

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/52201 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. September 2000 (08.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01595 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Februar 2000 (25.02.00) (30) Prioritätsdaten: 199 09 156.0 2. März 1999 (02.03.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVEN- TIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; Patent- und Lizenzabteilung, Industriepark Höchst, Gebäude D 706, D-65926 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÜLS, Christoph [DE/DE]; Danziger Weg 5, D-71696 Möglingen (DE). BAUER, Bettina [DE/DE]; Kleine Feldstrasse 9, D-65795 Hat- tersheim (DE). SIMANDI, Claus [DE/DE]; Sossenheimer Mühlgasse 10, D-65936 Frankfurt (DE). LÜHRMANN, Reinhard [DE/DE]; Ewiges Tal 16b, D-35041 Marburg (DE). ACHSEL, Tilmann [DE/DE]; Am Steinsgraben 15, D-37085 Göttingen (DE). VORNLOCHER, Hans-Peter [DE/DE]; Waldweg 12, D-35041 Marburg/Wehrda (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, NZ, PL, SG, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(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 test system comprising: (a) one or more identical or different immobilized nucleic acids including at least one nucleic acid capable of splicing; (b) at least one gel-free detection system for detecting a splicing reaction; possibly (c) at least one compound containing splicing components; and preferably (d) suitable detection probes; and possibly (e) other additives. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem enthaltend: (a) eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene immobilisierte Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleissfähigen Nukleinsäure, (b) mindestens ein gelfreies Nachweissystem zum Nachweis einer Spleissreaktion, gegebenenfalls, (c) mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleisskomponenten, und vorzugsweise, (d) geeignete Nachweissonden, und gegebenenfalls, (e) weitere Hilfsmittel.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Testsystem zum Nachweis einer Spleißreaktion, sowie dessen Verwendung

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem enthaltend
- (a) eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene immobilisierte Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäure,
 - (b) mindestens ein gelfreies Nachweissystem zum Nachweis einer Spleißreaktion, gegebenenfalls
 - 10 (c) mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten, und vorzugsweise
 - (d) geeignete Nachweissonden, und gegebenenfalls
 - (e) weitere Hilfsmittel

- 15 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.
- 20

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.

- 25 Die Bildung von mRNA in Eukaryonten erfordert daher einen sogenannten Spleißprozess, in dem die nicht kodierenden Genbereiche (Introns) aus dem primären Gentranskript entfernt werden.

- 30 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, entsteht. Der zweite

5 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).

10 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.,

15 (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).

20

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

25

30 (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: 133-155 Newman, 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) su-

pra). Nach der Beendigung der Spleiß-Reaktion wird die reife mRNA freigesetzt und das Spliceosom dissoziiert (Moore, J. M. et al., (1993) *supra*).

5 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 reguliert. 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-
10 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
15 gezeigt worden, daß durch fehlerhaftes Spleißen ein entscheidendes Enzym (Thyropoxidase) in einer inaktiven Form entsteht (Zanelli, E. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 170, 725). Untersuchungen für die Krankheit Spinale Muskelatrophie weisen darauf hin, daß ein defektes Genprodukt des Gens SMN (Survival of motor
20 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
25 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
30 Proteins konnte die Metastasierung wirksam unterdrückt werden (Sherman, L., et al., (1996) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213: 249-269).

Fehlerhaftes Spleißen kann zu stark ausgeprägten Phänotypen des betroffenen Organismus führen. So ist bekannt, daß eine Punktmutation in einem Intron des β -Globin zu einer β^+ -Thalassaemie führen kann. Durch die Punktmutation 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 Antisera 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 (β -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 mRNA durch in vitro Transkription hergestellt. Hierzu werden genetische Konstrukte aus Viren, z. B. Adenoviren, oder zellulärer Strukturgene verwendet. Derartige mRNAs enthalten alle wichtigen Strukturelemente, die für die Erkennung der mRNA durch das Spliceosom und den Ablauf des Spleißens notwendig sind. Im allgemeinen wird die mRNA radioaktiv markiert, damit man nach der Auftrennung auf 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 Auf-
finden von Substanzen, die das Spleißen modulieren können, geeignet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein 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 Through-Put Screening).

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß ein Testsystem mit einem gelfreien Nachweissystem zum Nachweis einer Spleißreaktion geeignet ist, die oben beschriebenen Nachteile des gängigen Testsystems zu überwinden und somit für das High Through-Put Screening beispielsweise in einer Roboteranlage geeignet ist.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Testsystem enthaltend

- (a) eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene immobilisierte Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäure,
- (b) mindestens ein gelfreies Nachweissystem zum Nachweis einer Spleißreaktion, gegebenenfalls
- (c) mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten, und vorzugsweise
- (d) geeignete Nachweissonden, und gegebenenfalls

(e) weitere Hilfsmittel.

Für die Bereitstellung eines gelfreien Testsystems für die Untersuchung von Spleißvorgängen ist die zu untersuchende Nukleinsäure an einer Festphase zu immobilisieren. Die Immobilisierung der Nukleinsäure kann beispielsweise kovalent, durch die Einführung von bestimmten Strukturelementen, beispielsweise Aptameren, in die zu spleißende Nukleinsäure und Verwendung von Bindungspartnern für diese Strukturelemente oder durch eine Hybridisierung erfolgen.

Für das gelfreie Testsystem ist zudem vorteilhafterweise eine geeignete Sonde zu generieren, die den Nachweis des erfolgten Spleißens bzw. des nicht erfolgten Spleißens ermöglicht. Diese Sonde kann beispielsweise ein zur Hybridisierung an die zu untersuchende Nukleinsäure verwendetes Oligonukleotid oder ein Bindungspartner, der an in die zu untersuchende Nukleinsäure eingeführte Strukturelemente bindet, sein.

Das gelfreie Nachweissystem enthält daher vorzugsweise mindestens eine Sonde. Insbesondere ist die Sonde eine zu der spleißfähigen Nukleinsäure komplementäre Nukleinsäure, eine die spleißfähige Nukleinsäure-bindende niedermolekulare Verbindung und/oder ein die spleißfähige Nukleinsäure-bindendes Peptid oder Protein.

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

Beispielsweise ist die komplementäre Nukleinsäure zu mindestens einem Intron, zu mindestens einem Exon und/oder zu mindestens einer Übergangsstelle von einem Exon und einem Intron und/oder zu der nach der Fusion der beiden Exons entstandenen Exon/Exon-Grenze komplementär. Die komplementäre Nukleinsäure dient hierbei als Sonde zum Nachweis einer Spleißreaktion.

So kann beispielsweise das während der Spleißreaktion freigesetzte Intron mittels des gelfreien Nachweissystems nachgewiesen werden, woraus gefolgert werden kann, daß beide Teilschritte der Spleißreaktion vollständig abgelaufen sind. Alternativ kann anhand eines geeigneten Nachweissystems, beispielsweise einer zu einer Übergangsstelle von einem Exon und einem Intron komplementären Nukleinsäure festgestellt werden, ob während des Spleißvorganges das Exon von dem Intron gelöst worden ist, was einen Aufschluß darüber geben kann, ob die erste Spleißreaktion am 5'-Ende des Introns und/oder die zweite Spleißreaktion am 3'-Ende des Introns erfolgte. Andere Nachweisformen sind unten im Detail erläutert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Sonde eine niedermolekulare Verbindung, beispielsweise Theophyllin, Xanthin oder ein Aminoglycosid wie Tobramycin. Enthält beispielsweise die spleißfähige Nukleinsäure oder eine zur spleißfähigen Nukleinsäure komplementäre Nukleinsäure des gelfreien Nachweissystems eine sog. Aptamer-Struktur, d. h. eine Bindesequenz für derartige Bindungspartner (siehe z. B. Jenison, R.D. et al. (1994) Science 263, 1425 - 1429, Hamasaki, K. et al. (1998) Biochem. 37, 656 - 663 oder Kiga, D. et al. (1998) Nucleic Acids Res., 26 (7), 1755 - 1760), so kann der Spleißvorgang besonders einfach über den Bindungspartner nachgewiesen werden.

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform kann der Bindungspartner ein Nukleinsäure-Bindeprotein, insbesondere ein "Iron Responsive Element Binding Protein" (IBP) sein, welches eine Erkennungssequenz für ein Nukleinsäure-Bindeprotein, insbesondere ein "Iron Responsive Element" (IRE) erkennt. Der Nachweis eines gegebenenfalls erfolgten Spleißvorganges erfolgt hierbei über das Nukleinsäure-Bindeprotein.

Die beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Bindungspartner und Strukturelement in der Nukleinsäure (niedermolekulare Verbindung und Aptamer, IBP und IRE, Oligonukleotid und Sequenz in der Nukleinsäure) sind ebenfalls geeignet die zu untersuchende spleißfähige Nukleinsäure an einer Festphase zu immobilisieren. Hierzu muß der Bindungspartner in geeigneter Weise an der Festphase verankert werden.

Dabei kann beispielsweise der Bindungspartner kovalent an die Festphase gebunden werden. Desweiteren eignen sich die Kopplung von Biotin an die Nukleinsäure und die Verwendung von an der Festphase gebundenem (Strept-)Avidin für eine Verankerung der Nukleinsäure. Diese Verankerung kann beispielsweise auch durch
5 Verwendung von Antikörper/Antigen-Wechselwirkungen erreicht werden.

Im allgemeinen enthält die Sonde eine Markierung, beispielsweise eine radioaktive Markierung, eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, mit Biotin, mit Digoxigenin und/oder mit Antikörpern. Vorzugsweise ist die Markierung an dem Liganden, beispielsweise an der komplementären Nukleinsäure, an der niedermolekularen Verbindung oder an dem Nukleinsäure-Bindeprotein angebracht. Insbesondere mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen kann auf einfache und in automatisierten Systemen schnelle Art und Weise festgestellt werden, ob beispielsweise durch Entfernung des Bindungspartners der Sonde in der Nukleinsäure während des Spleißvorganges eine
10 Spleißreaktion beispielsweise in Anwesenheit von mindestens einer zu untersuchenden Substanz ungestört ablaufen kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die spleißfähige Nukleinsäure und die Sonden-bindende Nukleinsäure miteinander verbunden. Dies hat den Vorteil, daß die Spleißreaktion direkt beispielsweise über die Freisetzung der Sondenbindenden Nukleinsäure nachgewiesen werden kann. Bei dieser Ausführungsform ist die Sonden-bindende Nukleinsäure vorzugsweise eine Nukleinsäure, die eine niedermolekulare Verbindung, beispielsweise ein sogenanntes Aptamer, und/oder ein Nukleinsäure-Bindeprotein binden kann. Da für die Bindung derartiger Sonden im
20 allgemeinen bestimmte Strukturelemente der Nukleinsäuren verantwortlich sind, wird die Sonden-bindende Nukleinsäure bei den folgenden bevorzugten Konstrukten mit "SE" für Strukturelement abgekürzt, wobei "3'Region" einen Nukleinsäureabschnitt am 3'-Ende der Nukleinsäure bedeutet:

- 30 1. Konstrukte mit im 5'-Exon eingeführten Strukturelement (SE):

---T7-Promotor---SE---Exon1---Intron---Exon2---3'Region---

---T7-Promotor---Exon1---SE---Exon1---Intron---Exon2---3'Region---

2. Konstrukt mit im Intron eingeführten Strukturelement:

---T7-Promotor---Exon1---Intron---SE---Intron---Exon2---3'Region---

3. Konstrukte mit im 3'-Exon eingeführten Strukturelement:

---T7-Promotor---Exon1---Intron---Exon2---SE---Exon2---3'Region---

---T7-Promotor---Exon1---Intron---Exon2---SE---3'Region---

---T7-Promotor---Exon1---Intron---Exon2---3'Region---SE---3'Region---

---T7-Promotor---Exon1---Intron---Exon2---3'Region---SE---

4. Konstrukte mit Kombinationen aus den in 1. - 3. aufgeführten Konstrukten.

5. Konstrukte mit verschiedenen Strukturelementen:

---T7-Promotor---Exon1---SE1---Intron---Exon2---SE2---3'Region

---T7-Promotor---Exon1---SE1---Exon1---Intron---SE2---Intron---Exon2---SE3---
3'Region---

Die Konstrukte zu 1. dienen hierbei insbesondere zum Nachweis, ob das Exon1 von der Intronsequenz während des Spleißvorganges abgetrennt werden konnte. Das Konstrukt zu 2. dient zum direkten Nachweis einer abgetrennten Intronsequenz. Die Konstrukte unter 3. dienen zum Nachweis, ob das Exon2 erfolgreich von der Intronsequenz abgetrennt werden konnte. Eine Kombination der Konstrukte gemäß 4.

dient zum Nachweis der einzelnen Zwischen- und Endprodukte während des Spleißvorganges. Exon1 steht im allgemeinen für ein 5' vom Intron gelegenes Exon und Exon 2 steht im allgemeinen für ein 3' vom Intron gelegenes Exon.

5 Die Konstrukte unter 5. enthalten verschiedene zusätzliche Erkennungssequenzen, die zum einen verschiedene Nachweissysteme betreffen können und die zum anderen über deren Bindungspartner die Bindung der Nukleinsäure an eine feste Phase ermöglichen können. So kann beispielsweise zum Immobilisieren in der 3'Region eine Sonden-bindende Nukleinsäure eingeführt werden, und gleichzeitig zum Nach-
10 weis des Spleißvorganges eine andere Sonden-bindende Nukleinsäure im Exon1 (siehe zu 5., erstes Konstrukt). Darüber hinaus können beispielsweise drei verschiedene Nukleinsäuren eingeführt werden, die zum einen zur Immobilisierung der gesamten Nukleinsäure und zum anderen zum Nachweis des entfernten Introns und zum Nachweis der Verknüpfung von Exon1 an die restliche Nukleinsäure dient (siehe zu 5., zweites Konstrukt). Die Lokalisation der einzelnen unter 5. beispielhaft auf-
15 geführten Sonden-bindenden Nukleinsäuren kann gemäß den oben beschriebenen Konstrukten unter 1. - 4. variieren. Zudem ist die genaue Lokalisation der einzelnen Sonden-bindenden Nukleinsäuren variabel.

20 In einer weiteren Ausführungsform ist daher die Nukleinsäure, vorzugsweise die spleißfähige Nukleinsäure, insbesondere eine Nukleinsäure gemäß einer der oben beschriebenen Ausführungsformen, direkt kovalent oder indirekt über ein Strukturelement und Bindungspartner zum Strukturelement oder mittels Hybridisierung an eine feste Phase gebunden.

25 Die direkte kovalente Bindung kann beispielsweise über die 3'-terminale cis-diol-Gruppe des Riboserückgrates der Nukleinsäure erfolgen. Beispielsweise kann eine RNA an Hydrazingruppen der festen Phase nach Perjodatoxidation der vicinalen 2', 3' Hydroxylgruppen der 3'-terminalen Ribose gebunden werden. Für eine indirekte
30 Bindung eignen sich auch geeignete Linker, wie beispielsweise Biotin- oder Dicarbonsäure-Linker. Die Bindung der Nukleinsäure kann jedoch auch, wie oben bereits ausgeführt, über einen Bindungspartner, beispielsweise über Theophyllin, Xanthin

oder ein Aminoglycosid wie Tobramycin und/oder über ein Nukleinsäure-Bindeprotein, wie beispielsweise IBP, erfolgen.

Für die Immobilisierung einer Nukleinsäure an einen Träger-gebundenen Liganden eignet sich beispielsweise im Falle von Theophyllin als Träger-gebundenen Bindungspartner das Theophyllin-Aptamer Th ($K_d = 0,9 \mu\text{M}$) (siehe z. B. Jenison, R.G. et al. (1994) supra) oder im Falle von Tobramycin als Träger-gebundenen Bindungspartner die Minimalversion des Tobramycin-Aptamers To ($K_d = 0,2 \mu\text{M}$) (Hamasaki, K. et al. (1998) supra). Die Sequenzen der beiden Aptamere sind vorzugsweise:

Th: AAGUGAUACC AGCAUCGUCU UGAUGCCCUU GGCAGCACUU (40mer)

To: GGCUUAGUAU AGCGAGGUUU AGCUACACUC GUGCUGAGCC (40mer)

Die feste Phase ist hierbei beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Glas, Kunststoff oder Polysaccharide, z.B. ein Agarosepolymer.

Sonden-bindende Nukleinsäuren, beispielsweise Aptamere, sind aber auch geeignet, um markierte Sonden zu binden, wodurch z. B. die Aptamer-enthaltende Nukleinsäure nachgewiesen und auch quantifiziert werden kann. Beispielsweise kann Tobramycin mit käuflichen, NH_2 -reaktiven Fluoreszenz-Farbstoffen umgesetzt werden (Wang, Y. et al. (1996) Biochemistry 35, 12338 - 12346). Bei Theophyllin wird vorzugsweise ein 1-Aminoalkyl- oder 1-Thioalkyl-Derivat des 3-Methylxanthins hergestellt, das an das Aptamer binden kann (Jenison, R. D. et al. (1994), supra).

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. Für den Fall, daß die RNA zusätzliche Sonden-bindende Sequenzen, wie oben bereits näher beschrieben, enthalten soll, ist es vorteilhaft, wenn diese auf beiden Exon-Seiten mindestens ca. 25 Nucleotide von der jeweiligen Spleißstelle, auf

der Intronseite mindestens ca. 17 Nucleotide vom Branchpoint und/oder mindestens ca. 7 Nucleotide von der 5'Spleißstelle entfernt sind. Hierdurch wird im allgemeinen gewährleistet, daß die zusätzlichen Sonden-bindenden Sequenzen die Spleißreaktionen nicht stören können.

5

10

15

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). In die MINX-kodierende DNA kann vorzugsweise eine zum Nachweis oder zur Immobilisierung geeignete weitere Sonden-bindende Nukleinsäure, wie oben bereits beschrieben, eingeführt werden, wobei vorzugsweise die Restriktionsenzymschnittstelle erhalten bleiben soll. Hierdurch kann man bei Bedarf in einem weiteren Klonierungsschritt eine weitere gleiche oder verschiedene Sonden-bindende Nukleinsäure für den Nachweis bzw. zur Immobilisierung einbauen, um dadurch die Fluoreszenzsignale verstärken oder die Bindung an die feste Phase festigen zu können.

20

Zur Immobilisierung von Prä-mRNA werden beispielsweise die Aptamere Th oder To am 3'-Ende des Exon2 der Prä-mRNA eingefügt und der entsprechende Bindungspartner an der Festphase kovalent gebunden. Die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen sind in Fig. 1A und 1B dargestellt.

25

Hierbei wird beispielsweise die entsprechende Aptamersequenz als DNA-Oligonucleotid in die BamHI-Schnittstelle der kodierenden Minx-DNA, d. h. zwischen Position 219 und 220 der korrespondierenden Minx-prä-mRNA, inseriert.

30

Wie bereits oben erwähnt, können auch Sonden-bindende Nukleinsäuren in die Intron-Struktur der prä-mRNA eingefügt werden, wobei diese durch das Spleißen freigesetzt und somit in der beispielsweise immobilisierten mRNA fehlt. 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 Sonden-bindenden Nukleinsäuren nicht aus der prä-mRNA entfernt werden und

könnten daher beispielsweise nach Immobilisierung der prä-mRNA nachgewiesen werden. Beispiele geeigneter Nukleinsäurekonstrukte sind in Form ihrer kodierenden Sequenzen in Fig. 2A und 2B dargestellt.

5 Hierzu wird beispielsweise die entsprechende Aptamersequenz als DNA-Oligonucleotid in die PstI-Schnittstelle der kodierenden Minx-DNA, d. h. zwischen Position 88 und 89 der korrespondierenden prä-mRNA, inseriert.

10 Wie bereits oben 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
15 entfernenbar. In Verbindung mit Konstrukten, die beispielsweise eine Aptamerstruktur im Intron haben, kann daher eine Aussage darüber gemacht werden, ob im ersten Spleißschritt beispielsweise eine Inhibierung stattgefunden hat. Werden beispielsweise zwei verschiedenen Aptamere, die verschiedene Sonden erkennen, am 5'-Ende des Exon1 und im Intron der prä-mRNA eingebaut, so kann sowohl der erste Spleißschritt, wie auch der zweite Spleißschritt in einem Testsystem verfolgt
20 werden. Beispiele geeigneter Nukleinsäurekonstrukte sind in Form ihrer kodierenden Sequenzen in Fig. 3A und 3B dargestellt.

25 Hierzu wird beispielsweise die entsprechende Aptamersequenz als DNA-Oligonucleotid in die EcoRI-Schnittstelle der kodierenden Minx-DNA, d. h. zwischen Position 9 und 10 der korrespondierenden Minx-prä-mRNA, inseriert.

30 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) und beispielsweise geeignete Aptamere, wie z. B. die oben beschriebenen Theophyllin- oder Tobramycin-Aptamere, einbauen. Beispiele geeigneter Nukleinsäurekonstrukte sind in Form ihrer kodierenden Sequenzen in Fig. 4A bis 4C dargestellt.

Zur Herstellung des Nukleinsäurekonstruktes gemäß Fig. 4A wird beispielsweise ein geeignetes Aptamer als DNA-Oligonucleotid in die SacII-Schnittstelle der kodierenden U3-DNA, d. h. zwischen Position 22 und 23 der prä-U3 RNA, inseriert.

5 Zur Herstellung des Nucleinsäurekonstruktes gemäß Fig. 4B wird beispielsweise ein geeignetes Aptamer als DNA-Oligonucleotid in die BstNI-Schnittstelle der kodierenden U3-DNA, d. h. zwischen Position 105 und 106 der prä-U3RNA, inseriert.

10 Die Nukleinsäuresequenz gemäß Fig. 5A stellt ein Beispiel einer Nukleinsäuresequenz mit einem "Iron Responsive Element" (IRE) dar, das für Untersuchungen im Humansystem geeignet ist. Das IRE ist hierbei an dem 3'-Ende des Exon2 analog den oben beschriebenen Aptameren eingefügt.

15 Für Untersuchungen im Hefesystem kann ein IRE-Element beispielsweise an dem 3'-Ende des Exon2 der prä-U3RNA, wie in Fig. 5B dargestellt, eingefügt werden:

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine spleißfähige Nukleinsäure, wie oben beispielhaft dargestellt, sowie deren Verwendung zur Herstellung eines Testsystems.

20

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 He-
25 La-Zellen oder Zellextrakte von Pilzen, insbesondere Hefen, nach dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren gewonnen werden (siehe Beispiele). Die Zellextrakte
30

enthalten im allgemeinen alle wichtigen Faktoren, um ein Spleißen in vitro durchführen zu können.

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

10 Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf ein Verfahren zur Herstellung eines Testsystems, bei dem mindestens eine spleißfähige und immobilisierte Nukleinsäure 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 oben näher beschrieben worden.

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

- 20 a) eine oder mehrere gleiche oder verschiedene immobilisierte Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäuresequenz 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) das sich gegebenenfalls gebildete Spleißprodukt mittels eines gelfreien Nachweissystems nachgewiesen wird.

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

30 Die wirksame Substanz kann hierbei eine pharmazeutisch wirksame Verbindung, 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.

5

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.

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

- 15 a) eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene immobilisierte Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäuresequenz in Anwesenheit von 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.

20 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. Die Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten kann in diesem Fall bei-

25 spielsweise eine behandelte oder unbehandelte Gewebeprobe des Patienten sein.

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken. Dargestellt sind die Konstrukte in DNA-Sequenzen. Die spleißfähigen RNAs können durch in vitro-Transkription, wie sie weiter unten beschrieben ist, generiert werden.

30

Beschreibung der Figuren

Fig. 1A zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, in der an das 3'-Ende des Exon2 einer für Minx codierenden prä-mRNA ein Th-Aptamer eingefügt wurde.

5 Fig. 1B zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, in der an das 3'-Ende des Exon2 einer für Minx codierenden prä-mRNA ein To-Aptamer eingefügt wurde.

Fig. 2A zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, in der in das Intron einer für Minx codierenden prä-mRNA ein Th-Aptamer eingefügt wurde.

10

Fig. 2B zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, in der in das Intron einer für Minx codierenden prä-mRNA ein To-Aptamer eingefügt wurde.

Fig. 3A zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, in der an das 5'-Ende des Exon1 einer für Minx codierenden prä-mRNA ein Th-Aptamer eingefügt wurde.

15

Fig. 3B zeigt die Sequenz einer RNA in der an das 5'-Ende des Exon1 einer für Minx codierenden prä-mRNA ein Th-Aptamer eingefügt wurde.

20 Fig. 4A zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, die für eine U3-prä-mRNA kodiert. Am 5'-Ende des Exon1 ist eine Einfügestelle für ein Th- oder To-Aptamer gekennzeichnet.

25 Fig. 4B zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, die für eine U3-prä-mRNA kodiert. Im Intron ist eine Einfügestelle für ein Th- oder To-Aptamer gekennzeichnet.

Fig. 4C zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, die für eine U3-prä-mRNA kodiert. Am 3'-Ende des Exon2 ist eine Einfügestelle für ein Th- oder To-Aptamer gekennzeichnet .

5 Fig. 5A zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, die für eine Minx-prä-mRNA kodiert. Am 3'-Ende des Exon2 ist ein die Sequenz für IRE eingefügt.

Fig. 5B zeigt die kodierende Nukleinsäuresequenz, die für eine der U3-prä-mRNA kodiert. Am 3'-Ende des Exon2 ist ein die Sequenz für IRE eingefügt.

10

Fig. 6 zeigt den zeitlichen Verlauf des Spleißens von MINX- und MINX-IRE-prä-mRNA durch HeLa Kernextrakt.

In vitro transkribierte MINX (Spuren 1-5) und MINX-IRE (Spuren 6-10) prä-mRNAs wurden mit HeLa Kernextrakt für den in der Abbildung angegebenen Zeitraum inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt und die ³²P-markierte RNA mit Hilfe von Autoradiographie nachgewiesen. Mehrfache Banden bei der IRE enthaltenden RNA (Spuren 6-10) sind durch unvollständige Denaturierung des IRE zu erklären.

20

Beispiele

1. Das RNA-Konstrukt:

Die zu spleißende mRNA besteht aus mindestens zwei Exons, die durch ein Intron getrennt sind. Zusätzlich zu diesen Sequenzen sind Sequenzen enthalten, die geeignet sind, eine spezifische Erkennung durch RNA-Bindeproteine oder niedermolekulare Verbindungen zu ermöglichen. Über die Kopplung dieser Bindeproteine oder Verbindungen an eine Matrix wird die mRNA selektiv an die Matrix gebunden. Alternativ erfolgt die Kopplung der mRNA auch kovalent über 3'-OH-Gruppen der Ribose direkt an die Matrix.

30

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 MgCl₂, 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 zentrifugiert. Das Sediment wird in 3 ml Puffer B (20 mM HEPES, 25% (v/v) Glycerin, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 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 MgCl₂, 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 entstandenen 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 MgSO₄, 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, Protease 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 mit IRE 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 (Neosequenz). Diese Sequenz wird zur Generierung von komplementären Nukleotidsequenzen genutzt, die selektiv nur an diese Neosequenz binden. Durch kovalente Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen, Biotin, Digoxigenin oder ähnlichen Molekülen bzw. durch radioaktive Markierung, wird indirekt das durchgeführte Spleißen nachgewiesen. Die Auswertung des Assays erfolgt in einem geeigneten Auswertegerät (ELISA-Reader, Fluoreszenzmeßgerät etc.).

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 Fig. 5A beschriebene Konstrukt wurde von dem dafür kodierenden Plasmid mittels in vitro Transkription in die korrespondierende mRNA umgeschrieben. Zur Kontrolle und späteren Vergleich wurde ebenfalls das entsprechende Konstrukt ohne die IRE-Sequenz in den Experimenten eingesetzt.

Zuvor wurden die Konstrukte in den Vektor pGEM-3Zf (Pharmacia) einkloniert und in E. coli vermehrt. Mit Hilfe von Standardtechnologien wurden die Plasmide gereinigt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Vor dem Einsatz in der in vitro Transkription wurden die Plasmide mit Hilfe von Restriktionsenzymen linearisiert.

Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 µl 5 x Transkriptionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7.9, 30 mM MgCl₂, 10 mM Spermidin, 50 mM NaCl)
1 µl BSA (1 mg/ml)
1 µl RNasin
2,5 µl DTT (100 mM)
1 µl NTP's (ATP, GTP, CTP mit 2,5 mM und UTP mit 1,25 mM)
2 µl ³²P-UTP (3000 Ci/mM)
2 µl MINX Plasmid linearisiert (1 mg/ml)
2,5 µl GpppG-Cap (1mM)
2 µl SP6 Polymerase
ad 25 µl mit H₂O

Der Transkriptionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend über ein präparatives Gel nach Standardmethoden gereinigt. Zum Auffinden der markierten

RNA wurde für 1 Minute ein Röntgenfilm aufgelegt und die Bande mittels eines Skalpells 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.

5

3.2 Durchführung der Spleißreaktion

10

7 µl Kernextrakt von HeLa-Zellen (=35 % v/v) wurden mit 3,25 mM MgCl₂, 35 mM KCl, 2 mM ATP, 20 mM Phosphocreatine, 1U/µl RNAsin und 30.000 – 50.000 cpm 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 IRE 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. Die Proben wurden mit 400 µl Phenol/Chloroform extrahiert und die wässrige Phase mit 2,5 Volumina Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) bei –20°C gefällt. Die RNA wurde abzentrifugiert und mit 70 - 80% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die RNA getrocknet.

15

20

Die getrocknete RNA wurde in 5 µl Probenpuffer (0,5 x TBE, 80% (v/v) Formamid, 0,1% (w/v) Xylencyanol und 0,1% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, für 10 Minuten bei 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und anschließend mittels eines 8%-igen Polyacrylamidgels aufgetrennt. Die aufgetrennte RNA wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen (siehe Fig. 6).

25

30

In den Spuren 1-5 der Fig. 6 ist der zeitliche Verlauf (0, 10, 20, 30, 40 Minuten) der Spleißreaktion der MINX prä-mRNA ohne IRE am 3'-OH Ende gezeigt. Auf der Abbildung ist zu erkennen, daß nach ca. 20 Minuten ein Großteil der Prä-mRNA in die reife mRNA überführt worden ist. In den Spuren 6-10 ist das gleiche Experiment mit der durch IRE am 3'-OH Ende modifizierten prä-mRNA gezeigt. Auch hier ist eine deutliche Spleißreaktion nach 20 Minuten Inkubationszeit zu erkennen.

Patentansprüche

1. Testsystem enthaltend

- 5 (a) eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene immobilisierte Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäure,
- (b) mindestens ein gelfreies Nachweissystem zum Nachweis einer Spleißreaktion, gegebenenfalls
- (c) mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Spleißkomponenten, und vorzugsweise
- 10 (d) geeignete Nachweissonden, und gegebenenfalls
- (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.

15

3. Testsystem nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das gelfreie Nachweissystem mindestens eine Sonde enthält.

20 4. Testsystem nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde eine zu der spleißfähigen Nukleinsäure komplementäre Nukleinsäure, eine die spleißfähige Nukleinsäure-bindende niedermolekulare Verbindung und/oder ein die spleißfähige Nukleinsäure-bindendes Peptid oder Protein ist.

25 5. Testsystem nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die niedermolekulare Verbindung ausgewählt ist aus Theophyllin, Xanthin oder einem Aminoglycosid, vorzugsweise Tobramycin, und das Nukleinsäure-bindende Peptid oder Protein ein "iron responsive element binding protein" IBP) ist.

30 6. Testsystem nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die komplementäre Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem Intron, zu mindestens einem Exon und/oder zu mindestens einer Übergangsstelle von einem Exon und einem Intron ist.

- 5 7. Testsystem nach einem der Ansprüche 3-6, dadurch gekennzeichnet, daß die spleißfähige Nukleinsäure oder die komplementäre Nukleinsäure des gelfreien Nachweissystems eine Erkennungssequenz für eine Nukleinsäure-bindende niedermolekulare Verbindung und/oder für ein Nukleinsäure-bindendes Peptid oder Protein enthält.
- 10 8. Testsystem nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennungssequenz für eine Nukleinsäure-bindende niedermolekulare Verbindung eine Aptamersequenz ist.
- 15 9. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß das gelfreie Nachweissystem eine Markierung enthält.
- 10 10. Testsystem nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine radioaktive Markierung, eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, mit Biotin, mit Digoxigenin und/oder mit Antikörper ist.
- 20 11. Testsystem nach einem der Ansprüche 3-8, dadurch gekennzeichnet, daß die spleißfähige Nukleinsäure und die Sonden-bindende Nukleinsäuresequenz miteinander verbunden sind.
- 25 12. Testsystem nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei verschiedene Sonden-bindende Nukleinsäuresequenzen mit einer spleißfähigen Nukleinsäure verbunden sind.
- 30 13. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure direkt kovalent oder indirekt über ein Strukturelement und einen Bindungspartner zum Strukturelement oder mittels Hybridisierung an eine feste Phase gebunden ist.
14. Testsystem nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die direkte kovalente Bindung über die vicinalen 2',3'-Hydroxylgruppe des Riboserückgrades der Nukleinsäure erfolgt.

15. Testsystem nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturelement ein Biotin- oder Dicarbonsäure-Linker ist
16. Testsystem nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindungspartner Theophyllin, Xanthin oder einem Aminoglycosid, vorzugsweise Tobramycin, und/oder ein Nukleinsäure-Bindeprotein, insbesondere IBP, ist.
17. Testsystem nach einem der Ansprüche 13-16, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase ausgewählt ist aus Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Glas oder Kunststoff.
18. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure eine RNA ist.
19. Testsystem nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die RNA von einer Nukleinsäure abgeleitet ist, ausgewählt aus einer Sequenz der Formel

T CTTGGATCGG

AAACCCGTCG GCCTCCGAAC GGTAAGAGCC TAGCATGTAG AACTGGTTAC
 CTGCAGCCCA AGCTTGCTGC ACGTCTAGGG CGCAGTAGTC CAGGGTTTCC
 TTGATGATGT CATACTTATC CTGTCCCTTT TTTTCCACA GCTCGCGGTT
 GAGGACAAAC TCTTCGCGGT CTTTCCAGTG GGGATCCAAG TGATACCAGC
 ATCGTCTTGA TGCCCTTGGC AGCACTTGGA TCC,

CACTCTTGGA TCGGAAACCC GTCGGCCTCC GAACGGTAAG AGCCTAGCAT
 GTAGAACTGG TTACCTGCAG CCCAAGCTTG CTGCACGTCT AGGGCGCAGT
 AGTCCAGGGT TTCCTTGATG ATGTCATACT TATCCTGTCC CTTTTTTTTTC
 CACAGCTCGC GGTGAGGAC AAACCTCTTCG CGGTCTTTCC AGTGGGGATC
 GGCTTAGTAT AGCGAGGTTT AGCTACACTC GTGCTGAGCC GGATCC

CACTCTTGGA TCGGAAACCC GTCGGCCTCC GAACGGTAAG AGCCTAGCAT
 GTAGAACTGG TTACCTGCAA AGUGAUACCA GCAUCGUCUU GAUGCCCUUG
 GCAGCACUUC TGCAGCCCAA GCTTGCTGCA CGTCTAGGGC GCAGTAGTCC
 AGGGTTTCCT TGATGATGTC ATACTTATCC TGTCCCTTTT TTTTCCACAG
 CTCGCGGTTG AGGACAACT CTTTCGCGGTC TTTCCAGTGG GGATCC

CCACTCTTGGA ATCGGAAACC CGTCGGCCTC CGAACGGTAA GAGCCTAGCA
 TGAGAACTG GTTACCTGCA GGCTTAGTAT AGCGAGGTTT AGCTACACTC
 GTGCTGAGCC CTGCAGCCCA AGCTTGCTGC ACGTCTAGGG CGCAGTAGTC
 CAGGGTTTCC TTGATGATGT CATACTTATC CTGTCCCTTT TTTTCCACA
 GCTCGCGGTT GAGGACAAAC TCTTCGCGGT CTTTCCAGTG GGGATCC

AAGTGATACC AGCATCGTCT TGATGCCCTT GGCAGCACTT GAATTCGAGC
 TCGCCCACTC TTGGATCGGA AACCCGTCGG CCTCCGAACG GTAAGAGCCT
 AGCATGTAGA ACTGGTTACC TGCAGCCCAA GCTTGCTGCA CGTCTAGGGC
 GCAGTAGTCC AGGGTTTCCT TGATGATGTC ATACTTATCC TGTCCCTTTT
 TTTTCCACAG CTCGCGGTTG AGGACAAACT CTTGCGGGTC TTTCCAGTGG
 GGATCC

GGCTTAGTAT AGCGAGGTTT AGCTACACTC GTGCTGAGCC GAATTCGAGC
 TCGCCCACTC TTGGATCGGA AACCCGTCGG CCTCCGAACG GTAAGAGCCT
 AGCATGTAGA ACTGGTTACC TGCAGCCCAA GCTTGCTGCA CGTCTAGGGC
 GCAGTAGTCC AGGGTTTCCT TGATGATGTC ATACTTATCC TGTCCCTTTT
 TTTTCCACAG CTCGCGGTTG AGGACAAACT CTTGCGGGTC TTTCCAGTGG
 GGATCC

(Th/To)-5'-verbunden mit einer Sequenz der Formel

CCGCGGTGGC GGCCGCTCTA GAACTAGTGG ATCCGTCGAC TGACTTCAGT
 ATGTAATATA CCCCAAACAT TTTACCCACA AAAAACCAGG ATTTGAAACT
 ATAGCATCTA AAAGTCTTAG GTACTAGAGT TTTCATTTTCG GAGCAGGCTT
 TTTGAAAAAT TTAATTCAAC CATTGCAGCA GCTTTTGACT AACACATTCT
 ACAGTAGGAT CATTTCTATA GGAATCGTCA CTCTTTGACT CTTCAAAAGA
 GCCACTGAAT CCAACTTGGT TGATGAGTCC CATAACCTTT GTACCCCAAGA
 GTGAGAAACC GAAATTGAAT CTAAATTAGC TTGGTCCGCA ATCCTTAGCG
 TTCGGCCATC TATAATTTTG AATAAAAATT TTGCTTTGCC GTTGCAATTTG
 TAGTTTTTTC CTTTGGAAGT AATTACAATA TTTTATGGCG CGATGATTCT
 TGACCCATCC TATGTACTTC TTTTTTGAAG GGATAGGGCT CTATGGGTGG
 GTACAAATGG CAGTCTGACA AGTT,

TCCGTCGACT GACTTCAGTA TGTAATATAC CCCAAACATT TTACCCACAA
 AAAACCA-3'-(Th/To)
 CCAGGATTTG AAACATATAGC ATCTAAAAGT CTTAGGTACT AGAGTTTTTCA
 TTTCGGAGCA GGCTTTTTTGA AAAATTTAAT TCAACCATTG CAGCAGCTTT
 TGACTAACAC ATTCTACAGT AGGATCATT CTATAGGAAT CGTCACTCTT
 TGACTCTTCA AAAGAGCCAC TGAATCCAAC TTGGTTGATG AGTCCCATAA
 CCTTTGTACC CCAGAGTGAG AAACCGAAAT TGAATCTAAA TTAGCTTGGT
 CCGCAATCCT TAGCGTTCGG CCATCTATAA TTTTGAATAA AAATTTTGCT
 TTGCCGTTGC ATTTGTAGTT TTTTCCTTTG GAAGTAATTA CAATATTTTA
 TGGCGCGATG ATTCTTGACC CATCCTATGT ACTTCTTTTT TGAAGGGATA
 GGGCTCTATG GGTGGGTACA AATGGCAGTC TGACAAGTT,

GTCGACTGAC TTCAGTATGT AATATACCCC AAACATTTTA CCCACAAAAA
 ACCAGGATTT GAAACTATAG CATCTAAAAG TCTTAGGTAC TAGAGTTTTTC
 ATTTTCGGAGC AGGCTTTTTG AAAAATTTAA TTCAACCATT GCAGCAGCTT
 TTGACTAACA CATTCTACAG TAGGATCATT TCTATAGGAA TCGTCACTCT
 TTGACTCTTC AAAAGAGCCA CTGAATCCAA CTTGGTTGAT GAGTCCATA
 ACCTTTGTAC CCCAGAGTGA GAAACCGAAA TTGAATCTAA ATTAGCTTGG
 TCCGCAATCC TTAGCGTTCG GCCATCTATA ATTTTGAATA AAAATTTTGC
 TTTGCCGTTG CATTTGTAGT TTTTTCCTTT GGAAGTAATT ACAATATTTT
 ATGGCGCGAT GATTCTTGAC CCATCCTATG TACTTCTTTT TTGAAGGGAT
 AGGGCTCTAT GGGTGGGTAC AAATGGCAGT CTGACAAGTT-3'-(Th/To)

CACTCTTGGA TCGGAAACCC GTCGGCCTCC GAACGGTAAG AGCCTAGCAT
 GTAGAACTGG TTACCTGCAG CCCAAGCTTG CTGCACGTCT AGGGCGCAGT
 AGTCCAGGGT TTCCTTGATG ATGTCATACT TATCCTGTCC CTTTTTTTTC
 CACAGCTCGC GGTGAGGAC AAACCTCTTCG CGGTCTTTCC AGTGGGGATC
 GGGGATCCTG CTTCAACAGT GCTTGGACGG ATCCTCTAGA c **oder**

TCCGTCGACT GACTTCAGTA TGTAATATAC CCCAAACATT TTACCCACAA
 AAAACCAGGA TTTGAAACTA TAGCATCTAA AAGTCTTAGG TACTAGAGTT
 TTCATTTTCGG AGCAGGCTTT TTGAAAAATT TAATTCAACC ATTGCAGCAG
 CTTTTGACTA ACACATTCTA CAGTAGGATC ATTTCTATAG GAATCGTCAC
 TCTTTGACTC TTCAAAAGAG CCACTGAATC CAACTTGGTT GATGAGTCCC
 ATAACCTTTG TACCCAGAG TGAGAAACCG AAATTGAATC TAAATTAGCT
 TGGTCCGCAA TCCTTAGCGT TCGGCCATCT ATAATTTTGA ATAAAAATTT
 TGCTTTGCCG TTGCATTTGT AGTTTTTTCC TTTGGAAGTA ATTACAATAT
 TTTATGGCGC GATGATTCTT GACCCATCCT ATGTAATTCT TTTTGAAGG
 GATAGGGCTC TATGGGTGGG TACAAATGGC AGTCTGACA AGTTGGGGATC
 CTGCTTCAAC AGTGCTTGA CGGATCCTCT AGAC,

wobei (Th/To) eine Sequenz ausgewählt aus

AAGTGATACC AGCATCGTCT TGATGCCCTT GGCAGCACTT GAATT (Th), oder

GGCTTAGTAT AGCGAGGTTT AGCTACACTC GTGCTGAGCC GAATT (To)

bedeutet.

20. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung gemäß Merkmal (c) "small nuclear ribonucleoprotein particles" (snRNP)-Komponenten und nicht-snRNP-Komponenten enthalten.

21. Testsystem nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die snRNP-Komponenten U1-, U2-, U4-, U5- und/oder U6-Proteine enthalten.

22. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung gemäß Merkmal (c) ein Zellextrakt, insbesondere ein eukaryotischer Zell- oder Zellkernextrakt ist.

23. Testsystem nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Zellkernextrakt aus tierischen Zellen, insbesondere Säugetierzellen, oder von Pilzen, insbesondere Hefen gewonnen ist.

24. Testsystem nach einem der Ansprüche 1-23, dadurch gekennzeichnet, daß die weiteren Hilfsmittel gemäß Merkmal (d) ausgewählt sind aus Pufferlösungen, Stabilisatoren und/oder Energieäquivalenten, insbesondere ATP.
25. Verfahren zur Herstellung eines Testsystems gemäß einem der Ansprüche 1-24, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine spleißfähige Nukleinsäure gemäß Merkmal (a) und mindestens ein gelfreies Nachweissystem gemäß Merkmal (b) sowie gegebenenfalls mindestens eine Zusammensetzung enthaltend Splice-komponenten gemäß Merkmal (c) und gegebenenfalls weitere Hilfsmitteln zusammengestellt werden.
26. Verfahren zum Auffinden einer wirksamen Substanz, dadurch gekennzeichnet, daß
- (a) eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene immobilisierte Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäuresequenz in Anwesenheit von mindestens einer zu untersuchenden Substanz und mindestens einer Zusammensetzung enthaltend Splice-komponenten und gegebenenfalls weiteren Hilfsmitteln unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden, und
- (b) das sich gegebenenfalls gebildete Spleißprodukt mittels eines gelfreien Nachweissystems nachgewiesen wird.
27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame Substanz eine pharmazeutisch wirksame Verbindung, ein Fungizid, ein Herbizid, ein Pestizid und/oder ein Insektizid ist.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die pharmazeutisch wirksame Substanz ein Antibiotikum ist.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 26-28, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Substanz ausgewählt ist aus einer natürlich vorkommenden, natürlich vorkommenden und chemisch modifizierten und/oder synthetischen Substanz.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Substanz in Form einer kombinatorischen Substanzbibliothek eingesetzt wird.

31. Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung, dadurch gekennzeichnet, daß

- (a) eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene immobilisierte Nukleinsäure/n mit mindestens einer spleißfähigen Nukleinsäuresequenz in Anwesenheit von mindestens einer Zusammensetzung enthaltend Splice Komponenten und gegebenenfalls weiteren Hilfsmitteln unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden, und
- (b) das sich gegebenenfalls gebildete Spleißprodukt mittels eines gelfreien Nachweissystems nachgewiesen wird.

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine Erbkrankheit, eine Krebserkrankung und/oder eine virale Erkrankung ist.

33. Verfahren nach Anspruch 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung ausgewählt ist aus Grave's Krankheit, spinale Muskelatrophie, β -Thalassaemie, Krebserkrankungen in bezug auf das c-erb-Onkogen, Hepatitis C Infektion und/oder Herpes Simplex Virus Infektion.

34. Spleißfähige Nukleinsäuren ausgewählt aus einer RNA, die von einer Nukleinsäure abgeleitet ist, ausgewählt aus einer Sequenz der Formel

T CTTGGATCGG

AAACCCGTCG GCCTCCGAAC GGTAAGAGCC TAGCATGTAG AACTGGTTAC
 CTGCAGCCCA AGCTTGCTGC ACGTCTAGGG CGCAGTAGTC CAGGGTTTCC
 TTGATGATGT CATACTTATC CTGTCCCTTT TTTTCCACA GCTCGCGGTT
 GAGGACAAAC TCTTCGCGGT CTTTCCAGTG GGGATCCAAG TGATACCAGC
 ATCGTCTTGA TGCCCTTGGC AGCACTTGGA TCC,

CACT CTTGGATCGG

AAACCCGTCG GCCTCCGAAC GGTAAGAGCC TAGCATGTAG AACTGGTTAC
 CTGCAGCCCA AGCTTGCTGC ACGTCTAGGG CGCAGTAGTC CAGGGTTTCC
 TTGATGATGT CATACTTATC CTGTCCCTTT TTTTCCACA GCTCGCGGTT
 GAGGACAAAC TCTTCGCGGT CTTTCCAGTG GGGATCGGCT TAGTATAGCG
 AGGTTTAGCT ACACTCGTGC TGAGCCGGAT CC,

5 AAACCCGTCG GCCTCCGAAC GGTAAGAGCC TAGCATGTAG AACTGGTTAC
 CTGCAAAGTG ATACCAGCAT CGTCTTGATG CCCTTGGCAG CACTTCTGCA
 GCCCAAGCTT GCTGCACGTC TAGGGCGCAG TAGTCCAGGG TTTCTTGAT
 GATGTCATAC TTATCCTGTC CCTTTTTTTT CCACAGCTCG CGGTTGAGGA
 CAAACTCTTC GCGGTCTTTC CAGTGGGGAT CC,

10

CCACT CTTGGATCGG
 15 AAACCCGTCG GCCTCCGAAC GGTAAGAGCC TAGCATGTAG AACTGGTTAC
 CTGCAAGGCTT AGTATAGCGA GGTTTAGCTA CACTCGTGCT GAGCCCTGCA
 GCCCAAGCTT GCTGCACGTC TAGGGCGCAG TAGTCCAGGG TTTCTTGAT
 GATGTCATAC TTATCCTGTC CCTTTTTTTT CCACAGCTCG CGGTTGAGGA
 CAAACTCTTC GCGGTCTTTC CAGTGGGGAT CC,

20

AAGT GATACCAGCA TCGTCTTGAT
 25 GCCCTTGGCA GCACTTGAAT TCGAGCTCGC CCACTCTTGG ATCGGAAACC
 CGTCGGCCTC CGAACGGTAA GAGCCTAGCA TGTAGAACTG GTTACCTGCA
 GCCCAAGCTT GCTGCACGTC TAGGGCGCAG TAGTCCAGGG TTTCTTGAT
 GATGTCATAC TTATCCTGTC CCTTTTTTTT CCACAGCTCG CGGTTGAGGA
 CAAACTCTTC GCGGTCTTTC CAGTGGGGAT CC,

30

GGCT TAGTATAGCG AGGTTTAGCT
 35 ACACTCGTGC TGAGCCGAAT TCGAGCTCGC CCACTCTTGG ATCGGAAACC
 CGTCGGCCTC CGAACGGTAA GAGCCTAGCA TGTAGAACTG GTTACCTGCA
 GCCCAAGCTT GCTGCACGTC TAGGGCGCAG TAGTCCAGGG TTTCTTGAT
 GATGTCATAC TTATCCTGTC CCTTTTTTTT CCACAGCTCG CGGTTGAGGA
 CAAACTCTTC GCGGTCTTTC CAGTGGGGAT CC,

(Th/To)-5'-verbunden mit einer Sequenz der Formel
 40 CCGCGGTGGC GGCCGCTCTA GAACTAGTGG ATCCGTCGAC TGACTTCAGT
 ATGTAATATA CCCCAAACAT TTTACCCACA AAAAACCAGG ATTTGAAACT
 ATAGCATCTA AAAGTCTTAG GTACTAGAGT TTTCAATTCG GAGCAGGCTT
 TTTGAAAAAT TTAATTCAAC CATTCGACGA GCTTTTGACT AACACATTCT
 ACAGTAGGAT CATTTCTATA GGAATCGTCA CTCTTTGACT CTTCAAAAGA
 GCCACTGAAT CCAACTTGGT TGATGAGTCC CATAACCTTT GTACCCGAGA
 GTGAGAAACC GAAATTGAAT CTAAATTAGC TTGGTCCGCA ATCCTTAGCG
 45 TTCGGCCATC TATAATTTTG AATAAAAATT TTGCTTTGCC GTTGCAATTG
 TAGTTTTTTC CTTTGGAAGT AATTACAATA TTTTATGGCG CGATGATTCT
 TGACCCATCC TATGTACTTC TTTTTTGAAG GGATAGGGCT CTATGGGTGG
 GTACAAATGG CAGTCTGACA AGTT,

TCCGTCGACT GACTTCAGTA TGTAATATAC CCCAAACATT TTACCCACAA
 AAAACCA-3'-(Th/To)
 CCAGGATTG AAACCTATAGC ATCTAAAAGT CTTAGGTACT AGAGTTTTTCA
 TTTTCGGAGCA GGCTTTTTTGA AAAATTTAAT TCAACCATTG CAGCAGCTTT
 5 TGACTAACAC ATTCTACAGT AGGATCATT CTATAGGAAT CGTCACTCTT
 TGA CTCTTCA AAAGAGCCAC TGAATCCAAC TTGGTTGATG AGTCCCATAA
 CCTTTGTACC CCAGAGTGAG AAACCGAAAT TGAATCTAAA TTAGCTTGGT
 CCGCAATCCT TAGCGTTCGG CCATCTATAA TTTTGAATAA AAATTTTGCT
 10 TTGCCGTTGC ATTTGTAGTT TTTTCCTTTG GAAGTAATTA CAATATTTTA
 TGGCGCGATG ATTCCTTGACC CATCCTATGT ACTTCTTTTT TGAAGGGATA
 GGGCTCTATG GGTGGGTACA AATGGCAGTC TGACAAGTT,

 GTCGACTGAC TTCAGTATGT AATATACCCC AAACATTTTA CCCACAAAAA
 ACCAGGATTT GAACTATAG CATCTAAAAG TCTTAGGTAC TAGAGTTTTTC
 15 ATTTTCGGAGC AGGCTTTTTTG AAAAATTTAA TTCAACCATT GCAGCAGCTT
 TTGACTAACA CATCTACAG TAGGATCATT TCTATAGGAA TCGTCACTCT
 TTGACTCTTC AAAAGAGCCA CTGAATCCAA CTTGGTTGAT GAGTCCCATA
 ACCTTTGTAC CCCAGAGTGA GAAACCGAAA TTGAATCTAA ATTAGCTTGG
 20 TCCGCAATCC TTAGCGTTCC GCCATCTATA ATTTTGAATA AAAATTTTGC
 TTTGCCGTTG CATTTGTAGT TTTTTCCTTT GGAAGTAATT ACAATATTTT
 ATGGCGCGAT GATTCTTGAC CCATCCTATG TACTTCTTTT TTGAAGGGAT
 AGGGCTCTAT GGGTGGGTAC AAATGGCAGT CTGACAAGTT-3'-(Th/To)

 CACTCTTGGA TCGGAAACCC GTCGGCCTCC GAACGGTAAG AGCCTAGCAT
 25 GTAGAACTGG TTACCTGCAG CCCAAGCTTG CTGCACGTCT AGGGCGCAGT
 AGTCCAGGGT TTCTTGATG ATGTCATACT TATCCTGTCC CTTTTTTTTTTC
 CACAGCTCGC GGTGAGGAC AAACCTCTTCG CGGTCTTTCC AGTGGGGATC
 30 GGGGATCCTG CTTCAACAGT GCTTGGACGG ATCCTCTAGA c oder

 TCCGTCGACT GACTTCAGTA TGTAATATAC CCCAAACATT TTACCCACAA
 AAAACCAGGA TTTGAAACTA TAGCATCTAA AAGTCTTAGG TACTAGAGTT
 35 TTCATTTTCGG AGCAGGCTTT TTGAAAAATT TAATTCAACC ATTGCAGCAG
 CTTTTGACTA ACACATTCTA CAGTAGGATC ATTTCTATAG GAATCGTCAC
 TCTTTGACTC TTCAAAAGAG CCACTGAATC CAACTTGGTT GATGAGTCCC
 ATAACCTTTG TACCCAGAG TGAGAAACCG AAATTGAATC TAAATTAGCT
 TGGTCCGCAA TCCTTAGCGT TCGGCCATCT ATAATTTTGA ATAAAAATTT
 40 TGCTTTGCCG TTGCATTTGT AGTTTTTTTCC TTTGGAAGTA ATTACAATAT
 TTTATGGCGC GATGATTCTT GACCCATCCT ATGTACTTCT TTTTGAAGG
 GATAGGGCTC TATGGGTGGG TACAAATGGC AGTCTGACA AGTTGGGGATC
 CTGCTTCAAC AGTGCTTGA CGGATCCTCT AGAC,

wobei (Th/To) eine Sequenz ausgewählt aus

AAGTGATACC AGCATCGTCT TGATGCCCTT GGCAGCACTT GAATT (Th), oder
 GGCTTAGTAT AGCGAGGTTT AGCTACACTC GTGCTGAGCC GAATT (To)

bedeutet.

35. Verwendung einer spleißfähigen Nukleinsäure gemäß Anspruch 34 zur Herstellung eines Testsystems.

Fig. 1A

taatacgactcactataGGGCGAATTCGAGCTCGCCCACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCC
---T7 Promotor-----.....Exon1.....

GAACGgtaagagcctagcatgtagaactggttacctgcagcccaagcttgctgcacgtctagggcg
.....-----Intron-----

cagtagtccagggtttccttgatgatgtcatacttatcctgtccctttttttccacagCTCGCGG
-----Intron-----.Exon2

TTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTGGGGATCCAAGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCC
.....Exon 2.....=====**Aptamer Th**=====

CTTGGCAGCACTTGGATCC
==**Aptamer Th**=====

Fig. 1B

ttaatacgactcactataGGGCGAATTCGAGCTCGCCCACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTC
---T7 Promotor-----.....Exon 1.....

CGAACGgtaagagcctagcatgtagaactggttacctgcagcccaagcttgctgcacgtctagggc
.....-----Intron-----

gcagtagtccagggtttccttgatgatgtcatacttatcctgtccctttttttccacagCTCGCG
-----Intron-----.Exon2

GTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTGGGGATCGGCTTAGTATAGCGAGGTTAGCTACA
.....Exon 2.....=====**Aptamer To**=====

CTCGTGCTGAGCCGGATCC
===**Aptamer To**=====

Fig. 2A

taatacgactcactataGGGCGAATTCGAGCTCGCCCACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCC
.....---T7 Promotor-----.....Exon 1.....

GAACGgtaagagcctagcatgtagaactgggttacctgcaAAGTGATAACCAGCATCGTCTTGATGCC
.....-----Intron-----**==Aptamer Th=====**

CTTGGCAGCACTTCTGCAgccaagcttgctgcacgtctagggcgagtagtccagggtttccttg
==Aptamer Th=====-----Intron-----

atgatgtcatacttatcctgtccctttttttccacagCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGG
-----Intron-----.....Exon2.....

TCTTTCCAGTGGGGATCC
.....Exon 2.....

Fig. 2B

taatacgactcactataGGGCGAATTCGAGCTCGCCCACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCC
.....---T7 Promotor---.....Exon1.....

GAACGgtaagagcctagcatgtagaactgggttacctgcaGGCTTAGTATAGCGAGGTTAGCTACA
.....-----Intron-----=====Aptamer To=====

CTCGTGCTGAGCCCTGCAgcccagcttgctgcacgtctagggcgagtagtccaggggttccttg
==Aptamer To=====-----Intron-----

atgatgtcatacttatcctgtccctttttttccacagCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGG
-----Intron-----.....Exon 2.....

TCTTTCCAGTGGGGATCC
.....Exon 2.....

Fig. 3A

taatacgactcactataGGGCGAATTAAGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACTT
---T7---=====Aptamer Th=====

Promotor

GAATTCGAGCTCGCCCACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGgtaagagcctagcatg
 =====.....Exon 1.....-----Intron----

tagaactggttacctgcagcccaagcttgctgcacgtctagggcgtagtccagggtttccttg
 -----Intron-----

atgatgtcatacttatacctgtccctttttttccacagCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGG
 -----Intron-----.....Exon 2.....

TCTTTCCAGTGGGGATCC
....Exon 2.....

Fig. 3B

taatacgactcactataGGGCGAATTGGCTTAGTATAGCGAGGTTTAGCTACACTCGTGCTGAGCC
---T7-----=**Aptamer To**=====

Promotor

GAATTCGAGCTCGCCCACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGgtaagagcctagcatg
 =====.....Exon 1.....-----Intron----

tagaactggttacctgcagcccaagcttgctgcacgtctagggcgagtagtccagggtttccttg
 -----Intron-----

atgatgtcatacttatcctgtccctttttttccacagCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGG
 -----Intron-----.....Exon 2.....

TCTTTCCAGTGGGGATCC
....Exon 2.....

Fig. 4A

TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGC (Th/To) CCGCGGTGGCGGCCGCTCTA
---T7 Promotor-----/-----/-----

Aptamer-einfügestelle

GAACTAGTGGATCCGTCGACTGACTTCAgtatgtaataaccccaaacattttaccacaaaaaac
-----...Exon 1....-----Intron-----

caggatttgaaactatagcatctaaaagtcttaggtactagagttttcatttcggagcaggcctttt
-----Intron-----

tgaaaaatttaattcaaccattgcagcagcttttgactaacacattctacagTAGGATCATTCTA
-----Intron-----.....Exon 2...

.....Exon 2.....

ACCTTTGTACCCAGAGTGAGAAACCGAAATTGAATCTAAATTAGCTTGGTCCGCAATCCTTAGCG
Exon 2.....

TTCGCCATCTATAATTTTGAATAAAAAATTTTGCTTTGCCGTTGCATTTGTAGTTTTTTCCTTTGG
Exon 2.....

AAGTAATTACAATATTTTATGGCGCGATGATTCTTGACCCATCCTATGTACTTCTTTTTGAAGGG
Exon 2.....

ATAGGGCTCTATGGGTGGGTACAAATGGCAGTCTGACAAGTT

Fig. 4B

TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGA
 ---T7 Promotor-----

TCCGTCGACTGACTTCAgtatgtaatataccccaaacattttaccacaaaaaacca(Th/To)CC
 ---...Exon 1....-Intron-----/

**Aptamer-
einfügestelle**

Aggatttgaaactatagcatctaaaagtcttaggtactagagttttcatttcggagcaggcgtttt
 /-----Intron-----

gaaaaatttaattcaaccattgcagcagcttttgactaacacattctacagTAGGATCATTCTAT
 -----Intron-----...Exon 2....

AGGAATCGTCACTCTTTGACTCTTCAAAAGAGCCACTGAATCCAACCTGGTTGATGAGTCCCATAA
Exon 2.....

CCTTTGTACCCAGAGTGAGAAACCGAAATTGAATCTAAATTAGCTTGGTCCGCAATCCTTAGCGT
Exon 2.....

TCGGCCATCTATAATTTGAATAAAAATTTTGCTTTGCCGTTGCATTGTAGTTTTTTCCTTTGGA
Exon 2.....

AGTAATTACAATATTTTATGGCGCGATGATTCTTGACCCATCCTATGTACTTCTTTTTGAAGGGA
Exon 2.....

TAGGGCTCTATGGGTGGGTACAAATGGCAGTCTGACAAGTT
Exon 2....

Fig. 4C

TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGA
 ---T7 Promotor-----

TCCGTCGACTGACTTCAgtatgtaatataccccaaacattttaccacaaaaaaccaggatttgaa
 ---...Exon 1.....-Intron-----

actatagcatctaaaagtcttaggtactagagttttcatttcggagcaggctttttgaaaaattta
 -----Intron-----

attcaaccattgcagcagcttttgactaacacattctacagTAGGATCATTCTATAGGAATCGTC
 -----Intron-----.....Exon 2.....

ACTCTTTGACTCTTCAAAAGAGCCACTGAATCCAACCTGGTTGATGAGTCCCATAACCTTTGTACC
Exon 2.....

CCAGAGTGAGAAACCGAAATTGAATCTAAATTAGCTTGGTCCGCAATCCTTAGCGTTCGGCCATCT
Exon 2.....

ATAATTTTGAATAAAAATTTGCTTTGCCGTTGCATTTGTAGTTTTTTCCTTTGGAAGTAATTACA
Exon 2.....

ATATTTTATGGCGCGATGATTCTTGACCCATCCTATGTACTTCTTTTTTGAAGGGATAGGGCTCTA
Exon 2.....

TGGGTGGGTACAAATGGCAGTCTGACAAGTT(Th/To)
Exon 2...../Aptamereinfügestelle

Fig. 5A

taatacgactcactataGGGCGAATTCGAGCTCGCCCACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCC
.....---T7-Promotor---.....Exon 1.....
GAACGgtaagagcctagcatgtagaactggttacctgcagcccaagcttgctgcacgtctagggcg
.....-----Intron-----
cagtagtccagggtttccttgatgatgtcatacttatacctgtccctttttttccacagCTCGCGG
-----Intron-----Exon 2
TTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTGGGGATCGGGGATCCTGCTTCAACAGTGCTTGGAC
.....Exon 2.....=====IRE=====

GGATCCTCTAGAC
===IRE=====

11 / 12

Fig. 5B

TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGA

-----T7-Promotor-----

TCCGTCGACTGACTTCagtatgtaatataccccaaacattttaccacaaaaaaccaggatttgaa

..Exon 1.....-----Intron-----

actatagcatctaaaagtcttaggtactagagttttcatttcggagcaggctttttgaaaaattta

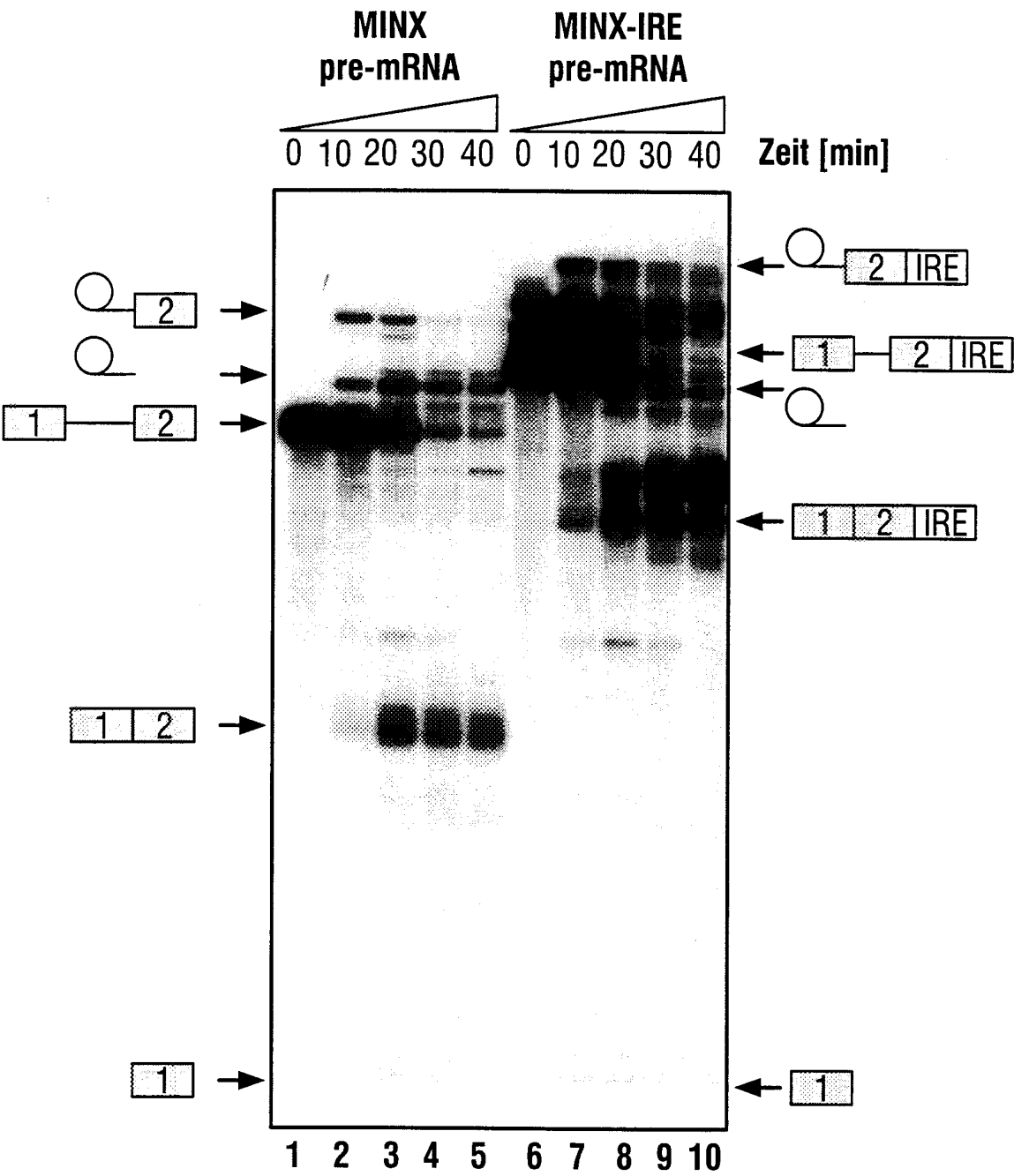
-----Intron-----

attcaaccattgcagcagcttttgactaacacattctacagTAGGATCATTCTATAGGAATCGTC

-----Intron-----.....Exon 2.....ACTCTTTGACTCTTCAAAGAGCCACTGAATCCAACCTGGTTGATGAGTCCCATAACCTTTGTACC.....Exon 2.....CCAGAGTGAGAAACCGAAATTGAATCTAAATTAGCTTGGTCCGCAATCCTTAGCGTTCGGCCATCT.....Exon 2.....ATAATTTGAATAAAAATTTGCTTTGCCGTTGCATTTGTAGTTTTTTCCTTTGGAAGTAATTACA.....Exon 2.....ATATTTTATGGCGCGATGATTCTTGACCCATCCTATGTACTTCTTTTTTGAAGGGATAGGGCTCTA.....Exon 2.....TGGGTGGGTACAAATGGCAGTCTGACAAGTTGGGGATCCTGCTTCAACAGTGCTTGGACGGATCCT.....Exon 2.....=====IRE=====CTAGAC

=IRE=

Fig. 6



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG

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

<130> 99f005

<140> 19909156.0

<141> 1999-03-02

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 40

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:APTAMER

<400> 1

aagugauacc agcaucgucu ugaugcccuu ggcagcacuu

40

<210> 2

<211> 40

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:APTAMER

<400> 2

ggcuuaguau agcgagguuu agcuacacuc gugcugagcc

40

<210> 3

<211> 283

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 3

```

taatacgact cactataggg cgaattcgag ctgcccact cttggatcgg aaacccgctc 60
gcctccgaac ggtaagagcc tagcatgtag aactgggttac ctgcagccca agcttgctgc 120
acgtctaggg cgagtagtc caggggtttcc ttgatgatgt catacttata ctgtcccttt 180
ttttccaca gctcgcggtt gaggacaaac tcttcgcggt ctttccagt gggtccaag 240
tgataccagc atcgtcttga tgcccttggc agcacttga tcc 283

```

<210> 4

<211> 283

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 4

```

ttaatacgac tcactatagg gcgaattcga gctcgccac tcttggatcg gaaacccgctc 60
ggcctccgaa cggtaagagc ctagcatgta gaactgggta cctgcagccc aagcttgctg 120
cacgtctagg gcgcagtagt ccaggggtttc cttgatgatg tcatacttat cctgtccctt 180
ttttttccac agctcgcggt tgaggacaaa ctcttcgcgg tctttccagt ggggatcggc 240
ttagtatagc gaggttttagc tacactcgtg ctgagccgga tcc 283

```

<210> 5

<211> 282

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 5

```

taatacgact cactataggg cgaattcgag ctgcccact cttggatcgg aaacccgctc 60
gcctccgaac ggtaagagcc tagcatgtag aactgggttac ctgcaaagt ataccagcat 120
cgtcttgatg cccttggcag cacttctgca gcccaagctt gctgcacgtc tagggcgag 180
tagtccaggg tttccttgat gatgtcatac ttatcctgtc cctttttttt ccacagctcg 240
cggttgagga caaactcttc gcggtcttcc cagtggggat cc 282

```

<210> 6

<211> 282

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 6

```

taatacgact cactataggg cgaattcgag ctgcccact cttggatcgg aaacccgtcg 60
gcctccgaac ggtaagagcc tagcatgtag aactggttac ctgcaggctt agtatagcga 120
ggtttagcta cactcgtgct gagccctgca gcccaagctt gctgcacgtc tagggcgag 180
tagtccaggg ttcccttgat gatgtcatac ttatcctgtc cctttttttt ccacagctcg 240
cggttgagga caaactcttc gcggtctttc cagtggggat cc 282

```

<210> 7

<211> 282

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 7

```

taatacgact cactataggg cgaattaagt gataccagca tcgtcttgat gcccttgga 60
gcacttgaat tcgagctcgc ccactcttgg atcggaacc cgtcggcctc cgaacggtaa 120
gagcctagca tgtagaactg gttacctgca gcccaagctt gctgcacgtc tagggcgag 180
tagtccaggg ttcccttgat gatgtcatac ttatcctgtc cctttttttt ccacagctcg 240
cggttgagga caaactcttc gcggtctttc cagtggggat cc 282

```

<210> 8

<211> 282

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 8

```

taatacgact cactataggg cgaattggct tagtatagcg aggttttagct acactcgtgc 60
tgagccgaat tcgagctcgc ccactcttgg atcggaacc cgtcggcctc cgaacggtaa 120
gagcctagca tgtagaactg gttacctgca gcccaagctt gctgcacgtc tagggcgag 180
tagtccaggg ttcccttgat gatgtcatac ttatcctgtc cctttttttt ccacagctcg 240
cggttgagga caaactcttc gcggtctttc cagtggggat cc 282

```

<210> 9

<211> 608

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 9

```

taatacgact cactataggg cgaattggag ctccaccgca agtgatacca gcatcgtctt 60
gatgcccttg gcagcacttg aattccgcgg tggcgggccg tctagaacta gtggatccgt 120
cgactgactt cagtatgtaa tataacccaa acattttacc cacaaaaaac caggatttga 180
aactatagca tctaaaagtc ttaggtacta gagttttcat ttcggagcag gctttttgaa 240
aaatttaatt caaccattgc agcagctttt gactaacaca ttctacagta ggatcatttc 300
tataggaatc gtcactcttt gactcttcaa aagagccact gaatccaact tggttgatga 360
gtcccataac ctttgtaccc cagagtgaga aaccgaaatt gaatctaaat tagcttgggtc 420
cgcaatcctt agcgttcggc catctataat tttgaataaa aattttgctt tgccgttgca 480
tttgtagttt tttcctttgg aagtaattac aatattttat ggcgcgatga ttcttgaccc 540
atcctatgta cttctttttt gaagggatag ggctctatgg gtgggtacaa atggcagtct 600
gacaagtt                                     608

```

<210> 10

<211> 607

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 10

```

taatacgact cactataggg cgaattggag ctccaccgcg gtggcgggccg ctctagaact 60
agtggatccg tcgactgact tcagtatgta atatacccca aacattttac ccacaaaaaa 120
ccaaagtgat accagcatcg tcttgatgcc cttggcagca cttgaattcc aggatttga 180
actatagcat ctaaaagtct taggtactag agttttcatt tcggagcagg ctttttgaaa 240
aatttaattc aaccattgca gcagcttttg actaacacat tctacagtag gatcatttct 300
ataggaatcg tcactctttg actcttcaaa agagccactg aatccaactt ggttgatgag 360
tcccataacc tttgtacccc agagtggaaa accgaaattg aatctaaatt agcttgggtcc 420
gcaatcctta gcgttcggcc atctataatt ttgaataaaa attttgcttt gccgttgcat 480
ttgtagtttt ttccttttgg aagtaattaca atattttatg gcgcgatgat tcttgaccca 540
tcctatgtac ttcttttttg aagggatag gctctatggg tgggtacaaa tggcagtctg 600
acaagtt                                     607

```

<210> 11

<211> 559

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 11

```

taatacgact cactataggg cgaattggag ctccaccgcg gtggcgggccg ctctagaact 60
agtggatccg tcgactgact tcagtatgta atatacccca aacattttac ccacaaaaaa 120
ccaggatttg aaactatagc atctaaaagt cttaggtact agagttttca tttcgagca 180

```

```

ggctttttga aaaatttaaat tcaaccattg cagcagcttt tgactaacac attctacagt 240
aggatcattt ctataggaat cgtcactctt tgactcttca aaagagccac tgaatccaac 300
ttggttgatg agtcccataa cctttgtacc ccagagttag aaaccgaaat tgaatctaaa 360
ttagcttggt cgcgaatcct tagcgttcgg ccatctataa ttttgaataa aaattttgct 420
ttgccgttgc attttagtatt ttttcctttg gaagtaatta caatatttta tggcgcgatg 480
attcttgacc catcctatgt acttcttttt tgaagggata gggctctatg ggtgggtaca 540
aatggcagtc tgacaagtt
559

```

<210> 12

<211> 244

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 12

```

tcttgatcg gaaacccgtc ggcctccgaa cggttaagagc ctagcatgta gaactgggta 60
cctgcagccc aagcttgctg cacgtctagg gcgcagtagt ccagggtttc cttgatgatg 120
tcatacttat cctgtccctt ttttttccac agctcgcggg tgaggacaaa ctcttcgcgg 180
tctttccagt ggggatccaa gtgataccag catcgtcttg atgcccttgg cagcacttgg 240
atcc
244

```

<210> 13

<211> 246

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 13

```

cactcttggg tcggaaaccc gtcggcctcc gaacggtaag agcctagcat gtagaactgg 60
ttacctgcag cccaagcttg ctgcacgtct agggcgcagt agtccagggt ttccttgatg 120
atgtcatact tatcctgtcc cttttttttc cacagctcgc ggttgaggac aaactcttcg 180
cggctctttc agtgggggac ggcttagtat agcgagggtt agctacactc gtgctgagcc 240
ggatcc
246

```

<210> 14

<211> 235

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 14

cactcttgga tcggaaaccc gtcggcctcc gaacggtaag agcctagcat gtagaactgg 60
 ttacctgcaa aggaaccagc acgcgagccc ggcagcacct gcagcccaag cttgctgcac 120
 gtctagggcg cagtagtcca gggtttcctt gatgatgtca tacttatacct gtcccttttt 180
 tttccacagc tcgcggttga ggacaaactc ttcgcggtct ttccagtggg gatcc 235

<210> 15

<211> 247

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 15

ccactcttgg atcggaaccc cgctggcctc cgaacggtaa gacccatgca ttagaactgg 60
 gttacctgca ggcttagtat agcgaggttt agctacactc gtgctgagcc ctgcagccca 120
 agcttgctgc acgtctaggg cgcagtagtc cagggtttcc ttgatgatgt catacttatac 180
 ctgtcccttt tttttccaca gctcgcggtt gaggacaaac tcttcgcggt ctttccagtg 240
 gggatcc 247

<210> 16

<211> 256

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 16

aagtataacc agcatcgtct tgatgccctt ggcagcactt gaattcgagc tcgcccactc 60
 ttggatcgga aaccgcgcg cctccgaacg gtaagagcct agcatgtaga actgggttacc 120
 tgcagcccaa gcttgctgca cgtctagggc gcagtagtcc agggtttcct tgatgatgtc 180
 atacttatcc tgtccctttt ttttccacag ctgcgcggtt aggacaaact cttcgcggtc 240
 tttccagtgg ggatcc 256

<210> 17

<211> 256

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 17

```

ggcttagtat agcgagggtt agctacactc gtgctgagcc gaattcgagc tcgcccactc 60
ttggatcgga aacccgtcgg cctccgaacg gtaagagcct agcatgtaga actggttacc 120
tgcagcccaa gcttgctgca cgtctagggc gcagtagtcc agggtttcct tgatgatgtc 180
atacttatcc tgtccctttt tttccacag ctgcggttg aggacaaact cttcgcggtc 240
ttccagtgg ggtacc                                     256

```

<210> 18

<211> 524

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 18

```

ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atccgtcgac tgacttcagt atgtaatata 60
cccaaacat tttaccaca aaaaaccagg atttgaaact atagcatcta aaagtcttag 120
gtactagagt tttcatttcg gagcaggctt tttgaaaaat ttaattcaac cattgcagca 180
gcttttgact aacacattct acagtaggat catttctata ggaatcgta ctctttgact 240
cttcaaaaga gccactgaat ccaacttggg tgatgagtcc cataaccttt gtaccccaga 300
gtgagaaacc gaaattgaat ctaaattagc ttgggtccgc atccttagcg ttcggccatc 360
tataattttg aataaaaatt ttgctttgcc gttgcatttg tagttttttc ctttggaagt 420
aattacaata ttttatggcg cgatgattct tgacccatcc tatgtacttc ttttttgaag 480
ggatagggct ctatgggtgg gtacaaatgg cagtctgaca agtt                                     524

```

<210> 19

<211> 57

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 19

```

tccgtcgact gacttcagta tgtaatatac ccaaacatt ttaccacaa aaaacca 57

```

<210> 20

<211> 439

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 20

```

ccaggatttg aaactatagc atctaaaagt cttagggtact agagttttca tttcggagca 60
ggctttttga aaaatttaat tcaaccattg cagcagcttt tgactaacac attctacagt 120
aggatcattt ctataggaat cgtcactctt tgactcttca aaagagccac tgaatccaac 180
ttgggttgatg agtcccataa cctttgtacc ccagagttag aaaccgaaat tgaatctaaa 240
ttagcttggg cgcgaatcct tagcgttcgg ccatctataa ttttgaataa aaattttgct 300
ttgccgttgc atttgtagtt ttttcctttg gaagtaatta caatatttta tggcgcgatg 360
attcttgacc catcctatgt acttcttttt tgaagggata gggctctatg ggtgggtaca 420
aatggcagtc tgacaagtt

```

439

<210> 21

<211> 490

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 21

```

gtcgactgac ttcagtatgt aatatacccc aaacatttta cccacaaaaa accaggattt 60
gaaactatag catctaaaag tcttaggtac tagagttttc atttcggagc aggctttttg 120
aaaaatttaa ttcaaccatt gcagcagctt ttgactaaca cattctacag taggatcatt 180
tctataggaa tcgtcactct ttgactcttc aaaagagcca ctgaatccaa cttggttgat 240
gagtcccata acctttgtac ccagagtga gaaaccgaaa ttgaatctaa attagcttgg 300
tccgcaatcc ttagcgttcg gccatctata attttgaata aaaattttgc tttgccgttg 360
catttgtagt tttttccttt ggaagtaatt acaatatttt atggcgcgat gattcttgac 420
ccatcctatg tacttctttt ttgaagggat agggctctat ggtgggttac aaatggcagt 480
ctgacaagtt

```

490

<210> 22

<211> 241

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 22

```

cactcttgga tcggaaacct gtcggcctcc gaacggtaag agcctagcat gtagaactgg 60
ttacctgcag cccaagcttg ctgcacgtct agggcgagc agtccagggt ttccttgatg 120
atgtcatact tactctgtcc cttttttttc cacagctcgc ggttgaggac aaactcttcg 180
cggcttttcc agtggggatc ggggatcctg cttcaacagt gcttggacgg atcctctaga 240
c

```

241

<210> 23

<211> 534

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:prä-mRNA

<400> 23

```

tccgtcgact gacttcagta tgtaatatac cccaaacatt ttaccacaa aaaaccagga 60
tttgaaacta tagcatctaa aagtcttagg tactagagtt ttcatttcgg agcaggcttt 120
ttgaaaaatt taattcaacc attgcagcag cttttgacta acacattcta cagtaggata 180
atttctatag gaatcgtcac tctttgactc ttcaaaagag ccactgaatc caacttggtt 240
gatgagtccc ataacctttg taccacagag tgagaaaccg aaattgaatc taaattagct 300
tgggtccgcaa tccttagcgt tcggccatct ataattttga ataaaaattt tgctttgccg 360
ttgcatttgt agttttttcc tttggaagta attacaatat tttatggcgc gatgattctt 420
gacccatcct atgtacttct tttttgaagg gatagggctc tatgggtggg tacaaatggc 480
agtctgacaa gttggggatc ctgcttcaac agtgcttgga cggatcctct agac      534

```

<210> 24

<211> 45

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:TH-APTAMER

<400> 24

```

aagtgatacc agcatcgtct tgatgccctt ggcagcactt gaatt      45

```

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:TO-APTAMER

<400> 25

```

ggcttagtat agcgaggttt agctacactc gtgctgagcc gaatt      45

```