(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Oktober 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/79537 A2

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/02234

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Februar 2001 (28.02.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 18 465.0 14. April 2000 (14.04.2000) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO KG** [DE/DE]; 65926 Frankfurt (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **BAUER, Bettina** [DE/DE]; Johannesallee 15, 65929 Frankfurt (DE). **SCHNEIDER, Eberhard** [DE/DE]; Atzelbergweg 1, 65779 Kelkheim/Eppenheim (DE). **BARTEL, Marion** [DE/DE]; Cöthnerstrasse 55, 04155 Leipzig (DE). **WAGNER, Peter** [DE/DE]; Im Altenhof 4, 65510 Idstein (DE).

(74) Anwalt: **ACKERMANN, Joachim**; Postfach 11 13 26, 60048 Frankfurt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** TEST SYSTEM FOR DETECTING A SPLICING REACTION AND USE THEREOF

(54) **Bezeichnung:** TESTSYSTEM ZUM NACHWEIS EINER SPLEISSREAKTION, SOWIE DESSEN VERWENDUNG



(57) **Abstract:** The invention relates to a homogenous test system containing the following: (a) at least one or more, identical or different mobile nucleic acids with at least one spliceable nucleic acid, containing at least one intron; (b) at least two probes, containing corresponding fluorophores which preferably bind with the 5' and/or 3' ends of an exon/intron; (c) at least one gel-free detecting system for detecting a splicing reaction; and optionally (d) at least one composition containing splicing components; and (e) other auxiliary agents.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein homogenes Testsystem enthaltend (a) mindestens eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene mobile Nukleinsäuren mit mindestens einer spleissfähigen Nukleinsäure, enthaltend mindestens ein Intron, (b) mindestens zwei Sonden, enthaltend korrespondierende Fluorophore, welche vorzugsweise an den 5' und/oder 3' Enden eines Exon/Intron binden, (c) mindestens ein gelfreies Nachweissystem zum Nachweis einer Spleissreaktion, gegebenenfalls (d) mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleisskomponenten, (e) weitere Hilfsmittel.

WO 01/79537 A2

Testsystem zum Nachweis einer Spleißreaktion, sowie dessen Verwendung

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein homogenes Testsystem enthaltend

(a) mindestens eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene mobile Nukleinsäuren mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäure, enthaltend mindestens ein Intron
(b) mindestens zwei Sonden, enthaltend korrespondierende Fluorophore, welche vorzugsweise an den 5´ und / oder 3´ Enden eines Exon / Intron binden
(c) mindestens ein gelfreies Nachweissystem zum Nachweis einer Spleißreaktion, gegebenenfalls
(d) mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten,
(e) weitere Hilfsmittel

Die meisten für Proteine kodierenden Gene in Eukaryonten werden in ihrer Form im Genom durch eine oder mehrere nicht für das Protein kodierende Sequenzen (Introns) unterbrochen. Bei der Transkription der genomischen DNA in die Boten-RNA (messenger RNA = mRNA) werden diese nicht-codierenden Bereiche (Introns) in das primäre Transkript übernommen. Um eine korrekte Form der mRNA zu generieren, muß diese Vorläufer-mRNA (Prä-mRNA) prozessiert werden.

Die Prozessierung der Prä-mRNA geschieht durch Entfernen der Introns und Fusion der kodierenden Bereiche (Exons). Erst dann kann ein ununterbrochen zu lesender Nukleotidstrang für die Translation im Zytoplasma zur Verfügung gestellt werden. Die Bildung von mRNA in Eukaryonten erfordert daher einen sogenannten Spleißprozess, in dem die nicht kodierenden Genbereiche (Introns) aus dem primären Gentranskript entfernt werden.

Das Spleißen findet im Kern statt, bevor die mRNA aus dem Kern transportiert wird. Es wird im allgemeinen in einem Zwei-Stufen-Mechanismus durchgeführt, in dem jeweils ein Transesterifizierungsschritt beteiligt ist (Moore, J.M. et al., (1993) Splicing of precursors to messenger RNAs by the Spliceosome. In The RNA world, Edited by

Gesteland R.F., Gesteland, J.F., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 303-358). Der erste Schritt generiert ein freies 5´-Exon und eine sogenannte Lariat-Struktur des Introns, welches immer noch mit dem 3´-Exon verbunden ist. Die Lariat-Struktur enthält eine verzweigte RNA, die durch eine Veresterung des 5´-Endes des Introns mit einer 2´-Hydroxyl-Gruppe einer Ribose in einem Adenosin, das ca. 20 - 40 Nukleotide stromaufwärts des 3´-Endes des Introns gelegen ist, der sogenannten Branch-site, entsteht. Der zweite katalytische Schritt führt zu einer Ligation der Exons und der Freisetzung des Introns. Obwohl keine Nukleotide während dieser Reaktionen eingebaut werden, ist eine Energiequelle, beispielsweise ATP, für diese Katalyse notwendig (Guthrie, C. (1991) Science, 253, 157).

An dem Vorgang des mRNA-Spleißens sind mehrere Faktoren beteiligt. Zwei Klassen von Spleiß-Faktoren werden zur Zeit unterschieden. Die erste Klasse besteht aus vier in der Evolution stark konservierten Protein-RNA-Partikeln (small nuclear ribonucleoprotein particles = snRNPs): U1, U2, U4/U6 und U5, die entweder eine (U1, U2, U5) oder zwei (U4/U6) snRNA Komponenten enthalten (Moore, J.M. et al., (1993) supra; Guthrie, (1991) supra; Green, M.R. (1991). Annu. Rev. Cell Biol., 7, 559). Die zweite Klasse besteht aus bisher wenig charakterisierten Proteinen, die nicht fest an die snRNPs gebunden sind und daher nicht-snRNP Spleiß-Faktoren genannt werden (Lamm, G.M. & Lamond, A.J. (1993) Biochim. Biophys. Acta, 1173, 247; Beggs, J.D. (1995), Yeast splicing factors and genetic strategies for their analysis, In: Lamond, A.I. (ed) Pre- mRNA Processing Landes, R.G. Company, Texas, pp. 79-95. Krämer, A. (1995), The biochemistry of pre-mRNA splicing. In: Lamond, A.I. (ed), Pre-mRNA Processing. Landes, R.G. Company, Texas, pp. 35-64).

Die Zusammensetzung der snRNPs ist am besten in HeLa-Zellen untersucht (Will, C.L. et al., (1995) Nuclear pre-mRNA splicing. In: Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. (eds). Nucleic Acids and Molecular Biology. Springer Verlag, Berlin, pp. 342-372). Bei relativ geringen Salzkonzentrationen, bei denen Kern-Extrakte aus HeLa-Zellen das Spleißen von Prä-mRNA in vitro bewirken können, liegen die snRNPs in einem 12S U1 snRNP, einem 17S U2 snRNP und einem 25S [U4/U6.U5] tri-snRNP Komplex vor. Bei höheren Salzkonzentrationen (ca. 350-450 mM) dissoziiert der tri-snRNP-Komplex in einen 20S U5- und einen 12S U4/U6-Partikel. Die U4 und U6

RNAs liegen im U4/U6 snRNP über zwei intermolekulare Helices basengepaart vor (Bringmann, P. et al. (1984) EMBO J., 3, 1357; Hashimoto, C. & Steitz, J.A. (1984) Nucleic Acids Res., 12, 3283; Rinke, J. et al., (1985) J. Mol. Biol., 185, 721; Brow, D.A. & Guthrie, C. (1988) Nature, 334, 213).

Die snRNPs bestehen aus zwei Gruppen von Proteinen. In allen snRNPs ist die Gruppe der allgemeinen Proteine (B/B´, D1, D2, D3, E, F und G) enthalten. Zusätzlich enthält jeder snRNP spezifische Proteine, die nur in diesem enthalten sind. So enthält nach dem bisherigen Stand der Forschung der U1 snRNP drei zusätzliche Proteine (70K, A und C) und der U2 snRNP elf weitere Proteine. Der 20S U5 snRNP trägt nach bisherigem Kenntnisstand neun weitere Proteine mit einem Molekulargewicht von 15, 40, 52, 100, 102, 110, 116, 200 und 220 kDa, während der 12S U4/U6 snRNP zwei zusätzliche Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 60 und 90 kDa enthält. Der 25S tri-snRNP [U4/U6.U5] enthält fünf zusätzliche Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 15.5, 20, 27, 61 und 63 kDa. (Behrens, S.E. & Lührmann, R. (1991) Genes Dev., 5, 1439; Utans, U. et al., (1992) Genes Dev., 6, 631; Lauber, J. et al., (1996) EMBO J., 15, 4001; Will, C.L. et al. (1995), supra, Will, C.L. & Lührmann, R. (1997) Curr. Opin. Cell Biol., 9, 320-328).

Die Zusammensetzung der Spleiß-Komponenten bei Saccharomyces cerevisiae sind noch nicht im Detail untersucht. Biochemische und genetische Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, daß die Sequenzen sowohl der snRNAs als auch der snRNP-Proteine in der Evolution hoch konserviert sind (Fabrizio, P. et al., (1994) Science, 264, 261; Lauber, J. et al., (1996), supra, Neubauer, G. et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 385; Krämer, A. (1995), supra; Beggs, J.D. (1995); supra, Gottschalk, A. et al. (1998) RNA, 4, 374-393).

Um einen funktionellen Spleiß-Komplex (Spliceosom) zu bilden, werden die einzelnen Komponenten (prä-mRNA, snRNPs und nicht-snRNP-Proteine) in einem stufenweisen Prozeß zusammengeführt. Dies wird nicht nur durch Interaktionen der prä-mRNA mit den Protein-haltigen Komponenten, sondern auch durch zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den Protein-haltigen Komponenten selbst erreicht (Moore, J.M. (1993) supra; Madhani, H.D. & Guthrie, C. (1994) Annu. Rev. Genetics, 28, 1; Nilsen, T.W. (1994) Cell, 65, 115). Die Prä-mRNA trägt in ihrer Sequenz

spezifische Erkennungssequenzen für die unterschiedlichen Spleißkomponenten. Zunächst bindet das U1 snRNP über diese Erkennungssequenzen an die 5´-Spleiß-Region des Introns der prä-mRNA. Gleichzeitig lagern sich eine noch nicht genau bestimmte Anzahl verschiedener weiterer Faktoren (z.B. SF2/ASF, U2AF, SC35, SF1) an diesen Komplex an und kooperieren mit den snRNAs in der weiteren Formierung des Prä-Spliceosoms. Das U2 snRNP-Partikel interagiert mit der sogenannten Branch-Site im Intron-Bereich (Krämer, A. & Utans, U. (1991) EMBO J., 10, 1503; Fu, X.D. & Maniatis, T. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89, 1725; Krämer, A. (1992) Mol. Cell Biol., 12, 4545; Zamore, P.D. et al. (1992) Nature, 355, 609; Eperon, J.C. et al. (1993) EMBO J., 12, 3607; Zuo, P. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3363; Hodges, P.E. & Beggs, J.D. (1994) Curr. Biol. 4, 264; Reed, R. (1996) Curr. Op. Gen. Dev., 6, 215). In einem letzten Schritt der Bildung des Spliceosoms interagiert der [U4/U6.U5] tri-snRNP und eine Anzahl bisher nicht genauer charakterisierter Proteine mit dem Prä-Spliceosom, um das reife Spliceosom zu bilden (Moore, J.M. et al., (1993) supra).

Für den Vorgang des Spleißens werden verschiedene Wechselwirkungen zwischen Prä-mRNA, snRNAs und sn-RNP gelöst und neue gebildet. So ist bekannt, daß vor oder während des ersten katalytischen Schritts der Spleißreaktion in den interagierenden Strukturen von U4 und U6 zwei Helices voneinander getrennt und durch neue Interaktionen Basenpaarungen zwischen U2- und U6-RNAs gebildet werden (Datta, B. & Weiner, A.M. (1991) Nature, 352, 821; Wu, J.A. & Manley, J.L. (1991) Nature, 352, 818; Madhani, H.D. & Guthrie, C. (1992) Cell, 71, 803; Sun, J.S. & Manley, J.L. (1995) Genes Dev., 9, 843; . Gleichzeitig wird die Bindung von U1 an die 5´Spleißstelle gelöst und die prä mRNA bindet sich an die Erkennungssequenz ACAGAG der U6 snRNA (Fabrizio, P. & Abelson, J. (1990) Science, 250, 404; Sawa, H. & Abelson, J. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 11269; Kandels-Lewis, S. & Séraphin, B. (1993) Science, 262, 2035; Lesser, C.F. & Guthrie, C. (1993) Science, 262, 1982; Sontheimer, E.J. & Steitz, J.A. (1993) Science, 262, 1989; . Das U5 snRNP interagiert über seinen konservierten Loop 1 mit Exon-Sequenzen, die nahe an den 5´- und 3´-Spleißstellen gelegen sind. Dieser Vorgang scheint sequenziell abzulaufen, während der gesamte Spleiß-Prozess von Stufe 1 zu Stufe 2 fortschreitet (M. McKeown, (1992) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 8: 133-155Newman, A. & Norman, C. (1991) Cell, 65, 115; Wyatt, J.R. et al., (1992) Genes

Dev., 6, 2542; Cortes, J.J. et al. (1993) EMBO J., 12, 5181; Sontheimer, E.J. & Steits, (1993) supra). Nach der Beendigung der Spleiß-Reaktion wird die reife mRNA freigesetzt und das Spliceosom dissoziiert (Moore, J. M. et al., (1993) supra).

Durch alternatives Spleißen können aus ein und demselben Primärtranskript verschiedene reife mRNAs gebildet werden, die für verschiedene Proteine kodieren. Dieses alternative Spleißen ist in vielen Fällen regulie rt. So kann dieser Mechanismus z.B. dazu genutzt werden, von einem nicht funktionellen zu einem funktionellen Protein umzuschalten (z. B. Transposase bei Drosophila). Weiterhin ist bekannt, daß alternatives Spleißen gewebespezifisch durchgeführt wird. So wird z.B. die Tyrosin-Kinase, die vom src-Proto-Oncogen codiert wird, in Nervenzellen durch alternatives Spleißen in einer speziellen Form synthetisiert.

Fehlerhaft reguliertes oder ausgeführtes alternatives Spleißen kann zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Bei Patienten, die an der Grave´s Krankheit leiden, ist gezeigt worden, daß durch fehlerhaftes Spleißen ein entscheidendes Enzym (Thyroperoxidase) in einer inaktiven Form entsteht (Zanelli, E. (1990) Biochem. Biophys. Res. Comm., 170, 725). Untersuchungen für die Krankheit Spinale Muskelatrophy weisen darauf hin, daß ein defektes Genprodukt des Gens SMN (Survival of motor neurons) zu einer erheblichen Störung der Bildung der snRNPs führt. Durch die Inhibierung des Spleißapparates der Muskelneuronen, kommt es zu einer Paralyse der Nervenzellen und zu einem Abbau des Muskelgewebes (Fischer, U. et al., (1997), Cell, 90: 1023-9; Liu, Q. et al. (1997), Cell, 90: 1013-21; Lefebvre, S. et al, (1997) Nat. Genet., 16, 265). Bei der Metastasierung von Krebszellen scheinen unter anderem bestimmte alternative Spleißvarianten von dem membranständigen Molekül CD44 eine entscheidende Rolle zu spielen. Das CD44-Gen enthält mehrere Exons, von denen 10 nebeneinanderliegende Exons in unterschiedlicher Anordnung bei der mRNA-Generierung aus der prä-mRNA gespleißt werden. Bei Ratten Karzinomazellen wurde nachgewiesen, daß metastasierende Varianten die Exons 4 bis 7 oder 6 bis 7 tragen. Mit Hilfe von Antikörpern gegen den von Exon 6 kodierten Teil des Proteins konnte die Metastasierung wirksam unterdrückt werden (Sherman, L., et al., (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 213: 249-269). Spleißmutanten des APC-(Adenomatöse Poliposis Coli)-Onkogen, die aus Patienten Familiärer Adomatöser

Poliposis (FAP) isoliert wurden, bringen verkürzte Proteine als Folge von fehlerhaftem alternativem Spleißen, wobei Exon 9, 10A und 14 herausgeschnitten werden, hervor (Bala, S., et al., (1996) Hum Genet 98(5): 528 – 533).

Fehlerhaftes Spleißen kann zu stark ausgeprägten Phänotypen des betroffenen Organismus führen. So ist bekannt, daß eine Punktmutation in einem Intron des ß-Globin zu einer ß$^+$-Thalassaemie führen kann. Durch den Basenaustausch entsteht ein falscher Spleißort, der zu einem veränderten Leseraster und zu einer vorzeitigen Termination der Peptidkette führt (Weatherall, D.J. & Clegg, J.B. (1982) Cell, 29, 7; Fukumaki, Y. et al. (1982) Cell, 28, 585). Bei Arabidopsis thaliana Mutanten führt z. B. eine Punktmutation an der 5´ Spleißstelle des Phytochrom B Gens zu einer fehlerhaften Expression des Gens. Durch diese Veränderung kann ein Intron nicht entfernt werden, welches ein Stopcodon in seiner Sequenz enthält. Die Entwicklung der Pflanzen ist gestört, da das Gen an der Phytomorphogenese beteiligt ist (Bradley, J.M. et al. (1995) Plant Mol. Biol, 27, 1133).

Bisher sind nur wenige Arbeiten bekannt geworden, in denen eine Beeinflussung von Spleißvorgängen in der Zelle beschrieben worden sind. So kann mit Hilfe von Antiseren oder monoklonalen Antikörpern gegen Komponenten des Spleißapparates die Generierung von reifer mRNA verhindert werden (Padgett, R.A. et al. (1983) Cell, 35, 10; Gattoni, R. et al. (1996) Nucleic Acid Res., 24, 2535).

Das NS1-Protein, das durch das Genom des Influenza Virus codiert wird, kann ebenfalls durch Bindung an die U6 snRNA in das Spleißen eingreifen. Das Protein bindet an die Nukleotide 27-46 und 83-101 der humanen U6 snRNA und verhindert so, daß U6 während des Ablaufs des Spleißvorganges mit den Partnern U2 und U4 interagieren kann (Fortes, P. et al. (1994) EMBO J., 13, 704; Qiu, Y. & Krug, R.M. (1995) J. Virol., 68, 2425. Darüberhinaus scheint das NS1 Protein auch über Bindung an den poly-A-Schwanz der gebildeten mRNA einen Export aus dem Kern zu verhindern (Fortes, P. et al. (1994), supra; Qiu, Y. & Krug, R.M. (1994), supra). Ähnliche Wirkungen werden von einem Genprodukt des Herpes Simplex Virus Typ 1 Genoms beschrieben. Das Protein ICP27 konnte in in vitro Experimenten das

Spleißen von einer Modell-RNA (ß-Globin-Prä-mRNA) wirkungsvoll verhindern (Hardy, W.R. & Sandri-Goldin, R.M. (1994) J. Virol., 68, 7790). Außerdem scheinen Peptide, die aus der C-terminalen Domäne der großen Untereinheit der RNA Polymerase II generiert wurden, ebenfalls in die Spleiß-Vorgänge eingreifen zu können (Yurvey, A. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 93, 6975; WO97/20031). Der Einbau von künstlichen Nukleotidanaloga (5-Fluor-, 5-Chlor- oder 5-Bromuridin) in die zu spleißende mRNA kann ebenfalls zu einer Inhibierung des Spleißvorganges in vitro führen (Sierakowska, H. et al. (1989) J. Biol. Chem., 264, 19185; Wu, X.P. & Dolnick, B. (1993) Mol. Pharmacol., 44, 22).

Eine Anzahl von weiteren Untersuchungen betrifft die Wirkung von Anti-Sense-Oligonukleotiden auf das Spleißen. So scheint das Verhältnis von zwei unterschiedlichen Spleißprodukten der c-erb-Onkogen-mRNA (c-erbA-alpha 1 und 2) der Ratte durch eine weitere mRNA, rev-ErbA-alpha, reguliert zu werden. Rev-ErbA-alpha ist eine natürlich vorkommende anti-Sense-RNA, die mit der c-erbA-alpha 2 mRNA aber nicht mit der c-erbA-alpha 1 mRNA paart. Das Spleißen der c-erbA-alpha prä-mRNA zur c-erbA-alpha 2 mRNA konnte durch einen Überschuß an rev-ErbA-alpha mRNA-Konstrukten, die komplementär zur 3´-Spleißstelle waren, wirkungsvoll inhibiert werden (Munroe, S.H. & Lazar, M.A., (1991) J. Biol. Chem., 266(33), 22083). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß durch Generierung von anti-sense-RNA, die an die Intron-Sequenzen der zu spleißenden mRNA binden, ebenfalls Spleißen inhibiert werden kann (Volloch, V.et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm., 179, 1600). Hodges und Crooke konnten zeigen, daß bei schwach erkannten Spleißstellen die Bindung von Oligonukleotiden ausreicht, um erfolgreich das Spleißen zu unterbinden. Werden dagegen bevorzugt erkannte Spleißstellen in die Konstrukte eingebaut, werden Oligonukleotide benötigt, die zusätzliche eine Aktivierung der RNase H bedingen können (Hodges, D. & Crooke S.T. (1995) Mol. Pharmacol., 48, 905). Eine genauere Analyse der für das Spleißen benötigten Sequenzen der prä-mRNA zeigte, daß 19 Nukleotide stromaufwärts vom Branch-Point Adenosin und 25 Nukleotide um die 3´- und 5´-Spleiß-Stelle geeignete Sequenzen zur Generierung von Antisense RNAs sind (Dominski, Z. & Kole, R. (1994) Mol. Cell Biol., 14, 7445). Insbesondere für die Hemmung von Viren wurden Untersuchungen mit Antisense Molekülen gemacht. Viren, die höhere Organismen

befallen, tragen oft Intron-enthaltende Gene in ihrem Genom. So konnte gezeigt werden, das Antisense Oligonukleotide gegen die 3´-Spleißstelle des immediate early Prä-mRNA 4/5 Gens des Herpes simplex Virus in Vero-Zellen die Replikation des Virus hemmen konnte (Iwatani, W. et al. (1996) Drug Delivery Syst., 11, 427).

Zur Untersuchung des Spleiß-Mechanismus wird im allgemeinen zunächst eine prä-mRNA durch in vitro Transkription hergestellt. Hierzu werden genetische Konstrukte aus Viren, z. B. Adenoviren, oder zellulärer Strukturgene verwendet. Derartige prä-mRNAs enthalten alle wichtigen Strukturelemente, die für die Erkennung der prä-mRNA durch das Spliceosom und den Ablauf des Spleißens notwendig sind. Im allgemeinen wird die Prä-mRNA radioaktiv markiert, damit man nach der Auftrennung in einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgrund der charakteristischen Bandenmuster beurteilen kann, ob eine Spleißreaktion stattgefunden hat, bzw. bei welchem Reaktionsschritt eine Störung stattgefunden hat. Derartige Testsysteme sind jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig und daher nicht für das systematische Auffinden von Substanzen, die das Spleißen modulieren können, geeignet.

In der älteren deutschen Patenanmeldung der Anmelderin 199 09 156 wird ein in-vitro Spleißassay offenbart, welches auf einfache und effektive Art und Weise eine große Anzahl von Verbindungen aus chemischen oder natürlichen Substanzbibliotheken auf ihre Wirkung beim Spleißen von Nukleinsäuren untersuchen kann (sog. High Throughput Screening). Hierbei müssen jedoch die spleißfähigen Nukleinsäuren immobilisiert werden. Es liegt daher ein heterogenes System vor, welches diverse Waschschritte erfordert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein homogenes Testsystem zu finden, mit dem auf einfache und effektive Art und Weise eine große Anzahl von Verbindungen aus chemischen oder natürlichen Substanzbibliotheken auf ihre Wirkung beim Spleißen von Nukleinsäuren untersucht werden können (sog. High Throughput Screening).

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß ein homogenes Testsystem mit einem gelfreien Nachweissystem mit spezifischen Sonden, in dem alle Komponenten sich mobil in einer löslichen Phase befinden, zum Nachweis einer Spleißreaktion geeignet ist, die oben beschriebenen Nachteile der gängigen Testsysteme zu überwinden und somit für das homogene High Throughput Screening beispielsweise in einer Roboteranlage geeignet ist.

Die Aufgabe wird durch die spezifsche Wahl der Sonden gelöst.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein homogenes Testsystem enthaltend

(a) mindestens eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene mobile Nukleinsäuren mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäure, enthaltend mindestens ein Intron
(b) mindestens zwei Sonden, enthaltend korrespondierende Fluorophore, welche vorzugsweise an den 5´ und / oder 3´ Enden eines Exon / Intron binden
(c) mindestens ein gelfreies Nachweissystem zum Nachweis einer Spleißreaktion, gegebenenfalls
(d) mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten,
(e) weitere Hilfsmittel

Für ein homogenes Testsystem sind daher geeignete Sonden zu generieren, die den Nachweis des erfolgten Spleißens bzw. des nicht erfolgten Spleißens ermöglichen. Die Sonden gemäß (b) können vorzugsweise mittels Hybridisierung an die zu untersuchende Nukleinsäure binden.

Die hierzu notwendigen, zu Teilsequenzen der spleißfähigen Nukleinsäure komplementären Nukleinsäuren solcher Sonden sind zu mindestens einer Teilsequenz eines Introns und einer Teilsequenz eines Exons oder mindestens zu zwei Teilsequenzen zweier Exons komplementär. Die prinzipielle Anordnung ist in Figur 1a)-d) gezeigt.

Vorzugsweise befinden sich die komplementären Sonden an den Enden des Introns oder Exons und erzeugen aufgrund korrespondierender Flurophore in der ungespleißten spleißfähigen Nukleinsäure oder im Spleißprodukt ein detektierbares Signal, durch welche der Reife-Zustand der RNA (pre-mRNA oder mRNA) charakterisiert und untersucht werden kann.

Unter der Bezeichnung Fluorophor sind dem Fachmann Moleküle bekannt, deren physikalisches Verhalten sich dadurch auszeichnet, daß sie durch eine distinkte Wellenlänge angeregt, d.h. auf ein höheres Energieniveau gehoben werden und diese zusätzliche Energie in Form von Licht einer längeren Wellenlänge abgeben, wenn sie auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückfallen.

Unter korrespondierenden Fluorophoren im Sinne der Erfindung wird ein Paar fluoreszierender Moleküle verstanden, deren Eigenschaften darin bestehen, daß die Wellenlänge des abgestrahlten Lichts (Emission) des Fluorophors niedrigerer Wellenlänge (Donor) im Bereich der Anregungswellenlänge des zweiten Fluorophors (Akzeptor) liegt. Natürliche Fluorophorenpaare sind zum Beispiel Phenylalanin/Tyrosin und Tyrosin/Tryptophan in Proteinen. Erfindungsgemäß bevorzugt werden korrespondierende Fluorophore auf der Basis

Fluoreszein/Rhodamin, und deren Derivate wie Carboxyfluoreszein-Succinimidylester/Texas-Red-Sulfonylchlorid, FITC/TMR (Fluoreszein-5-Isothiocyanate/Tetramethylrhodamin, sowie Naphtalene/Dansyl, Dansyl/DDPM (N-[4-(dimethylamino)-3,5-dinitrophenyl]maleimide), IAEDANS/DiO-C14 (5-(2-((iodoacethyl)amino)ethyl)amino)-naphthalen-1-sulfoniacid/3,3-ditetradodecyloxacarbocyanin), ANAI/IPM (2-anthracen-N-acethlyimidazole/3(4-isothiocyanatophenyl)7-diethyl-4-amino-4-methylcoumarin, BPE/CY5 (B-Phycoerythrin/Carboxymethyl indocyanin-N-Hydoxysuccimidylester) und andere, die alle kommerziell erhältlich sind.

Ganz besonders bevorzugt sind jedoch korrespondierende Fluorophore auf der Basis von Lanthanid-Chelaten, ebenfalls korrespondierend zu Fluorescein, die in den Patentanmeldungen WO 97/29373 und 98/15380 offenbart sind und käuflich erhältlich sind (Wallac, Turku, Finland).

Die fluoreszierenden Moleküle können mit dem Fachmann bekannten Methoden während der Synthese einer Nukleotidsequenz mit den Nukleotiden verknüpft, oder auch spezifisch mit dem 5' oder 3'-Terminus der Nukleotidsequenz kovalent verbunden werden (siehe Beispiele).

Zudem sind solche korrespondierende Fluorophore bevorzugt, die dem vorteilhaften zeitaufgelösten Fluoresenz-Resonanz-Energie Transfer zugänglich sind.

Das durch die Spleißreaktion entstehende Spleißprodukt, die reife mRNA, kann erfindungsgemäß mittels der korrespondierenden Fluorophore nachgewiesen werden, demzufolge sind beide Teilschritte (jeweils Exon1 / Intron / Exon2 Schnitt an den charakteristischen Consensus-Sequenzen) einer Spleißreaktion vollständig abgelaufen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bestehen daher die Sonden aus zwei Oligonukleotiden, die komplementär zum 3'-Ende des Exons 1 bzw. 5' Ende des Exons 2 sind und wiederum an ihrem 5'- bzw. 3' Ende ein korrespondierendes

Fluorophor tragen. Derart kann der erfolgte Spleißvorgang besonders einfach über ein durch Fluoreszenz Resonanzenergietransfer entstehendes Signal nachgewiesen werden (vgl. Fig. 1a).

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform besteht die Sonde aus zwei Oligonukleotiden, die komplememtär zum 3'-Ende des Exons 1 bzw. 5' Ende des Introns sind, bzw. komplementär zum 3' Ende des Introns und 5' –Ende des Exons 2 sind und an ihrem 5'- bzw. 3' Ende ein fluoreszierendes Molekül tragen. So kann der Spleißvorgang besonders einfach über die Abnahme eines durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer entstehenden Signals nachgewiesen werden (Vgl. Fig. 1b).

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform besteht eine Sonde aus zwei Oligonukleotiden, die komplementär zum 3'-Ende des Exons 1 bzw. 5' Ende des Exons 2 sind und an ihrem 5'- bzw. 3' Ende ein fluoreszierendes Molekül tragen. Anhand der entstehenden Fluoreszenz kann hierdurch der erfolgte Spleißvorgang nachgewiesen werden. Ein drittes Oligonukleotid, komplementär zum 3'-Ende des Introns zeigt durch ein entsprechendes Signal die Inhibition der Spleißreaktion an. (Vgl. Fig. 1c)

Die Anordnung der Oligonukleotide in Fig. 1a dient zum direkten Nachweis einer deletierten Intronsequenz.

Die Anordnung der Oligonukleotide in Fig. 1b dient vorzugsweise zum Nachweis, ob das Exon1 von der Intronsequenz während des Spleißvorganges abgetrennt werden konnte.

Die Anordnung der Oligonukleotide in Fig. 1c dient vorzugsweise zum Nachweis, ob das Exon2 erfolgreich von der Intronsequenz abgetrennt werden konnte.

Eine Kombination aus Fig. 1a und 1b zeigt Fig. 1d und dient daher vorzugsweise zum Nachweis der einzelnen Zwischen- und Endprodukte während des Spleißvorganges.

Daher kann das erfindungsgemäße Testsystem herangezogen werden,um zu bestimmen, in welchem Reaktionsschritt der Spleißvorgang unterbrochen wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die spleißfähige Nukleinsäure mindestens zwei Exons, die durch mindestens ein Intron getrennt sind.

Exon1 steht im allgemeinen für ein 5' vom Intron gelegenes Exon und Exon2 steht im allgemeinen für ein 3' vom Intron gelegenes Exon.

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist die spleißfähige Nukleinsäure jede beliebige Nukleinsäure, die gespleißt werden kann, vorzugsweise eine RNA, beispielsweise in Form einer sogenannten prä-mRNA oder in Form einer DNA, die RNA-Abschnitte enthält.

Intron bedeutet eine nicht kodierende Sequenz, welche gespleißt wird, aufgrund der erkennenden Consensus- Sequenzen. Solche Consensus Sequenzen sind in der Hefe: /GUAUGU in der 5'-Spleißstelle, YAG/G in der 3'-Spleißstelle und UACUAAC im Verzweigungspunkt (branchpoint); im Menschen: AG/GURAGU in der 5'Spleißstelle, YAG/ in der 3'-Spleißstelle und YNYURAC im Verzweigungspunkt (branchpoint). Die unterstrichenen Nukleotide sind streng konserviert. Ganz besonders bevorzugt ist ein Intron, welches endständig über Consensus-Sequenzen mit zwei Exons ligiert ist.

Eine für das Spleißen im Humansystem geeignete spleißfähige Nukleinsäure ist beispielsweise die MINX-Modell-prä-mRNA (MINX = miniature wildtype substrate; Zillmann, M., Zapp, M.L., Berget, S.M., (1988), Mol. Cell. Biol., 8:814-21.

Wie bereits erwähnt, können zusätzliche Sonden in die Intron-Struktur der prä-mRNA eingefügt werden. Derartige Konstrukte eignen sich daher zum Nachweis

einer Inhibierung des Spleißens im ersten Schritt, d. h. Öffnen der mRNA und Lariatbildung, oder im zweiten Schritt, d. h. Entfernung des Lariats. Im Falle einer Inhibierung des Spleißprozesses würden die Fluorophore nicht voneinander entfernt werden und daher weiterhin ein Signal abgeben.

Wie bereits näher beschrieben, wird die Verbindung zwischen Exon1 und Intron im ersten Spleißschritt durch das Spliceosom an der 5'-Spleißstelle des Introns geöffnet. Erst im zweiten Spleißschritt erfolgt eine kovalente Verknüpfung von Exon1 und Exon2. Das Exon1 ist folglich während des ersten Schrittes der Spleißreaktion nicht mehr mit der mRNA verbunden und somit aus der Spleißreaktion entfernbar. In Verbindung mit Konstrukten, an die beispielsweise korrespondierende Fluorophorenpaare an Oligonukleotiden im Intron und im Exon 1 binden, kann daher eine Aussage darüber gemacht werden, ob im ersten Spleißschritt beispielsweise eine Inhibierung stattgefunden hat. Werden beispielsweise zwei verschiedene Fluorophorenpaare, die in verschiedenen Wellenlängen emittieren, am 5'-Ende des Exon1 und im Intron sowie am 3'-Ende des Introns und dem 5'-Ende des Exons2 der prä-mRNA eingebaut, so kann sowohl der erste Spleißschritt, wie auch der zweite Spleißschritt in einem Testsystem verfolgt werden. Beispiele geeigneter Nukleinsäurekonstrukte sind in Form ihrer kodierenden Sequenzen in der deutschen Patentanmeldung 199 09 156 offenbart. In Figur 2 ist eine prinzipielle Anordnung zur Ausführung gegeben. Je nach Signalfolge kann bei Benutzung verschiedener Wellenlängen auf den Ablauf des Spleißvorganges geschlossen werden.

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur Untersuchung des Spleißvorganges.

Für Untersuchungen im Hefesystem kann man beispielsweise von der prä-mRNA für U3 der Hefe ausgehen (Mougin, A. et al., (1996), RNA, 2: 1079-93).

Zur Durchführung der Untersuchungen der einzelnen Spleißreaktionen mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Testsystems wird üblicherweise eine Zusammensetzung enthaltend die einzelnen Spleißkomponenten, vorzugsweise "Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles (snRNP)-Komponenten und nicht-snRNP-Komponenten

verwendet. Insbesondere enthalten die snRNP-Komponenten U1-, U2-, U4-, U5- und/oder U6-Proteine. Insbesondere ist es bevorzugt, wenn man entsprechende Zellextrakte, insbesondere eukaryotische Zellextrakte für die Untersuchungen verwendet. Beispielsweise können die Zellextrakte aus tierischen Zellen, insbesondere Säugetierzellen, vor allem HeLa-Zellen, insbesondere aus Zellkernextrakten von HeLa-Zellen oder Zellextrakte von Pilzen, insbesondere Hefen, nach dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren gewonnen werden (siehe Beispiele). Die Zellextrakte enthalten im allgemeinen alle wichtigen Faktoren, um ein Spleißen in vitro durchführen zu können.

Zur Durchführung der Untersuchungen ist es essentiell, weitere Hilfsmittel, wie z. B. Pufferlösungen, Stabilisatoren und/oder Energieäquivalente, insbesondere ATP, einzusetzen.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf ein Verfahren zur Herstellung eines Testsystems, bei dem mindestens eine mobile spleißfähige Nukleinsäure samt zugehörigen Sonden enthaltend korrespondierende Fluorophore und mindestens ein gelfreies Nachweissystem sowie gegebenenfalls mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten und gegebenenfalls weitere Hilfsmittel zusammengestellt werden. Bevorzugte Ausführungsformen der einzelnen Komponenten sind bereits näher beschrieben worden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zum Auffinden einer wirksamen Substanz, wobei

a) eine oder mehrere gleiche oder verschiedene mobile Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäuresequenz samt zugehörigen Sonden mit korrespondierenden Fluorophoren in Anwesenheit von mindestens einer zu untersuchenden Substanz und mindestens einer Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten und gegebenenfalls in Anwesenheit von weiteren Hilfsmitteln unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden, und

b) das sich gegebenenfalls gebildete Spleißprodukt mittels eines gelfreien Nachweissystems nachgewiesen wird.

Bevorzugte einzelne Komponenten des erfindungsgemäßen Verfahrens sind oben bereits näher beschrieben.

Die wirksame Substanz kann hierbei eine pharmazeutisch wirksame Verbindung, ein Naturstoff im weitesten Sinne, ein Fungizid, ein Herbizid, ein Pestizid und/oder ein Insektizid sein, vorzugsweise ist es ein Antibiotikum. Die zu untersuchende Substanz ist im allgemeinen eine natürlich vorkommende, eine natürlich vorkommende und chemisch modifizierte und/oder eine synthetische Substanz. Insbesondere können mit den erfindungsgemäßen Verfahren besonders einfach und schnell sogenannte kombinatorische Substanzbibliotheken durchsucht werden.

In der Beschreibungseinleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß verschiedene Erkrankungen auf eine Störung des Spleißmechanismus zurückzuführen sind. Daher eignet sich die vorliegende Erfindung auch zur Diagnose einer Erkrankung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung, wobei

a) eine oder mehrere gleiche oder verschiedene mobile Nukleinsäure/n vorzugsweise mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäuresequenz samt Sonden mit zugehörigen korrespondierenden Fluorophoren in Anwesenheit von mindestens einer zu untersuchenden Substanz und mindestens einer Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten und gegebenenfalls weiteren Hilfsmitteln unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden, und

b) daß sich gegebenenfalls gebildete Spleißprodukt mittels eines gelfreien Nachweissystems nachgewiesen wird.

Ganz bevorzugt handelt es sich bei der Substanz um eine Nukleinsäure, vorzugsweise um RNA.

Die zu diagnostizierenden Erkrankungen sind hierbei vorzugsweise Erbkrankheiten, Krebserkrankungen und/oder virale Erkrankungen, insbesondere Grave's Krankheit, spinale Muskelatrophie, β'-Thalassaemie, Krebserkrankungen in bezug auf das c-Erb-Onkogen, Hepatitis-C Infektionen und/oder Herpes Simplex Virus Infektionen. Insbesondere kann die vorliegende Erfindung verkürzte alternative Spleißpro dukte des mutierten APC-Onkogens auf direktem Wege identifizieren und stellt so eine Alternative zu dem bisher praktizierten PTT (proteine truncation test) (Bala, S., et al., (1996) Hum Genet 98(5): 528 – 533) dar.

Die Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten kann in diesem Fall beispielsweise eine behandelte oder unbehandelte Gewebeprobe des Patienten sein.

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

Beispiele

1. Das RNA-Konstrukt:

Die zu spleißende mRNA besteht aus mindestens zwei Exons, die durch ein Intron getrennt sind. Es kann sowohl natürlichen als aus molekularbiologischen Ursprungs sein.

2. Präparation der Kernextrakte:

2.1 Kernextrakte aus Säugetierzellen

Für das Herstellen von Kernextrakte aus Säugetierzellen werden Zellkulturen mit Hela-Zellen herangezogen. Hierzu werden die Zellen durch Zentrifugation (1000 x g, 10 Min.) aus dem Kulturmedium sedimentiert und mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wird das Zellsediment in fünffachem Volumen Puffer A (10 mM HEPES, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, pH 7,9, 4°C) aufgenommen und

10 Minuten inkubiert. Die Zellen werden erneut sedimentiert und in zweifachem Volumen Puffer A aufgenommen. Diese Suspension wird mit einem Dounce Homogenisator (Pistill B) aufgeschlossen (10-faches Auf- und Abbewegen des Pistills). Die Kerne werden durch Zentrifugation sedimentiert. Abschließend werden die Kerne erneut in Puffer A aufgenommen und für 20 Minuten bei 25.000 x g zentrifuguiert. Das Sediment wird in 3 ml Puffer B (20 mM HEPES, 25% (v/v) Glycerin, 0,42 M NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,5 mM DTT, pH 7,9) aufgenommen und erneut mit dem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Die entstehende Suspension wird 30 Minuten auf einem Magnetrührer inkubiert und anschließend bei 25.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Erneut schließt sich eine Zentrifugation bei 25.000 x g (30 Min.) an. Der klare Überstand wird gegen das 50-fache Volumen Puffer C (20 mM HEPES, 20% (v/v) Glycerin, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, pH 7,9) dialysiert. Das Dialysat wird zentrifugiert (25.000 x g, 20 Min.) und der resultierende Überstand kann als Kernextrakt in flüssigem Stickstoff gelagert werden (Dignam; J.D. et al. (1983) Nucleic Acid Res., 11, 1475).

2.2 Zellextrakte aus Hefezellen

Zellextrakte aus Hefezellen werden auf sehr ähnliche Weise hergestellt. Hefezellen eines Protease-defizienten Stammes (BJ926, EJ101 oder ähnliche Stämme) werden in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation (1500 x g, 5 Min., 4°C) sedimentiert. Die Zellen werden in dem zwei- bis vierfachen Volumen eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut bei 1.500 x g (5 Min, 4°C) zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in dem einfachen Volumen Zymolyasepuffer (50 mM Tris HCL, 10 mM $MgCl_2$, 1M Sorbitol, 30 mM DTT, pH 7,5) aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert (1.500 x g, 5 Min., 4°C), in dem dreifachen Volumen Zymolyasepuffer mit 2 mg (200 U) Zymolyase 100 T aufgenommen und 40 Minuten bei 30°C auf einem Schüttler (50 RPM) inkubiert. Die enstandenen Sphäroblasten werden abzentrifugiert (1.500 x g, 5 Min., 4°C) und einmal in 2 ml eiskaltem Zymolyasepuffer gewaschen. Das Sediment wird mit zwei Volumen Lysepuffer (50 mM Tris HCl, 10 mM $MgSO_4$, 1 mM EDTA, 10 mM Kalium Acetat, 1 mM DTT, Protease Inhibitoren, 1 mM PMSF, pH 7,5) gewaschen und schließlich in einem Volumen Lysepuffer aufgenommen. Die

Sphäroblasten werden anschließend in einem Dounce Homogenisator durch 15- bis 20-maliges Auf- und Abbewegen des Pistills (Abstand 1-2 µm) lysiert. Das Lysat wird mit dem gleichen Volumen Extraktionspuffer (Lysepuffer + 0,8 M Ammoniumsulfat, 20 % (v/v) Glycerin) versetzt und 15 - 30 Minuten auf einem Überkopfschüttler inkubiert (4°C). Anschließend wird 90 Minuten bei 100.000 x g zentrifugiert (4°C). Der Überstand wird gegen das hundertfache Volumen Lagerungspuffer (20 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 100 mM KCl, 1 mM DTT, Proteae Inhibitoren, 1 mM PMSF, pH 7,5) dialysiert. Das Dialysat wird bei 10.000 x g abzentrifugiert (4°C) und der Überstand in flüssigem Stickstoff gelagert (Dunn, B. & Wobbe, C.R. (1994) Preparation of protein extracts from yeast, In: Ausubel, F.M., et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, 2nd Volume, John Wiley and Sons, Inc., USA pp. 13.13.1 - 13.13.9).

3. In vitro Spleißen von Konstrukten in einem Testsystem

Durch das Ausschneiden des Introns aus der RNA-Sequenz entsteht an der Grenze der beiden nun verbundenen Exons eine Nukleotidsequenz, die in der ungespleißten prä-mRNA nicht vorhanden ist, komplementäre Nukleotidsequenzen, die an den 3'Terminuns des Exons 1 und den 5'-Terminus des Exons 2 hybridisieren bilden nun eine durchgehende Sequenz. Die infolgedessen entstehende Nähe zweier korrespondierender Fluorophore ermöglicht einen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET). Das nach Anregung einer spezifischen Extinktionswellenlänge gemessene Signal weist den erfolgreich durchgeführten Spleißvorgang nach. Die Auswertung des Assays erfolgt in einem geeigneten Auswertegerät (Fluoreszensspektrometer, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland; Fluoreszezreader, Fluostar Galaxy, BMG, Offenburg, Deutschland; Light Cycler, Roche, Mannheim, Deutschland).

Alle beschriebenen Versuche wurden nach Standardmethoden, wie sie in (Eperon, I.C., and Krainer, A.R. (1994) Splicing of mRNA precursors in mammalian cells. In RNA Processing, vol. I - A Practical Approach (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds.) Oxford: IRL Press, pp. 57-101) beschrieben sind, durchgeführt.

3.1. Durchführung der in vitro Transkription

Das in Figur 2 beschriebene Konstrukt wurde über eine PCR-Standardreaktion mit einem T7-Promotor versehen und amplifiziert. Anschließend wurde es mittels in vitro Transkription in die korrespondierende mRNA umgeschrieben. Als Positivkontrolle und zum späteren Vergleich wurde ebenfalls das entsprechende Konstrukt ohne Intron in den Experimenten eingesetzt.

Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1,5 µl 5 x Transkriptionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7.9, 30 mM $MgCl_2$, 10 mM Spermidin, 50 mM NaCl)
0,5 µl RNAsin (40 U/µl)
1 µl DTT (100 mM)
1 µl NTPs (ATP, GTP, CTP und UTP mit 5 mM)
1 µl MINX template DNA (1 mg/ml)
1 µl T7 Polymerase (10 U/µl)
ad 10 µl mit H_2O

Der Transkriptionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend über ein präparatives Harnstoffgel nach Standardmethoden gereingt. Zum Auffinden der markierten RNA wurde das Gel auf eine Dünnschicht-Chromatographie-Platte, die eine 0,25 mm dicke Schicht Kieselgel-60 mit Fluoreszenzindikator UV254 trägt (Macherny-Nagel), aufgelegt und von oben durch eine UV-Lampe mit einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt. Die RNA-Bande absorbiert die zur Anregung des Fluoreszenzindikators notwendige Wellenlänge und ve rursacht somit einen nicht angeregten Bereich auf der Dünnschicht-Chromatographie-Platte, der als Schatten sichtbar wird. Anhand dieses Schattens wurde die RNA mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gelfragment wurde zerschnitten und über Nacht bei 4°C mit Elutionspuffer (500 mM Na-Acetat pH 5, 1 mM EDTA pH 8, 2,5% Phenol/Chloroform) die RNA aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurde das Acrylamid durch 10-minütige Zentrifugation bei 13 000 x g sedimentiert und die RNA mit Ethanol/Natriumacetat aus dem Überstand gefällt, gewaschen, getrocknet und in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen.

3.2 Durchführung der Spleißreaktion

7 µl Kernextrakt von HeLa-Zellen (=35 % v/v) wurden mit 3,25 mM $MgCl_2$, 35 mM KCl, 2 mM ATP, 20 mM Phosphocreatine, 1U/µl RNAsin, und 1 µg MINX-prä-mRNA (Zillmann et al., 1988, Molecular and Cellular Biology, 8: 814) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 0, 10, 20, 30 und 40 Minuten bei 30°C inkubiert. Zum Vergleich wurde prä-mRNA eingesetzt, die das Intron nicht enthielt. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von 400 µl Proteinase K-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 12,5, mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS, 0,1 mg Proteinase K) beendet, danach je 50 pmol Sonde hinzugegeben und der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer im Fluoreszensspektrometer (Perkin Elmer) gemessen.

Zur zeitlichen Verfolgung des Spleißvorgangs (Online Detektion in Echtzeit) wurde der Reaktionsansatz wie oben einschließlich der Sonden pipettiert und die Zu - bzw. Abnahme des Signals mittels Fluoreszensreader über eine Zeitspanne von 40 Minuten verfolgt.

Die Detektion einer großen Anzahl kleiner Proben, beispielsweise zur Diagnose der verkürzten Spleißprodukte des APC-Onkogens, können im Light-Cycler System (Roche, Schweiz) oder in einem Fluoreszensreader (Fluostar Galaxy, BMG, Offenburg, Deutschland) erfolgen.

4. Herstellung der Sonden

Die verwendeteten Oligonukleotide können durch Standard-Festphasen-DNA-Synthese mit einem 392 RNA/DNA-Synthesizer (Applied Biosystems, 1992: Evaluating and Isolating Synthetic Oligonucleot ides) hergestellt werden. Die Synthesen werden in einem Maßstab von 0,2 oder 1 µmol nach den von Applied Biosystems empfohlenen Standardzyklen unter Beibehaltung der 5'-endständigen Dimethoxytritylgruppe ("trityl-on") durchgeführt. Zur Synthese einer 3'- markierten Sonde wird dabei ein mit einem Fluorophor beladener Träger (CPG-Support – controlled pore glass Träger) eingesetzt. Dadurch erfolgt der Einbau des Fluorophors (Fluorescein-CPG, TAMRA-CPG, Glen Research; Sterling, Virginia) am 3'-Terminus bereits während der Synthese. Zur Herstellung einer 5'-markierten

Sonde wird die Oligosynthese standardmäßig durchgeführt und die 5'-Modifikation durch Umsetzung mit einem Fluorescein-Phosphoramidit (Glen Research) am 5'-Ende erhalten.

Die Abspaltung der Oligonukleotide von der Festphase erfolgt mit wäßriger Ammoniak-Lösung (33%) bei RT über einen Zeitraum von 1 h. Die darauffolgende Abspaltung der Schutzgruppen wird durch eine weitere Zugabe von wäßriger Ammoniak-Lösung (33%) und anschließender Inkubation bei 55 °C für 6 h durchgeführt. Die Effizienz der einzelnen Kupplungsschritte wird UV/VIS-spektrometrisch durch Messung der Absorption der während der Synthese abgespaltenen Tritylgruppen bei 495 nm bestimmt. Die entschützten Oligonukleotidlösungen werden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophyllisiert, wobei zur Vermeidung der Detritylierung an der endständigen 5'-Position eine pH-Wert Kontrolle in 20-minütigem Abstand erfolgt und gegebenenfalls Triethlyamin (10µl) hinzugefügt wird.

Das Lyophilisat wird anschließend in 400 µl 100 mM Triethylammoniumacetat, pH 7,0 aufgenommen und die Oligonukleotide mittels reversed pased HPLC über eine Hypersil reversed phase C-18-Säule mit einer Flußrate von 1 ml/min aufgereinigt. Die Elution erfolgt über den folgenden Gradienten: 11 - 26% 70% Acetonitril / 30% 100 mM Triethylammoniumacetat, pH 7,0 (0-20 min), 26 – 44 % 70% Acetonitril / 30% 100 mM Triethylammoniumacetat, pH 7,0, (20-30 min), 44 - 100 % 70% Acetonitril / 30% 100 mM Triethylammoniumacetat, pH 7,0 (30-33 min). Die Chromatographie wird UV-spektroskopisch bei den Wellenlängen λ = 260 und 290 nm verfolgt. Die Produktfraktionen werden vereinigt, lyophilisiert und Spuren von Triethylammoniumacetat durch mehrmaliges Aufnehmen in Wasser (jeweils 1 ml) und anschließender Lyophilisation entfernt. Das Lyophilisat wird in Wasser (500 µl) aufgenommen und die Konzentration der Oligonukleotide durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von λ = 260 bestimmt. Die Abspaltung der 5'-endständigen Tritylgruppe ("Detrilierung") wird mit wässriger Essigsäure (80%ig, 10µl/nmol Oligonukleotid) für 20 min bei RT vorgenommen. Die detritylierten Oligonukleotide werden nach Zugabe von wäßriger Natriumacetat-Lösung (3M, pH 5,2 1,5 µl/nmol Oligonukleotid) und Isoproanol (34 µl/nmol Oligonukleotid) bei -80 °C für 10 min

gefällt. Die Oligonukleotide werden bei 4 °C abzentrifugiert (17 000 g) , der Überstand verworfen und der erhaltene weiß-milchige Niederschlag mit auf -20 °C gekühlter wäßriger Ethanol-Lösung (2 x 200 µl, 70%ig) gewaschen. Die Oligonukleotide werden erneut bei 4 °C zentrifugiert (17 000 x g), der Überstand verworfen und der erhaltene Niederschlag bei RT im Hochvakuum getrocknet. Das resultierende Lyophylisat wurde in Wasser (500 µl) aufgenommen, und der pH-Wert mit wäßriger Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt.

Die Reinheitsbestimmung der erhaltenen detrinylierten Oligonukleotide erfolgt durch revered phase HPLCunter Verwendung einer ODS Hypersil reversed phase C-18-Säulöe. Zur Elution wird folgender Gradient verwendet: 5-25% 70% Acetonitril / 30% 100 mM Triethylammoniumacetat, pH 7,0 (0-20 min), 25-45% 70% Acetonitril / 30% 100 mM Triethylammoniumacetat, pH 7,0 (20-25 min), 45-100% 70% Acetonitril / 30% 100 mM Triethylammoniumacetat, pH 7,0 (25-28 min).

Zum Entsalzen werden die Oligonukleotide auf eine mit Wasser präequilibrierte Gelfiltrationssäule (NAP-5) aufgetragen und mit Wasser 1,5 ml eluiert. Die gesammelten Fraktionen (100 µl) werden durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von λ = 260 bestimmt, die Hauptfraktionen vereinigt, das Volumen durch Lyophilisation eingeengt und die Konzentration der Oligonukleotide UV-spektroskopisch bestimmt.

Patentansprüche

1. Homogenes Testsystem enthaltend

(a) mindestens eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene mobile Nukleinsäuren mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäure, enthaltend mindestens ein Intron
(b) mindestens zwei Sonden, enthaltend korrespondierende Fluorophore, welche vorzugsweise an den 5´ und / oder 3´ Enden eines Exon / Intron binden
(c) mindestens ein gelfreies Nachweissystem zum Nachweis einer Spleißreaktion, gegebenenfalls
(d) mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten,
(e) weitere Hilfsmittel

2. Testsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die spleißfähige Nukleinsäure mindestens zwei Exons enthält, die durch mindestens ein Intron getrennt sind.

3. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens zwei Sonden Nukleinsäuren umfassen, die zu Teilsequenzen von mindestens zwei Exons und/oder zu Teilsequenzen von mindestes einem Exon und einem Intron der spleißfähigen Nukleinsäure gemäß Merkmal (a) komplementär sind, wobei die Teilsequenzen durch die Spleißreaktion zusammengefügt und/oder voneinander entfernt werden.

4. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die spleißfähige Nukleinsäure und die Sonden-bindende Nukleinsäuresequenz miteinander verbunden sind.

5. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden gemäß Merkmal (b) an die spleißfähige Nukleinsäure gemäß (a) hybridisieren.

6. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die korrespondierenden Fluorophore ausgewählt sind aus Fluoreszein/Rhodamin, und deren Derivate wie Carboxyfluoreszein-Succinimidylester/Texas-Red-Sulfonylchlorid, FITC/TMR (Fluoreszein-5-Isothiocyanate/Tetramethylrhodamin, sowie Naphtalene/Dansyl, Dansyl/DDPM (N-[4-(dimethylamino)-3,5-dinitrophenyl]maleimide), IAEDANS/DiO-C14 (5-(2-((iodoacethyl)amino)ethyl)amino)-naphthalen-1-sulfoniacid/3,3-ditetradodecyloxacarbocyanin), ANAI/IPM (2-anthracen-N-acethlyimidazole/3(4-isothiocyanatophenyl)7-diethyl-4-amino-4-methylcoumarin, BPE/CY5 (B-Phycoerythrin/Carboxymethyl indocyanin-N-Hydoxysuccimidylester) sowie Lanthanid-Chelate.

7. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß dieses korrespondierende Fluorophore enthält, die dem zeitaufgelösten Fluoresenz-Resonanz-Energie Transfer zugänglich sind.

8. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure eine RNA ist.

9. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung gemäß Merkmal (c) "small nuclear ribonucleoprotein particles" (snRNP)-Komponenten und nicht-snRNP-Komponenten enthalten.

10. Testsystem nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die snRNP-Komponenten U1-, U2-, U4-, U5- und/oder U6-Proteine enthalten.

11. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung gemäß Merkmal (c) ein Zellextrakt, insbesondere ein eukaryotischer Zell- oder Zellkernextrakt ist.

12. Testsystem nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Zellkernextrakt aus tierischen Zellen, insbesondere Säugetierzellen, oder von Pilzen, insbesondere Hefen gewonnen ist.

13. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die weiteren Hilfsmittel ausgewählt sind aus Pufferlösungen, Stabilisatoren und/oder Energieäquivalente, insbesondere ATP.

14. Verfahren zur Herstellung eines Testsystems gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine mobile spleißfähige Nukleinsäure samt zugehörigen Sonden enthaltend korrespondierende Fluorophore und mindestens ein gelfreies Nachweissystem sowie gegebenenfalls mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten und gegebenenfalls weitere Hilfsmittel zusammengestellt werden.

15. Verfahren zum Auffinden einer wirksamen Substanz, dadurch gekennzeichnet, daß

a) eine oder mehrere gleiche oder verschiedene mobile Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäuresequenz samt zugehörigen Sonden mit korrespondierenden Fluorophoren in Anwesenheit von mindestens einer zu untersuchenden Substanz und mindestens einer Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten und gegebenenfalls in Anwesenheit von weiteren Hilfsmitteln unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden, und

b) das sich gegebenenfalls gebildete Spleißprodukt mittels eines gelfreien Nachweissystems nachgewiesen wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame Substanz ausgewählt ist aus Naturstoffen im weitesten Sinne, Herbiziden, Insektiziden, Pestiziden, Antibiotika, Pharmaka, kombinatorischen Substanzbibliotheken.

17. Verfahren nach den Ansprüchen 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Substanz ausgewählt ist aus einer natürlich vorkommenden, natürlich vorkommenden und chemisch modifizierten und/oder synthetischen Substanz.

18. Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung, dadurch gekennzeichnet, daß
(a) eine oder mehrere gleiche oder verschiedene mobile Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäuresequenz samt zugehörigen Sonden mit korrespondierenden Fluorophoren in Anwesenheit von mindestens einer zu untersuchenden Substanz und vorzugsweise mindestens einer Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten und gegebenenfalls in Anwesenheit von weiteren Hilfsmitteln unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden, und
(b) das sich gegebenenfalls gebildete Spleißprodukt mittels eines gelfreien Nachweissystems nachgewiesen wird.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz eine Nukleinsäure, vorzugsweise RNA, ist.

20. Verfahren nach den Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine Erbkrankheit, eine Krebserkrankung und/oder eine virale Erkrankung ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18-20, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung ausgewählt ist aus Grave's Krankheit, spinale Muskelatrophy, ß'-Thalassaemie, Krebserkrankungen in bezug auf das c-erb-Onkogen, das APC-Onkogen, Hepatitis C Infektion und/oder Herpes Simplex Virus Infektion.



Fig. 1a

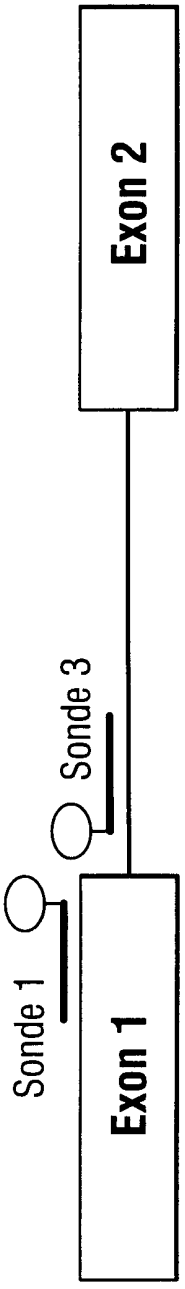


Fig. 1b

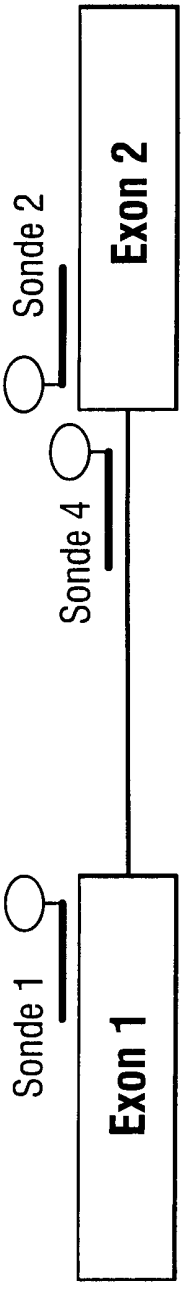


Fig. 1c

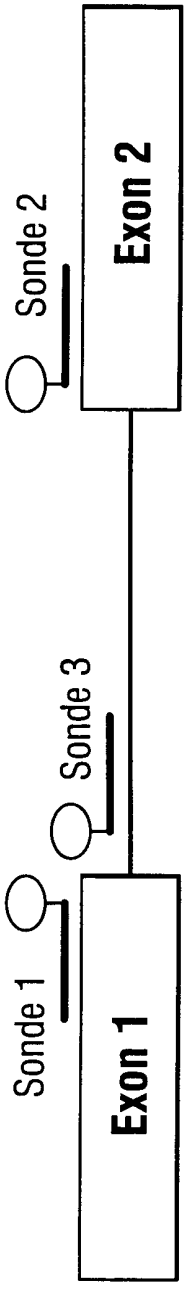


Fig. 1d

MINX-RNA-Konstrukt mit Intron (unterstrichen)

Sonde 1 Sonde 3

acucuuggau.cgg**aaacccg.ucggccuccg.aacg**gu**aaga.gccuagcaug.**

uaggacuggu.uaccugcagc.ccaagcuugc.ugcacgucua.gggcgcagua.

Sonde 4

guccaggguu.uccuugauga.ugucauacuu.a**uccuguccc.uuuuuuuucc.**

Sonde 2

acag**cucgcg.guugaggaca.aacuc**uucgc.ggucuuucca.ga

Sonden, nach Fig.1a bis Fig.1d

Sonde 1: 5'-Acceptorfluorophor 1-cgttcggaggccgacgggttt

Sonde 2: 5'-gagtttgtcctcaaccgcga-Donorfluorophor 1

Sonde 3: 5'-gtcctacatgctaggctgtt-Donorfluorophor 2

Sonde 4: 5'- Acceptorfluorophor 2-tgtggaaaaaaaagggacagga

Fig. 2

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG

<120> Testsystem zum Nachweis einer Spleißreaktion, sowie dessen Verwendung

<130> 200at06

<140> 10018465.0
<141> 2000-04-14

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 192
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
acucuuggau cggaaacccg ucggccuccg aacgguaaga gccuagcaug uaggacuggu 60
uaccugcagc ccaagcuugc ugcacgucua gggcgcagua guccaggguu uccuugauga 120
ugucauacuu auccuguccc uuuuuuuucc acagcucgcg guugaggaca aacucuucgc 180
ggucuuucca ga 192

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
cgttcggagg ccgacgggtt t 21

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
gagtttgtcc tcaaccgcga 20

<210> 4
<211> 20

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
gtcctacatg ctaggctgtt 20

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
tgtggaaaaa aaagggacag ga 22