1-Promotors, die sich von den Nukleotidpositionen –395 bis –250 erstreckt, welche die erste CArG-Domäne nicht einschließt, war ebenfalls funktionsfähig, indem sie dem heterologen Promotor eine Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung verlieh, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als pE425/250TK. Die Induzierbarkeit der CAT-Expression durch Röntgenstrahlung wurde auch in Zellen beobachtet, die mit einem Plasmid transfiziert waren, das nur eine CArG-Domäne umfasste.

[0165] Als weiteres Beispiel wurde die Expression des TNF-α-Proteins durch ionisierende Strahlung in Zellen induziert, die mit dem Plasmid pE425-TNF transfiziert waren. SQ-20B-, RIT-3- und HL-525-Zellen wurden mittels DEAE-Präzipitation mit dem Plasmid pE425-TNF transfiziert. Transfizierte Zellen wurden 10 Gy Röntgenstrahlung mit einer Rate von 1 Gy/min ausgesetzt. Die Expression von TNF-α war in etwa 2fach, 5fach bzw. 4fach in SQ-20B-, RIT-3- und HL-525-Zellen im Vergleich zu transfizierten, nicht bestrahlten Zellen erhöht.

[0166] Als Vergleichsbeispiel wurde die CAT-Expression durch ionisierende Strahlung in RIT-3-Zellen induziert, die mit dem Plasmid c-Jun-CAT transfiziert waren, wobei das Plasmid ein 1100-Basenpaar-Fragment des c-Jun-Promotors umfasst, das funktionell mit einem CAT-Gen verbunden ist. Die Zellen wurden mit einem SV40-Promotor-β-Galactosidase-Expressionsvektor cotransfiziert, um die Transfektionseffizienz zu kontrollieren.

[0167] Die Transfektanten wurden 40 Stunden nach der Transfektion bestrahlt (10 Gy, 1 Gy/min, GE Maxitron). CAT wurde 6 Stunden nach der Bestrahlung extrahiert. Die CAT-Aktivität nahm nach der Bestrahlung von RIT-3-Zellen, die mit pc-Jun-CAT transfiziert waren, in etwa 3fach zu. Die β-Gal-Expression wurde durch die Bestrahlung nicht beeinflusst. Die ionisierende Strahlung erhöhte nicht die CAT-Expression in Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert waren, das den minimalen Jun-Promotor (Nukleotidbasenposition –18 bis Nukleotidbasenposition +170 relativ zu der Transkriptionsstartstelle) umfasste, der funktionell mit CAT verbunden war.

[0168] Die oben dargestellten Daten zeigen, dass ionisierende Strahlung als ein Auslöser zur Regulation der Transkription einer kodierenden Region in einem DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung und der Expression eines von dieser Region kodierten Polypeptids verwendet werden kann.

[0169] In einem alternativen Ausführungsbeispiel wird die Polypeptidexpression durch die Verwendung von zwei DNA-Molekülen reguliert. Eines dieser DNA-Moleküle umfasst einen wie in den Patentansprüchen definierten, auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die umfasst:

(a) eine erste kodierende Sequenz, die eine DNA-Bindungsdomäne eines ersten Transkriptionsfaktors kodiert;

(b) eine zweite kodierende Sequenz, die eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne eines zweiten Transkriptionsfaktors kodiert;

(c) eine dritte kodierende Sequenz, die ein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert, wobei die ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen funktionell in einem Leserahmen in einer beliebigen Anordnung miteinander verbunden sind, mit der Maßgabe, dass die dritte kodierende Sequenz nur vorhanden sein muss, falls die erste oder zweite kodierende Sequenz kein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert; und

(d) eine Transkriptions-terminierende Region, die funktionell mit einer beliebigen der ersten, zweiten oder dritten kodierenden Sequenzen verbunden ist, so dass die Transkriptions-terminierende Region 3' zu allen der ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen angeordnet ist.

[0170] Ein zweites DNA-Molekül umfasst eine Bindungsregion, die fähig ist, die DNA-bindende Domäne des ersten Transkriptionsfaktors zu binden, wobei die Bindungsregion funktionell mit einem Minimalpromotor verbunden ist, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist.

[0171] Ein auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor, ein Transkriptionsfaktor, eine Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors und eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne eines Transkriptionsfaktors sind vorzugsweise die oben angegebenen. Ein von einer kodierenden Region kodiertes Polypeptid ist ebenfalls vorzugsweise das gleiche wie oben angegeben.

[0172] Zellen, die mit solchen DNA-Molekülen transfiziert sind, zeigen eine durch ionisierende Strahlung induzierbare Polypeptidexpression.

[0173] Als Vergleichsbeispiel wurden zwei Plasmide unter Verwendung eines Kalzium-Präzipitationsverfahrens in HeLa- und RIT-3-Zellen transfiziert. Das erste Plasmid (pSG424) enthielt den SV40-Promotor (transkriptionell nicht auf Strahlung ansprechend) stromaufwärts der kodierenden Sequenz für die δ-, A1- und A2-Regionen der Aktivierungsdomäne des Jun-Proteins, worin die DNA-Bindungsdomäne von Jun durch die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 ersetzt war. Ein zweites Plasmid, G5BCAT, enthielt die DNA-Sequenz, die das Gal4-Protein bindet, die mit einem Minimal-TK-Promotor stromaufwärts des CAT-Reportergens verbunden war.

[0174] Die transfizierten Zellen wurden mit 10 Gy an Röntgenstrahlen bestrahlt. Die CAT-Aktivität nahm in den bestrahlten, transfizierten HeLa- und RIT-3-Zellen im Vergleich zu transfizierten, nicht bestrahlten Zellen zu.

[0175] Beispielsweise induzierte die Bestrahlung eine Zunahme der TNF-α-Expression in RIT-3-Zellen, die mit den Plasmiden pE425-Gal4/VP16 und pG5-TNF transfiziert waren. Das Plasmid pE425-Ga14/VP-16 umfasst ein Fragment von in etwa 491 Basenpaaren des Egr-1-Promotors, das 6 CArG-Domänen enthält, wobei das Fragment funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die eine erste kodierende Sequenz umfasst, die die DNA-bindende Domäne von Gal4 kodiert, die in einem Leserahmen mit einer zweiten kodierenden Sequenz verbunden ist, die die Aktivierungsdomäne des viralen Proteins VP-16 kodiert. Das Plasmid G5-TNF umfasst ein DNA-Segment, das die Gal4-Bindungsdomäne bindet, das funktionell mit einem Minimalpromotor verbunden ist, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die TNF-α kodiert. RIT-3-Zellen wurden mit den Plasmiden pE425-Gal/VP16 und G5-TNF unter Verwendung der Lipofektion cotransformiert. Die transfizierten Zellen wurden 36 Stunden nach der Transfektion bestrahlt, und 10 Stunden nach der Bestrahlung wurde auf TNF getestet. Die Konzentration des intrazellulären TNF nahm in etwa 9fach im Vergleich zu alleine mit G5-TNF transfizierten Zellen zu.

[0176] Falls die Regulation inhibierend ist, umfasst eine kodierende Region vorzugsweise:

(a) eine erste kodierende Sequenz, die eine DNA-Bindungsdomäne eines ersten Transkriptionsfaktors kodiert;

(b) eine zweite kodierende Sequenz, die eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne eines zweiten Transkriptionsfaktors kodiert;

(c) eine dritte kodierende Sequenz, die ein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert, wobei die ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen funktionell innerhalb eines Leserahmens in einer beliebigen Anordnung miteinander verbunden sind, mit der Maßgabe, dass die dritte kodierende Sequenz nur vorhanden sein muss, falls die erste oder zweite kodierende Sequenz kein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert; und

(d) eine Transkriptions-terminierende Region, die funktionell mit einer beliebigen der ersten, zweiten oder dritten kodierenden Sequenzen verbunden ist, so dass die Transkriptions-terminierende Region 3' zu allen der ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen angeordnet ist.

[0177] Vorzugsweise kodiert die zweite kodierende Sequenz die Repressionsdomäne des Wilms-Tumor-Suppressorgens WT1 oder die Repressionsdomäne von Egr-1. Ein auf Bestrahlung ansprechender Enhancer-Promotor und ein erster Transkriptionsfaktor sind die gleichen, wie oben angegeben.

E. Verfahren zur Hemmung von Tumorwachstum

[0178] Gemäß einem noch weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Hemmung des Wachstums eines Tumors, umfassend die Schritte:

(a) Verabreichen an den Tumor einer therapeutisch wirksamen Menge eines DNA-Moleküls, das einen wie

in den Patentansprüchen definierten, auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor umfasst, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert, das die Fähigkeit besitzt, Tumorzellwachstum zu hemmen, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist; und

(b) Exponieren des Tumors an eine wirksame, die Expression induzierende Dosis ionisierender Strahlung.

[0179] Ein auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor umfasst eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors, und ein Polypeptid, das die Fähigkeit besitzt, Tumorzellwachstum zu hemmen, ist ein Zytokin, ein Dominant Negatives, ein Tumor-supprimierender Faktor oder ein Angiogenesehemmer. Beispielhafte und bevorzugte Polypeptide sind TNF-α, Interleukin-4, Ricin, das Pseudomonastoxin, p53, das Retinoblastom-Genprodukt oder das Wilms-Tumor-Genprodukt.

[0180] TNF ist für Tumorzellen zytotoxisch. Eine Wechselwirkung zwischen TNF und Strahlung wurde in 12 humanen Epitheltumor-Zelllinien gefunden, die auf Zytotoxizität gegenüber TNF und synergistisches Abtöten durch die Kombination der beiden Mittel analysiert wurden (Hallahan et al., 1990; Hallahan et al., 1989). Es wurde gefunden, dass TNF zytotoxische Wirkungen bei Konzentration von 10 bis 1000 Units/ml in zehn von zwölf untersuchten Tumorzelllinien besaß (Hallahan et al., 1990; Hallahan et al., 1989). Außerdem wurde in sieben dieser zehn Zelllinien ein synergistisches oder additives Abtöten durch TNF und Röntgenstrahlen beobachtet.

[0181] Wenn Zellen eines Maus-Nierenzelltumors so konstruiert wurden, dass sie hohe Dosen von Interleukin-4 (IL-4) lokal ausschieden, wurden in einer von T-Zellen vorwiegend unabhängigen Weise abgestoßen (Golumbek et al., 1985). Jedoch entwickelten Tiere, die die mit IL-4 transfizierten Tumore abstießen, eine von T-Zellen abhängige systemische Immunität gegenüber dem Elterntumor. Diese systemische Immunität war tumorspezifisch und vorwiegend von $CD8^+$-T-Zellen vermittelt. Etablierte Elterntumore konnten durch die systemische Immunantwort geheilt werden, die durch die Injektion der genetisch konstruierten Tumore erzeugt wurde. Diese Ergebnisse liefern eine Grundlage für die Verwendung von Lymphokingen-transfizierten Tumorzellen, die durch Bestrahlung aktiviert werden, als eine Modalität für die Krebstherapie.

[0182] Ricin ist ein Zytotoxin, das Säuger-Ribosomen durch die Katalysieren der Spaltung der N-glycosidischen Bindung der 28S-rRNA inaktiviert (Endo & Tsurngi 1987). Dieses Enzym ist extrem toxisch, wenn es systemisch verabreicht wird, aber kann durch die Verwendung des Ansteuerns ("targting") mittels Bestrahlung des für Ricin kodierenden Gens bei einem Tumor lokalisiert werden.

[0183] Das Gen für den transformierenden Wachstumsfaktor Typ alpha wurde an ein modifiziertes Gen für das Pseudomonastoxin fusioniert, aus dem die Zellerkennungsdomäne deletiert wurde (Chaudhary et al., 1987). Das chimäre Gen wurde in Escherichia coli exprimiert, und das chimäre Protein, PE40-TGF-alpha, wurde hochgradig gereinigt. PE40-TGF-alpha tötet Zellen, die Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor exprimieren, und besitzt eine geringe Aktivität gegenüber Zellen mit wenigen Rezeptoren. Dieses chimäre Protein könnte nützlich bei der Behandlung von Krebsarten sein, die große Zahlen von Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor enthalten. Das Gen, das das Pseudomonastoxin kodiert, oder seine Chimäre können durch Bestrahlung zielgerichtet („targeted") werden, um die möglichen systemischen Folgen dieses Toxins auszuschließen.

[0184] Die Verabreichung erfolgt vorzugsweise durch Injizieren des DNA-Moleküls in den Tumor. Falls der Tumor sich in einem Individuum befindet, erfolgt die Verabreichung vorzugsweise durch Verabreichen des DNA-Moleküls in das Kreislaufsystem des Individuums. In einem stärker bevorzugten Ausführungsbeispiel umfasst das Verabreichen die Schritte:

(a) Bereitstellen eines Vehikels, das das DNA-Molekül enthält; und

(b) Verabreichen des Vehikels an das Individuum.

[0185] Ein Vehikel ist vorzugsweise eine Zelle, die mit dem DNA-Molekül transformiert oder transfiziert ist, oder eine transfizierte Zelle, die von solch einer transformierten oder transfizierten Zelle abgeleitet ist. Eine beispielhafte und bevorzugte transformierte oder transfizierte Zelle ist ein Leukozyt, wie ein Tumor-infiltrierender Lymphozyt oder eine T-Zelle oder eine Tumorzelle aus dem Tumor, der behandelt wird. Mittel für das Transformieren oder Transfizieren einer Zelle mit einem DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung sind oben angegeben.

[0186] Humane Lymphozyten können außerdem unter Verwendung der vorhandenen Technologie, die den retroviral vermittelten Gentransfer einschließt (Overell et al., 1991; Fauser 1991), mit durch Strahlung induzier-

baren Plasmidkonstrukten transfiziert werden. In einem beispielhaften Ausführungsbeispiel können LAK-Zellen, die dazu neigen, sich mit einem gewissen Maß an Präferenz an dem in Rede stehenden Ort des Tumors anzusiedeln, obwohl es wohl bekannt ist, dass sie sich im Körper auch an andere Orte verteilen werden, verwendet werden, um Tumore anzusteuern („to target"). Tatsächlich besteht einer der wichtigsten Vorteile des durch Strahlung induzierbaren Systems darin, dass nur diejenigen LAK-Zellen, die sich in dem Bestrahlungsfeld befinden, aktiviert werden und ihre exogen eingeführten Lymphokingene aktiviert werden. Somit besteht im Fall der LAK-Zellen keine besondere Notwendigkeit für ein weiteres Ansteuern („targeting").

[0187] Alternativ dazu ist das Vehikel ein Virus oder ein Antikörper, der ein Antigen des Tumors spezifisch infiziert oder damit immunreagiert. Retroviren, die verwendet werden, um die Konstrukte zu den Wirtszielgeweben zu bringen, sind im Allgemeinen Viren, in denen der 3'-LTR (lineare Transferregion) inaktiviert wurde. Dies heißt, dass diese promotorlose 3'-LTRs sind, die häufig als SIN (selbst-inaktivierende Viren) bezeichnet werden, weil der 3'-LTR nach der produktiven Infektion in die Wirtszelle an das 5'-Ende transferiert wird und beide viralen LTRs in Bezug auf die Transkriptionsaktivität inaktiv sind. Eine dem Fachmann wohl bekannte Verwendung dieser Viren besteht darin, Gene zu klonieren, bei denen die regulatorischen Elemente des klonierten Gens in den Zwischenraum zwischen die beiden LTRs insertiert werden. Ein Vorteil eines viralen Infektionssystems besteht darin, dass es einen sehr hohen Infektionsgrad in den entsprechenden Rezipientenzellen, z. B. LAK-Zellen, ermöglicht.

[0188] Für Zwecke der vorliegenden Erfindung kann ein wie in den Patentansprüchen definierter, auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor, der sich 5' der entsprechenden kodierenden Region befindet, unter Verwendung von in der Technik wohl bekannten Standardtechniken in das Virus kloniert werden.

[0189] Die viralen Konstrukte werden durch ein beliebiges Verfahren in einen Wirt eingebracht, das bewirkt, dass die Konstrukte die Zellen des Zielgewebes erreichen und gleichzeitig die Merkmale des in dieser Erfindung verwendeten Konstrukts bewahrt. Zum Beispiel zeigte eine Gliomzelllinie aus Ratte, C6-BU-1, eine differenzielle Empfindlichkeit gegenüber Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2), nämlich sämtliche bisher getesteten HSV-1-Stämme persistierten in dieser Zelllinie, aber die HSV-2-Stämme taten dies nicht (Sakihama et al., 1991). C6-BU-1-Zellen bestehen aus Subpopulationen, die bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber HSV-1 heterogen sind, die möglicherweise untereinander austauschbar sind. Außerdem konnte das Wachstum von Tumoren, die von von C6 abgeleiteten Zellen, die das HSV-1-tk-Gen tragen, aber nicht von C6-Elternzellen produziert werden, durch die intraperitoneale Verabreichung von Ganciclovir gehemmt werden (Ezzeddine et al., 1991). Diese Arbeit zeigte die Effektivität der von dem HSV-1-tk-Gen exprimierten Thymidinkinase bei der Sensitivierung von Gehirn-Tumorzellen gegenüber den toxischen Wirkungen von Nukleosidanaloga. Retrovirus-Vektoren sollten sich deshalb als nützlich bei der selektiven Verabreichung dieses Killergens an sich teilende Tumorzellen im Nervensystem erweisen, in dem sich die meisten endogenen Zellen nicht teilen. Eine Bestrahlung wird verwendet werden, um die Spezifität der Verabreichung oder die Aktivierung der Transkription des tk-Gens nur in bestrahlten Gebieten zu verstärken.

[0190] Antikörper wurden für das Ansteuern ("targeting") und das Verabreichen von DNA-Molekülen verwendet. Ein N-terminal modifiziertes poly(L-Lysin)-(NPLL-)Antikörperkonjugat bildet leicht einen Komplex mit Plasmid-DNA (Trubetskoy et al., 1992). Ein Komplex von monoklonalen Antikörpern gegen ein mit NPLL konjugiertes Zelloberflächen-Thrombomodulin wurde verwendet, um mit einer fremden Plasmid-DNA eine Antigen-exprimierende Maus-Lungenendothel-Zelllinie und die Maus-Lunge anzusteuern ("to target"). Diese angesteuerten ("targetted") Endothelzellen exprimierten das von dieser Fremd-DNA kodierte Produkt.

[0191] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel umfasst das Exponieren die Schritte:

a) Bereitstellen eines radioaktiv markierten Antikörpers, der mit einem Antigen des Tumors immunreagiert; und

b) Verabreichung eines wirksamen, die Expression induzierenden des radioaktiv markierten Antikörpers an den Tumor.

[0192] Die Wirksamkeit der Verwendung von Antikörpern um eine Radiotherapie ins Ziel zu steuern ("to target") wurde gezeigt, einschließlich des Modulierens der Dosis einer intraperitonealen Radioimmuntherapie mit alpha- und beta-Strahlern[4] an den Tumor und normales Gewebe. Diese Technologie wurde in in-vivo-Experimenten eingesetzt. Astatin-211-Markierung eines anti-Melanom-Antikörpers und seines Fab-Fragments unter Verwendung von N-Succinimidyl-p-astatobenzoat: in-vivo-Vergleich mit dem p-(125)Iodbenzoyl-Konjugat[5].

[0193] Alternativ umfasst ein Verfahren zur Hemmung des Wachstums eines Tumors die Schritte:

(a) Verabreichen an den Tumor einer therapeutisch wirksamen Menge von

(1) einem ersten DNA-Molekül, das einen wie in den Patentansprüchen definierten, auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor umfasst, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die umfasst
(i) eine erste kodierende Sequenz, die eine DNA-bindende Domäne eines ersten Transkriptionsfaktors kodiert;
(ii) eine zweite kodierende Sequenz, die eine Aktivierungs- oder Repressionsdomäne eines zweiten Transkriptionsfaktors kodiert;
(iii) eine dritte kodierende Sequenz, die ein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert, wobei die ersten, zweite und dritten kodierenden Sequenzen funktionell in einem Leserahmen in einer beliebigen Anordnung miteinander verbunden sind, mit der Maßgabe, dass die dritte kodierende Sequenz nur vorhanden sein muss, falls die erste oder zweite kodierende Sequenz kein Zellkern-Lokalisierungssignal kodiert; und
(iv) eine Transkriptions-terminierende Region, die funktionell mit einer beliebigen der ersten, zweiten oder dritten kodierenden Sequenzen verbunden ist, so dass die Transkriptions-terminierende Region 3' zu allen der ersten, zweiten und dritten kodierenden Sequenzen angeordnet ist; und
(2) einem zweiten DNA-Molekül, das eine Bindungsregion umfasst, die fähig ist, die DNA-Bindungsdomäne des ersten Transkriptionsfaktors zu binden, wobei die Bindungsregion funktionell mit einem Minimalpromotor verbunden ist, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert, das eine zytotoxische Aktivität gegenüber einer Tumorzelle besitzt, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist; und
(b) Exponieren der Zelle an eine wirksame, die Expression induzierende Dosis ionisierender Strahlung.

[0194] Ein auf Strahlung ansprechender Enhancer-Promotor umfasst eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors, und das Polypeptid, das eine zytotoxische Aktivität gegenüber einer Tumorzelle besitzt, ist ein Zytokin, ein Dominant Negatives, ein Tumor-supprimierender Faktor oder ein wie oben beschriebener Angiogenesehemmer.

[0195] Die Verabreichung erfolgt vorzugsweise in gleicher Weise wie oben angegeben.

[0196] TNF-α nimmt nach der Behandlung mit Röntgenstrahlen in bestimmten humanen Sarkomzellen zu. Die Zunahme der TNF-α-mRNA wird von einer erhöhten Produktion des TNA-α-Proteins begleitet. Die Induktion eines zytotoxischen Proteins durch die Exponierung von Zellen, die das TNF-Gen enthalten, an Röntgenstrahlen wurde vermutet, als gefunden wurde, dass von bestrahlten Kulturen einiger humaner Sarkomzelllinien abgenommenes Medium gegenüber diesen Zellen sowie gegenüber anderen Tumorzelllinien zytotoxisch ist. Der Spiegel von TNF-α in den bestrahlten Tumorkulturen war gegenüber demjenigen von nicht bestrahlten Zellen bei der Analyse mittels der ELISA-Technik erhöht (Sariban et al., 1988). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass das erhöhte TNF-α-Protein nach der Bestrahlung die Abtötung von Zellen durch Röntgenstrahlung durch einen ungewöhnlichen, zuvor nicht beschriebenen Mechanismus verstärkt (siehe Vergleichsbeispiel 1).

[0197] RNA aus unbehandelten Zellen (Kontrolle) und bestrahlten Zellen wurde nach der Größe fraktioniert und mit ^{32}P-markierter TNF-α-cDNA (STSAR-13) und dem PE4-Plasmid, das die TNF-α-cDNA enthielt (STSAR-48), hybridisiert. Die Autoradiogramme zeigten eine erhöhte Expression der TNF-α-mRNA 3 Stunden nach der Bestrahlung in der Zelllinie STSAR-13 und nach 6 Stunden in der Zelllinie STSAR-48. Diese Daten zeigen, dass die Expression des TNF-α-Gens nach der Bestrahlung erhöht ist.

[0198] Die **Fig. 1** zeigt den Einfluss von TNF-α auf die Strahlungsletalität von TNF-α-produzierenden humanen Sarkomen und humanen Tumorzellen, die kein TNF-α produzieren. Die durchgezogenen Linien zeigen die Wirkungen der Strahlung alleine an, und die gestrichelten Linien zeigen die Wirkungen von sowohl TNF-α als auch der Bestrahlung. Repräsentative Überlebensdaten für die Zelllinie STSAR-33 sind in dem Diagramm links, A, gezeigt. Die untere gestrichelte Linie zeigt das für eine Plattierungseffizienz (PE) von 30 % korrigierte Überleben von Zellen mit 1000 Units/ml TNF-α. Das Überleben von bestrahlten humanen Epitheltumorzellen (SQ-20B) mit TNF-α (10 Units/ml und 1000 Units/ml) ist in dem mittleren Diagramm, B, gezeigt. Die Überlebensdaten für SQ-20B zeigen eine additive Wirkung von TNF-α (1000 Units/ml). Die Überlebensdaten mit TNF-α sind bezüglich des 85 %igen Abtötens mit TNF-α alleine korrigiert. Die Daten des Überlebens der Bestrahlung für HNSCC-68 sind in dem Diagramm auf der rechten Seite, C, gezeigt. Eine nichtletale Dosis von TNF-α (10 Units/ml) wurde 24 Stdn vor der Bestrahlung zugegeben.

[0199] Wie aus diesen Ergebnissen und aus der in dem Vergleichsbeispiel 1 besprochenen Information entnommen werden kann, ist der Tumor-Nekrose-Faktor α nach der Behandlung mit Röntgenstrahlen erhöht. Sowohl die mRNA als auch die TNF-α-Proteine waren erhöht.

[0200] Obwohl beobachtet wurde, dass andere DNA-schädigende Mittel als Röntgenstrahlen die Expression einer Vielzahl von prokaryontischen und Säugergenen induzieren, ist das TNF-α-Gen das erste Säugergen, von dem gefunden wurde, dass es eine erhöhte Expression nach der Exponierung an ionisierende Strahlung aufweist. Dieses Gen ist nicht als ein DNA-Reparaturgen kategorisiert.

[0201] Ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung besitzt Verwendungen neben der Hemmung von Tumorwachstum. Beispielhafte derartige Verwendungen sind unten in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3

Verwendung	Kodiertes Polypeptid	Anwendung auf Erkrankung
Abtöten von Tumorzellen	Toxine TNF Wachstumsfaktoren (IL-1-6, PDGF, FGF)	feste & hämatologische Malignitäten
Schützen von normalen Geweben vor Strahlung und anderen Zytotoxinen während der Krebstherapie	Lymphokine GCSF CMCSF Erythropoetin aplastisch anämisch	feste & hämatologische Malignitäten
Hemmen der Metastasierung	NM23	Krebsmetastase
Tumorsuppressor-Genprodukte	Rb, p53	Prävention von Malignität nach Standard-Radiotherapie und Chemotherapie

Radiosensibilisierung Chemosensibilisierung (Verstärken der Wirkung von Routinebehandlungen)	TNF	feste & hämatologische Malignitäten
Korrigieren von Defekten bei Gerinnungsfaktoren	Faktor 8	Gerinnungsstörungen
Einführen von Anti-Gerinnungsfaktoren	Streptokinase Urokinase	Myokardinfarkt, ZNS-Thrombose, periphere Thrombose
Korrigieren von Defekten, die eine Hämoglobinpathie charakterisieren	normales Hämoglobin	Sichelzellanämie
Korrigieren von Defizienzen, die zu neurodegenerativen Erkrankungen führen	Nervenwachstumsfaktor	Alzheimer-Erkrankung
Bereitstellung einer Behandlungskomponente für Diabetes	Insulin	Diabetes
Erkrankung durch DNA-Reparaturabnormitäten	ERCC-1, XRCC-1	Ataxia teleangiectatica, Xeroderma pigmentosum

[0202] Die folgenden Beispiele veranschaulichen bestimmte Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung und beschränken in keinerlei Weise die Beschreibung und die Patentansprüche.

VERGLEICHSBEISPIEL 1: Erhöhung der Tumor-Nekrose-Faktor-α-mRNA nach der zellulären Exponierung an ionisierende Strahlung

A. Proteinprodukte

[0203] Um die Produktion des TNF-α-Proteins nach der Röntgenbestrahlung zu untersuchen, wurden die Spiegel von TNF-α in dem Medium von humanen Tumorzelllinien und Fibroblasten mittels der ELISA-Technik (Sariban et al., 1988) vor und nach der Exponierung an 500 cGy Röntgenstrahlen quantifiziert. Fünf von 13

humanen Knochen- und Weichgewebe-Sarkomzelllinien (STSAR-5, -13, -33, -43 und -48) setzten nach der Bestrahlung TNF-α in das Medium frei, wogegen die TNF-α-Spiegel in dem Überstand von normalen humanen Fibroblasten-Zelllinien (GM-1522 und NHF-235) und vier humanen Epitheltumor-Zelllinien (HN-SCC-68, SCC-61, SCC-25 und SQ-20B) nach der Strahlungsexponierung nicht erhöht waren. Der Test misst exakt die TNF-α-Spiegel zwischen 0,1 und 2,0 Units pro ml ($2,3 \times 10^6$ Units/mg) (Saribon et al., 1988). Die Tumorzelllinie STSAR-13 produzierte nicht nachweisbare Mengen von TNF-α vor der Röntgenbestrahlung und 0,35 Units/ml nach der Röntgenstrahlungsexponierung. Die Zelllinien STSAR-5 und -33 antworteten auf die Röntgenbestrahlung mit Erhöhungen der TNF-α-Konzentrationen von >5- bis 10fach; jedoch überschritten Mengen von mehr als 2 Units/ml den Bereich des Tests (Saribon et al., 1988). Die Zelllinien STSAR-43 und -48 zeigten Zunahmen von TNF-α um das 1,5- bis 3fache (Tabelle 4, unten). Das TNF-α-Protein in dem Medium war zuerst nach 20 Stdn nach der Röntgenbehandlung erhöht, erreichte maximale Spiegel nach 3 Tagen und blieb bis nach 5 Tagen erhöht. Außerdem war der Überstand von bestrahlten, aber nicht von Kontroll-STSAR-33 gegenüber der gegenüber TNF-α empfindlichen Zelllinie SQ-20B zytotoxisch.

Tabelle 4

TNF-α-Spiegel (Units/ml)

Zelllinie	Ursprung	Kontrolle	Röntgenstrahlung
STSAR-5	MFH	0,4	>2,0
STSAR-13	Liposarkom	0,0	0,34
STSAR-33	Ewingsarkom	0,17	>2,0
STSAR-43	Osteosarkom	0,41	1,3
STSAR-48	Neurofibrosarkom	0,28	0,43

[0204] Die TNF-α-Spiegel wurden in dem Medium von konfluenten Zellkulturen (Kontrolle) und bei bestrahlten konfluenten Zellen (Röntgenstrahlung) gemessen. Die TNF-α-Spiegel nahmen gemäß der Messung mit der ELISA-Technik zu. MFH, malignes fibröses Histiozytom.

B. RNA-Analyse

[0205] Erhöhte Spiegel der TNF-α-mRNA wurden in den TNF-α-produzierenden Sarkom-Zelllinien nach der Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen nachgewiesen. Zum Beispiel waren TNF-α-Transkripte in unbestrahlten STSAR-13- und -48-Zelllinien vorhanden. Die Spiegel der TNF-α-mRNA in der Zelllinie STSAR-13 nahmen um >2,5fach zu, wie durch Densitometrie 3 Stdn nach der Exponierung an 500 cGy gemessen wurde, und nahmen dann während 6 Stdn bis zum Grundspiegel ab. Diese Transkripte nahmen nach 6 Stdn nach der Bestrahlung in der Zelllinie STSAR-48 zu, was auf eine gewisse Heterogenität zwischen den Zelllinien im Hinblick auf die Kinetik der Expression des TNF-α-Gens hindeutet. Im Gegensatz dazu hatte die Bestrahlung keine nachweisbare Auswirkung auf die Spiegel der 7S-RNA oder die Expression des Polymerase-β-Gens.

C. Wechselwirkung zwischen TNF-α und der Röntgenbestrahlung

[0206] Um den Einfluss von TNF-α auf die durch Bestrahlung induzierte Zytotoxizität in TNF-α-produzierenden Zelllinien zu untersuchen, wurde rekombinantes humanes TNF-α vor der Bestrahlung zu Kulturen zugegeben. Rekombinantes humanes TNF-α (1000 Units/ml) ($2,3 \times 10^6$ Units/mg) war für vier von fünf TNF-α-produzierende Sarkome (STSAR-5, -13, -33 und -43) zytotoxisch. Die Plattierungseffizienz (PE) war in diesen Linien bei 1000 Units/ml um 60–90 % verringert. Die Bestrahlungs-Überlebensanalyse der Zelllinie STSAR-33 wurde mit TNF-α (10 Units/ml) durchgeführt. Die als der Kehrwert der Endsteigung der Überlebenskurven definierte Radiosensitivität (D_0) betrug 80,4 cGy für die Zelllinie STSAR-33. Wenn TNF-α 20 Stdn vor der Bestrahlung zugegeben wurde, betrug D_0 60,4 cGy. Die überlebenden Fraktionen wurden in Bezug auf die mit TNF-α verringerte PE korrigiert. Somit war die Wechselwirkung zwischen TNF-α und der Strahlung in STSAR-33-Zellen synergistisch (Dewey 1979).

[0207] Subletale Konzentrationen von TNF-α (10 Units/ml) verstärkten das Abtöten durch Strahlung in der Zelllinie STSAR-33, was auf eine radiosensibilisierende Wirkung von TNF-α hindeutet. Der überlebende Teil der Zelllinie STSAR-5 bei 100-700 cGy war niedriger als aufgrund des voneinander unabhängigen Abtötens durch TNF-α und Röntgenstrahlen erwartet, obwohl die D_0-Werte ähnlich waren. Somit ist die Wechselwirkung zwischen TNF-α und der Strahlung in STSAR-5-Zellen additiv (Dewey 1979). Die Zelllinien STSAR-13 und STSAR-43 wurden unabhängig voneinander durch Röntgenstrahlen und TNF-α abgetötet, und es wurde keine Wechselwirkung beobachtet.

[0208] Um die möglichen Wechselwirkungen zwischen TNF-α und Röntgenstrahlen in Zellen, die kein TNF-α produzieren, zu bestimmen, wurden humane Epitheltumorzellen (SQ-20B und HNSCC-68) 20 Stdn nach der Zugabe von TNF-α bestrahlt. Diese Zelllinien produzierten kein TNF-α in Antwort auf die ionisierende Strahlung. TNF-α (1000 Units/ml) war gegenüber SQ-20B- und SCC-61-Zellen zytotoxisch, was die PE um 60 bis 80 % verringerte. Die D_0 für die Zelllinie SQ-20B beträgt 239 cGy. Wenn TNF-α (1000 Units/ml) 24 Stdn vor der Röntgenstrahlung zugegeben wurde, war die D_0 130,4 cGy. Somit wurde in dieser Zelllinie eine synergistische Wechselwirkung (Dewey 1979) zwischen TNF-α und Röntgenstrahlen gezeigt. TNF-α, das nach der Bestrahlung zugegeben wurde, verstärkte das Abtöten der Zellen durch die Bestrahlung in der Zelllinie SQ-20B nicht. Nichtletale Konzentrationen von TNF-α (10 Units/ml) führten zu einem verstärkten Abtöten durch Strahlung in der Zelllinie HNSCC-68, was einen Beleg dafür lieferte, dass TNF-α einige Epithel- wie auch Mesenchymaltumor-Zelllinien für eine Bestrahlung sensibilisiert.

[0209] Die folgenden spezifischen Verfahren wurden in dem Vergleichsbeispiel 1 verwendet.

[0210] Zelllinien. Verfahren zur Etablierung von humanen Sarkom- und Epithelzelllinien wurden beschrieben (Weichselbaum et al., 1986, 1988). Das Kulturmedium für Epitheltumorzellen war 72,5 % Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium/22,5 % Ham's Nährstoffmischung F-12 (DMEM/F-12 (3:1)), 5 % fetales Rinderserum (FBS), Transferrin zu 5 μg/ml/10^{-10} M Choleratoxin/1,8 × 10^{-4} M Adenin, Hydrokortison zu 0,4 μg/ml/2 × 10^{-11} M Trijod-L-Thyronin/Penicillin zu 100 Units/ml/Streptomycin zu 100 μg/ml. Das Kulturmedium für Sarkomzellen war DMEM/F-12 (3:1)/20 % FBS, Penicillin zu 100 Units/ml/Streptomycin zu 100 μg/ml.

[0211] TNF-α-Proteintest. Humane Sarkomzellen wurden, wie oben beschrieben, kultiviert und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Das Medium wurde 3 Tage nach der Ernährung und nochmals 1–3 Tage nach der Bestrahlung auf TNF-α analysiert. Dreizehn etablierte humane Sarkom-Zelllinien wurden mit 500 Zentigray (cGy) Röntgenstrahlen mit einem 250-kV-Maxitrongenerator bestrahlt (Weichselbaum et al., 1988). TNF-α wurde mittels ELISA mit zwei monoklonalen Antikörpern gemessen, die distinkte Epitope für das TNF-α-Protein besaßen (Sariban et al., 1988); der Test weist TNF-α von 0,1 bis 2,0 Units/ml nach.

[0212] RNA-Isolierung und RNA-Blotanalyse. Die zelluläre Gesamt-RNA wurde aus Zellen unter Verwendung des Guanidiniumthiocyanat-Lithiumchlorid-Verfahrens isoliert (Cathala et al., 1983). Die RNA wurde durch Formaldehyd-1-%-Agarose-Gelelektrophorese nach der Größe fraktioniert, auf Nylonmembranen transferiert (GeneScreenPlus, New England Nuclear), wie zuvor beschrieben mit dem 1,7-Kilobasen-(-kb-)BamHI-Fragment des PE4-Plasmids, das die TNF-α-cDNA enthielt (19, 23), hybridisiert und für 16 Tage bei –85 °C mit Verstärkerschirmen autoradiographiert. Die Northernblots wurden außerdem gegen die 7S-rRNA und β-Polymerase-Plasmide, wie beschrieben (Fornace et al., 1989), hybridisiert. Die Färbung mit Ethidiumbromid zeigte, dass in jeder Spur gleiche Mengen von RNA aufgetragen wurden. Die RNA-Blot-Hybridisierung von TNF-α wurde nach einer zellulären Bestrahlung mit 500 cGy analysiert. Die Zellen wurden mit kalter, Phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und während jeder Pause auf Eis gestellt. Die RNA wurde 3, 6 und 12 Stdn nach der Bestrahlung isoliert.

[0213] Röntgenbestrahlung und TNF-α. Exponentiell wachsende Zellen wurden unter Verwendung eines 250-kV-Röntgengenerators bestrahlt. Der Koloniebildungstest wurde verwendet, um das Überleben der Zellen zu bestimmen (Weichselbaum et al., 1988). Die Überlebenskurven des Multizielmodells wurden an ein Einzeltreffer-Multizielmodell angepasst ($S = 1 – (-e^{-D|DO})^n$). Die Konzentrationen von rekombinantem humanem TNF-α (10 Units/ml) (2:3 × 10^6 Units/mg) und (1000 Units/ml) (Asahi Chemical, New York) wurden 24 Stdn vor der Bestrahlung zugegeben.

VERGLEICHSBEISPIEL 2: Erhöhte Expression von c-Jun nach dem Exponieren an ionisierende Strahlung

[0214] Ein weiteres Vergleichs-DNA-Molekül leitet sich von dem c-Jun-Protoonkogen und verwandten Genen ab. Ionisierende Strahlung reguliert die Expression des c-Jun-Protoonkogens und auch der verwandten Gene c-fos und Jun-B. Das Proteinprodukt von c-Jun enthält eine DNA-Bindungsregion, die Mitgliedern einer Familie

von Transkriptionsfaktoren gemeinsam ist. Der Expressionsspiegel nach der Bestrahlung ist dosisabhängig. Das c-Jun-Gen kodiert eine Komponente des AP-1-Proteinkomplexes und ist wichtig bei den frühen Signalereignissen, die an verschiedenen zellulären Funktionen beteiligt sind. AP-1, das Produkt des Protoonkogens c-Jun, erkennt und bindet an spezifische DNA-Sequenzen und stimuliert die Transkription von Genen, die auf bestimmte Wachstumsfaktoren und Phorbolester ansprechen (Bohmann et al., 1987; Angel et al., 1988). Das Produkt des c-Jun-Protoonkogens enthält eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne, die einer Familie von Säuger-Transkriptionsfaktoren, einschließlich Jun-B, Jun-D, c-fos, fos-B, fra-1 und des GCN4-Proteins aus Hefe, gemeinsam ist.

[0215] Zusätzlich zu der Regulation der Expression des c-Jun-Gens, werden c-Jun-Transkripte in bestrahlten Zellen posttranskriptionell durch ein unstabiles Protein abgebaut. Die posttranskriptionelle Regulation der Expression des Gens ist in Sherman et al., 1990, beschrieben.

[0216] Im Gegensatz zu dem, was auf der Grundlage früherer DNA-Schädigungs- und -Abtötungsraten für andere Wirkstoffe erwartet würde, war das Verringern der Dosisrate, z. B. von 14,3 Gy/min auf 0,67 Gy/min, mit einer erhöhten Induktion von c-Jun-Transkripten assoziiert.

[0217] Maximale Spiegel der c-Jun-mRNA waren nach 50 Gy ionisierender Strahlung nachweisbar. Eine ähnliche Kinetik der Induktion von c-Jun wurden in bestrahlten humanen U-937-monozytischen Leukämiezellen und in normalen humanen AG-1522-diploiden Fibroblasten beobachtet. Die Behandlung von AG-1522-Zellen mit ionisierender Strahlung war außerdem mit dem Erscheinen eines geringen ("minor") 3,2-kb-c-Jun-Transkripts assoziiert.

[0218] Die folgenden Verfahren wurden in dem Vergleichsbeispiel 2 verwendet.

[0219] Zellkultur. Humane HL-60-promyclozytische Leukämiezellen, U-937-monozytische Leukämiezellen (beide von der American Type Culture Collection) und AG-1522-diploide Vorhautfibroblasten (National Institute of Aging Cell Repository, Camden, NJ) wurden unter Standardbedingungen wachsen gelassen. Die Zellen wurden unter Verwendung von entweder einem Philips-RT-250-Beschleuniger bei 250 kV, 14 mA, der mit einem 0,35-mm-Cu-Filter ausgestattet war, oder einer Gammacell 1000 (Atomic Energy of Canada, Ottawa) mit einer ^{137}Cs-Quelle, die mit einer festen Dosisrate von 14,3 Gy/min, wie durch Dosimetrie bestimmt, emittierte, bestrahlt. Kontrollzellen wurden den gleichen Bedingungen ausgesetzt, aber nicht bestrahlt.

[0220] Northernblot-Analyse. Die zelluläre Gesamt-RNA wurde wie beschrieben (29) isoliert. Die RNA (20 µg pro Spur) wurde in einem Agarose/Formaldehydgel aufgetrennt, auf einen Nitrozellulosefilter transferiert und mit den folgenden ^{32}P-markierten DNA-Sonden hybridisiert: (i) der 1,8-Kilobasen-(-kb-)BamHI/EcoRI-c-Jun-cDNA (30); (ii) der 0,91-kb-ScaI/NcoI-c-fos-DNA, die aus den Exons 3 und 4 bestand (31); (iii) der aus dem Plasmid p465,20 isolierten 1,8-kb-EcoRI-Jun-B-cDNA (32); und (iv) der aus pA1 gereinigten 2,0-kb-PstI-β-Actin-cDNA (33). Die Autoradiogamme wurden unter Verwendung eines LKB-UltroScan-XL-Laserdensitometers gescannt und unter Verwendung des LKB-GelScan-XL-Softwarepakets analysiert. Die Intensität der c-Jun-Hybridisierung wurde gegen die β-Actin-Expression normalisiert.

[0221] Run-on-Transkriptionsanalyse. HL-60-Zellen wurden mit ionisierender Strahlung behandelt, und die Zellkerne wurden nach 3 Stdn isoliert. Frisch verlängerte, ^{32}P-markierte RNA-Transkripte wurden mit Plasmid-DNAs, die verschiedene klonierte Inserts enthielten, nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wie folgt hybridisiert: (i) dem 2,0-kb-PstI-Fragment des β-Actin-pA1-Plasmids aus Huhn (Positivkontrolle); (ii) dem 1,1-kb-BamHI-Insert des humanen β-Globulin-Gens (Negativkontrolle); und (iii) dem 1,8-kb-BamHI/EcoRI-Fragment der humanen c-Jun-cDNA aus dem pBluescript-SK(+)-Plasmid. Die gespaltene DNA wurde auf einem 1-%-Agarosegel laufen gelassen und mittels des Verfahrens von Southern auf Nitrozellulosefilter transferiert. Die Hybridisierung wurde mit 10^7 cpm ^{32}P-markierter RNA pro ml Hybridisierungspuffer für 72 Stdn bei 42 °C durchgeführt. Die Autoradiographie wurde für 3 Tage durchgeführt, und die Autoradiogramme wurden, wie bereits beschrieben, gescannt.

BEISPIEL 1: Durch Strahlung induzierte Transkription von Jun und Egr-1

[0222] Innerhalb von 0,5 bis 3 Stdn nach der zellulären Röntgenbestrahlung trat eine erhöhte mRNA-Expression bei verschiedenen Klassen von Genen der Immediate-Early-Antwort auf Strahlung (Jun, Egr-1) auf. Die Vorinkubation mit Cycloheximid war mit einer Superinduktion von Jun und Egr-1 in Röntgen-bestrahlten Zellen assoziiert. Die Hemmung der Proteinkinase-C-(PKC-)Aktivität durch eine verlängerte Stimulation mit TPA oder dem Proteinkinaseinhibitor H7 vor der Bestrahlung, verringerte die Zunahme der Egr-1- und Jun-Transkripte.

Diese Daten deuteten darauf hin, dass Egr-1 und Jun Signaltransducer während der zellulären Antwort auf eine Strahlungsverletzung sind, und legten nahe, dass diese Wirkung zum Teil durch einen von Proteinkinase-C (PKC) abhängigen Signalweg vermittelt wird.

[0223] Jun-Homodimere und Jun/fos-Heterodimere regulieren die Transkription durch die Bindung an AP1-Stellen in bestimmten Promotorregionen (Curran und Franza, 1988). Die Jun- und fos-Gene werden nach einer Röntgenexponierung in humanen myeloiden Leukämiezellen induziert, was darauf hindeutet, dass Zellkern-Signaltransducer an der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung beteiligt sind.

[0224] Die Egr-1- und Jun-Gene werden in der Abwesenheit einer de-novo-Proteinsynthese nach der Exponierung an ionisierende Strahlung schnell und vorübergehend exprimiert. Egr-1 und Jun sind höchstwahrscheinlich an der Signaltransduktion nach der Röntgenbestrahlung beteiligt. Das Herunterregulieren der PKC durch TPA und H7 ist mit einer Abschwächung der Induktion der Egr-1- und Jun-Gene durch ionisierende Strahlung assoziiert, was auf die Aktivierung von PKC und die nachfolgende Induktion der Egr-1- und Jun-Gene als Signalisierungsereignisse hindeutet, die die phänotypische Antwort von Säugerzellen auf eine Verletzung durch ionisierende Strahlung initiiert.

[0225] Die Kontroll-RNA aus unbestrahlten Zellen zeigte niedrige, aber nachweisbare Spiegel der Egr-1- und Jun-Transkripte. Im Gegensatz dazu nahm die Expression von Egr-1 in bestrahlten Zellen in einer von der Dosis abhängigen Weise zu. Nach 3 Gy waren die Spiegel niedrig, aber nachweisbar, und nahmen in einer Dosis-abhängigen Weise nach 10 und 20 Gy zu. Zwanzig Gy wurden in Experimenten verwendet, die den Zeitverlauf der Genexpression untersuchten, so dass Transkripte leicht nachweisbar waren. Die Zellen blieben lebensfähig, wie während dieses Zeitverlaufs durch den Ausschluss des Farbstoffs Trypanblau bestimmt wurde. Eine zeitabhängige Zunahme der Egr-1- und Jun-mRNA-Spiegel wurde beobachtet. SQ-20B-Zellen zeigten koordinierte Zunahmen der Egr-1- und Jun-Expression nach 30 Minuten nach der Bestrahlung, die innerhalb von 3 Stdn bis zum Grundspiegel abnahmen. Im Gegensatz dazu, waren die Egr-1-Transkriptspiegel nach 3 Stdn über den Basalspiegel erhöht, wogegen Jun in AG1522 nach einer Stunde erhöht war und nach 3 Stdn zum Grundspiegel zurückkehrte. Die Jun-Spiegel waren nach 6 Stdn in 293-Zellen erhöht, wogegen Egr-1 nach 3 Stdn erhöht war und nach 6 Stdn zu den Grundspiegeln zurückkehrte.

[0226] Um zu bestimmen, ob Egr-1 und Jun als Immediate-Early-Gene nach der Röntgenbestrahlung beteiligt waren, wurden die Auswirkungen der Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid in den Zelllinien 293 und SQ-20B nach der Röntgenexponierung untersucht. Die Behandlung mit Cycloheximid alleine führte zu einer geringen, aber nachweisbaren Zunahme der Egr-1- und Jun-Transkripte, die gegen 7S normalisiert waren. In der Abwesenheit von CHI kehrte der Spiegel der Egr-1- und Jun-Expression zu dem Grundspiegel zurück. Im Gegensatz dazu zeigten SQ-20B-Zellen, die mit CHI vorbehandelt waren, eine fortdauernde Erhöhung von Egr-1 nach 3 Stdn, und 293-Zellen zeigten eine fortdauernde Erhöhung der Jun-mRNA nach 6 Stdn nach der Bestrahlung, was somit auf eine Superinduktion dieser Transkripte hindeutete.

[0227] Die mRNA-Spiegel der Transkriptionsfaktoren Egr-1 und Jun nahmen nach der Exponierung an ionisierende Strahlung in einer zeit- und dosisabhängigen Weise zu. Die mögliche Bedeutung der Induktion von Egr-1 und Jun durch ionisierende Strahlung wird durch das jüngste Ergebnis veranschaulicht, dass die Induktion der PDGFα-Kette durch Röntgenstrahlung die Proliferation von Gefäßendothelzellen stimuliert (Witte et al., 1989). PDGF besitzt AP-1- und Egr-1-Bindungsdomänen, wogegen TNF Elemente besitzt, die ähnlich zu AP-1- und Egr-1-Zielsequenzen sind (Rorsman et al., 1989; Economou et al., 1989). Die Induktion von PDGF und TNF durch Röntgenstrahlung wird wahrscheinlich durch Egr-1 und Jun reguliert.

[0228] Das folgende Verfahren wird in BEISPIEL 1 verwendet:

Kinase-Inhibitoren

[0229] Die Zelllinie SQ-20B wurde mit 1 μM TPA für 40 Stunden vorbehandelt, um die PKC herunterzuregulieren, und dann mit TPA, Serum oder Röntgenstrahlung (20 Gy) stimuliert. Kontrollen schlossen Röntgenstrahlung ohne TPA-Vorbehandlung, TPA (50 nM) ohne TPA-Vorbehandlung und unbehandelte Zellen ein. Die RNA wurde nach einer Stunde isoliert und an Egr-1 hybridisiert. SQ-20B-Zellen wurden mit 100 μM H7 (1-(5-Isochinolinsulfonyl)-2-methyl-piperazin) oder 100 μM HA1004 (N-(2-Methylamino)ethyl)-5-isochinolinsulfonamid) (Seikagaku America, Inc., St. Petersberg, FL) für 30 Minuten präinkubiert oder für 40 Stdn mit TPA vorbehandelt (1 μM), gefolgt von einer Exponierung an 20 Gy Röntgenstrahlung. Die RNA wurde eine Stunde nach der Bestrahlung extrahiert. Positive Kontrollzellen, die unter den gleichen Bedingungen, aber in der Abwesenheit von Inhibitor behandelt wurden, erhielten ebenfalls 20 Gy, wogegen negative Kontrollzellen weder

H7 noch Röntgenstrahlung erhielten. Die RNA wurde eine Stunde nach 20 Gy ohne Inhibitor extrahiert. Northernblots wurden an Egr-1 oder 7S hybridisiert. 293-Zellen, die mit den oben genannten Inhibitoren vorbehandelt waren, wurden bestrahlt, die RNA wurde nach 3 Stdn extrahiert, und der Northernblot wurde mit Jun- und 7S-Sonden hybridisiert.

BEISPIEL 2: Ionisierende Strahlung aktiviert die Transkription des Egr-1-Gens mittels CArG-Domänen

[0230] Die zelluläre Antwort auf ionisierende Strahlung schließt einen Zellzyklus-spezifischen Wachstumsstopp, die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und die nachfolgende Proliferation von überlebenden Zellen ein. Jedoch bleiben die Ereignisse, die für die Kontrolle dieser Antwort verantwortlich sind, unklar. Jüngste Studien haben gezeigt, dass die Exponierung an ionisierende Strahlung mit der Aktivierung von bestimmten Immediate-Early-Genen assoziiert ist, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Diese schließen Mitglieder der Jun/fos- und Early-Growth-Response-(Egr)-Genfamilien ein (Sherman et al., 1990; Hallahan et al., 1991). Andere Studien haben gezeigt, dass Röntgenstrahlen die Expression und die DNA-Bindungsaktivität des Zellkernfaktors κB (NF-κB; Brach et al., 1991) induzieren.

[0231] Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren könnte die Transduktion von frühen Zellkernsignalen in längerfristige Änderungen der Genexpression darstellen, die die Antwort auf ionisierende Strahlung bilden. In diesem Zusammenhang ist die Bestrahlung von verschiedenen Zelltypen auch mit einer erhöhten Expression der TNF-, PDGF-, FGF- und Interleukin-1-Gene assoziiert (Hallahan et al., 1989; Witte et al., 1989; Woloschak et al., 1990; Sherman et al., 1991). Es ist denkbar, dass die Expression von Zytokinen an der Reparatur und Wiederbesiedlung beteiligt ist, die mit der durch Röntgenstrahlung induzierten Gewebeschädigung assoziiert ist, und sie könnte einige der organismischen Wirkungen von ionisierender Strahlung erklären (Hall 1988). Außerdem ist es möglich, dass Immediate-Early-Transkriptionsfaktoren dazu dienen, diese Änderungen der Genexpression zu induzieren.

[0232] Die vorliegenden Studien beziehen sich auf Mechanismen, die für die durch Röntgenstrahlung induzierte Aktivierung des Egr-1-Gens (auch als zif/268, TIS-8, NFGI-A und Krox-24 bekannt; Sukhatme et al., 1988; Christy et al., 1988; Milbrandt 1987; Lemaire et al., 1988; Lim et al., 1987) verantwortlich sind. Das Egr-1-Gen kodiert ein 533-Aminosäuren-Phosphoprotein aus dem Zellkern mit einer Cys_2-His_2-Zinkfingerdomäne, die teilweise homolog zu der korrespondierenden Domäne in dem Wilms-Tumor-Empfänglichkeitsgen ("Wilms tumor-susceptibility gene") ist (Gessler 1990). Das Egr-1-Protein bindet an die DNA-Sequenz CGC-CCCCGC in einer Zink-abhängigen Weise und funktioniert als ein Regulator der Gentranskription (Christy et al., 1989; Cao et al., 1990; Gupta et al., 1991). Es wurde von sowohl mitogenen als auch Differenzierungssignalen gezeigt, dass sie die schnelle und vorübergehende Expression von Egr-1 in einer Vielzahl von Zelltypen induzieren. Zum Beispiel wird das Egr-1-Gen nach der mitogenen Stimulation von Balb/c-3T3-Zellen durch Serum, PDGF oder FGF induziert (Lau et al., 1987; Sukhatme et al., 1987). Das Egr-1-Gen wird auch während: 1) der kardialen und neuronalen Differenzierung der pluripotenten EC-Linie (Sukhatme et al., 1988); und 2) der monozytischen Differenzierung humaner myeloider Leukämie-Zelllinien (Kharbanda et al., 1991; Bernstein et al., 1991) induziert. Während die Transkription von Egr-1 durch die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität von v-src und v-fps aktiviert wird (Gius et al., 1990; Christy et al., 1989; Homma et al., 1986), deuten weitere Arbeiten darauf hin, dass die Serin/Threonin-Kinase-Aktivität von c-raf-1 auch daran beteiligt ist, die Induzierbarkeit dieses Gens zu vermitteln (Chirgwin et al., 1979). Andere Studien haben gezeigt, dass die Induktion der Egr-1-Expression in vielen Situationen ähnlich zu derjenigen von c-fos ist und dass diese koordinierte Regulation durch die Anwesenheit von Serum-Antwortelementen in beiden Promotoren vermittelt wird (Sukhatme et al., 1988; Cleveland et al., 1980; Wilson et al., 1978).

[0233] Obwohl frühere Arbeiten gezeigt haben, dass die Behandlung mit ionisierender Strahlung mit Zunahmen der Spiegel der Egr-1-mRNA assoziiert ist (Hallahan et al., 1991), sind die für diese Wirkung verantwortlichen Mechanismen unklar. Die vorliegenden Studien zeigen, dass Röntgenstrahlen die Transkription des Egr-1-Gens aktivieren. Serumantwort- oder CArg-Domäne-($CC(A/T)_6GG$-)Domänen in dem 5'-Promotor des Egr-1-Gens sind bei dieser Antwort funktionsfähig. Dies ist der erste Bericht über spezifische DNA-Sequenzen, die an der Regulation der Gentranskription durch ionisierende Strahlung beteiligt sind.

[0234] Ein niedriger, aber nachweisbarer Spiegel von 3,4-kb-Egr-1-Transkripten war in unbehandelten HL-525-Zellen vorhanden. Im Gegensatz dazu war die Behandlung mit ionisierender Strahlung mit einer Zunahme der Egr-1-Expression assoziiert, die nach einer Stunde nachweisbar war. Maximale Zunahmen (18fach) der Egr-1-mRNA-Spiegel wurden nach 3 Stunden erhalten, während längere Zeiträume mit dem Herunterregulieren bis nahezu denjenigen in Kontrollzellen assoziiert waren. Diese vorübergehende Induktion der Egr-1-Expression erfolgte in der Abwesenheit von signifikanten Veränderungen der Spiegel der Actin-mRNA.

[0235] Zellkern-Run-on-Tests wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob durch Röntgenstrahlung induzierte Zunahmen von Egr-1-Transkripten auf der transkriptionellen Ebene kontrolliert werden. Es gab keine nachweisbare Transkription des β-Globingens (Negativkontrolle) in HL-525-Zellen, wogegen das Actingen (Positivkontrolle) konstitutiv transkribiert wurde. Außerdem hatte die Behandlung mit ionisierender Strahlung nur geringe Auswirkungen auf die Transkription dieser Gene. Jedoch war die Transkription des Egr-1-Gens mit niedrigen Spiegeln in Kontrollzellen nachweisbar, die Behandlung mit ionisierender Strahlung führte zu einer 30fachen Zunahme dieser Rate. Zusammengenommen deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die durch Röntgenstrahlung induzierte Egr-1-Expression in erheblichem Maße durch transkriptionelle Mechanismen kontrolliert wird.

[0236] Um die cis-Elemente zu identifizieren, die für die durch Röntgenstrahlung induzierte Egr-1-Transkription verantwortlich sind, wurde die Egr-1-Promotorregion, die sich von der Position –957 stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle bis zu der Position +248 erstreckt, an das CAT-Reportergen ligiert (Plasmid pEgr-1 P1.2). Diese Region enthält mehrere vermutliche cis-Elemente, einschließlich zwei AP-1-Stellen und sechs CArG-Domänen (Christy et al., 1989; Gius et al., 1990). Die Behandlung der mit pEgr-IP1.2 transfizierten Zellen mit ionisierender Strahlung war mit einer 4,1 fachen Zunahme der CAT-Aktivität im Vergleich zu transfizierten, aber unbestrahlten Zellen assoziiert. Im Gegensatz dazu zeigten ähnliche Studien, die mit dem Plasmid pΔEgr-1 P1.2 (–550 bis –50 deletiert) durchgeführt wurden, eine allenfalls geringe Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlen. Diese Daten deuteten darauf hin, dass die Induzierbarkeit von Egr-1 durch Röntgenstrahlung durch Sequenzen vermittelt wird, die sich zwischen –550 und –50 des Egr-1-Promotors befinden. Tatsächlich war die Bestrahlung von mit pE425 transfizierten Zellen mit einer 3,6fachen Induktion der CAT-Aktivität im Vergleich zu derjenigen in unbestrahlten, mit diesem Konstrukt transfizierten Zellen assoziiert.

[0237] Eine Serie von deletierten Egr-1-Promotorkonstrukten wurde als Nächstes verwendet, um die auf Röntgenstrahlung ansprechenden Elemente in pE425 weiter zu definieren. Diese Konstrukte wurden zuvor beschrieben und sind in schematischer Weise in dem Schema 1 gezeigt. Die sequenzielle Deletierung der drei distalen CArGs verringerte in zunehmendem Maße die CAT-Aktivität. pE395 (erstes CArG deletiert) verlieh in einem geringeren Maße als pE425 eine Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung. Die Deletion der ersten und zweiten (pE359) CArGs führte zu weiteren Abnahmen der CAT-Aktivität, während die Deletion der ersten drei CArG-Domänen (pE342) mit allenfalls geringen Zunahmen der CAT-Aktivität assoziiert war. Zusammengenommen unterstützten diese Ergebnisse die Hypothese, dass die drei distalen CArG-Elemente dem Egr-1-Gen eine Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung verleihen.

[0238] Andere Studien wurden mit Fragmenten des Egr-1-Promotors durchgeführt, die mit dem HSV-TK- und dem CAT-Gen verbunden waren. Es gab keine nachweisbare Induzierbarkeit von pTK35CAT durch Röntgenstrahlen. Im Gegensatz dazu sprach pE425/250TK, das die vier distalen CArG-Domänen enthält, stärker auf eine Behandlung mit Röntgenstrahlung an als pTK35CAT. Die Region von –395 bis –250, die das erste CArG-Element ausschließt, war auch funktionsfähig, indem sie dem heterologen Promotor eine Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung verlieh, jedoch in einem geringeren Maß als pE425/250TK. Während diese Ergebnisse die Beteiligung von CArG-Domänen an der durch Röntgenstrahlung induzierten Egr-1-Transkription weiter unterstützten, könnten andere Sequenzen zwischen diesen Domänen die funktionellen cis-Elemente sein. Die Induzierbarkeit der pTK35CAT-Transkription durch Röntgenstrahlung wurde auch mit dem ersten CArG mit sieben Basenpaaren der 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen gezeigt (pSRE1TK).

[0239] Da die Ergebnisse der transienten Expressionstests darauf hindeuteten, dass die CArG-Domäne die Zielsequenz für die durch Röntgenstrahlung vermittelte Aktivierung des Egr-1-Gens ist, wurden andere Studien durchgeführt, um zu bestimmen, ob Zellkernproteine mit diesen Elementen wechselwirken und ob die Behandlung mit Röntgenstrahlung diese Wechselwirkung verändert. Zellkernextrakte aus unbehandelten und mit Röntgenstrahlung behandelten Zellen wurden mit einer ^{32}P-markierten Sonde inkubiert, die die erste CArG-Domäne umfasste. Zellkernproteine aus Kontrollzellen führten zu der Bildung von mehreren DNA-Proteinkomplexen. Ein ähnliches Muster wurde mit Zellkernproteinen aus mit Röntgenstrahlung behandelten Zellen erhalten. Um zu bestimmen, welche Komplexe die CArG-Protein-Bindung widerspiegelten, wurden ansteigende Mengen von unmarkierter Sonde mit den Zellkernproteinen vorinkubiert. In diesen Experimenten hemmte ein 100facher Überschuss an unmarkierter Sonde vollständig die Bildung des Komplexes mit der geringsten Mobilität. Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe eines Oligonukleotids, das die nicht verwandte NF-κB-Konsensussequenz enthielt, keine Auswirkung auf die Intensität dieses Komplexes. Diese Beobachtungen und die Ergebnisse von ähnlichen Gelretardationsstudien mit diesem markierten Fragment (Cleveland et al., 1980) deuten darauf hin, dass der obere Komplex die spezifische CArG-Protein-Wechselwirkung darstellt.

[0240] Die folgenden Verfahren wurden in dem Beispiel 4 verwendet.

[0241] Zellkulturen. Humane HL-525-myeloide Leukämiezellen (Jamal et al., 1990) wurden in RP-MI-1640-Medium unterhalten, das 20 % fetales Rinderserum (FBS) mit 1 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt. Die Bestrahlung (20 Gy) wurde bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Gammacell 1000 (Atomic Energy of Canada Ltd., Ontario) mit einer ^{137}Cs-Quelle durchgeführt, die mit einer festen Dosisrate von 13,3 Gy/min, wie durch Dosimetrie bestimmt, emittierte.

[0242] Isolierung und Analyse von RNA. Die zelluläre Gesamt-RNA wurde durch die Guanidinium-Isothiocyanat-Cäsiumchlorid-Technik (Grosschedl et al., 1985) gereinigt. Die RNA wurde mittels Elektrophorese durch 1-%-Agarose-Formaldehyd-Gele analysiert, auf Nitrozellulosefilter transferiert und mit den folgenden ^{32}P-markierten DNA-Sonden hybridisiert: 1) dem 0,7-kb-nicht-Zinkfinger-Insert einer Egr-1-cDNA aus Maus (9); und 2) dem 2,0-kb-PstI-Insert eines β-Actingens aus Maus, das aus dem pA1-Plasmid gereinigt war (Dignam et al., 1983). Die Hybridisierungen wurden bei 42 °C für 24 h in 50 % (vol/vol) Formamid, 2 × SSC, 1 × Denhardts-Lösung, 0,1 % SDS und 200 µg/ml Lachssperma-DNA durchgeführt. Die Filter wurden zweimal in 2 × SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und dann in 0,1 × SSC, 0,1 % SDS bei 60 °C für 1 Std gewaschen. Die Signalintensität wurde durch Laserdensitometrie bestimmt und gegen diejenige der Actin-Kontrolle normalisiert.

[0243] Zellkern-Run-on-Tests. Zellkerne wurden aus 10^8 Zellen isoliert und in 100 µl Glycerinpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 40 % Glycerin, 5 mM $MgCl_2$ und 0,1 mM EDTA) suspendiert. Ein gleiches Volumen an Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP und 5 mM Dithiothreitol) wurde zu den Zellkernen in der Suspension zugegeben und bei 26 °C für 45 min mit 250 µCi (α-^{32}P) UTP (3000 Ci/mmol; Dupont, Boston, MA) inkubiert. Die Zellkern-RNA wurde wie beschrieben (Kharbanda et al., 1991) isoliert und mit den folgenden DNAs hybridisiert: 1) einem 1,1-kb-BamHI-Insert eines humanen β-Globingens (Negativkontrolle) (Hallahan et al., 1991); 2) einer PstI-Spaltung des pA1-Plasmids, das ein Fragment des β-Actingens aus Huhn enthielt (Positivkontrolle) (Dignam et al., 1983); und 3) dem 0,7-kb-Insert der Egr-1-cDNA aus Maus (Sukhatme et al., 1988). Die gespaltenen DNAs wurden in 1-%-Agarosegelen laufen gelassen und auf Nitrozellulosefilter transferiert. Die Hybridisierungen wurden mit 10^7 cpm ^{32}P-markierter RNA/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4 × SSC, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS, 2 × Denhardts-Lösung, 40 % Formamid und 100 µg/ml Hefe-tRNA für 72 Stdn bei 42 °C durchgeführt. Die Filter wurden gewaschen in: a) 2 × SSC, 0,1 % SDS bei 37 °C für 30 min; b) 200 ng/ml RNase A in 2 × SSC bei Raumtemperatur für 5 min; und c) 0,1 × SSC, 0,1 % SDS bei 42 °C für 30 min.

[0244] Reportertests. Die Konstrukte pEgr-1P1.2, pE425, pE395, pE359, pE342, pE125, pE98 und pE70 wurden wie beschrieben (26) hergestellt. pE425/250TK wurde durch Klonieren eines HindIII-SmaI-Fragments von pE425 konstruiert, das die Region –425 bis –250 des Egr-1-Promotors, stromaufwärts des Promotors der Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK) in dem Plasmid pTK35CAT (Homma et al., 1986) überspannt. pE395/250TK wurde auf die gleiche Weise unter Verwendung eines HindIII-SmaI-Fragments von pE395 konstruiert. pSRE1TK enthielt die 5' am meisten distal gelegene oder erste CArG-Domäne in dem Egr-1-Promotor zusammen mit sieben Basenpaaren der 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen, die in die SalI-BamHI-Stelle von pTK35CAT (Homma et al., 1986) kloniert waren. Die Konstrukte wurden unter Verwendung der DEAE-Dextran-Technik (Treisman et al., 1990) in Zellen transfiziert. Die Zellen (2 × 10^7) wurden in 1 ml Tris-gepufferter Salzlösung (25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,6 mM Na_2HPO_4, 0,7 mM $CaCl_2$ und 0,7 mM $MgCl_2$), die 0,4 mg DEAE-Dextran und 8 µg Plasmid enthielt, bei 37 °C für 45 min inkubiert. Die Zellen wurden mit Medien gewaschen, die 10 % FBS enthielten, in vollständigen Medien resuspendiert und bei 37 °C inkubiert. Sechsunddreißig Stdn nach der Transfektion diente ein Aliquot der Zellen als eine Kontrolle, und das andere wurde mit ionisierender Strahlung behandelt. Die Zellen wurden nach 8 Stunden geerntet und durch drei Zyklen von Gefrieren und Auftauen in 0,25 M Tris-HCl, pH 7,8 und 1 µM Phenylmethylsulfonylfluorid lysiert. Gleiche Mengen der Zellextrakte wurden mit 0,025 µCi (^{14}C)Chloramphenicol, 0,25 M Tris-HCl, pH 7,8 und 0,4 mM Acetyl-Coenzym A für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Enzymtest wurde durch die Zugabe von Ethylacetat beendet. Die organische Schicht, die das acetylierte (^{14}C)Chloramphenicol enthielt, wurde durch Dünnschicht-Chromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95 % : 5 %; vol/vol) aufgetrennt. Nach der Autoradiographie wurden sowohl die acetylierten als auch die nicht-acetylierten Formen von (^{14}C)Chloramphenicol aus den Platten ausgeschnitten, und die Umwandlung von Chloramphenicol in die acetylierte Form wurde durch Messen der Radioaktivität in einem β-Szintillationszähler berechnet.

[0245] Gelretardationstests. Zellkernextrakte wurden wie beschrieben hergestellt (Fisch et al., 1987). Ein synthetisches, doppelsträngiges 40-bp-Oligonukleotid, das das erste CArG-Element enthielt (Cleveland et al., 1980), wurde unter Verwendung der T4-Polynukleotid-Kinase mit (α-^{32}P)-dCTP endmarkiert und dann in einem 5-%-Polyacrylamidgel gereinigt. Die gereinigte, endmarkierte Sonde (1 ng; näherungsw. 1 × 10^5 cpm) wurde mit veränderlichen Mengen von Zellkern-Proteinextrakt für 15 min bei 20 °C in einem Puffer inkubiert, der 12 mM HEPES, pH 7,9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM Dithiothreitol, 6 % (vol/vol) Glycerin, 1 µg Rinderserum-

albumin und 0,25 µg mit Ultraschall behandelte Lachssperma-DNA enthielt. Kompetitionsexperimente wurden entweder mit unmarkierter Sonde oder mit einem 22-bp-Oligonukleotid, das die NF-κB-Bindungsstelle enthielt, durchgeführt. Kompetitierende Oligonukleotide wurden mit dem Zellkern-Proteinextrakt für 20 min bei 4 °C vor der Zugabe der markierten Sonde vorinkubiert. Die endgültigen Reaktionsprodukte wurden durch Elektrophorese in einem 5-%-Polyacrylamidgel analysiert, das ¼ × TBE (22 mM Tris, 22 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) enthielt, und nachfolgende Autoradiographie analysiert.

[0246] In den vorliegenden Untersuchungen antworteten HL-525-Zellen auf ionisierende Strahlung mit der Induktion der Spiegel der Egr-1-mRNA. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ionisierende Strahlung die Egr-1-Expression über Signalwege erhöht, die verschieden von denjenigen sind, die während der Induktion dieses Gens in mit TPA behandelten Zellen aktiviert sind. Außerdem deutet das Ergebnis, dass die durch Röntgenstrahlung induzierte Expression des TNF-Gens in der HL-525-Linie abgeschwächt ist (Gilman 1988), darauf hin, dass ionisierende Strahlung die Egr-1- und TNF-Gene in diesen Zellen über distinkte Signalwege induziert.

[0247] Diese Untersuchungen zeigen außerdem, dass die durch Röntgenstrahlung induzierte Egr-1-Expression zumindest zum Teil durch transkriptionelle Mechanismen reguliert ist. Zellkern-Run-on-Tests zeigten eine Zunahme der Rate der Transkription des Egr-1-Gens nach ionisierender Strahlung. Außerdem zeigte die Analyse des Egr-1-Promotors mit der vollen Länge (pEgr-1P1.2) in transienten Expressionstests die Induzierbarkeit durch ionisierende Strahlung. Die Transfektion von pΔEgr-1P1.2 (–550 bis –50 deletiert) und pE425 lieferte einen zusätzlichen Hinweis, dass die Promotorregion, die die sechs CArG-Elemente enthält, dafür verantwortlich war, die Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung zu verleihen. Diese Ergebnisse wurden durch die Verwendung von mehreren anderen deletierten Promotorkonstrukten unterstützt, die anzeigten, dass die Region, die die ersten drei CArG-Elemente umfasst, bei der Antwort auf Röntgenstrahlung funktionsfähig ist.

[0248] In diesem Zusammenhang beseitigte die schrittweise Deletierung dieser distalen CArGs in zunehmendem Maße die Antwort auf Röntgenstrahlung. Die vier distalen CArGs verliehen auch einem heterologen Promotor eine Induzierbarkeit durch Röntgenstrahlung, und diese Wirkung wurde durch das Deletieren der ersten CArG-Domäne verringert. Noch wichtiger, zeigten Studien mit der ersten CArG-Domäne, dass dieses Element ausreichend war, um die Antwort auf Röntgenstrahlung zu verleihen. Zusammengenommen liefernn diese Ergebnisse einen deutlichen Hinweis auf die CArG-Domäne als das auf Strahlung ansprechende Element.

VERGLEICHSBEISPIEL 3: Durch die Aktivierung von Jun vermitteltes Strahlungssignalisieren

[0249] Ionisierende Strahlung erzeugt bei Zellen ein breites Spektrum von Wirkungen, die die Induktion von Mutationen, Letalität, maligne Transformation in einigen überlebenden Zellen, den Zellzyklus-Stopp und die nachfolgende Proliferation von Zellen einschließen. Jun, ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Bedeutung bei der Förderung von Tumoren, der Proliferation und der Regulation des Zellzyklus hat, wird in Säugerzellen durch DNA-schädigende Mittel aktiviert (Devary 1991 und Bernstein 1989). Ein vorgeschlagener Mechanismus der Jun-Aktivierung ist mittels der Dissoziierung von Jun von einem Inhibitor der Transkription von Jun (Baichwal 1990).

[0250] Um die Proteinbindung an die AP-1-Sequenz nach der Bestrahlung zu untersuchen, wurden Zellkernproteine aus bestrahlten Zellen der humanen Sarkomzelllinie RIT-3 in 5-minütigen Intervallen während 30 Minuten nach der Exponierung an 10 Gy extrahiert. Die mit ^{32}P markierten AP-1-, NFκB -, SP-1- und CTF-Bindungssequenzen wurden mit Zellextrakten inkubiert. Die DNA-Proteingemische wurden dann durch Elektrophorese aufgetrennt. Eine Zunahme der Bindung von Zellkernprotein an AP-1-DNA-Sequenzen wurde nach 10 bis 20 Minuten nach der Bestrahlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen in elektrophoretischen Mobilitätsshifttests gefunden, wogegen es keine Zunahme der Bindung von Zellkernprotein an NF-κB, SP-1, Oct-1 oder CTF nach der Bestrahlung von RIT-3-Zellen gab.

[0251] Die DNA-Protein-Komplexierung wurde durch die Zugabe des Inhibitors der Proteinsynthese Cycloheximid zu Zellen vor der Bestrahlung nicht verhindert. Die Bindung von AP-1 wurde beseitigt, wenn die unmarkierte AP-1-Konsensussequenz (Rauscher 1988) um Zellkernprotein kompetitierte, wenn sie vor der Zugabe von markiertem AP-1 zu den Extrakten zugegeben wurde, und beseitigte die von Extrakten von bestrahlten RIT-3-Zellen erzeugten Banden. Im Gegensatz dazu kompetitierte eine unspezifische DNA-Sequenz (Oct-1) nicht um die Bindung von Zellkernprotein. Diese Daten deuteten darauf hin, dass die Bindung von Zellkernprotein an AP-1 nach der Bestrahlung spezifisch ist.

[0252] Um zu bestimmen, ob AP-1-bindende Zellkernproteine aus bestrahlten RIT-3-Zellen Epitope mit be-

kannten Transkriptionsfaktoren gemeinsam haben, wurden Jun- und fos-Antiseren (Chiles 1991 und Stopera 1992) vor der Zugabe von markierten AP-1-DNA-Sequenzen zu den Zellkernextrakten zugegeben. Die Zugabe von Antiserum gegen die DNA-bindenden Domänen von fos (Ab-2) und Jun (CRB) führte zu einer Verringerung der Proteinkomplexierung an die AP-1-Sequenz nach der Bestrahlung. Dementsprechend verringerten ansteigende Konzentrationen von Antiserum in zunehmendem Maße die Protein-DNA-Komplexe. Diese Daten deuten darauf hin, dass Proteine, die die AP-1-Sequenz nach der Bestrahlung binden, Epitope besitzen, die von dem Antiserum gegen die DNA-Bindungsdomänen von Jun und fos erkannt werden.

[0253] Um zu bestimmen, ob aktiviertes Jun zu einer verstärkten Transkription von der AP-1-Bindungsstelle aus nach der Exponierung an ionisierende Strahlung führt, wurde das Plasmid (p3xTRE-CAT), das drei AP-1-Stellen stromaufwärts des minimalen tk-Promotors (pBLCAT2) enthält, in RIT-3-Zellen transfiziert. Die Bestrahlung von p3xTRE-CAT-Transfektanten führte zu einer 3fachen Zunahme der CAT-Expression. Um zu bestimmen, ob der c-Jun-Promotor durch Strahlung in einer analogen Weise zu Serum und Phorbolestern induziert wird, wurde das stromaufwärts des Chloramphenicol-Acetyltransferase-(CAT-)Gens (Angel 1988) angeordnete 1840-Basenpaar-Segment des c-Jun-Promotors in RIT-3-Zellen transformiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen in 0,2 % fetalem Kälberserum (FCS) unterhalten und 40 Stdn nach der Transfektion bestrahlt (10 Gy, 2 Gy/min) und CAT wurde 5 Stunden nach der Bestrahlung extrahiert.

[0254] Die Transfektion der –1,1-kb- bis +740-bp-Region des c-Jun-Promotors (c-Jun-CAT) zeigte eine 3fache Zunahme der Genexpression nach der Exponierung an ionisierende Strahlung. Die Transfektion des Plasmids mit einer bei +150 bp angeordneten Deletion der AP-1-Stelle (–132/+170 Δ AP-1CAT) führte zu einem Verlust der durch Röntgenstrahlung vermittelten Induktion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das aktivierte AP-1 an der Transkription von c-Jun beteiligt ist und dass die AP-I-DNA-Sequenz ausreichend und notwendig ist, um eine durch Röntgenstrahlung vermittelte Geninduktion zu verleihen.

[0255] Innerhalb des Jun-Proteins existieren mehrere regulatorische und DNA-bindende Domänen. Nahe zu der DNA-Bindungsdomäne befindet sich eine als A_2 bezeichnete Region, die erforderlich ist, um die Transkription zu aktivieren (Übersicht in Lewin 1991). A_1, eine zusätzliche transkriptionelle Aktivierungsdomäne, befindet sich nahe dem N-Terminus, benachbart zu einer Delta (Δ) genannten Region, von der vorgeschlagen wurde, dass sie ein zelluläres Protein bindet, das die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von Jun hemmt (Baichwal 1990 und Baichwal 1991). Die transkriptionelle Aktivität von Jun kann durch eine oder beide Aktivierungsdomänen A_1 und A_2 verliehen werden. Die Behandlung mit Phorbolester führt zu der Modifizierung des Jun-Proteins durch eine von Proteinkinase C (PKC) abhängige Phosphorylierung der A_1-Region und autoinduziert dadurch die Transkription von c-Jun (Binetruy 1991 und Pulverer 1991).

[0256] Die verstärkte Bindung von Jun an AP-1-Sequenzen nach der Bestrahlung deutet darauf hin, dass das Jun-Protein nach der Bestrahlung modifiziert wird. Zusammengenommen mit den jüngsten Ergebnissen, dass PKC nach der Bestrahlung von Zellen aktiviert wird und dass die Depletion von PKC die Induktion von c-Jun durch Bestrahlung unterdrückt (Hallaham 1992), deuten diese Daten darauf hin, dass die Exponierung an Röntgenstrahlung Jun durch die Modifizierung der A_1-Domäne durch PKC aktiviert (Binetruy 1991 und Pulverer 1991).

[0257] Zwei Plasmide wurden in HeLa- und RIT-3-Zellen transfiziert, um die Aktivierung des transkriptionellen Potenzials des Jun-Proteins nach der Bestrahlung zu untersuchen. pSG-Jun5-253 enthält den SV40-Promotor, der auf Strahlung nicht transkriptionell anspricht, stromaufwärts der kodierenden Sequenz für Δ, A_1 und A_2 (Baichwal 1990). Die DNA-Bindungsdomäne von Jun wurde durch die DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Gens aus Hefe ersetzt, das ein Protein kodiert, das an der transkriptionellen Regulation in Hefe beteiligt ist (Baichwal 1990). Ein zweites Plasmid, G5BCAT, enthält die 5' der E1b-TATA-Box, stromaufwärts des CAT-Reportergens angeordnete DNA-Sequenz, die das Gal4-Protein bindet (Baichwal 1990). Wenn die Aktivierungsdomäne des Jun-Proteins transkriptionell aktiv wird, initiiert das chimäre Gal-Jun-Protein die CAT-Transkription nach der Bindung an die Gal4-Bindungssequenz.

[0258] Diese Plasmide wurden mittels Kalziumphosphat-Präzipitation in HeLa- und RIT-3-Zellen cotransfiziert. Die Transfektanten wurden mit 20 Gy bestrahlt und zeigten eine dreifache Zunahme der CAT-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Dieser Expressionsspiegel war mit demjenigen vergleichbar, der nach der TPA-Stimulation beobachtet wurde, die eine 3,5fache Zunahme der CAT-Aktivität erzeugte. Die Bestrahlung von RIT-3-Zellen, die mit G5BCAT alleine transfiziert waren, zeigte keine Zunahme der CAT-Aktivität. Ähnliche Ergebnisse wurden in HeLa-Zellen erhalten, die den Jun-Inhibitor enthalten. Jedoch zeigten Hep-G2-Zellen, die den Jun-Inhibitor nicht enthalten (Baichwal 1990), keine durch Röntgenstrahlung induzierte Aktivierung der Gal4-Jun-Chimäre. Diese Daten deuten darauf hin, dass das Gal-Jun-chimäre Protein nach einer Bestrah-

lung aktiviert wird, was zu der Bindung von DNA führt, um die Transkription von CAT zu beschleunigen.

[0259] Weil die von Röntgenstrahlen induzierte Expression des c-Jun-Gens abgeschwächt wird, wenn PKC depletiert oder gehemmt wird, wurde der PKC-Inhibitor H7 zu RIT-3-Zellen zugegeben, die mit pSG-Jun5-235 und G5BCAT transfiziert waren. Die Behandlung mit H7 setzte die durch Röntgenstrahlung induzierte Zunahme der CAT-Aktivität außer Kraft. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Ergebnissen überein, die zeigten, dass die durch Röntgenstrahlung induzierte PKC-Aktivierung für die Genexpression erforderlich ist (Hallahan 1991).

[0260] Der Inhibitor der Jun-Transkription, der an die Δ/A_1-Domänen bindet, reprimiert die transkriptionelle Aktivität von A_1. Der Inhibitor der Jun-Transkription wurde ursprünglich in Experimenten definiert, in denen ein Überschuss von Jun um den Inhibitor konkurrierte und deshalb dem ungehemmtem Jun erlaubte, die Transkription des G5-CAT-Konstrukts im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu verstärken. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird über HeLa-Zellen berichtet, dass sie den Jun-Inhibitor enthalten (Baichwal 1990), wogegen dies bei HepG2-Zellen nicht der Fall ist. Um zu bestimmen, ob der Jun-Inhibitor in RIT-3-Zellen vorhanden ist, wurde der Expressionsvektor CMV-Jun, der c-Jun konstitutiv exprimiert, mit pSGJun5-235 und G5BCAT cotransfiziert. Die basale Expression von CAT nahm in RIT-3- und HeLa-Zellen, aber nicht in HepG2 zu, wenn CMV-Jun zugegeben wurde. Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern die Ergebnisse von Tijan et al., dass HeLa- und RIT-3-Zellen den Jun-Inhibitor enthalten, HepG2-Zellen dagegen nicht. Zellen, die den Jun-Inhibitor enthalten, zeigen eine Zunahme der durch Strahlung vermittelten Transkription von G5BCAT, wogegen Zellen, die den Inhibitor von Jun nicht enthalten, keine Zunahme der Transkription von G5BCAT zeigen.

[0261] Mit CMV-Jun, pSGJun5-235 und G5BCAT cotransfizierte RIT-3-Zellen zeigen keine Zunahme der Transkription im Vergleich zu diesen Transfektanten, die mit identischen Bedingungen, aber ohne Bestrahlung behandelt wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Dissoziierung von dem Jun-Inhibitor ein Mechanismus der Regulation der durch Strahlung vermittelten Transkription sein könnte.

[0262] Die folgenden Verfahren wurden in dem Vergleichsbeispiel 3 verwendet.

[0263] Zellkernextrakte. Zellkernextrakte wurden gemäß zuvor beschriebenen Verfahren (Schreiber 1989) nach 10, 20, 30 und 60 min nach der Bestrahlung hergestellt. RIT-3-Zellen (10^6) wurden in 10 ml PBS gewaschen, abgeschabt und durch Zentrifugation bei 1500 g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und nochmals für 15 sec pelletiert. Das PBS wurde entfernt und das Zellpellet in 400 µl kaltem Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) resuspendiert. Den Zellen wurde erlaubt, auf Eis für 15 min anzuschwellen, gefolgt von der Zugabe von 25 ml 10 % NP-40. Das Gemisch wurde für 30 sec zentrifugiert und das Zellkernpellet in 50 µl eiskaltem Puffer B (20 mM HEPES, pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) für 15 min resuspendiert und der Zellkernextrakt für 5 min zentrifugiert. Der Proteingehalt wurde nach dem Bradford-Verfahren (Bio-Rad) bestimmt. Die AP-1-Konsensussequenz-DNA (BRL-GIBCO) wurde mit (^{32}P)dATP unter Verwendung des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I endmarkiert.

[0264] Bindungstests. Bindungstests wurden durch Inkubieren der endmarkierten DNA (1 ng) mit 10 µg Zellkernprotein, 75 mM KCl und 1 µg/ml Poly (dI-dC) in einer 20 µl-Reaktion für 20 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

[0265] Kompetitionstests. Kompetitionsstudien wurden unter Verwendung von Oligonukleotiden, die den bekannten cis-aktiven Elementen AP-1 und Oct-1 (BRL-GIBCO) entsprachen, in einem 100fachen molaren Überschuss im Vergleich zu den markierten Fragmenten durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden durch 5-%-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, getrocknet und durch Autoradiographie analysiert.

[0266] Antiseren-Studien. Antiseren gegen die Jun- und fos-Proteine verringerten die durch Strahlung induzierte AP-1-Bindung. A. Antiserum gegen die humanen Transkriptionsfaktoren c-Jun (Aminosäuren 73–87, Ab-2, Oncogene Sci.), c-Jun, Jun-B, Jun-D (Cambridge Research, log OA-11-837) und c-fos (Aminosäuren 4–17, Ab-2, Oncogene Sci. und Aminosäuren 1–14, Charge OA-11-823, Cambridge Research) wurden zu 10 µg Zellkernextrakten in einer 1:200-Verdünnung zugegeben und bei 24 °C unter Schütteln für eine Stunde inkubiert. Die DNA-Segmente wurden wie oben beschrieben zugegeben, gefolgt von der Auftrennung unter Verwendung von elektrophoretischen Mobilitätsshift-Tests.

[0267] Transfektionstests. Plasmide, die c-Jun-CAT, 3xTRE-CAT und ΔAP-1-CAT (2 µg) enthielten, wurden mit einem Plasmid, das einen CMV-Promotor enthielt, der mit dem (3-Galactosidasegen (1 µg) verbunden war, und 12 µg Träger-DNA in RIT-3-Zellen cotransfiziert. Die Zellen wurden unter Verwendung des Lipofectin-Re-

agens (BRL-GIBCO) für 20 Stdn, gefolgt von der Zugabe von Medium mit 0,2 % fetalem Rinderserum transfiziert. Die Transfektanten wurden für 40 Stdn nach der Transfektion inkuziert, gefolgt von einer Behandlung mit 10 Gy (1 Gy/min, GE Maxitron) ionisierender Strahlung, und 6 Stdn später durch Abschaben geerntet. Die Zellen wurden lysiert, und die Extrakte wurden mit (^{14}C)Chloramphenicol und Acetyl-Coenzym A für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die CAT-Aktivität wurde durch Trennen von acetyliertem (^{14}C)Chloramphenicol durch aufsteigende Chromatographie bestimmt. Die Szintillationszählung sowohl der nicht-acetylierten als auch der acetylierten Formen von (^{14}C)Chloramphenicol wurde verwendet, um die CAT-Aktivität zu quantifizieren. Oben sind die Ergebnisse gezeigt von: dem mit CAT verbundenen 1,1-kb-Segment des c-Jun-Promotors (c-Jun-CAT); 3xTRE-CAT; dem ΔAP-1-CAT-Plasmid, in dem die AP-1-Sequenz aus dem c-Jun-Promotor deletiert wurde. Die CAT-Aktivität wird mit unbestrahlten und mit TPA behandelten Transfektanten verglichen. Der Mittelwert und die Standardabweichungen von 3 Experimenten sind wiedergegeben.

[0268] Die Plasmide pSG-Jun5-253 (2 μg) und G5BCAT (4 μg) wurden mit einem Plasmid, das einen CMV-Promotor enthielt, der mit dem β-Galactosidasegen (1 μg) verbunden war, und 12 μg Träger-DNA in RIT-3- und HeLa-Zellen unter Verwendung von Lipofektion cotransfiziert. Die CAT-Aktivität wird mit unbestrahlten und mit TPA behandelten Transfektanten verglichen. Der Mittelwert und die Standardabweichungen von 3 Experimenten sind wiedergegeben.

VERGLEICHSBEISPIEL 4: Beteiligung von reaktiven Intermediaten an der Induktion der Transkription des c-Jun-Gens durch ionisierende Strahlung

[0269] Es wurde postuliert, dass ionisierende Strahlung die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen, den Zellzyklusstopp in der G_2-Phase und die Lethalität entweder durch direkte Wechselwirkung mit der DNA oder durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI), die die DNA schädigen, induziert. Jüngste Studien haben außerdem eine Rolle für die Aktivierung der Immediate-Early-Gene bei der Antwort auf ionisierende Strahlung vorgeschlagen. Zum Beispiel ist das Exponieren von Zellen an Röntgenstrahlen mit der Aktivierung der c-Jun/c-fos- und Egr-1-Genfamilien assoziiert, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Andere Studien haben gezeigt, dass ionisierende Strahlung die Expression und die DNA-Bindungsaktivität des Zellkernfaktors κB (NF-κB) induziert. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren stellt wahrscheinlich einen kritischen Kontrollpunkt bei der Transduktion von frühen Zellkernsignalen in längerfristige Änderungen der Genexpression dar, die die Antwort auf die durch Röntgenstrahlung induzierte Schädigung widerspiegeln. Studien haben gezeigt, dass die Strahlungsbehandlung mit einer erhöhten Expression bestimmter Zytokine, einschließlich TNF, Platelet-Derived-Growth-Factor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor und Interleukin-1, assoziiert ist. Die Zunahme der TNF-Expression nach der Exponierung an ionisierende Strahlung wird durch transkriptionelle Mechanismen reguliert, obwohl nicht bekannt ist, welche DNA-bindenden Proteine diese Induzierbarkeit verleihen.

[0270] Das c-Jun-Gen kodiert für die Hauptform des 40-44-kD-AP-1-Transkriptionsfaktors. Wie in bestrahlten Zellen beobachtet, wird dieses Gen als ein Immediate-Early-Ereignis als Antwort auf Phorbolester und bestimmte Wachstumsfaktoren induziert. Der Jun/AP-1-Komplex bindet an die heptamere DNA-Konsensussequenz $TGA^{G}/_{C}TCA$. Die DNA-Bindungsdomäne von c-Jun ist einer Familie von Transkriptionsfaktoren, einschließlich Jun-B, Jun-D und c-fos, gemeinsam. Außerdem steht die Affinität der Bindung von c-Jun an DNA im Zusammenhang mit der Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren mit Produkten der fos-Genfamilie.

[0271] Jun-B bildet ebenfalls Dimere und bindet an das AP-1-Element, wenn auch die transwirkenden Eigenschaften von Jun-B sich von denjenigen von c-Jun unterscheiden. Während das Produkt des Jun-D-Gens ebenfalls mit c-fos wechselwirkt und ähnliche Bindungseigenschaften wie diejenigen von c-Jun besitzt, ist die Funktion von Jun-D unbekannt. Gewisse Einblicke sind bezüglich der Signale verfügbar, die zu der Regulation dieser Gene beitragen. Zum Beispiel deutete das Ergebnis, dass Phorbolester die Transkription von c-Jun in verschiedenen Zelltypen aktivieren, auf die Beteiligung eines Phosphorylierungs-abhängigen Mechanismus hin. Ein ähnlicher Signalweg scheint zumindest zum Teil eine Rolle bei der Induktion der Expression von c-Jun durch ionisierende Strahlung zu spielen. In dieser Hinsicht ist die länger andauernde Behandlung mit Phorbolestern, um PKC herunterzuregulieren, mit Abnahmen bei den Wirkungen von Röntgenstrahlen auf die Transkription von c-Jun assoziiert. Außerdem blockieren unspezifische Inhibitoren von PKC, wie das Isochinolinsulfonamid-Derivat H7, die durch Röntgenstrahlung induzierte Expression von c-Jun. Zusammengenommen mit dem Nachweis, dass ionisierende Strahlung eine Aktivität mit charakteristischen Eigenschaften von PKC induziert, haben diese Ergebnisse darauf hingedeutet, dass PKC oder eine verwandte Kinase Signale transduziert, die eine Induzierbarkeit des c-Jun-Gens durch Röntgenstrahlung verleihen.

[0272] Die vorliegenden Studien untersuchten die Auswirkungen von ionisierender Strahlung auf die Expres-

sion von c-Jun in einer Variante der HL-60-Zellen, genannt HL-525, die defizient bezüglich der durch PKC vermittelten Signaltransduktion ist. Diese Variante ist sowohl gegenüber der durch Phorbolester induzierten Differenzierung als auch der durch Röntgenstrahlung induzierten Expression des TNF-Gens resistent. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die HL-525-Zellen auch gegenüber der Induktion der Expression von c-Jun durch Phorbolester resistent sind. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Behandlung dieser Zellen mit ionisierender Strahlung mit einer Superinduktion der Spiegel der c-Jun-mRNA im Vergleich zu den auf Phorbolester ansprechenden HL-60-Zellen assoziiert ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Wirkung von ionisierender Strahlung zumindest zum Teil mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten in Zusammenhang steht.

[0273] Frühere Studien haben gezeigt, dass die Behandlung von HL-205-Zellen mit TPA mit der Translokation der PKC-Aktivität aus der cytosolischen Fraktion an die Zellmembran assoziiert ist, wogegen keine zelluläre Umverteilung von PKC während ähnlichen Exponierungen von HL-525-Zellen nachweisbar ist. Weil frühere Arbeiten darauf hindeuteten, dass ionisierende Strahlung die Early-Response-Genexpression mittels eines PKC-abhängigen Mechanismus induziert, wurden Studien durchgeführt, um die Auswirkungen von Röntgenstrahlen auf eine Zelle, wie HL-525, die bezüglich der PKC-vermittelten Signaltransduktion defizient ist, zu bestimmen. Ein niedriger Spiegel von c-Jun-Transkripten war in unbehandelten HL-205-Zellen nachweisbar, während die Behandlung mit ionisierender Strahlung mit einer vorübergehenden Zunahme verbunden war, die nach 3 Stunden maximal war. Die Kinetik und Intensität dieser Antwort waren identisch zu denjenigen, die für die HL-60-Elternzellen berichtet wurden. Die Expression des c-Jun-Gens war auch in unbehandelten HL-525-Zellen niedrig. Jedoch führte die Exponierung dieser Zellen an ionisierende Strahlung zu Spiegeln der c-Jun-mRNA nach 3 Stdn, die 3,5fach höher waren als diejenigen, die in HL-205-Zellen erhalten wurden. Höhere Spiegel der c-Jun-Expression wurden auf ähnliche Weise in HL-525-Zellen nach 6 und 8 Stdn nach der Exponierung an Röntgenstrahlung nachgewiesen. Die Expression der Jun-B- und Jun-D-Gene war nach der Röntgenbestrahlung der HL-205-Linie ebenfalls vorübergehend erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden mit HL-525-Zellen erhalten, obwohl die mRNA-Spiegel für Jun-B und Jun-D nach 3 Stunden in dieser Variante 2,0fach und 2,5fach höher waren als im Vergleich in HL-205-Zellen.

[0274] Von Mitgliedern der Jun-Genfamilie kodierte Proteine können Heterodimere mit fos-Genprodukten bilden. Folglich wurden auch die Auswirkungen von Röntgenstrahlen auf die Expression von c-fos und fos-B untersucht. Transkripte von c-fos waren in niedrigen Spiegeln in HL-205-Zellen vorhanden, und es gab eine allenfalls geringe Auswirkung von ionisierender Strahlung auf die Expression dieses Gens. Ähnliche Ergebnisse wurden für fos-B erhalten. Im Gegensatz dazu war, während die Expression von c-fos und fos-B in HL-525-Zellen ebenfalls gering war, die Exponierung an Röntgenstrahlung mit vorübergehenden Zunahmen der Transkripte für diese beiden Gene assoziiert. Die Kinetik dieser Zunahmen der Expression des fos-Gens war ähnlich zu derjenigen, die für Mitglieder der Jun-Genfamilie erhalten wurde. Somit könnte die Aktivierung von mehrfachen Jun- und fos-Genen zu unterschiedlichen Zellkernsignalen bei der Antwort von Zellen auf Röntgenstrahlen beitragen.

[0275] Die Behandlung von HL-60-Zellen und anderen myeloiden Leukämiezellen mit TPA ist mit der Induktion des c-Jun-Gens assoziiert. Ähnliche Effekte wurden in mit TPA behandelten HL-205-Zellen erhalten. Die Antwort dieser Zellen auf TPA war mit Zunahmen der c-Jun-Expression assoziiert, die nach 6 Stunden nachweisbar waren und nach 24 Stunden maximale Spiegel erreichten. Im Gegensatz dazu führten Exponierungen von HL-525-Zellen an TPA zu einer Zunahme der Expression von c-Jun, die nach 12 Stunden vorübergehend erfolgte und im Vergleich zu derjenigen in der HL-205-Linie abgeschwächt war. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass HL-525-Zellen zumindest zum Teil resistent gegenüber den Auswirkungen von TPA auf die durch Jun/AP-1 vermittelten Signalisierungsereignisse sind. Da TPA die PKC aktiviert und die Translokation dieses Enzyms in HL-525-Zellen nicht nachweisbar ist, wurde die Expression von PKC in den HL-205- und HL-525-Linien verglichen. Von HL-60-Zellen wurde gezeigt, dass sie die α- und β-PKC-Isozyme exprimieren. In der Tat waren die Transkripte für PKCα und PKCβ in HL-205-Zellen nachweisbar. Jedoch war die konstitutive Expression beider Gene in HL-525-Zellen um mehr als 75 % verringert.

[0276] Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die relative Resistenz von HL-525-Zellen gegenüber der durch TPA induzierten Transkription von c-Jun niedrigen Spiegeln der Expression von PKC zugeschrieben werden konnte. Zusammengenommen mit dem Ergebnis, dass die Expression von c-Jun in HL-525-Zellen durch ionisierende Strahlung superinduziert wird, deuteten diese Ergebnisse auch darauf hin, dass die durch Röntgenstrahlung induzierte Expression von c-Jun von Ereignissen vermittelt werden könnte, die von PKCα und PKCβ unabhängig sind.

[0277] Um die für die Induktion der Expression von c-Jun in HL-525-Zellen verantwortlichen Mechanismen

weiter zu definieren, wurden Zellkern-Run-on-Tests durchgeführt, um die Auswirkungen von Röntgenstrahlen auf die Raten der Transkription von c-Jun zu bestimmen. Ähnliche Studien wurden in HL-205-Zellen für Vergleichszwecke durchgeführt. Das Actingen (Positivkontrolle) wurde in HL-205-Zellen konstitutiv transkribiert, während es keine nachweisbare Transkription des β-Globingens (Negativkontrolle) gab. Ähnliche Muster wurden in HL-525-Zellen beobachtet. Die Transkription des c-Jun-Gens war mit niedrigen Spiegeln in beiden Zelltypen nachweisbar. Außerdem führte die Behandlung der HL-205- und HL-525-Linien mit Röntgenstrahlung zu einer 6- bzw. 5fachen Stimulierung der Rate der Transkription von c-Jun. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass andere Mechanismen, möglicherweise auf der posttranskriptionalen Ebene, für die höheren Spiegel der Expression von c-Jun nach der Behandlung von HL-525-Zellen verantwortlich waren.

[0278] Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Stabilität der c-Jun-mRNA nach der Behandlung mit Actinomycin D, um eine weitere Transkription zu hemmen, untersucht. Die Halbwertszeit von c-Jun-Transkripten in mit Röntgenstrahlung behandelten HL-205-Zellen betrug 31 Minuten. Im Gegensatz dazu war die Stabilität dieser Transkripte in bestrahlten HL-525-Zellen 3fach erhöht, mit einer Halbwertszeit von 106 Minuten. Zusammengenommen deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die transkriptionelle Aktivierung des c-Jun-Gens durch Röntgenstrahlen in beiden Zelltypen ähnlich ist, und dass höhere Spiegel der Expression von c-Jun in der HL-525-Variante mit Unterschieden in der posttranskriptionellen Kontrolle in Zusammenhang stehen.

[0279] Das Ergebnis, dass ionisierende Strahlung die Expression von c-Jun in den HL-525-Zellen induziert, die eine alternative Antwort dieser Gene auf TPA zeigen, deutete darauf hin, dass von PKC unabhängige Signalwege diese Auswirkungen von Röntgenstrahlen vermitteln könnten. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass ionisierende Strahlung die Bildung von ROIs induziert. Außerdem haben jüngste Studien gezeigt, dass H_2O_2, ein Wirkstoff, der durch die Produktion von ROIs wirkt, das c-Jun-Gen in HeLa-Zellen aktiviert. Den Wirkungen der ROIs in Zellen wirkt das wohlcharakterisierte Antioxidationsmittel N-Acetyl-L-Cystein (NAC) entgegen. Die Exponierung von HL-205-Zellen an 30 mM NAC hatte eine allenfalls geringe Auswirkung auf die konstitutiven Spiegel von c-Jun-Transkripten. Jedoch hemmte dieser Wirkstoff die durch Röntgenstrahlung induzierten Zunahmen der Expression von c-Jun um mehr als 90 %. Ähnliche Ergebnisse wurden in den HL-525-Zellen erhalten. Diese inhibitorischen Wirkungen von NAC auf die durch Röntgenstrahlung induzierte Expression von c-Jun wurden durch eine Blockierung der transkriptionellen Aktivierung des c-Jun-Gens vermittelt. Während ionisierende Strahlung alleine die Rate der Transkription von c-Jun in HL-525-Zellen 4fach erhöhte, hemmte die Zugabe von NAC diese Antwort um nahezu 90 %.

[0280] Im Gegensatz dazu besaß NAC keine nachweisbare Auswirkung auf die Induktion des c-Jun-Gens in HL-525-Zellen durch 1-β-D-Arabinofuranosylcytosin (ara-C; Daten nicht gezeigt), einen weiteren DNA-schädigenden Wirkstoff, der sich in den DNA-Strang einlagert. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass NAC ein spezifischer Inhibitor der durch Röntgenstrahlung induzierten Transkription von c-Jun ist, vermutlich mittels seiner Auswirkungen auf ROIs.

[0281] Frühere Studien haben gezeigt, dass die zelluläre Antwort auf verschiedene andere Klassen von DNA-schädigenden Mitteln, einschließlich ara-C, UV-Licht, alkylierende Mittel und Etoposid, die Induktion der Expression von c-Jun einschließt. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die DNA-Schädigung per se das für die Aktivierung dieses Gens verantwortliche Signal ist. Diese Antwort scheint eine Proteinkinase einzuschließen, die durch fortgesetzte Exponierung an TPA herunterreguliert wird. Da ROIs die DNA schädigen, wurden Untersuchungen durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Antwort auf diese Zwischenprodukte auch einen TPA-sensitiven Mechanismus einschließt. Die Behandlung der HL-525-Zellen mit TPA alleine für 36–39 Stunden hatte keine nachweisbare Auswirkung auf die Spiegel der c-Jun-mRNA. Jedoch blockierte die Vorbehandlung mit diesem Wirkstoff die durch Röntgenstrahlung induzierten Zunahmen der Expression von c-Jun um mehr als 75 %.

[0282] Ähnliche Studien wurden mit Bryostatin durchgeführt, einem von TPA verschiedenen Wirkstoff, der die PKC ebenfalls vorübergehend aktiviert. Die Behandlung von HL-525-Zellen mit Bryostatin für 36 Stunden besaß eine allenfalls geringe Auswirkung auf die Induktion von c-Jun-Transkripten durch ionisierende Strahlung. Da H_2O_2 mittels der Produktion von ROIs ebenfalls als ein DNA-schädigender Wirkstoff wirkt, wurden ähnliche Studien in HL-525-Zellen durchgeführt, die mit diesem Wirkstoff behandelt wurden. H_2O_2 induzierte vorübergehend die Expression von c-Jun in diesen Zellen, und diese Wirkung wurde durch NAC gehemmt.

[0283] Eine Vorbehandlung mit TPA blockierte die durch H_2O_2 induzierten Zunahmen der Expression von c-Jun um 80 %, wogegen eine ähnliche Exponierung an Bryostatin keine nachweisbare Auswirkung hatte. Zusammengenommen deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass Mittel, wie ionisierende Strahlung und H_2O_2, die ROIs produzierten, die Expression von c-Jun durch einen Mechanismus induzierten, der durch TPA aber

nicht durch Bryostatin herunterreguliert wurde.

[0284] NAC wirkt den Wirkungen von oxidativem Stress entgegen, indem es ROIs abfängt und das intrazelluläre Glutathion (GSH) erhöht. Frühere Studien haben gezeigt, dass NAC ein wirksamer Inhibitor der durch Phorbolester induzierten Aktivierung des langen terminalen Repeats von HIV-1 ist. Es wurde außerdem gefunden, dass dieses Antioxidationsmittel die Aktivierung des Zellkernfaktors κB (NF-κB) durch Phorbolester und andere Mittel, wie H_2O_2, hemmt. Die verfügbaren Ergebnisse deuten darauf hin, dass ROIs NF-κB aktivieren, indem sie die Freisetzung der inhibitorischen Untereinheit IκB induzieren. ROIs werden auch während der Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung gebildet. Somit könnte die zelluläre Antwort auf dieses Mittel die durch ROI induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und somit längerfristige Auswirkungen auf die Genexpression einschließen. Tatsächlich haben jüngste Arbeiten gezeigt, dass die DNA-Bindungsaktivität und die Expression von NF-κB nach der Exponierung an ionisierende Strahlung induziert wird. Jedoch besitzen ROIs extrem kurze Halbwertszeiten, und während die DNA-Bindung von NF-κB in mit Röntgenstrahlungen behandelten Zellen schnell zunimmt, ist es nicht klar, ob diese Wirkung direkt oder indirekt mit der Bildung von Sauerstoffradikalen in Zusammenhang steht.

[0285] Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen deuten darauf hin, dass ROIs ebenfalls zu der Aktivierung der Transkription von c-Jun durch ionisierende Strahlung beitragen. Dieses Ereignis wurde durch NAC gehemmt. Außerdem erhöhte H_2O_2 die Expression von c-Jun, und diese Wirkung wurde auf ähnliche Weise durch NAC gehemmt. Während diese Ergebnisse eine unspezifische Hemmung der Expression von c-Jun widerspiegeln könnten, besaß NAC keine nachweisbare Auswirkung auf die durch ara-C-induzierten Zunahmen der c-Jun-Transkripte. Ara-C schädigt DNA durch Einlagerung in sich verlängernde Stränge, und es ist von ihm nicht bekannt, dass es seine zytotoxischen Wirkungen durch ROIs vermittelt. Interessanter Weise schließt die zelluläre Antwort auf ara-C auch die Aktivierung von NF-κB ein. Da ROIs die DNA in bestrahlten und mit H_2O_2 behandelten Zellen schädigen, könnte diese Schädigung das mit Mitteln wie ara-C gemeinsame Ereignis darstellen.

[0286] Andere Studien deuteten darauf hin, dass die Induktion der Expression von c-Jun durch ionisierende Strahlung durch einen von PKC abhängigen Mechanismus vermittelt wird.

[0287] Eine fortgesetzte Behandlung mit TPA, um PKC herunterzuregulieren, führt zu einer deutlichen Abschwächung des c-Jun-Gens durch Röntgenstrahlen, die ebenfalls von H7, einem unspezifischen Inhibitor von PKC, aber nicht durch HA1004, einem selektiveren Inhibitor von von zyklischem Nukleotid abhängigen Proteinkinasen, gehemmt wird. Folglich sollten Zelllinien, wie HL-525, die bezüglich des durch PKC vermittelten Signalwegs defizient sind, wahrscheinlich mit einer abgeschwächten Induktion der Expression von c-Jun auf ionisierende Strahlung antworten. Tatsächlich ist die Aktivierung der Expression von TNF in mit Röntgenstrahlung behandelten HL-525-Zellen im Vergleich zu auf TPA ansprechenden HL-60-Linien verringert. Außerdem unterstützt das vorliegende Ergebnis, dass die Behandlung von HL-525-Zellen mit TPA mit einer abgeschwächten c-Jun-Antwort assoziiert ist, einen Defekt bei den durch PKC vermittelten Ereignissen, die die Expression von c-Jun kontrollieren. Dennoch antworteten HL-525-Zellen auf ionisierende Strahlung mit einer Zunahme der Expression von c-Jun, die tatsächlich ausgeprägter war, als diejenige, die in HL-205-Zellen erhalten wurde.

[0288] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zunahme der Spiegel der c-Jun-mRNA durch die Aktivierung der Transkription von c-Jun reguliert wird, sowie von einer Verlängerung der Halbwertszeit dieser Transkripte. Andere Mitglieder der Jun/fos-Familie (Jun-B, Jun-D, c-fos, fos-B) wurden ebenfalls nach der Exponierung der HL-525-Variante an Röntgenstrahlung induziert, während die Behandlung dieser Zellen mit TPA zu einer allenfalls geringen Auswirkung auf die Expression dieser Gene führte. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ionisierende Strahlung die Expression von Jun/fos über Signalwege erhöht, die distinkt von denjenigen sind, die während der Induktion dieser Gene in mit TPA behandelten Zellen aktiviert werden.

[0289] Die Grundlage für das Fehlen der Umverteilung von PKC in mit TPA behandelten HL-525-Zellen ist unklar. Dennoch könnte die Translokation von PKC aus dem Cytosol an die Zellmembran für bestimmte durch TPA induzierte Signalisierungsereignisse notwendig sein, wie die Induktion der Expression von c-Jun. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Translokation an die Zellmembran für die Aktivierung von jeder der verschiedenen PKC-Isoformen notwendig ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die fortgesetzte Behandlung der HL-525-Variante mit TPA die durch Röntgenstrahlung induzierte Zunahmen der Expression von c-Jun blockiert. Dieses Ergebnis unterstützt die Beteiligung eines von PKC abhängigen Mechanismus.

[0290] Die HL-525-Variante exprimiert relativ niedrige Spiegel von PKCα und PKCβ im Vergleich zu

HL-205-Zellen. Niedrige bis nicht nachweisbare Spiegel der PKCγ-mRNA wurden ebenfalls sowohl in der HL-205- als auch der HL-525-Linie gefunden (Daten nicht gezeigt). Somit könnten andere PKC-Isoenzyme, die gegenüber einem Herunterregulieren von PKC empfindlich sind, für die Transduktion von Signalen verantwortlich sein, die eine Induzierbarkeit des c-Jun-Gens durch Röntgenstrahlung verleihen. Alternativ dazu könnte eine fortgesetzte Behandlung mit TPA ein Herunterregulieren von anderen, von PKC unabhängigen Signalwegen verursachen, die an der Induktion von c-Jun durch ionisierende Strahlung beteiligt sind. Von der Behandlung mit Röntgenstrahlung wurde zuvor gezeigt, dass sie mit der Aktivierung einer PKC-ähnlichen Aktivität assoziiert ist.

[0291] Die folgenden Verfahren wurden in dem Vergleichsbeispiel 4 verwendet.

[0292] Zellkultur. Der Klon HL-205 wurde aus der humanen myeloiden Leukämie-Zelllinie HL-60 isoliert. Die mit HL-525 bezeichnete, gegenüber Phorbolester resistente Variante von HL-60-Zellen wurde isoliert, indem Wildtyp-Zellen niedrigen Konzentrationen von 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-l3-acetat (TPA; 0,5 bis 3 nM) für 102 Passagen ausgesetzt wurden. Diese Zellen wurden in RPMI-1640-Medium unterhalten, das 20 % fetales Rinderserum (FBS) mit 1 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt. Die Bestrahlung wurde bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Gamma Cell 1000 (Atomic Energy of Canada Ltd., Ontario) mit einer ^{13}Cs-Quelle, die mit einer festen Dosisrate von 14,3 Gray (Gy)/min, wie durch Dosimetrie festgestellt, emittierte, durchgeführt.

[0293] Isolierung und Analyse von RNA. Die zelluläre Gesamt-RNA wurde durch die Guanidiniumisothiocyanat-Cäsiumchlorid-Technik gereinigt. Die RNA wurde durch Elektrophorese durch 1 %-Agarose-Formaldehydgele gereinigt, auf Nitrozellulosefilter transferiert und mit den folgenden ^{32}P-markierten DNA-Sonden hybridisiert: 1) dem 1,8-kb-BamHI/EcoRI-Insert des aus einem pBluescript-SK(+)-Plasmid gereinigten humanen c-Jun-Gens; 2) dem 1,5-kb-EcoRI-Fragment der Jun-B-cDNA aus Maus aus dem p465.20-Plasmid; 3) Jun-D; 4) dem aus dem pc-fos-1-Plasmid gereinigten 0,9-kb-ScaI/NcoI-Insert des humanen c-fos-Gens; 5) dem aus dem pA1-Plasmid gereinigten 2,0-kb-PstI-Insert eines β-Actingens aus Huhn; und 6) dem aus dem pE4-Plasmid gereinigten 1,9-kb-BamHI/PstI-Insert einer humanen TNF-cDNA. Die Hybridisierungen wurden bei 42 °C für 24 Stdn in 50 % (vol/vol) Formamid, 2 × SSC, 1 × Denhardts-Lösung, 0,1 % SDS und 200 µg/ml Lachssperma-DNA durchgeführt. Die Filter wurden zweimal in 2 × SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und dann in 0,1 × SSC, 0,1 % SDS bei 60 °C für 1 Stunde gewaschen.

[0294] Zellkern-Run-on-Tests. Zellkerne wurden aus 10^8 Zellen isoliert und in 100 µl Glycerinpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 40 % Glycerin, 5 mM $MgCl_2$ und 0,1 mM EDTA) suspendiert. Ein gleiches Volumen an Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP und 5 mM Dithiothreitol) wurde zu den Zellkernen in der Suspension zugegeben und bei 26 °C für 30 min mit 250 µCi (α-^{32}P)UTP (3000 Ci/mmol; Dupont, Boston, MA) inkubiert. Die Zellkern-RNA wurde wie beschrieben isoliert und an die folgenden DNAs hybridisiert: 1) eine PstI-Spaltung des pA1-Plasmids, das ein Fragment des β-Actingens aus Huhn enthielt; und 2) eine BamHI/EcoRI-Spaltung des pBluescript-SK(+)-plasmids, das ein Fragment des humanen c-Jun-Gens enthielt. Die gespaltenen DNAs wurden in 1-%-Agarosegelen laufen gelassen und auf Nitrozellulosefilter transferiert. Hybridisierungen wurden mit 10^7 cpm von ^{32}P-markierter RNA/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4 × SSC, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS, 2 × Denhardts-Lösung, 40 % Formamid und 100 µg/ml Hefe-tRNA für 72 Stdn bei 42 °C durchgeführt. Die Filter wurden gewaschen in: a) 2 × SSC, 0,1 % SDS bei 37 °C für 30 min; b) 200 ng/ml RNase A in 2 × SSC bei Raumtemperatur für 5 min; und c) 0,1 × SSC, 0,1 % SDS bei 42 °C für 30 min.

BEISPIEL 3: Protokoll für die Behandlung von Kopf- und Halskrebs mit durch Röntgenstrahlung induziertem TNF und therapeutischen Röntgenstrahlen

[0295] Für die Behandlung von Patienten mit Kopf- und Halskrebs werden die folgenden Schritte befolgt:

1. Herstellen eines DNA-Moleküls (genetischen Konstrukts), das einen, wie in den Patentansprüchen definierten, auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor umfasst, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die ein Polypeptid kodiert.
   Dieses Konstrukt umfasst vorzugsweise eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors und das Gen für den Tumor-Nekrose-Faktor. Dieses Konstrukt wird für die Zwecke dieses Beispiels als „Konstrukt A" bezeichnet.
2. Das „Konstrukt A" wird in ein Retrovirus eingeführt, das selbst-inaktivierend ist.
3. Lymphokin-aktivierte Killer-(LAK-)Zellen werden mit dem Retrovirus infiziert, das das „Konstrukt A" trägt. Die Zellen sollen gegen die bösartigen Zellen in dem Hals und Nacken gerichtet werden.
4. Die infizierten LAK-Zellen werden in den zu behandelnden Patienten infundiert.
5. Die Kopf- und Halsregion wird bestrahlt.

[0296] Die vorstehenden Beispiele veranschaulichen bestimmte Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung. Ein gewöhnlicher Fachmann wird ohne Weiteres erkennen, dass Veränderungen, Modifikationen und Änderungen dieser Ausführungsbeispiele durchgeführt werden können, ohne den wahren Umfang des Erfindungsgedankens zu verlassen.

QUERVERWEISE

[0297] Die unten aufgelisteten Querverweise und alle hierin zitierten Querverweise sind in dem Maße, in dem sie hierin verwendete Methodiken, Techniken und/oder Zusammensetzungen ergänzen, erläutern, einen Hintergrund für sie liefern oder sie lehren, durch Verweis hierin einbezogen.

Alexandropoulos, K., Qureshi, S.A., Rim, M., Sukhatme, V.P. und Foster, D.A. (1992) Nucl. Acids. Res. 20, 2355–2359.
Andrews, G.K., Harding, M.A., Calvert, J.P. und Adamson, E.D. (1987) Mol. Cell. Biol. 7, 3452–3458.
Angel, P., Poting, A., Mallick, U., Rahmsdorf, H.J., Schorpp, M. und Herrlich, P. (1986) Mol. Cell. Biol. 6, 1760–1766.
Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Dallus, H., Rahmsdorf H.J. und Herrlich, P. (1987) Mol. Cell. Biol. 7, 2256–2266.
Angel, P. Allegretto, E.A., Okino, S., Hattori, K., Boyle, W.J., Hunter, T. und Karin, M. (1988a) Nature (London) 332, 166–171.
Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. & Karin, M. (1988a) Cell 55, 875–885.
Attar, R.M. und Gilman, M.Z. (1992) Mol. Cell. Biol. 12, 2432–2443.
Baichwal, V.R. & Tjian, R. (1990) Cell 63, 815–825.
Baichwal, V.R. & Tjian, R. (1991) Nature 352, 165–168.
Ballard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 1875.
Becker, R.C., Corrae, J.M., Harrington, R., et al. (1991) Am. Heart J.
Bernstein, L.R. & Colburn, N.H. (1989) Science 244, 566–569.
Bernstein, S.H., Kharbanda, S.M., Sherman, M.L., Sukhatme, V P. und Kufe, D.W. (1991) Cell Growth and Diff. 2, 273–278.
Bevelacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A. und Seed, B. (1989) Science 243, 1160-1165.
Binetruy, B., Smeal, T. & Karin, M. (1991) Nature 351, 122–127.
Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K und Tjian, R (1987) Science 238, 1386–1392.
Querverweise (fortges.)
Bonura, T. und Smith, K.C. (1976) Int. J. Radiat. Biol 29, 293–296.
Boothman, D.A., Bouvard, I. und Hughes, E.N. (1989) Cancer Res. 49, 2871–2878.
Borek, C. (1985) Pharmacol. Ther. 27, 99–142.
Brach, M.A., Hass, R., Sherman, M., Gunji, H., Weichselbaum, R. und Kufe, D. (1991) J. Clin Invest. 88, 691–695.
Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojikler, M. & Karin, M. (1989) Nature 337, 661-663.
Brott, T., Cerebrovase Brain Metab. Rev. 3, 91–113 (1991).
Buscher, M., Rhamsdorf, H.J., Litfin, M., Karin, M. und Herrlich, P. (1988) Oncogene 3, 301–311.
Cao, X., Koski, R.A., Gashler, A., McKiernan, M., Morris, C.F., Gaffney, R., Hay, R.V. und Sukhatme, V.P. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 1931–1939.
Carswell, E.A. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3666–3670.
Cathala, G., Savouret, J.F., Mendez, B., West, B.L., Karin, M., Martial, J.A. und Baxter, J.D. (1983) DNA 2, 329–335.
Chaudhary, V.K., FitzGerald, D.J., Adhya, S., et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4538–42.
Chiles, T., Liu, J. & Rothstein, T. (1991) J. Immunol. 146, 1730–1735.
Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. und Rutter, W.J. (1979) Biochemistry 18, 5294–5299.
Christy, B.A., Lau, L.F., Nathans, D. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7857–7861.
Christy, B.A. und Nathans, D. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 8737–8741.
Cleveland, D.W., Lopata, M.A., MacDonald, R.J., Cowan, N.J., Rutter, W.J. und Kirschner, M.W. (1980) Ce1l 20, 95–105.
Curran, T., Franza, B.R. (1988) Cell 55, 395–397.
Dalton, S. und Treisman, R. (1992) Cell 68, 597–612.
Querverweise (fortges.)
Devary, Y., Gottlieb, R. A., et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11, 2804–2811.
Dewey, W.C. (1979) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5, 1165–1174.
Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. und Roeder, R.G. (1983) Nucl. Acids. Res. 11, 1475–1489.
Diller (1990) Molec. Cell Biol. 10, 5772.

Economou, J.S., Rhoades, K., Essner, R., McBride, W.H., Gasson, J.C. und Morton, D.L. (1989) J. Exp. Med. 170, 321–326.
Endo, Y. & Tsurngi, K. (1987) J. Biol. Chem. 262, 8128–8130.
Ezzeddine, Z.D., Martuza, R.L., Platika, D., et al. (1991) New Biol. 3, 608–14.
Fauser, A.A. (1991) J. Cell. Biochem. 45, 353–358.
Fisch, T.M., Prywes, R. und Roder, R.G. (1987) Mol. Cell. Biol. 8, 2159–2165.
Fornace, A.J., Alamo, I. und Hollander, M.C. (1988a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8800–8804.
Fornace, A.J., Jr., Schalch, H. und Alamo, I., Jr. (1988b) Mol. Cell. Biol. 8, 4716–4720.
Fornace, A.J., Zmudzka, B., Hollander, M.C. und Wilson, S.H. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 851–853.
Gessler, M. (1990) Nature 343, 774–778.
Gilman, M. Z. (1988) Genes Dev. 2, 394–402.
Gius, D., Cao, X., Rauscher, F.J. III, Cohen, D.R., Curran, T. und Sukhatme, V.P. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 4243–4255.
Golumbek, P.T., Lazenby, A.J., Levitsky, H.I., et al. (1991).
Graham, R. und Gilman, M. (1991) Science 251, 189–192.
Grosschedl, R. und Baltimore, D. (1985) Cell 41, 885–897.
Gupta, M.P., Gupta, M., Zak, R. und Sukhatme, V.P. (1991) J. Biol. Chem. 266, 12813–12816.
Querverweise (fortges.)
Hadley, S.W., Wilbur, D.S., Gray, M.A., et al. (1991) Bioconjug. Chem. 2, 171 179.
Halazonetis, T.D., Georgopoulos, K., Greenberg, M.E., & Leder, P. (1988) Cell 55, 917–924.
Hall, E.J. (1988) in Radiobiology for the Radiologist, Hrsg. Hall, E.J. (Lippincott, Philadelphia), S. 17–38.
Hallahan, D.E., Spriggs, D.R., Beckett, M.A., Kufe, D.W. und Weichselbaum, R.R. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10104–10107.
Hallahan, D.E., Beckett, M.A., Kufe, D., et al. (1990) Int. J. Rad. Onc. Biol. 19, 69–74.
Hallahan, D.E., Sukhatme, V.P., Sherman, M.L., Virudachalam, S., Kufe, D.W. und Weichselbaum, R.R. (1991a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2156–2160.
Hallahan, D.E., Virudachalam, S., Sherman, M.L., Huberman, E., Kufe, D.W., & Weichselbaum, R.R. (1991b) Cancer Res. 51, 4565–4569.
Hattori, K., Angle, P., LeBeau, M.M. und Karin, M. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9148–9152.
Herrlich, P. (1987) Accomplishments in Cancer Research (Lippincott, Philadelphia), S. 213–228.
Hollander, C.M. und Fornace, A.J., Jr. (1989) Cancer Res. 49, 1687–1693.
Homma, Y., Henning-Chub, C.B. und Huberman, E. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7316–7321.
Johnson, P., Gray, D., Mowat, M., et al. (1991) Mol. Cell Biol. 11, 1–11.
Kalderon, D., Roberts, B., Richardson, W. G. und Smith, A. E. (1984) Cell 39, 499–509.
Kharbanda, S., Nakamura, T., Stone, R., Hass, R., Bernstein, S., Datta, R., Sukhatme, V. P. und Kufe, D. (1991) J. Clin. Invest. 88, 571–577.
Kolch (1991) Nature 349, 426.
Lambert, M. und Borek, C. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80, 1492–1497.
Lau, L.F. und Nathans, D. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1182–1186.
Querverweise (fortges.)
Lemaire, P., Revelant, O., Bravo, R. und Charnay, P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4691–4695.
Levine, S.R., & Brott, T.G. (1992) Prog. Cardiovasc. Dis. 34, 235–262.
Lewin, B. (1991) Cell 64, 303–312.
Little, J.W. und Mount, D.W. (1982) Cell 29, 11–22.
Lim, R.W., Varnum, B.C., Herschman, H.R. (1987) Oncogene 1, 263–270.
Lory (1988) J. Bacteriology 170, 714.
Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M. und Harrison, S. C. (1992) Nature, 356, 408–453.
Matthews, N., Neale, M.L., Fiera, R.A., Jackson, S.K. und Stark, S.M. (1988) Tumor Necrosis Factor/Cachectin and Related Cytokinesis, Hrsg. Bonavida, B., Gifford, G.E., Kirchner, H. & Old, L.J. (Karger, New York), S. 20–25.
Matthews, N., Neale, M.L., Jackson, S.K. und Stark, J.M. (1987) Immunology 62, 153–155. Milbrandt, J., (1987) Science 238, 797–799.
Miskin, R. und Ben-Ishai, R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6236–6240.
Mitchell, P.J., & Tijan, R. (1989) Science 245, 371–378.
Moulder, J.E. und Rockwell, S. (1984) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 10, 695–712.
Nakabeppu, Y., Ryder, K., & Nathans, D. (1988) Cell 55, 907–915.
Neale, M.L., Fiera, R.A. und Matthews, N. (1988) Immunology 64, 81–85.
Neta, R., Vogel, S. N., Sipe, J.D., et al. (1988) Lymphokine Res. 7, 403–411.
Neta, R., Oppenheim, J.J., Schreiber, R.D., et al. (1991) J. Exp. Med. 173, 1177–1182.
Neta, R., Perlstein, R., Vogel, S.N., et al. (1992) J. Exp. Med. 175 689–694.

Old, L.J. (1985) Science 230, 630–634.
Querverweise (fortges.)
Overell, R.W., Weisser, K.E., Hess, B.W., et al. (1991) J. Immunol. Methods 141, 53–62.
Papathanasiou, M., Barrett, S.F., Hollander, M.C., Alamo, J., Jr., Robbins, J.H., Fornace, A.J., Jr. (1990) Proc. Ann. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 31, A1802.
Prywes, R. und Roeder, R. G. (1986) Cell 47, 777–784.
Prywes, R., Dutta, A., Cromlish, J.A. und Roeder, R.G. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7206–7210.
Pulverer, B.J., Kyriakis, J., Avruch, J., et al. (1991) Nature 353, 670–674.
Qureshi, S.A., Cao, X., Sukhatme, V.P. und Foster, D.A. (1991a). J. Biol. Chem. 266, 10802–10806.
Qureshi, S.A., Joseph, C.K., Rim, M., Maroney, A. und Foster, D.A. (1991b) Oncogene 6, 995–999.
Qureshi, S.A., Rim, M., Bruder, J., Kolch, W., Rapp, U., Sukhatme, V.P. und Foster, D.A. (1991) J. Biol. Chem. 266, 20594–20597.
Rauscher, F. J. (1988) Cell 52, 471–480.
Roeske, J.C., Chen, G.T., Atcher, R.W., et al. (1990) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 19, 1539–1548.
Rollins, B.J. (1992) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 7, 126–127.
Rorsman, F., Bywater, M., Knott, T.J., Scott, J. und Betsholtz, C. (1989) Mol. Cell. Biol. 8, 571–577.
Rubin, B.Y., Smith, L.J., Hellerman, G.R., Lunn, R.M., Richardson, N.K und Anderson, S.L. (1988) Cancer Res. 48, 6006–6010.
Ryan, Jr., W.A., Franza, Jr., R.B. und Gilman, M. Z. (1989) EMBO J. 8, 1785–1792.
Ryder, K., Lau, L.F. und Nathans, D. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1487–1491.
Sakihama, K., Eizuru, Y. & Minamishima, Y. (1991)Acta Virol. (Praha) 35, 127–34.
Sariban, E., Imamura, K., Luebbers, R. und Kufe, D. (1988) J. Clin. Invest. 81, 1506–1510.
Querverweise (fortges.)
Scanlon, M., Laster, S.M., Wood, J.G. & Gooding, L.R. (1989) Cell Biol. 86, 182–186.
Schorpp, M., Mallick, V., Rahmsdorf H.J. und Herrlich, P. (1984) Cell 37, 861–868.
Sersa, G., Willingham, V. und Milas, L. (1988) Int. J. Cancer 42, 129–134.
Shaw, P.E., Schroter, H. und Nordheim, A. (1989) Cell 56, 563–572.
Sheng, M., Dougan, S.T., McFadden, C. und Greenberg, M.E. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 2787–2796.
Sherman, M.L., Datta, R., Hallahan, D.E., Weichselbaum, R.R., Kufe, D.W. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5663–5666.
Sherman, M.L., Datta, R., Hallahan, D.E., Weichselbaum, R.R. und Kufe, D.W. (1991) J. Clin, Invest. 87, 1794–1797.
Sherman, M.L., Stone, R.M., Datta, R., Bernstein, S.H. und Kufe, D.W. (1990) J. Biol. Chem. 265, 3320–3323.
Steiner, B. (Williams Wilky, 1984) Treatment of arteriovenous malformations by radiosurgery 1-295-313.
Stopera, S., Davie, J. & Bird, R. (1992) Carcinogen. 13, 573–578.
Stumpo, D., Stewart, T.N., Gilman, M.Z. und Blackshear, P.J. (1988) J. Biol. Chem. 263, 1611–1616.
Sugarman, B.J., Aggarwai, B.B., Huas, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A., Jr. und Shepard, H.M. (1985) Science 230, 943–945.
Sukhatme, V.P., Cao, X., Chang, L.L., Tsai-Morris, C.-H., Stamenkovich, D., Ferreira, P.C.P., Cohen, D.R., Edwards, S.A., Shows, T.B., Curran, T. LeBeau, M.M. und Adamson, E.D. (1988) Cell 53, 37–43.
Sukhatme, V.P., Kartha, S., Toback, F.G., Taub, R., Hoover, R.G. und Tsai Morris, C.-H. (1987) Oncogene 1, 343–355.
Tiefenbrunn, A.J. (1992) Am. J. Cardiol. 69.
Treisman, R.H. (1986) Cell 46, 567–574.
Treisman, R. (1990) Semin. Cancer Biol. 1, 47–58.
Querverweise (fortges.)
Triezanberg, S., Kingsbury, R.C. und McKnight, S.L. (1988) Genes & Development, 2, 718–729.
Trubetskoy, V.S., Torchilin, V.P., Kennel, S.J., Huang, L. (1992) Bioconjugate Chem., 3, 323–327.
Tsai-Morris, C.-H., Cao, X. und Sukhatme, V.P. (1988) Nucleic Acids Research 16, 8835–8846.
Uckun, F.M., Gillis, S., Souza, L., et al. (1989) Int. J. Radiol. Onc. Biol. Phys. 16, 415–435.
Unlap, T., Franklin, C.C., Wagner, F., et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20, 897902 van Straaten, F., Muller, R., Curran, T., van Beveren, C. und Verma, I.M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3183–3187.
Waddick, K.G., Song., C.W., Souza L., et al. (1991) Blood 77, 2364–2371.
Walsh, K. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 2191–2201.
Wang, A.M., Creasg, A.A., Lander, M.B., Lin, L.S., Strickler, J., Van Arsdell, J.N., Yanamotot, R. und Mark, D.F. (1985) Science 228, 149–154.
Weichselbaum, R.R., Nove, J. und Little, J.B. (1980) Cancer Res. 40, 920–925.
Weichselbaum, R.R., Dahlberg, W., Beckett, M.A., Karrison, T., Miller, D., Clark, J. und Ervin, T.J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2684–2688.
Weichselbaum, R.R., Beckett, M.A., Simon, M.A., McCowley, C., Haraf, D., Awan, A., Samuels, B., Nachman,

J. und Drtischilo, A. (1988) Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 15, 937-942.
Wilson, J.T., Wilson, L.B., deRiel, J.K., Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Forget, B.G. und Weissman, S.M. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 563–580.
Witte, L., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., Vlodavsky, I., Goodman, D.S. und Eldor, A. (1989) Cancer Res. 49, 5066–5072.
Woloschak, G.E., Chang-Liu, C.M., Jones, P.S. und Jones, C.A. (1990) Cancer Res. 50, 339–344.
Wong (1985) Science 228, 149.
Querverweise (fortges.)
Wong, G.W.H. und Goeddel, D.V. (1988) Science 242, 941–943.
Wong, G.H.W., Elwell, J.H., Oberly, L.H., Goeddel, D.V. (1989) Cell 58, 923–931.
Wong, G., McHugh T., Weber, R., et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 4372–4376.
Yamuchi, N., Karizana, H., Watanabe, H., Neda, H., Maeda, M. und Nutsu, Y. (1989) Cancer Res. 49, 1671–1675.
Zimmerman, R.J., Chan, A. und Leadon,S.A. (1989) Cancer Res. 49, 1644–1648.
Zorial, M., Toschi, L., Ryseck, R. P., Schuermann, M., Muller, R., & Bravo, R. (1989) EMBO J. 8, 805–813.
Zucker, M.B. & Katz, J.R. (1991) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 198, 693–702.

Patentansprüche

1. Synthetisches DNA-Molekül, umfassend einen auf Strahlung ansprechenden Enhancer-Promotor, der funktionell mit einer kodierenden Region verbunden ist, die wenigstens ein Polypeptid kodiert, wobei das Polypeptid das Wachstum einer Zelle bei der Induktion des Promotors durch Strahlung hemmt, wobei die kodierende Region funktionell mit einer Transkriptions-terminierenden Region verbunden ist, wobei der auf Strahlung ansprechende Enhancer-Promotor wenigstens eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors umfasst.

2. DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei der auf Strahlung ansprechende Enhancer-Promotor eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors umfasst, wobei die CArG-Domäne zwischen der Position –425 und der Position –395 des Egr-1-Promotors angeordnet ist.

3. DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei der auf Strahlung ansprechende Enhancer-Promotor wenigstens eine der drei am meisten distal gelegenen CArG-Domänen eines Egr-1-Promotors umfasst, wobei die drei am meisten distal gelegenen CArG-Domänen zwischen der Position –425 und der Position –342 des Egr-1-Promotors angeordnet sind.

4. DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei der auf Strahlung ansprechende Enhancer-Promotor drei CArG-Domänen eines Egr-1-Promotors umfasst, wobei drei CArG-Domänen zwischen der Position –395 und der Position –250 des Egr-1-Promotors angeordnet sind.

5. DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei der durch Strahlung induzierbare Promotor sechs CArG-Domänen eines Egr-1-Promotors umfasst.

6. DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei der auf Strahlung ansprechende Promotor ein Egr-1-Promotor ist.

7. DNA-Molekül nach einem beliebigen der Ansprüche 1–6, wobei das kodierte Polypeptid ein Zytokin, ein Tumor-supprimierender Faktor oder ein Angiogenesehemmer ist.

8. DNA-Molekül nach einem beliebigen der Ansprüche 1–6, wobei das kodierte Polypeptid der Tumor-Nekrose-Faktor alpha ist.

9. DNA-Molekül nach einem beliebigen der Ansprüche 1–6, wobei das kodierte Polypeptid die Umwandlung eines Pro-Wirkstoffs in einen Wirkstoff katalysiert.

10. DNA-Molekül nach Anspruch 9, wobei das kodierte Polypeptid die Herpessimplex-Virus-Thymidin-Kinase oder eine Cytosin-Deaminase ist.

11. DNA-Molekül nach einem beliebigen der Ansprüche 1–10, wobei der auf Strahlung ansprechende Promotor-Enhancer 1205 Nukleotide oder weniger enthält.

12. DNA-Molekül nach einem beliebigen der Ansprüche 1–11 zur Verwendung in einem Verfahren zur Hemmung des Wachstums eines Tumors.

13. Mit einem DNA-Molekül nach einem beliebigen der Ansprüche 1–11 transformierte oder transfizierte Zelle.

14. Transformierte oder transfizierte Zelle nach Anspruch 13, die eine Tumorzelle ist.

15. Vehikel, das ein DNA-Molekül nach einem beliebigen der Ansprüche 1–11 enthält.

16. Vehikel nach Anspruch 15, wobei das Vehikel ein Virus ist.

17. Vehikel nach Anspruch 15, wobei das Vehikel ein Antikörper ist, der mit einem Antigen eines Tumors immunreagiert.

18. Vehikel nach einem beliebigen der Ansprüche 15–17 zur Verwendung in einem Verfahren zur Hemmung des Wachstums eines Tumors.

19. In-vitro-Verwendung des Vehikels nach einem beliebigen der Ansprüche 15–17 in einem Verfahren zur Verabreichung eines Proteins an eine Tumorzelle.

20. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen physiologisch annehmbaren Träger und ein DNA-Molekül gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1–11.

21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei das kodierte Polypeptid der Tumor-Nekrose-Faktor alpha ist.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Vehikel gemäß einem beliebigen der Ansprüche 15–17 oder eine transformierte oder transfizierte Zelle gemäß einem beliebigen der Ansprüche 13–14 und einen physiologisch annehmbaren Träger.

23. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem beliebigen der Ansprüche 20–22 zur Verwendung in einem Verfahren zur Hemmung des Wachstums eines Tumors.

24. In-vitro-Verwendung eines Strahlungs-empfindlichen Enhancer-Promotors, der wenigstens eine CArG-Domäne eines Egr-1-Promotors umfasst, zur auf Strahlung ansprechenden Expression wenigstens eines Polypeptids, dass das Wachstum einer Zelle hemmt.

25. Verwendung eines DNA-Moleküls nach einem beliebigen der Ansprüche 1–11 oder einer transformierten oder transfizierten Zelle nach einem beliebigen Ansprüche 13–14 oder eines Vehikels nach einem beliebigen der Ansprüche 15–17 zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Krebs, sekundären Malignitäten, die sich als eine Nebenwirkung einer Standardradio- und -chemotherapie ergeben, Ataxia teleangiectatica und/oder Xeroderma pigmentosum.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

