

(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
16. März 2006 (16.03.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/027099 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/009028

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. August 2005 (20.08.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 043 155.8
3. September 2004 (03.09.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN** [DE/DE]; Ludwigstrasse 23, 35390 Giessen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **PINGOUD, Alfred, M.** [DE/DE]; Goethestrasse 45, 35582 Wet-
zlar-Dutenhofen (DE). **JELTSCH, Albert** [DE/DE];
Auf dem Salzstock 12, 27721 Ritterhude (DE). **EISEN-
SCHMIDT, Kristin** [DE/DE]; Schwimmbadweg 2, 35398
Giessen-Lützellinden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

(54) Title: ENZYME CONJUGATES WITH A PROGRAMMABLE SPECIFICITY, WHICH REACT IN A HIGHLY SPECIFIC MANNER WITH DNA

(54) Bezeichnung: HOCHSPEZIFISCH MIT DNA INTERAGIERENDE ENZYM-KONJUGATE MIT PROGRAMMIERBARER SPEZIFITÄT

(57) Abstract: The invention relates to the principle, the production and the use of enzyme conjugates with a programmable specificity, which interact in a highly specific manner with DNA. Said inventive enzyme conjugates consist of enzymes, which are covalently linked to oligonucleotide derivatives by means of linkers. The enzymatic portion of the inventive enzyme conjugates bonds to its identification sequence on the target DNA, whilst the oligonucleotide portion forms a triple helix by means of a complementary base pairing with a triplex forming sequence (TFS) of the target DNA. The enzyme conjugates can be tailored by a suitable combination of the enzymes, linkers and oligonucleotides and contain an identification site on the target DNA. The inventive enzyme conjugates are suitable for the targeted manipulation of large DNA molecules and for the mapping of genomic DNA in vitro. They can be used in vitro and in vivo for the introduction of a targeted double-strand break, to stimulate a homologous recombination and/or DNA repair and/or for the repression of gene expression.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt das Prinzip, die Herstellung und die Verwendung von hochspezifisch mit DNA interagierenden Enzym-Konjugaten mit programmierbarer Spezifität. Diese erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate bestehen aus Enzymen, die über Linker kovalent mit Oligonukleotidderivaten verknüpft sind. Der Enzymanteil der erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate bindet an seine Erkennungssequenz auf der Ziel-DNA, während der Oligonukleotidanteil über eine komplementäre Basenpaarung mit einer Triplex-Bildungsstelle (TFS) der Ziel-DNA eine Tripelhelix ausbildet. Die Enzym-Konjugate lassen sich durch geeignete Kombination von Enzym, Linker und Oligonukleotid maßschneidern und besitzen eine Erkennungsstelle auf der Ziel-DNA. Die erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate eignen sich zur gezielten Manipulation großer DNA-Moleküle sowie zum Mapping genomischer DNA in vitro. In vitro und in vivo können sie zur Einführung eines gezielten Doppelstrangbruchs verwendet werden, um die homologe Rekombination und / oder die DNA-Reparatur zu stimulieren und/oder zur Repression der Genexpression.

WO 2006/027099 A2

Hochspezifisch mit DNA interagierende Enzym-Konjugate mit programmierbarer Spezifität

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Gebiete Biologie, Biochemie, Chemie, Pharmazie sowie Human- und Veterinärmedizin.

Verschiedene Familien von Enzymen werden in vitro und in vivo zur Manipulation von DNA eingesetzt. Zu diesen Enzymfamilien gehören beispielsweise Restriktionsendonukleasen, Exonukleasen, DNAsen, DNA-Reparaturenzyme und DNA-Methyltransferasen. Die spezifischeren dieser Enzyme (Restriktionsendonukleasen und DNA-Methyltransferasen) erkennen allerdings typischerweise relativ kurze DNA-Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren, welche beispielsweise im menschlichen Genom 10^2 - 10^6 mal vorkommen. Somit ist eine gezielte, exklusive Adressierung einzelner bestimmter Gene durch diese Enzyme nicht möglich. Für zukünftige Applikationen in der Biotechnologie und molekularen Medizin werden jedoch solche gezielten Adressierungen benötigt. Derartige Anwendungen erfordern daher eine Methode, die es gestattet, die Spezifität von Enzymen, die mit DNA interagieren, gezielt zu erweitern. Um unterschiedliche Gene und DNA-Sequenzen zu adressieren, sollten diese Enzyme hochspezifisch und programmierbar sein, d.h. ihre Erkennungssequenz muss gezielt veränderbar sein.

Die vorliegende Erfindung beschreibt das Prinzip und die Verwendung von hochspezifisch mit DNA interagierenden Enzym-Konjugaten mit programmierbarer Spezifität. Diese erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate bestehen aus Enzymen, die über Linker kovalent mit Oligonukleotidderivaten verknüpft sind.

Stand der Technik

Der Stand der Technik kennt die hochspezifische Ausbildung von Tripelhelices mit Oligodesoxynukleotiden oder Peptidnukleinsäuren (peptide nucleic acids, PNAs).

- 5 Triplex bildende Oligodesoxynukleotide benötigen eine DNA-Erkennungssequenz von 10-20 Basenpaaren. Anfangs wurde die Tripelhelix-Strategie nur bei DNA angewandt, bei der ein Strang ausschließlich Purine enthielt [A.J. Cheng und M.W. van Dyke (1994): Oligodeoxyribonucleotide length and sequence effects on inter-
- 10 molecular purine-purine-pyrimidine triple helix formation. Nucleic Acids Research 22; 4742-4747]. Die DE 198 42 527 A1 beschreibt dagegen ein Verfahren zur Bildung Tripelhelix-bildender Oligomere auch für solche Nukleinsäure-Bereiche, in denen weder eine Homopurin- noch eine Homopyrimidin-Sequenz vorliegt, was die Flexibilität der adressierbaren Erkennungsstellen erhöht. In der genannten Patentschrift wird darauf hingewiesen, dass die gleiche Vorgehensweise auch für die
- 15 Ausbildung von Doppelhelices gilt. Weder die genannte Homopurin-Strategie noch DE 198 42 527 A1 gestatten es allerdings, Nukleasen oder andere Enzyme spezifisch an bestimmte DNA-Regionen zu lenken.

- Dagegen können PNAs im Prinzip jede DNA-Sequenz spezifisch erkennen, führen
- 20 aber in Kombination mit Nukleasen zu DNA-Spaltungen, deren Position stark variieren kann, da Nukleasen i.d.R. mehrere Zielstellen besitzen [K.I. Izvolsky, V.V. Demidov, P.E. Nielsen und M.D. Kamenetskii (2000): Sequence-specific protection of duplex DNA against restriction and methylation enzymes by pseudocomplementary PNAs. Biochemistry 39; 10908-10913].

Die spezifische Erkennung von DNA mit Oligodesoxynukleotiden oder PNAs wird im Sinne einer Antigen-Technologie eingesetzt. Hierbei wird durch die Gabe eines TFOs (Tripelhelix-forming oligonucleotide = Tripelhelix-bildendes Oligonukleotid) die Ausbildung einer Tripelhelix im Gen- oder Promotorbereich eines Zielgens induziert, wodurch die Transkriptionsinitiation oder –elongation inhibiert wird [L. Good und P.E. Nielsen (1998): Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA. *Nature Biotechnology* 16; 355-358]. Außerdem wurde die sequenzspezifische Erkennung von DNA mit TFOs für gezielte Mutagenese eingesetzt und um homologe Rekombinationen zu stimulieren [M.P. Knauert und P.M. Glazer (2001): Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools für gene targeting. *Human Molecular Genetics* 10; 2243-2251]. Allerdings lassen sich bei allen diesen Vorgehensweisen die Ereignisse, die nach Ausbildung der Tripelhelix ablaufen (Inaktivierung der Genexpression, homologe Rekombination, Mutagenese) nicht vorherbestimmen und sind schwer zu beeinflussen.

Eine Erweiterung der DNA-Erkennungsspezifität kann durch Fusion mit anderen DNA-bindenden Proteinen erzielt werden. Die DE 197 56 975 A1 beschreibt ein Protein, welches das zelluläre Protein p27 inhibiert und damit die durch p27 bewirkte Hemmung der Zellproliferation aufhebt, sowie Nukleinsäurekonstrukte aus Aktivierungs-, Binde- und Transkriptionssequenzen, die für das Inhibitorprotein von p27 codieren und für die Gentherapie von Erkrankungen verwendet werden sollen. Nachteil dieser Konstrukte ist, dass für die meisten potenziellen Zielsequenzen keine geeignete DNA-Bindungsdomäne als Fusionspartner zur Verfügung steht, welche die Sequenz mit hinreichender Affinität und Spezifität bindet.

Der Stand der Technik kennt Verfahren zur Herstellung von Konjugaten aus Nukleinsäuren und/oder Proteinen und weiteren Informations- und Funktionseinheiten

wie Antikörpern, Enzymen und anderen Biomolekülen. So beschreibt die DE 197 45 668 A1 ein Verfahren zur Kopplung von Oligonukleotiden und Biomolekülen für Bioanalytik, Sensorik und Diagnostik. Die DE 44 21 079 C1 beschreibt chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragmente, die die zielgerichtete Einbringung in Zellorganel-
5 len und Zellen ermöglichen soll. Beide Verfahren gestatten jedoch keine zielgerichtete Adressierung bestimmter Sequenzen in vitro und in vivo.

Eine Alternative zur hochspezifischen Spaltung von DNA sind selten schneidende Restriktionsendonukleasen, die 8 und mehr Basen erkennen. Sog. Homingendonukleasen wurden von Chevalier und Stoddard beschrieben [B.S. Chevalier
10 und B.L. Stoddard (2001): Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility, Nucleic Acids Research 29; 3757-3774]. Sie erkennen wesentlich längere DNA-Sequenzen. Es gibt allerdings nur wenige dieser Endonukleasen, und im Falle von Homingendonukleasen sind die Erkennungssequenzen oft nicht genau definiert. Hochspezifische DNA-
15 Methyltransferasen sind nicht bekannt. Ein weiteres Problem ist, dass die Regionen der DNA, die adressiert werden sollen, normalerweise keine Erkennungssequenz für eines dieser Enzyme enthalten.

Die vorliegende Erfindung zeichnet sich gegenüber dem Stand der Technik da-
20 durch aus, dass sie Konjugate aus Enzymen und sog. Spezifitätsankern bereitstellt, die über einen Linker chemisch miteinander verknüpft sind. Spezifitätsanker sind dabei Oligodeoxynukleotide oder Peptidnukleinsäuren, die mit der Erkennungsstelle der zu adressierenden DNA Doppel- oder Tripelhelices bilden. Die Erkennungsstelle auf der Ziel-DNA des Konjugates ist durch die Erkennungsse-

quenzen des Spezifitätsankers und des Enzyms gegeben, wodurch das Konjugat hochspezifisch mit der Ziel-DNA wechselwirkt.

Aufgabe

- 5 Aufgabe der Erfindung ist es, hochspezifisch mit DNA wechselwirkende Enzym-Konjugate mit programmierbarer Spezifität und ein Verfahren zu ihrer Herstellung bereitzustellen, wobei unter hochspezifisch mit DNA wechselwirkenden Enzym-Konjugaten verstanden wird, dass
- innerhalb der Ziel-DNA genau eine Erkennungssequenz des Enzym-Konjugates existiert,
 - es sich bei der Wechselwirkung der Enzym-Konjugate mit der Erkennungssequenz auf der Ziel-DNA um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt,
 - die enzymatisch katalysierte Reaktion ausgewählt ist aus der Gruppe Spaltung oder Methylierung und homologe Rekombination und Induktion einer
 - 15 DNA-Reparatur oder gezielte Hemmung der Genexpression durch spezifische Methylierung der Ziel-DNA, und
 - die an der Erkennungssequenz der Ziel-DNA stattfindende, durch das Enzym-Konjugat katalysierte Reaktion mindestens zehnmals schneller abläuft als jede andere in Gegenwart des Enzym-Konjugats an anderen als der Erkennungs-
 - 20 sequenz der Ziel-DNA ablaufende Reaktion.

Die Aufgabe der Bereitstellung hochspezifisch mit DNA wechselwirkender Enzym-Konjugate mit programmierbarer Spezifität wird erfindungsgemäß gelöst durch die Merkmale des Anspruchs 1, d.h. durch Enzym-Konjugate, bei denen ein Enzym

über je einen Linker kovalent an mindestens einen sog. Spezifitätsanker gebunden ist, wobei

- das Enzym auf seiner Oberfläche eine reaktive funktionelle Gruppe zur Bindung eines Linkers aufweist,
- 5 – es sich bei dem mindestens einen Spezifitätsanker um eine Oligonukleotidverbindung handelt, die über eine komplementäre Basenpaarung mit einer Triplex-Bildungsstelle (TFS) der Ziel-DNA eine Tripelhelix ausbildet, und die am 5'-Ende oder am 3'-Ende eine reaktive funktionelle Gruppe aufweist,
- der Spezifitätsanker eine Sequenzhomologie von mindestens 85 % zur
10 Triplex-Bindungsstelle aufweist,
- der mindestens eine Linker eine molekulare Verbindung darstellt, die mindestens eine Kette aus mindestens zwei Kohlenstoffatomen enthält, wobei die Kette an zwei Stellen mit gleichen oder verschiedenen reaktiven funktionellen Gruppen derivatisiert ist,
- 15 – je eine der beiden reaktiven funktionellen Gruppen des mindestens einen Linkers eine kovalente chemische Bindung mit der reaktiven funktionellen Gruppe des Enzyms und der reaktiven funktionellen Gruppe des Spezifitätsankers ausbildet, und
- Enzym und Spezifitätsanker mit einem Abstand von mindestens zwei Basen-
20 paaren an die Ziel-DNA gebunden werden.

Die Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate bereitzustellen, wird erfindungsgemäß gelöst durch Anspruch 13, indem nacheinander folgende Schritte durchgeführt werden:

- Umsetzung des Linkers mit dem Spezifitätsanker, wobei eine reaktive funktionelle Gruppe des Linkers mit der reaktiven funktionellen Gruppe des Spezifitätsankers eine kovalente chemische Bindung eingeht,
- Umsetzung mit dem Enzym, wobei die zweite reaktive funktionelle Gruppe des Linkers mit der reaktiven funktionellen Gruppe des Enzyms eine kovalente chemische Bindung eingeht,
- Reinigung des Endproduktes.

Dem Fachmann ist bekannt, dass es sich bei Enzymen um biokatalytisch wirkende Proteine handelt, die substrat- und reaktionsspezifisch wirken, d.h. jedes Enzym katalysiert einen ganz bestimmten Reaktionsablauf, und dies auch nur bei bestimmten Substraten, nämlich solchen, die nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip genau in die Bindungsstelle des betreffenden Enzyms passen. Als „spezifisch mit DNA interagierend“ werden in der vorliegenden Erfindung Enzyme und Enzym-Konjugate verstanden, die substrat- und reaktionsspezifisch nur mit solchen DNA-Bereichen wechselwirken, deren Basensequenz nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zur Erkennungsstelle des Enzyms passt. Diese Basensequenz bezeichnet der Fachmann als Erkennungssequenz (der Ziel-DNA). Dem Fachmann ist bekannt, dass es zahlreiche DNA-Moleküle gibt, die die Erkennungssequenz für ein bestimmtes Enzym mehrfach aufweisen.

Als „hochspezifisch mit DNA interagierend“ werden dagegen in der vorliegenden Erfindung solche Enzym-Konjugate bezeichnet, deren Bindung und nachfolgende substrat- und reaktionsspezifische Wechselwirkung mit der Ziel-DNA von zwei Faktoren abhängt: zum Einen – wie im Falle der oben beschriebenen spezifischen Interaktion - von der Erkennungssequenz für das Enzym, zum Anderen von einer

Triplex-Bildungsstelle (TFS) auf der Ziel-DNA, wobei diese TFS benachbart zur Erkennungssequenz für das Enzym liegen muss. Dabei legen Oligonukleotid- und Linkeranteil des Enzym-Konjugates fest, an welcher Stelle der Ziel-DNA und in welchem Abstand zum Enzymanteil des Enzym-Konjugates die Triplexbildung zwischen TFS der Ziel-DNA und Triplex-bildendem Oligonukleotidanteil des Enzym-Konjugates erfolgt. Die Spezifität eines derartigen erfindungsgemäßen Enzym-Konjugates kann daher „programmiert“ werden, d.h. selbst im Falle von Ziel-DNA, die mehr als eine Erkennungssequenz für ein gewähltes Enzym aufweist, wird durch Kopplung mit einem bestimmten Triplex-bildenden Oligonukleotid und einem Linker (= „Programmierung“) erreicht, dass auf der Ziel-DNA genau eine Erkennungssequenz für das Konjugat aus Enzym und TFO existiert. Sollte diese Erkennungssequenz für das Konjugat aus Enzym und TFO mehr als einmal in einer genomischen Ziel-DNA auftreten, wird die Anzahl derjenigen Stellen der Ziel-DNA, an die das Konjugat bindet, dennoch gegenüber der Anzahl der Bindungsstellen des unkonjugierten Enzyms minimiert durch das Erfordernis einer der Erkennungssequenz des Enzyms benachbarten TFS (s.o.).

Zur Herstellung von Enzym-Konjugaten mit programmierbarer Spezifität wird das Enzym chemisch über einen Linker an ein Reagenz gekoppelt, das in der Lage ist, DNA spezifisch zu erkennen. Dieses Reagenz wird nachfolgend als „Spezifitätsanker“ bezeichnet.

Solche Spezifitätsanker sind z.B. Oligodesoxynukleotide oder Peptidnukleinsäuren (peptide nucleic acids, PNA), welche doppelsträngige DNA spezifisch über die Ausbildung einer Doppel- (duplex invasion oder double duplex invasion) und/oder Tripelhelix erkennen können. Die DNA-Erkennung über Doppel- bzw. Tripelhelices

erfolgt nach Regeln der Basenpaarung, so dass vorhersagbar ist, welche Sequenz der zu verwendende Spezifitätsanker aufweisen muss, um eine bestimmte Zielsequenz zu erkennen. Der Spezifitätsanker muss eine Sequenzhomologie von mindestens 85 % zur TFS der Ziel-DNA aufweisen. Bei einer Länge des Spezifitätsankers von 12 Basenpaaren entspricht eine Sequenzhomologie von 85 % einer Fehlpaarung. Homologie meint dabei eine komplementäre Identität der intramolekularen Nukleotidbasenpaarung von TFO und TFS, so dass 100 % Sequenzhomologie bedeuten, dass jeder Nukleotidbase des TFO nach den Regeln der Basenpaarung eine jeweils komplementäre Nukleotidbase auf der TFS gegenübersteht.

10 Unter Linker wird eine molekulare Verbindung verstanden, die mindestens eine Kohlenwasserstoffkette aus mindestens zwei C-Atomen enthält, wobei die Kette an zwei Stellen mit gleichen oder verschiedenen reaktiven funktionellen Gruppen derivatisiert ist, wobei Linker mit zwei verschiedenen reaktiven funktionellen Gruppen bevorzugt sind. Diese reaktiven funktionellen Gruppen bilden in bekannten

15 chemischen Reaktionen kovalente chemische Bindungen aus, wobei zuerst eine der funktionellen Gruppen an den Spezifitätsanker und die andere an das Enzym bindet. Alternativ wird zuerst die kovalente Bindung zwischen Linker und Enzym und danach diejenige zwischen Linker und Spezifitätsanker gebildet. Bei diesen chemischen Reaktionen handelt es sich beispielsweise, aber nicht erschöpfend,

20 um die Bildung von Ether-, Thioether-, Ester-, Thioester- oder Amidbindungen. Bevorzugt besteht der Linker aus der kovalenten Verknüpfung eines 5'-Link oder 3'-Link mit einem Crosslinker. Dabei stellt der 5'-Link oder 3'-Link eine molekulare Verbindung dar, die 1. eine Kohlenwasserstoffkette aus mindestens zwei C-Atomen enthält, 2. an das 5'-Ende oder 3'-Ende des Spezifitätsankers gebunden

25 ist und die 3. an einer Stelle eine reaktive funktionelle Gruppe enthält. Dem Fach-

mann ist bekannt, dass Nukleinsäurederivate wie Oligodesoxyribonukleotide (ODN) oder PNA, die chemisch mit einem solchen 5'-Link oder 3'-Link verbunden sind, kommerziell erhältlich sind. Bei der reaktiven funktionellen Gruppe handelt es sich z.B. um eine primäre Aminogruppe.

- 5 Der Crosslinker stellt eine molekulare Verbindung aus mindestens einer Kohlenwasserstoffkette dar, wobei diese mindestens eine Kohlenwasserstoffkette mindestens zwei C-Atome enthält und an zwei Stellen reaktive funktionelle Gruppen enthält. Bei den reaktiven funktionellen Gruppen handelt es sich beispielsweise um Ester-, Carbonsäure-, Imid- und/oder Aminogruppen, bevorzugt um Succinimider- und Maleimidogruppen. Stellt der Crosslinker einen Teil der erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate dar, so ist eine seiner reaktiven funktionellen Gruppen mit dem Enzym und die andere mit der reaktiven funktionellen Gruppe des chemisch an den Spezifitätsanker gebundenen 5'-Link oder 3'-Link jeweils kovalent verbunden.
- 10
- 15 Unter „programmierbarer Spezifität“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass die erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate dergestalt mit einer komplementären DNA-Adresse versehen werden, dass ihre Wechselwirkung mit DNA nach dem Fachmann bekannten Regeln genau einstellbar und hochspezifisch ist.
- 20 Die einzelnen Komponenten der erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate - Enzyme, Spezifitätsanker, 5'-Link, 3'-Link und Crosslinker - sind nachfolgend im Detail beschrieben.

Bei den Enzymen, welche erfindungsgemäß über je einen Linker kovalent an mindestens einen sog. Spezifitätsanker gebunden sind, handelt es sich um

25

- Typ II-Restriktionsendonukleasen, wie beispielsweise, aber nicht erschöpfend
Acil, Alul, Bfal, BsaJI, BslI, BsoFI, BssKI, BstUI, Cac8I, Chal, Csp6I, CviJI,
Ddel, Dpnl, DpnII, Fmul, Fnu4HI, HaeIII, Hhal, HinfI, HinPI, HpaII, MaeII,
MaellI, Mbol, MnlI, Msel, Mspl, Mwol, NlaIII, NlaIV, RsaI, Sau3AI, Sau96I,
5 *ScrFI, Tail, TaqI, Tsp4CI, Tsps09I,*
AcIWI, Alw26I, AlwI, AsuHPI, Avall, BbvI, Bccl, Bcefi, BinI, BsbI, BscGI,
BseII, BseNI, BsmAI, BsmFI, BspLUIII, BsrI, BsrSI, Bst7I, BstF5I, BstNI, CjeI,
CjePI, EcoRII, Faul, FinI, FokI, Hgal, HphI, MbolI, NciI, PfiI, SfaNI, SimI, Taul,
TfiI, TseI, Tsp45I, TspRI, VpallAI,
- 10 *Accl, AflIII, Apol, Aval, BanI, BanII, BmgI, BsaI, BsaHI, BsaWI, BsiEI,*
BsiHKAI, BsoBI, Bsp1286I, BsrFI, BstYI, DsaI, EaeI, EcoO109I, GdIII, HaeI,
HaeII, Hin4I, HincII, Mmel, MslI, MspAll, Nspl, ScfI, Styl, TatI, TthIII, AatI,
AccII3I, Acc65I, AcINi, AflI, Alw44I, ApaI, ApaLI, Asel, Asp718I, AvrII, Ball,
BamHI, Bbul, BbsI, BclI, BfrI, BglII, BlnI, BpI, Bpml, BsaI, BsaMI, BseRI,
15 *BsmBI, Bsml, Bsp120I, Bspl407I, Bsp19I, BspHI, BspLUIII, BspMI, BspTI,*
BsrGI, BstII07I, Bst98I, DraI, EamII04I, EarI, EclI36II, Eco147I, Eco255I, E-
co57I, EcoNI, EcoRI, EcoRV, EcoT22I, HindIII, HpaI, KpnI, MfeI, MscI, NcoI,
NdeI, NheI, NsiI, PstI, Pvull, SacI, Scal, SpeI, SphI, SspI, SstI, Stul, XbaI,
AatII, BbeI, BsiI, BsiWI, BsmBI, BspDI, BsrBI, BssHII, Bst2BI, ClaI, EagI, EciI,
20 *Eco47III, Ehel, Esp3I, Fspl, KasI, MluI, NarI, Nrul, Pfi1108I, PmlI, Psp1406I,*
PvuI, SacII, SnaBI, XhoI,
AscI, BaeI, FseI, NotI, PacI, PmeI, PpuMI, RsrII, SanDI, SapI, SexAI, SfiI, SgfI,
SgrAI, SrfI, Sse8387I, SwaI
Aspl, BglI, BsgI, DraIII, DsaV, EciXI, Ksp632I, MaeI, MamI, MclI, MunI, RleI,
25 *Ssp4800I,*

- andere spezifisch DNA spaltende Nukleasen, insbesondere Homingendonukleasen, wie beispielsweise, aber nicht erschöpfend, I-CreI, I-PpoI, F-SceI, F-SceII, F-SuvI, F-TevI, F-TevII, I-Amal, I-Anil, I-CeuI, I-CeuAIIp, I-Chul, I-Cmoel, I-Cpal, I-Cpall, I-Crel, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIp, I-CrepsbIIIp, I-CrepsbIVp, I-Csml, I-Cvul, I-CvuAIP, I-DdI, I-DdII, I-DiI, I-Dmol, I-Hmul, I-Hmull, I-HspNIP, I-LIal, I-Msol, I-Naal, I-NanI, I-NclIP, I-NgrIP, I-NitI, I-Njal, I-Nsp236IP, I-PakI, I-PbolP, I-PculP, I-PcuAI, I-PcuVI, I-PgrIP, I-PobIP, I-PorI, I-PorIP, I-PpbIP, I-PpoI, I-SPBetap, I-Scal, I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SceVI, I-SceVII, I-SexIP, I-SnelP, I-SpomCP, I-SpomIP, I-SpomIIP, I-SqulP, I-Ssp6803I, I-SthPhiJP, I-SthPhiST3P, I-SthPhiS3bP, I-TdeIP, I-TevI, I-TevII, I-TevIII, I-UarAP, I-UarHGPA1P, I-UarHGPA13P, PI-PspI PI-SPBetap, PI-SceI, PI-Tful, PI-Tfull, PI-Thyl, PI-TII, PI-TIIL.
 - DNA-Reparaturenzyme, wie beispielsweise, aber nicht erschöpfend, MutH und Vsr,
 - DNA-Methyltransferasen, wie beispielsweise, aber nicht erschöpfend, M.SssI, M.HhaI, EcoDam, DNA-Methyltransferasen aus Säugern oder katalytisch aktive Fragmente davon, darunter beispielsweise die humanen Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b,
- 20 Die Bindung des Enzyms an den Linker erfolgt durch Ausbildung einer kovalenten chemischen Bindung zwischen einer reaktiven funktionellen Gruppe des Linkers und der auf der Oberfläche zugänglichen reaktiven funktionellen Gruppe des Enzyms. Bei dieser auf der Oberfläche zugänglichen reaktiven funktionellen Gruppe des Enzyms handelt es sich beispielsweise um ein singuläres Cystein im Falle
- 25 einer Restriktionsendonuklease oder um einen mit Hilfe einer ortsspezifischen Mu-

tagenese in eine Methyltransferase eingeführtes Cystein. Alternativ sind beispielsweise Enzyme ohne oberflächlich zugängliches Cystein einsetzbar, wobei in diesem Falle bevorzugt Oligonukleotidderivate eingesetzt werden, die einen 5'-SH-Link oder 3'-SH-Link aufweisen. Dem Fachmann ist bekannt, wie er weitere
5 oberflächlich zugängliche funktionelle Gruppen in Enzyme einführen kann. Er kann diese Methoden, ohne den Schutzbereich der Patentansprüche zu verlassen, verwenden, um die im Rahmen der vorliegenden Erfindung einzusetzenden Enzyme gegebenenfalls dergestalt zu modifizieren, dass sie mit einem Linker umsetzbar sind.

10

Bei den Spezifitätsankern handelt es sich um Oligonukleotide und Oligonukleotidanaloga – zusammengefasst als „Oligonukleotidverbindungen“ bezeichnet -, die aus 10 bis 20 Nukleotiden bestehen, um eine spezifische Adressierung zu gewährleisten und eine Paarung einzugehen, die hinreichend stabil ist, um unter den
15 Reaktionsbedingungen in der Zelle oder in vitro eine Bindung des Konjugats an die Zielsequenz sicherzustellen, die eine Sequenzhomologie von mindestens 85 % zur TFS der Ziel-DNA aufweisen, beispielsweise um

- Oligodesoxyribonukleotide (ODN) und ihre Derivate, darunter beispielsweise Oligonukleotide, deren Phosphatgerüst teilweise Phosphodiester- und teilweise oder ausschließlich modifizierte Phosphorothioatgruppen aufweist, Methylphosphonat-, H-Phosphonat- oder andere phosphatanaloge Gruppen aufweist oder durch andere Verbindungen ersetzt ist, wie beispielsweise die Methyl(methylimino)- oder Methylencarboxamid-Gruppe, sowie ODN, deren Riboseeinheit am 2'-C- oder 4'-C-Atom modifiziert ist oder durch einen anderen
20 Zucker ersetzt ist, wie beispielsweise das α -Anomer der Desoxyribose,
25

- Peptidnukleinsäuren (PNA),
- Threose-Nukleinsäureanaloga (TNA), beispielsweise α -Threofuranosyl-(3'→2')-Oligonukleotide, die mit DNA eine Tripelhelix bilden oder spezifisch mit einem Strang der DNA eine Paarung eingehen können

5

Dem Fachmann ist bekannt, dass zahlreiche der genannten Oligonukleotide und Oligonukleotidanaloga, mit einem 5'-Link oder 3'-Link versehen, kommerziell erhältlich sind, während er nicht kommerziell erhältliche, beispielsweise mit einem 3'- oder 5'-Link versehene TNAs, PNAs und Oligonukleotidderivate mit β -anomerer Ribose mit Hilfe seines Fachwissens selbst herstellen kann. Bevorzugt werden Oligonukleotide und Oligonukleotidanaloga mit einem 5'-Aminolink verwendet, wobei es sich bei dem 5'-Aminolink beispielsweise um eine ω -Aminoalkylgruppe mit 1 bis 20 C-Atomen handelt, besonders bevorzugt mit 2 bis 12 C-Atomen, verwendet, darunter ω -Aminoethyl- und ω -Amino-n-dodecylgruppen. Alternativ werden Oligonukleotide und Oligonukleotidanaloga mit einem 5'-SH-Link oder 3'-SH-Link verwendet.

Als Crosslinker, die kovalent an die reaktive funktionelle Gruppe des 5-Link oder 3'-Link des Spezifitätsankers und die oberflächlich zugängliche reaktive funktionelle Gruppe des Enzyms gebunden werden, sind Verbindungen geeignet, die über zwei reaktive funktionelle Gruppen verfügen, von denen eine spezifisch mit der reaktiven funktionellen Gruppe des 5'-Link oder 3'-Link des TFO und die andere mit der oberflächlich zugänglichen reaktiven funktionellen Gruppe des Enzyms verbunden wird, beispielsweise eine Succinimidester- und eine Maleimidfunktion, wie es in N-(γ -Maleimidobutyryloxy)-succinimidester der Fall ist. Weitere Crosslin-

25

ker sind dem Fachmann bekannt und können, ohne den Schutzbereich der Patentansprüche zu verlassen, verwendet werden. Die beiden reaktiven funktionellen Gruppen des Crosslinkers sind bevorzugt in einem Abstand von 1 bis 20 CH₂-Gruppen und ganz besonders bevorzugt in einem Abstand von 6 bis 12 CH₂-Gruppen angeordnet.

Erfindungsgemäß deckt die durch Verknüpfung von Crosslinker und 5'-Link oder 3'-Link gebildete, als Linker bezeichnete Einheit, auf der Ziel-DNA des Enzym-Konjugates einen Abstand von mindestens 2 Basenpaaren, bevorzugt 2 bis 20 bp, zwischen Erkennungssequenz für das Enzym und der Adresse für das TFO auf der Ziel-DNA ab.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Enzyme mit programmierbarer Spezifität erfolgt durch eine kovalente Kopplung von Spezifitätsanker und Enzym mit Hilfe bifunktioneller Crosslinker. Es werden kommerziell erhältliche Crosslinker wie beispielsweise N-(γ -Maleidobutyryloxy-)succinimidester eingesetzt, die auf der einen Seite des Spezifitätsankers mit der reaktiven funktionellen Gruppe des 5'-Link oder 3'-Link reagieren und auf der anderen Seite mit der oberflächlich zugänglichen, d.h. zum Lösungsmittel hin exponierten, reaktiven funktionellen Gruppe des Enzyms, bei der es sich beispielsweise um ein Cystein oder eine nicht natürliche Aminosäure handelt. Das mit dem TFO verknüpfte Enzym muss von dem freien Enzym abgetrennt werden, was durch chromatographische Verfahren geschieht, beispielsweise durch Ionenaustauschchromatographie.

Tripelhelixbildung mit Oligodesoxyribonukleotiden oder PNAs ist hochspezifisch. Während Oligodesoxyribonukleotide eine DNA-Erkennungssequenz von 10 bis 20

Basenpaaren benötigen, können PNAs jede Sequenz spezifisch erkennen. Die vorliegende Erfindung nutzt diese Spezifität, um die Spezifität der DNA-Erkennung eines mit DNA interagierenden Enzyms zu erhöhen, indem die inhärente Spezifität des mit DNA interagierenden Enzyms beibehalten und erweitert wird. Damit wird

5 sichergestellt, dass an der DNA eine chemisch definierte Modifikation vorgenommen wird. So wird die DNA z.B. von einem erfindungsgemäßen TFO-Restriktionsendonuklease-Konjugat weiterhin an der für das Restriktionsenzym definierten Spaltposition gespalten. Ein erfindungsgemäßes TFO-Methyltransferase-Konjugat überträgt Methylgruppen weiterhin nur auf die Zielba-

10 se innerhalb der Erkennungssequenz der Methyltransferase. In beiden Fällen werden durch die erfindungsgemäßen Konjugate aber nicht alle Zielsequenzen dieses Enzyms auf der Ziel-DNA-gespalten bzw. methyliert, sondern nur diejenigen, welche benachbart auch die Erkennungssequenz für das TFO aufweisen.

15 Die erfindungsgemäßen hochspezifisch mit DNA wechselwirkenden Enzym-Konjugate mit programmierbarer Spezifität sind für zahlreiche Anwendungen geeignet, bei denen unterschiedliche Gene und DNA-Sequenzen, unabhängig davon, ob sie aus Prokarya, Eukarya oder Archaea stammen, gezielt adressiert werden müssen und/oder eine spezifische Manipulation von DNA erforderlich ist. Un-

20 ter gezielter Adressierung ist hierbei die exklusive Adressierung von solchen Erkennungssequenzen eines Enzyms zu verstehen, die einer TFS benachbart sind. Dabei findet keine enzymatische Reaktion an solchen Erkennungsstellen des Enzyms statt, welche keiner TFS benachbart sind. Eine spezifische Manipulation von DNA bedeutet, dass die Manipulation ortsspezifisch bezogen auf Sequenz und

Spalt- oder Modifikationsstelle ist und eine definierte chemische Reaktion katalysiert wird.

So können programmierbare Restriktionsendonuklease-Konjugate zur Manipulation großer DNA-Moleküle in vitro eingesetzt werden, da sie für die gezielte Spaltung jeder geforderten Stelle der Ziel-DNA programmierbar sind. Unter „groß“ werden dabei DNA-Moleküle verstanden, die aus mindestens 10.000 Basenpaaren bestehen. Diese programmierbaren Restriktionsenzym-Konjugate sind daher beispielsweise zur Klonierung und Charakterisierung von kleinen und großen DNA-Fragmenten geeignet.

- 10 Die erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate eignen sich für das in vitro-Mapping genomischer DNA. Es ist für den Fachmann ersichtlich, dass es hierbei – und bei allen anderen in vitro-Verwendungen – nicht zwingend erforderlich ist, dass die Erkennungssequenz für ein erfindungsgemäßes Enzym-Konjugat auf der Ziel-DNA nur ein einziges Mal vorkommt.
- 15 Zur Verwendung in vitro sind solche erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate geeignet, bei denen der Spezifitätsanker eine Sequenzhomologie von mindestens 85 % zur TFS der Ziel-DNA aufweist und bei denen die an der Erkennungssequenz der Ziel-DNA stattfindende, durch das Enzym-Konjugat katalysierte Reaktion mindestens zehnmal schneller abläuft als jede andere in Gegenwart des Enzym-
- 20 Konjugats an anderen als der Erkennungssequenz der Ziel-DNA ablaufende Reaktion. Bevorzugt werden solche erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate für in vitro-Verwendungen eingesetzt, bei denen die Sequenzhomologie zwischen TFO und TFS 90 % bis 100 % beträgt und die durch das Enzym-Konjugat katalysierte Reaktion mindestens 100 mal schneller abläuft als jede andere in Gegenwart des

Enzym-Konjugats an anderen als der Erkennungssequenz der Ziel-DNA ablaufende Reaktion.

Ganz besonders bevorzugt sind Enzym-Konjugate, bei denen der Spezifitätsanker eine Sequenzhomologie von 100 % zur TFS der Ziel-DNA aufweist und die an der

5 Erkennungssequenz der Ziel-DNA stattfindende, durch das Enzym-Konjugat katalysierte Reaktion mindestens tausend Mal schneller abläuft als jede andere in Gegenwart des Enzym-Konjugats an anderen als der Erkennungssequenz der Ziel-DNA ablaufende Reaktion. Diese ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate eignet sich außerdem für Verwendun-

10 gen in vivo, sofern auf der Ziel-DNA genau eine Erkennungssequenz für dieses Enzym-Konjugat existiert und diese Erkennungssequenz genau einmal auf der Ziel-DNA vorliegt.

Nach dem derzeitigen Stand der Technik ist die geringe Ausbeute, mit der in Zel-

15 len eingebrachte DNA durch Rekombination in das Gen integriert wird, ein zentrales Problem der Gentherapie. Das Einbringen eines spezifischen Doppelstrangbruchs erhöht die Ausbeute der Rekombination mehr als 1000-fach. Die erfindungsgemäßen programmierbaren Restriktionsendonuklease-Konjugate schneiden die DNA dagegen gezielt an der Zielstelle, stimulieren dadurch die homologe

20 Rekombination und steigern damit die Effizienz des Austauschs von Ziel-DNA-Sequenzen mit dem Ziel der DNA-Reparatur durch exogene DNA (gene targeting). Hierbei ist auch sichergestellt, dass die exogene DNA an einem vorbestimmten Ort in das Genom integriert wird. Programmierbare Restriktionsendonuklease-Konjugate eignen sich somit für die Gentherapie und die experimentelle Genetik

25 zur Erzeugung von Organismen, beispielsweise tierischen oder pflanzlichen Orga-

nismen, mit Veränderungen in der DNA-Sequenz. Des Weiteren stimulieren die erfindungsgemäßen hochspezifisch mit DNA wechselwirkenden Enzyme die DNA-Reparatur in Zellen durch einen gezielten Doppelstrangbruch.

Eine gezielte DNA-Methylierung mit Hilfe der erfindungsgemäßen hochspezifisch mit DNA wechselwirkenden Enzyme ist für die in vitro-Manipulation von DNA geeignet, indem beispielsweise DNA gezielt an einem Adeninrest einer GATC-Sequenz methyliert und die modifizierte Sequenz durch das Restriktionsenzym DpnI gezielt gespalten wird.

Da DNA-Methylierung eine stabile Repression der Genexpression induziert, eignen sich erfindungsgemäße programmierbare DNA-Methyltransferasen zur Repression der Genexpression. Eine gezielte Repression von Genen hat eine Reihe von biomedizinischen Anwendungen, denen gemein ist, dass z.B. die Expression eines Krankheitsgens inhibiert wird. Bei den in Frage kommenden gewünschten Inhibierungsreaktionen handelt es sich beispielsweise um die Repression der Expression von Onkogenen in der Tumorthherapie oder die Repression der Expression viraler Proteine bei der Bekämpfung von viralen Infektionen. Bei amyloiden Speichererkrankungen (z.B. Parkinson, Alzheimer) wird die Expression des Vorläuferproteins inhibiert und damit die Progression der Krankheit gestoppt. Ein Vorteil der erfindungsgemäßen programmierbaren DNA-Methyltransferase-Konjugaten ist, dass ein einmal verändertes Methylierungsmuster der DNA stabil bleibt und vom zellulären Methylierungssystem erhalten wird. Daher ist keine dauerhafte Anwesenheit der erfindungsgemäßen programmierten DNA-Methyltransferase erforderlich, und die genomische DNA-Sequenz der Zielzelle bleibt unverändert.

Die erfindungsgemäßen Enzym-Konjugate sind des weiteren als Hilfsmittel für die biomedizinische Forschung geeignet, beispielsweise für die experimentelle Reduktion der Expression eines Gens, für die Herstellung transgener Organismen oder zur Manipulation von DNA, besonders für die Manipulation großer DNA-Moleküle.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Herstellung von Kits verwendet werden, die Mittel zur Kopplung von Crosslinkern an Enzyme und mit einem 5'-Link oder 3'-Link versehene Spezifitätsanker bereitstellen, so dass die mit einem 5'-Link oder 3'-Link versehenen Spezifitätsanker zunächst mit den bereit gestellten

10 Crosslinkern und anschließend mit den bereit gestellten Enzymen zu erfindungsgemäßen Enzymkonjugaten umgesetzt werden. Dem Hersteller des erfindungsgemäßen Kits ist aus seinem allgemeinen Wissen bekannt, wie er die einzelnen Komponenten des Kits, z.B. Enzyme, Crosslinker, Spezifitätsanker und Puffer, herstellt, formuliert und lagert.

15

Die erfindungsgemäßen hochspezifisch mit DNA interagierenden Enzym-Konjugate mit programmierbarer Spezifität können als Arzneimittel für Patienten zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Erkrankungen verwendet werden, bei denen eine Störung der Genexpression auftritt, wobei unter Störung sowohl

20 pathogene Hyper- als auch Hypoexpression verstanden wird. Bei diesen Erkrankungen handelt es sich beispielsweise um Viruserkrankungen (z.B. AIDS, Herpes simplex), Tumorerkrankungen (z.B. chronische myeloische Leukämie), amyloide Speichererkrankungen (Creutzfeld-Jakob-Krankheit, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson). Des Weiteren zählen hierzu monogen hereditäre Erkrankungen, dar-

25 unter Muskoviszidose (Cystische Fibrose), Phenylketonurie, Albinismus, Adreno-

genitales Syndrom, Mukopolysaccharidosen, Galaktosämie, hereditäre Taubstummheit, Xeroderma pigmentosum, Sichelzellanämie, Brachydaktylie, Achondroplasie, Apert-Syndrom, Neurofibromatose, Marfan-Syndrom, Osteogenesis imperfecta Typ I, Chorea Huntington, Myotone Dystrophie, Rot-Grün-
5 Farbsinnstörungen, Hämophilie A und B, Muskeldystrophie Typ Duchenne / Typ Becker, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, Glykogenspeicherkrankheiten (z.B. Pompe).

Der Begriff Patient bezieht sich dabei gleichermaßen auf Menschen und Wirbeltiere. Damit können die Arzneimittel in der Human- und Veterinärmedizin verwendet
10 werden. Pharmazeutisch akzeptable Kompositionen von Verbindungen gemäß den Ansprüchen deren Salze, Ester, oder Amide können, sofern sie nach zuverlässiger medizinischer Beurteilung keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen. Die therapeutisch wirksamen Verbindungen der vorliegenden Erfindung können dem Patienten als Teil einer pharmazeutisch akzeptablen Komposition entweder oral, rektal, parenteral, intravenös,
15 intramuskulär, subkutan, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravasculär, intrathekal, intravesikal, topisch, lokal (Puder, Salbe oder Tropfen) oder in Sprayform (Aerosol) verabreicht werden. Die intravenöse, subkutane, intraperitoneale oder intrathekale Gabe kann dabei kontinuierlich mittels einer Pumpe oder Dosiereinheit erfolgen. Dosierungsformen für die örtliche Administration der erfindungsgemäßen Verbindungen schließen Salben, Puder, Zäpfchen, Sprays und Inhalationsmittel ein. Die aktive Komponente wird dabei unter sterilen Bedingungen mit einem physiologisch akzeptablen Trägerstoff und möglichen stabilisierenden und/oder konservierenden Zusätzen, Puffern, Verdünnungs- und Treibmitteln je
20 nach Bedarf vermischt.
25

Ausführungsbeispiele

1. Proteine und Oligonukleotide

- 5 Als Bindungspartner zur Herstellung eines adressierten Restriktionsenzym wird die einzelsträngige Variante scPvuII des Restriktionsenzym PvuII verwendet, da in dieser Variante ein einzelnes Cystein für die Kopplung mit dem TFO einführbar ist. Am C-Terminus von scPvuII wird ein His₆-tag, gefolgt von vier Glycinresten und einem Cysteinrest eingeführt: [2-157]-GSGG-[2-157]-H₆G₄C.
- 10 Diese einen Cysteinrest enthaltende Variante des scPvuII-H₆G₄C wird durch eine PCR-basierte ortsspezifische Mutagenese unter Verwendung von pRIZ'-scPvuII als Templat hergestellt. Die PCR-basierte ortsspezifische Mutagenese ist dem Fachmann bekannt und in RD Kirsch, E Joly: An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. Nucleic Acids Res 1998, 26, 1848-1850 beschrieben.
- 15 Die Verwendung von pRIZ'-scPvuII als Templat ist dem Fachmann beispielsweise aus A Simoncsits, ML Tjornhammar, T Rasko, A Kiss, S Pongor: Covalent joining of the subunits of a homodimeric type II restriction endonuclease: single-chain PvuII endonuclease, J Mol Biol 2001, 309, 89-97 bekannt. Die His₆-tagged scPvuII-Variante wird nach
- 20 der dem Fachmann aus W Wende, W Grindl, F Christ, A Pingoud, V Pingoud: Binding, bending and cleavage of DNA substrates by the homing endonuclease PI-SceI, Nucleic Acids Res 1996, 24, 4123-4132 bekannten Methode exprimiert und aufgereinigt und in 0,03 M K-Phosphat pH 7,2, 0,5 M NaCl, 0,2 M Imidazol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,01 % Lubrol (w/v) bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung
- 25 gelagert.

Triplex bildende Oligonukleotide (TFO) enthalten einen 5'-C6-Spacer oder einen 5'-C6-Spacer mit einer terminalen Aminogruppe (Eurogentec, Köln, Deutschland): 5'-NH₂-[CH₂]_{6/12}-MPMPMPMPMPPPPPT-3', wobei M für 5-Methyl-2'-desoxycytidin und P für 5-[1-Propinyl]-2'-desoxyuridin steht.

5

2. Gelelektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay

Gelelektrophoretische Mobilitätsshift-Assays werden mit den TFO und einem komplementären doppelsträngigen Oligonukleotid durchgeführt. Hierzu werden 50 bis 500 nM TFO mit 500 nM ³²P-markiertem doppelsträngigem 5'-
10 d(GAGAGAGAGAAAAAA) -3' in 10 mM Tris-Phosphat, pH 7,2, 1 mM Spermin bei 37 °C für 1h in einem Volumen von 15 µl inkubiert. Anschließend werden 5 µl 10 mM Tris-Phosphat pH 7,2, 25 % (w/v) Sucrose zugegeben. Die Komplexbildung wird mittels Gelelektrophorese über 15%-ige Polyacrylamidgele in 10 mM Tris-Phosphat, pH 7,2, bestimmt. Nach der Elektrophorese werden die Gele
15 getrocknet und die radioaktiven Banden mit einem Instant Imager (Canberra Packard) sichtbar gemacht. Die quantitative Auswertung der gelelektrophoretischen Mobilitätsshift-Assays ergibt für die Bindung zwischen TFO und ds DNA eine Bindungskonstante $K_{ass}=6,4 \cdot 10^{-7} \text{M}^{-1}$.

20 3. Assay zur Untersuchung des Schutzes von Restriktionsenzymen vor Spaltung

Der Assay zur Untersuchung des Schutzes von Restriktionsenzymen vor Spaltung wird mit einem 150 bp DNA-Substrat durchgeführt, das eine FokI-Stelle und eine daneben liegende, die Spaltungsstelle von FokI überlappende Tripelhelix-
25 Bildungsstelle (TFS) stromabwärts aufweist. 1 µM Substrat wird in 10 mM Tris-

Phosphat pH 7,2 mit 10 μ M TFO oder - im Falle der Kontrolle - einem nicht spezifischen Hexadecadeoxyribonukleotid für 4 h bei 37 °C in 70 μ l Gesamtvolumen inkubiert. Anschließend werden 40 U FokI in Spaltungspuffer bis zu einem Endvolumen von 100 μ l zugegeben. Nach 30, 60, 90, 120, 300, 600, 1200, 1800, 2700
5 und 3600 Sekunden werden 10 μ l-Aliquote entnommen und die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 50 mM beendet. Nach Zugabe von 5 μ l Ladepuffer (10 % w/v Ficoll, 10 % (w/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol) wird der Spaltungsschutz durch Elektrophorese über 12 %-ige Polyacrylamidgele in 80 mM Tris-Phosphat pH 8,2, 2 mM ED-
10 TA bestimmt. Die Banden werden durch Färben des Gels mit Ethidiumbromid (0,1 μ g/ml) und Bestrahlen mit UV-Licht sichtbar gemacht.

4. Crosslinking-Reaktion

Zur Aktivierung des Oligonukleotids werden 500 μ M TFO mit 40 mM des bifunktionalen Crosslinkers N-(γ -Maleidobutyryloxy)-succinimidester (GMBS) (Pierce Chemical, Rockford / Illinois, USA) in 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM K₂HPO₄, pH 7,2 (PBS-Puffer) für eine Stunde bei 23 °C inkubiert. Nicht umgesetzter Crosslinker wird mittels Anionenaustauschchromatographie in zwei Schritten entfernt, wobei im ersten Schritt eine NAP[®]5- und im zweiten Schritt eine
20 NAP[®]-10-Säule (Amersham, Braunschweig, Deutschland) verwendet wird. Das entsalzte aktivierte TFO wird in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Reines, entsalztes aktivierte TFO wird in einer Ausbeute von >70 %, bezogen auf das als Edukt eingesetzte nicht aktivierte TFO, erhalten. Das entsalzte aktivierte TFO wird in 80 μ l PBS-Puffer gelöst. Für die Crosslinking-Reaktion zwischen Oligonukleotid
25 und Protein werden 80 μ M aktivierte TFO für 1 h bei 23 °C mit 20 μ M scPvull-

H₆G₄C inkubiert. Das scPvull-H₆G₄C wird zuvor für 4 h gegen PBS-Puffer dialysiert, um DTT zu entfernen. Die Ausbeute der Crosslinking-Reaktion wird mittels 15%-iger SDS-PAGE bestimmt.

5 5. Protein-TFO-Aufreinigung

Nicht kovalent mit dem TFO verknüpfte scPvull-H₆G₄C wird durch Anionenaustauschchromatographie von quervernetztem scPvull-H₆G₄C-C₆/C₁₂-TFO getrennt, wobei DE52 in 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 3 mM EDTA und ein linearer Gradient von 100 mM bis 400 mM NaCl verwendet werden. Der Proteingehalt jeder
10 Fraktion wird mittels 15 %-iger SDS-PAGE bestimmt. scPvull-H₆G₄C eluiert mit dem ersten Durchfluss, d.h. bevor mit der Gradientenelution begonnen wird, wohingegen scPvull-H₆G₄C-C₆/C₁₂-TFO während der Gradientenelution bei einer NaCl-Konzentration von 350 mM bis 390 mM eluiert. Das aufgereinigte scPvull-H₆G₄C-C₆/C₁₂-TFO wird gegen PBS-Puffer dialysiert, welcher 25 % PEG 10000
15 enthält, und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

6. Substrate für DNA-Spaltungsversuche

Für die DNA-Spaltungsversuche werden radioaktiv markierte 239 bp-Substrate, die eine Pvull-Schnittstelle enthalten, mittels PCR unter Verwendung von [α -³²P]
20 dATP hergestellt. Als Templat für die Herstellung des 239 bp-PCR-Produktes wird das pAT153-Plasmid verwendet, welches eine Pvull- an Stelle einer BamHI-Schnittstelle enthält, wobei die folgenden Primer eingesetzt werden:
5'- GGCCTCTTGCGGGAGATCTTCCATTCCGAC-3' und
5'-CGGTACTCGACGACAGTCGGCGCACATCAGACAGCTGACAGGACGGGTG-3'
25 (Die Pvull-Schnittstelle ist CAGCTG).

Das nicht adressierte 478 bp-Substrat enthält keine TFS-Stelle und wird mittels PCR mit demselben Plasmid hergestellt, wobei [α - ^{32} P]dATP und 5'- ATAGGCGC-CAGCAACCGCACCTGTG-3' und 5'-AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC-3' als Primer verwendet werden. Dieses

5 nicht adressierte Substrat besitzt dieselbe Sequenz wie die adressierten Spaltungssubstrate (siehe unten) mit Ausnahme seiner größeren Anzahl von Basenpaaren und der TFS. Alle Substrate werden über PCR-Säulen aufgereinigt (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Reinheit wird mittels nativer PAGE bestimmt. Die Konzentration wird unter der Voraussetzung bestimmt, dass 1 OD_{260nm} 50 ng/ μ l
10 entspricht.

7. Kompetitionsversuch: Spaltung von Substraten mit und ohne TFS

In diesem Kompetitionsversuch wird die Spaltung eines 478 bp-Substrates ohne TFS mit derjenigen eines 239 bp-Substrates mit einer TFS im Abstand von 9 bp
15 zur PvuII-Schnittstelle verglichen. Es wird scPvuII-C₁₂-TFO verwendet. Die Präinkubation des scPvuII-C₁₂-TFO mit den jeweiligen DNA-Substraten wird bei 23 °C für 10-15 h in dem für die Tripelhelixbildung geeigneten Puffer 10 mM Tris-Phosphat pH 7,2, 1 mM Spermin, 3 mM EGTA in Abwesenheit von Mg²⁺ durchgeführt, um die Bindung der PvuII-Schnittstellen ohne benachbarte TFS sowie DNA-
20 Spaltung zu verhindern, welche beide die Anwesenheit von Mg²⁺ erfordern. Bei dieser Präinkubation werden im Wesentlichen äquimolare Konzentrationen von scPvuII-C₁₂-TFO und adressiertem DNA-Substrat eingesetzt, um eine im Wesentlichen stöchiometrische Bindung der TFS zu erreichen und freies Enzym im Reaktionsgemisch zu vermeiden. Die Spaltung wird durch Zugabe von PvuII-
25 Spaltungspuffer, bestehend aus 10 mM Tris-HCl pH 7,2, mit MgCl₂ in verschiedenen Konzentrationen gestartet. Dabei betragen die Endkonzentrationen 1,25 mM, 2,5 mM und 5 mM MgCl₂. Die Präferenz für das adressierte Substrat ist abhängig

von der $MgCl_2$ -Konzentration: Mit abnehmender $MgCl_2$ -Konzentration nimmt die Geschwindigkeit der Spaltung des nicht adressierten 478 bp-Substrates ab und erreicht bei einer Konzentration von 1,25 mM $MgCl_2$ den Wert Null, wohingegen die Geschwindigkeit der Spaltung des adressierten 239 bp-Substrates unverändert bleibt (Fig. 5 a und 5b). Bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1,25 mM liegen in der Reaktionsmischung die gleichen Mengen an gebildetem Produkt und scPvull- C_{12} -TFO vor, so lange die Menge des eingesetzten scPvull- C_{12} -TFO die Menge des adressierten Substrates nicht übersteigt. Werden mehr als stöchiometrische Mengen des Enzyms im Vergleich zur DNA zugegeben, so tritt zusätzlich Spaltung des nicht adressierten Substrates ein, wobei die letztgenannte Spaltung mit einer im Wesentlichen sehr geringen Geschwindigkeit verläuft.

8. Einfluss des Abstandes zwischen TFS und Pvull-Schnittstelle und der Länge des Linkers auf die Spaltung

In verschiedenen Abständen zur Pvull-Schnittstelle wird durch ortsspezifische Mutagenese eine angrenzende Tripelhelix-Bildungsstelle (TFS, triple helix forming site) eingeführt, und zwar 3, 5, 7, 9, 11 bzw. 13 bp stromabwärts der TFS, so dass alle adressierten 239mer-Substrate angrenzend an die Pvull-Schnittstelle (fett) dieselbe Sequenz mit Ausnahme der TFS (unterstrichen) besitzen:

20	3 bp	5'- CGGTACTCGACG <u>TTTTTTTCTCTCTCTC</u> CAGACAGCTG...-3'
	5 bp	5'- CGGTACTCGA <u>TTTTTTTCTCTCTCTC</u> CGCAGACAGCTG...-3'
	7 bp	5'- CGGTACTC <u>TTTTTTTCTCTCTCTC</u> CCAGCAGACAGCTG...-3'
	9 bp	5'- CGGTAC <u>TTTTTTTCTCTCTCTC</u> CCACAGCAGACAGCTG...-3'
	11 bp	5'- CGG <u>TTTTTTTCTCTCTCTC</u> CCGCACAGCAGACAGCTG...-3'
25	13 bp	5'- CG <u>TTTTTTTCTCTCTCTC</u> CGGCGCACAGCAGACAGCTG...-3'

Außerdem werden zwei scPvull-TFO-Konjugate wie oben beschrieben hergestellt, die sich nur in der Länge des Linkers unterscheiden: scPvull- C_6 -TFO und scPvull-

- c₁₂-TFO. Um die DNA-Spaltung zu bestimmen, werden 45 nM jedes Substrats mit 5 nM scPvull-H₆G₄C-C₆-TFO bzw. scPvull-c₁₂-TFO bei 37 °C in 10 mM Tris-Phosphat pH 7,2, 10 mM MgCl₂, und 1 mM Spermin gespalten. Die Spaltung wird nach 5, 10, 20, 30, 60 bzw. 110 min durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 50 mM beendet. Die Reaktionsprodukte werden durch Elektrophorese über 12 %-ige PAGE-Gele bestimmt. Anschließend werden die Gele getrocknet und die radioaktiven Banden mittels Autoradiographie unter Verwendung eines Instant Imager-Systems (Canberra Packard, Rüsselsheim, Deutschland) bestimmt.
- 10 Die Ziel gerichtete Spaltung von 45 nM scPvull-H₆G₄C-C_{6/C12}-TFO wird im Kompetitionsversuch durch gleichzeitiges Inkubieren mit je 45 nM des adressierten und des nicht adressierten Substrates in 10 mM Tris-Phosphat pH 7,2, 1 mM Spermin, 3 mM EGTA bei 23 °C für 12 bis 18 h untersucht. EGTA wird dem Präinkubationspuffer zugesetzt, um Ca²⁺-Ionen zu komplexieren, die selbst bei niedrigen
- 15 Konzentrationen die spezifische Bindung des nicht adressierten Substrates an die Pvull-Stelle stimulieren. Die Spaltungsreaktion wird bei 37 °C gestartet, indem identische Volumina des Spaltungspuffers 10 mM Tris-HCl pH 7,2 zugegeben werden, die verschiedene Konzentrationen an MgCl₂ enthalten, wobei die Endkonzentration an MgCl₂ 1,25 mM, 2,5 mM bzw. 5 mM beträgt. Die Spaltungsreaktion wird gestoppt, und die Spaltungsprodukte werden wie oben beschrieben bestimmt.
- 20

Die Spaltungsgeschwindigkeiten der nicht adressierten Substrate sind in allen Reaktionen, die mit 1,25 mM MgCl₂ durchgeführt werden, sehr gering und etwa

25 1.400-fach niedriger als die der adressierten Substrate. Die Geschwindigkeitskon-

stanten für die Spaltung des nicht adressierten Substrates durch scPvull-C₆-TFO bzw. scPvull-C₁₂-TFO betragen $k_{\text{nicht adressiert(C12)}} = 0,002 \text{ min}^{-1}$ bzw. $k_{\text{nicht adressiert(C6)}} = 0,001 \text{ min}^{-1}$. Für die adressierten Substrate ergeben sich bis zu 1.400-fach höhere Spaltungsgeschwindigkeiten, siehe Tab. 1. Am schnellsten findet die Spaltung
5 dabei statt, wenn der Abstand zwischen Pvull-Schnittstelle und TFS 9 bp bis 11 bp beträgt. Bei Verwendung von scPvull-C₁₂-TFO stellt auch die DNA mit 13 bp Abstand zwischen Pvull-Schnittstelle und TFS ein gutes Substrat dar. Die für scPvull-C₁₂-TFO ermittelten Spaltungsgeschwindigkeiten sind höher als die für scPvull-C₁₂-TFO. Die Spaltungsgeschwindigkeit von Substraten, bei denen der Abstand
10 zwischen Pvull-Schnittstelle und TFS kürzer als 7 bp ist, nimmt mit geringer werdendem Abstand ab, wobei dieser Effekt bei scPvull-C₆-TFO stärker ist als bei scPvull-C₁₂-TFO.

Spaltungsgeschwindigkeiten der adressierten Substrate sowie die für die Reaktion in Gegenwart von 1,25 mM MgCl₂ bestimmten Präferenzen sind in Tab. 1 dargestellt:
15

Tabelle 1: Geschwindigkeitskonstanten für die Spaltung des 239 bp-Substrates durch scPvull-C6/C12-TFO

Abstand	$k_{\text{adressiert(C12)}}$	Spaltungspräferenz C12	$k_{\text{adressiert(C6)}}$	Spaltungspräferenz C6
3 bp	1.0 min^{-1} (+/- 5 %)	440	0.03 min^{-1} (+/- 7 %)	20
5 bp	0.8 min^{-1} (+/- 6 %)	360	0.03 min^{-1} (+/- 17 %)	20
7 bp	1.2 min^{-1} (+/- 7 %)	540	0.3 min^{-1} (+/- 7 %)	210
9 bp	3.2 min^{-1} (+/- 9 %)	1410	0.5 min^{-1} (+/- 6 %)	450
11 bp	3.1 min^{-1} (+/- 13 %)	1360	1.0 min^{-1} (+/- 15 %)	820
13 bp	2.6 min^{-1} (+/- 10 %)	1140	0.2 min^{-1} (+/- 10 %)	190

- 5 Tab.1 zeigt die Geschwindigkeitskonstanten der Spaltung für sechs verschiedene adressierte 239 bp-Substrate, die sich im Abstand zwischen Pvull-Spaltungsstelle und Tripelhelixbindungsstelle (TFS) unterscheiden. Der angegebene Fehlerbereich basiert auf drei unabhängigen Messungen. Die Spaltungspräferenz stellt das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten des adressierten 239-bp-Substrates und des nicht adressierten 478 bp-Substrates dar. Aufgeführt sind die Daten für die scPvull-C6-TFO- und scPvull-C12-TFO-Varianten, die sich in der Länge der Spacer unterscheiden (6 oder 12 Methylengruppen zwischen Protein und Oligonukleotid).

15 9. Adressierte Spaltung von Plasmiden mit mehreren Schnittstellen

Für die Ziel gerichtete Spaltung eines Plasmidsubstrates durch scPvull-H₆G₄C-C₆/C₁₂-TFO wird ein 5556 bp-Plasmid mit 5 Pvull-Stellen verwendet, das eine Pvull-Schnittstelle im Abstand von 9 bp zu einer TFS aufweist. Wird das überspiralisierte Plasmids ohne Präinkubation mit Pvull oder scPvull-C₁₂-TFO gespalten, so resul-

20 tieren fünf Spaltungsfragmente.

Präinkubation und Spaltung des überspiralisierten und HindIII-linearisierten Plasmids werden wie für die PCR-Produkte beschrieben durchgeführt. Dabei werden scPvull-C₁₂-TFO und überspiralisiertes bzw. HindIII-linearisiertes Plasmid in einem

im Wesentlichen stöchiometrischen Verhältnis eingesetzt. Die Spaltungsprodukte werden mittels Elektrophorese über ein 0,8 %-iges Agarosegel bestimmt. Das Gel wird anschließend mit SYBR Gold gefärbt und mit Hilfe einer geeigneten Software analysiert (Biometra, Göttingen, Deutschland). Die Analyse der Längen der Spaltungsprodukte des überspiralisierten und des linearisierten Plasmids zeigen, dass nur die adressierte Schnittstelle geschnitten wird. Die quantitative Analyse der Intensitäten der verschiedenen DNA-Banden ergibt Geschwindigkeitskonstanten für die Spaltung der adressierten Schnittstelle des überspiralisierten und des linearisierten Plasmids von $k_{\text{überspiralisiert}} = 1,4 \text{ min}^{-1}$ sowie $k_{\text{linear}} = 3,9 \text{ min}^{-1}$. Eine Spaltung im Bereich der PvuII-Schnittstellen ohne benachbarte TFS wird nicht beobachtet, da eine etwa 1000-fach höhere Spaltungspräferenz für die adressierte PvuII-Schnittstelle vorliegt. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt.

Bezugszeichenliste

1. DNA
2. Spezifitätsanker (TFO)
- 5 3. Linker
4. Enzym
5. Erkennungssequenz des Spezifitätsankers
6. Erkennungssequenz des Enzyms
7. Erkennungsstelle des Konjugats aus Spezifitätsanker und Enzym
- 10 8. Zellmembran
9. Zellkernmembran
10. Plasmidvektor
11. programmierbares Restriktionsenzym
12. verändertes Zielgen
- 15 13. Upstream-Homologieregion
14. Downstream-Homologieregion
15. neue Genprodukte
16. Zielzelle mit retroviralem Genprodukt
17. retrovirales Genom
- 20 18. Genom der Zielzelle vor der adressierten Methylierung
19. Zielsequenz für die DNA-Methylierung
20. methylierte Zielregion
21. Chromatin-Kondensation
22. Tochterzellen ohne retrovirales Genprodukt

Abbildungslegenden

Fig. 1

Dargestellt ist das Prinzip der Herstellung von hoch spezifischen mit DNA 1 interagierenden Enzymen mit programmierbarer Spezifität. Spezifitätsanker 2 und Enzym 4 sind über einen Linker 3 chemisch miteinander verbunden. Der Linker 3 legt den Abstand zwischen Spezifitätsanker 2 und Enzym 4 fest. Die Erkennungsstelle 7 des Konjugats aus Spezifitätsanker und Enzym ist durch die Erkennungssequenz des Spezifitätsankers 5 bzw. des Enzyms 6 festgelegt.

10

Fig. 2

Prinzip des Genaustauschs mit Hilfe einer programmierbaren Restriktionsendonuklease 11.

- A) Das programmierbare Restriktionsenzym 11 wird zusammen mit einem Plasmidvektor 10 in die Zelle eingebracht. Der Vektor 10 enthält das veränderte Zielgen 12, das flankiert ist von Bereichen, die zur genomischen Region homolog sind (Upstream-Homologieregion 13, Downstream-Homologieregion 14).
- B) Die genomische DNA wird vom programmierbaren Restriktionsenzym 11 gespalten. Die Genkopie auf dem Plasmidvektor 10 enthält keine Erkennungssequenz für das programmierbare Restriktionsenzym 10.
- C) Dadurch wird die homologe Rekombination stimuliert, und es kommt zum Austausch des internen DNA-Abschnitts gegen den externen (gene targeting).

- D) Es kommt zu einer stabilen Veränderung des Genoms; alle Nachkommen weisen die neuen Genprodukte **15** auf.

Fig. 3

- 5 Prinzip der gezielten Inhibition der Gentranskription durch DNA-Methylierung
- E) Eine programmierbare DNA-Methyltransferase wird in eine Zielzelle **16** eingebracht, die z.B. ein retrovirales Genom **17** in ihr Genom **18** integriert hat. Die Zielsequenz **19** wird methyliert.
- F) Die Methylierung breitet sich im Bereich der Zielregion **20** aus, und die Ex-
10 pressionsaktivität der entsprechenden DNA-Region sinkt.
- G) Es kommt zur Chromatin-Kondensation **21**, Histon-Deacetylierung und Histon-Methylierung. Die Expression der DNA wird dauerhaft abgeschaltet.
- H) Dieser Zustand ist stabil und wird an Tochterzellen **22** vererbt. Damit ist das integrierte Retrovirus still gelegt.
- 15 Dem Fachmann ist ohne Weiteres ersichtlich, dass nach demselben Prinzip auch andere Gene gezielt inaktivierbar sind, deren Expression eine pathogene Wirkung hat, z.B. Onkogene oder Gene, deren Proteinprodukte zur Ausbildung von Aggregaten in Zellen führen.

20 **Fig. 4**

- Die Herstellung eines programmierten Restriktionsenzym ist schematisch dargestellt. Die einzelsträngige Variante von PvuII wird über einen $(CH_2)_6$ - oder $(CH_2)_{12}$ -Linker unter Verwendung eines chemischen Crosslinkers mit einem Tripelhelix bildenden Oligonukleotid (TFO) verknüpft. Das Endprodukt scPvuII- C_6/C_{12} -TFO
25 weist eine zweiteilige Erkennungsstelle auf: die PvuII-Erkennungsstelle und die Tri-

pelhelixbindungsstelle (TFS). Die Spaltung des Doppelstranges findet in der Pvull-Stelle statt, jedoch nur, wenn diese der TFS benachbart ist.

Fig. 5a und b:

- 5 Die Fig. 5a und b stellen die adressierte (239 bp-Substrat) und die nicht adressierte DNA-Spaltung (478 bp-Substrat) durch scPvull-C₆/C₁₂-TFO bei zwei verschiedenen Mg²⁺-Konzentrationen dar. Eingesetzt werden ein 239 bp-Substrat, das eine TFS in einem Abstand von 9 bp zur Pvull-Schnittstelle aufweist, sowie ein 478 bp-Substrat, welches keine TFS besitzt. 45 nM jedes Substrates werden zum Zwecke
- 10 der Tripelhelix-Bildung mit 40 nM scPvull-C₆/C₁₂-TFO in Gegenwart von Spermin inkubiert. Nach Zugabe von 1,25 mM (Fig. 5a) oder 5 mM (Fig. 5b) MgCl₂ werden die kinetischen Daten der Spaltung bestimmt. Während das nicht adressierte Substrat (◆) bei einer MgCl₂-Konzentration von 5 mM im Wesentlichen ebenso schnell gespalten wird wie das adressierte Substrat (■), ist eine Spaltung bei ei-
- 15 ner MgCl₂-Konzentration von 1,25 mM im Wesentlichen nicht feststellbar. Im Gegensatz dazu wird das adressierte Substrat sowohl bei 5 mM als auch bei 1,25 mM MgCl₂ schnell gespalten.

Fig. 6

Fig. 6 zeigt die adressierte Spaltung eines 5556 bp-Plasmids durch scPvuII-C₆/C₁₂-TFO. Das Plasmid besitzt fünf PvuII-Schnittstellen (in Fig. 6 mit P bezeichnet); eine davon weist eine TFS im Abstand von 9 bp auf und ist mit ★ gekennzeichnet. Zum Zwecke der Tripelhelixbildung werden 50 nm des Plasmids mit 45 nM scPvuII-C₆/C₁₂-TFO in Gegenwart von Spermin präinkubiert. Aliquote des Reaktionsgemisches werden 0, 1, 10, 30, 60, 120 und 300 Minuten nach Zugabe von MgCl₂ entnommen und die Reaktionsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Oberer bzw. unterer Teil der Abbildung zeigen die Ergebnisse der adressierten Spaltung der überspiralisierten bzw. linearisierten Form des Plasmids. Durch die substöchiometrische Zugabe von scPvuII-C₆/C₁₂-TFO ist die Spaltung nicht vollständig. Bahn 1 im oberen Gel zeigt das Ergebnis des Kontrollspaltungsexperiments, bei dem das überspiralisierte Plasmid ohne Präinkubation für 5 min mit scPvuII-C₆/C₁₂-TFO in Spaltungspuffer inkubiert wird. In diesem Fall wird das Plasmid an allen fünf PvuII-Spaltungsstellen gespalten.

Ansprüche

1. Mit Ziel-DNA interagierendes Enzym-Konjugat, dadurch gekennzeichnet, dass
es sich bei dem Enzym-Konjugat um eine Verbindung handelt, bei der ein Enzym über je einen Linker kovalent an mindestens einen Spezifitätsanker gebunden ist, wobei
- das Enzym auf seiner Oberfläche eine reaktive funktionelle Gruppe zur Bindung eines Linkers aufweist,
 - es sich bei dem mindestens einen Spezifitätsanker um eine Oligonukleotidverbindung handelt, die über eine komplementäre Basenpaarung mit einer Triplex-Bildungsstelle (TFS) der Ziel-DNA eine Tripelhelix ausbildet, und die am 5'-Ende oder am 3'-Ende eine reaktive funktionelle Gruppe aufweist,
 - der Spezifitätsanker eine Sequenzhomologie von mindestens 85 % zur Triplex-Bindungsstelle der Ziel-DNA aufweist,
 - der mindestens eine Linker eine molekulare Verbindung darstellt, die mindestens eine Kette aus mindestens zwei Kohlenstoffatomen enthält, wobei die Kette an zwei Stellen mit gleichen oder verschiedenen reaktiven funktionellen Gruppen derivatisiert ist,
 - je eine der beiden funktionellen Gruppen des mindestens einen Linkers eine kovalente chemische Bindung mit der reaktiven funktionellen Gruppe des Enzyms und der reaktiven funktionellen Gruppe des Spezifitätsankers ausbildet, und
 - Enzym und Spezifitätsanker mit einem Abstand von mindestens zwei Basenpaaren an die Ziel-DNA gebunden werden.

2. Enzym-Konjugat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe Typ II-Restriktionsendonuklease, Homin-gendonuklease, DNA-Reparaturenzym, DNA-Methyltransferase.
- 5 3. Enzym-Konjugat gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym eine Typ II-Restriktionsendonuklease ist.
4. Enzym-Konjugat gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym eine Methyltransferase ist.
- 10 5. Enzym-Konjugat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Spezifitätsanker ausgewählt ist aus der Gruppe Oligonukleotid, Oligonukleotidanalogen, PNA, Threose-NukleinsäureanalogON.
- 15 6. Enzym-Konjugat gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Spezifitätsanker um ein Oligonukleotidanalogen ausgewählt aus den Gruppen
- Oligonukleotide mit modifiziertem Phosphatgerüst: mixed backbone-Oligonukleotide, Methylphosphonat-, Methyl-(methylenimino)-, Methylcar-
 - 20 boxamid-modifizierte Oligonukleotide,
 - Oligonukleotide mit modifizierter Riboseeinheit: am 2'- oder 4'-C-Atom modifizierte Ribose, α -Anomere, 3'-Desoxyribose
- handelt.

7. Enzym-Konjugat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Spezifitätsanker aus 10 bis 20 Nukleotiden besteht.
8. Enzym-Konjugat gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Spezifitätsanker aus 10 bis 20 Nukleotiden besteht und eine Sequenzhomologie zur Triplex-bildenden Stelle der Ziel-DNA von 100 % aufweist.
9. Enzym-Konjugat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker eine kovalente chemische Verknüpfung aus einem Crosslinker und einem 3'-Link oder 5'-Link ist, wobei
- der Crosslinker eine molekulare Verbindung aus mindestens einer Kohlenwasserstoffkette darstellt, wobei diese mindestens eine Kohlenwasserstoffkette mindestens zwei C-Atome enthält und an zwei Stellen reaktive funktionelle Gruppen enthält,
 - der 5'-Link oder 3'-Link eine molekulare Verbindung darstellt, die eine Kohlenwasserstoffkette aus mindestens zwei C-Atomen enthält, an das 5'-Ende oder 3'-Ende des Spezifitätsankers gebunden ist und an einer Stelle eine reaktive funktionelle Gruppe enthält und
 - eine reaktive funktionelle Gruppe des Crosslinkers mit der funktionellen reaktiven Gruppe des 3'-Links oder 5'-Links chemisch kovalent verbunden ist.
10. Enzym-Konjugat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Spezifitätsanker mit einem 5'-Aminolink chemisch kovalent verbunden ist und der 5'-Aminolink 6 bis 12 Methylengruppen enthält.

11. Enzym-Konjugat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Crosslinker eine Succinimidester- und Maleimid-Funktion enthält.
- 5 12. Enzym-Konjugat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass Enzym und Spezifitätsanker in einem Abstand von 2 bis 20 Basenpaaren an die Ziel-DNA gebunden werden, bevorzugt in einem Abstand von 9 bis 13 Basenpaaren.
- 10 13. Verfahren zur Herstellung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass nacheinander folgende Schritte durchgeführt werden:
- a) Umsetzung des Linkers mit dem Spezifitätsanker, wobei eine reaktive funktionelle Gruppe des Linkers mit der reaktiven funktionellen Gruppe
 - 15 des Spezifitätsankers eine kovalente chemische Bindung eingeht,
 - b) Umsetzung des Linkers mit dem Spezifitätsanker, wobei eine reaktive funktionelle Gruppe des Linkers mit der reaktiven funktionellen Gruppe
 - des Spezifitätsankers eine kovalente chemische Bindung eingeht,
 - c) Reinigung des Enzym-Konjugates.
- 20
14. Verfahren zur Herstellung von Enzym-Konjugaten gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym eine Methyltransferase ist und vor der Durchführung von Schritt b) in Anspruch 9 über PCR-basierte ortsspezifische Mutagenese ein oberflächlich zugänglicher Cysteinrest am Enzym eingeführt
- 25 wird.

15. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 zur
in vitro-Klonierung und/oder Charakterisierung von DNA-Fragmenten, die aus
mindestens 10.000 Basenpaaren bestehen.
- 5
16. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 zur
DNA-Methylierung in vitro.
17. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12
10 zum in vitro-Mapping von genomischer DNA.
18. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12
deren Salze, Ester und/oder Amide zur Herstellung eines Reagenz zur spezifi-
schen Repression der Expression eines Gens in vivo.
- 15
19. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12
sowie deren pharmazeutisch akzeptabler Salze, Ester und/oder Amide zur
Herstellung eines Arzneimittels.
- 20 20. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12
und 19 sowie deren pharmazeutisch akzeptabler Salze, Ester und/oder Amide
zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie, Diagnose und Prophylaxe
von Erkrankungen, die durch die Expression pathogener Gene verursacht wer-
den.

21. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 3, 5 bis 12 sowie 19 und 20 sowie deren pharmazeutisch akzeptabler Salze, Ester und/oder Amide zur Herstellung eines Arzneimittels zur Herbeiführung eines gezielten DNA-Doppelstrangbruches in vivo.

5

22. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß Anspruch 19 sowie deren pharmazeutisch akzeptabler Salze, Ester und/oder Amide zur Herstellung eines Arzneimittels, welches die homologe Rekombination und/oder die DNA-Reparatur in vivo stimuliert.

10

23. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 4 bis 12 sowie 19 und 20 sowie deren pharmazeutisch akzeptabler Salze, Ester und/oder Amide zur Herstellung eines Arzneimittels zur spezifischen Methylierung von DNA in vivo.

15

24. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß Anspruch 20 sowie deren pharmazeutisch akzeptabler Salze, Ester und/oder Amide zur Herstellung eines Arzneimittels zur spezifischen Repression von pathogenen Genen in vivo.

20 25. Verwendung von Enzym-Konjugaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, 19 und 20 sowie deren pharmazeutisch akzeptabler Salze, Ester und/oder Amide zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie, Diagnose und Prophylaxe von Erkrankungen, bei denen Onkogenprodukte, virale Proteine oder Vorläuferproteine amyloider Speichererkrankungen produziert werden.

25

26. Pharmazeutisch akzeptable Komposition enthaltend Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 als aktive Komponente und einen physiologisch akzeptablen Trägerstoff.

- 5 27. Pharmazeutisch akzeptable Komposition gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass sie oral, rektal, parenteral, intravenös, intramuskulär, subkutan, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravasculär, intrathekal, intravesikal, topisch, lokal oder als Aerosol verabreicht wird.

[Anhängende Zeichnungen]

Fig. 1

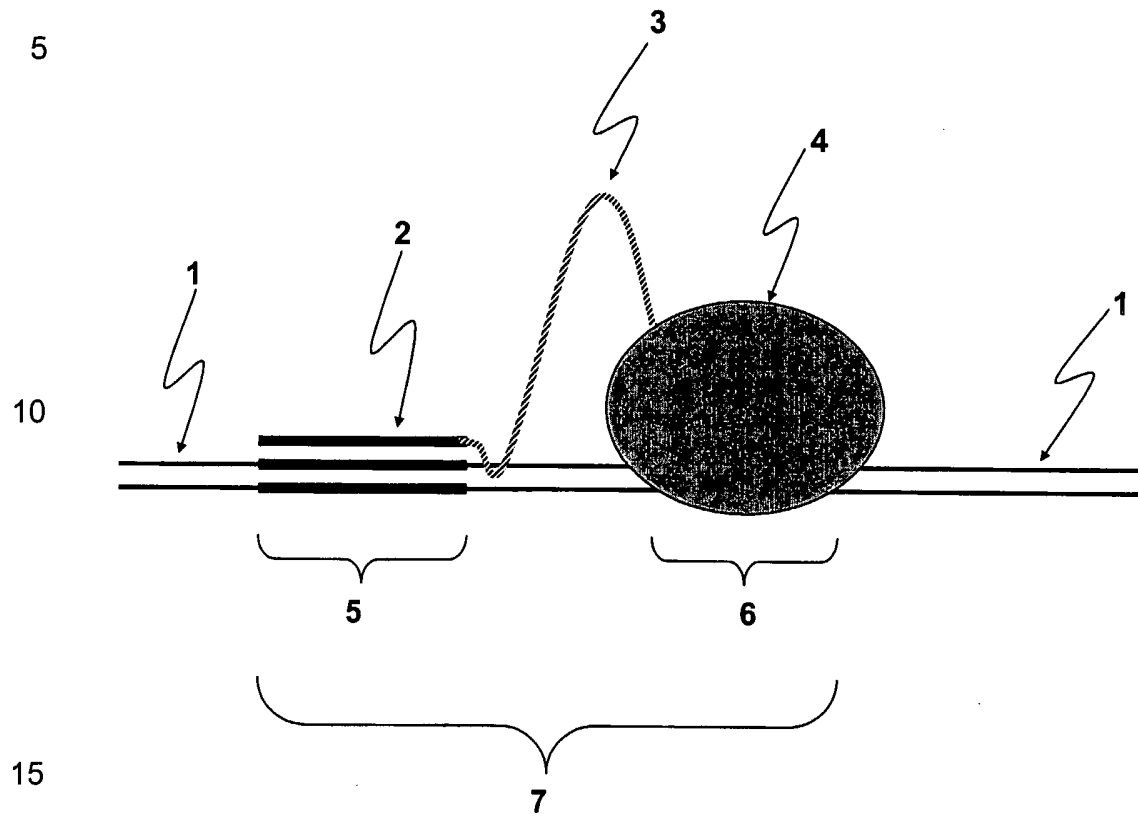


Fig. 2

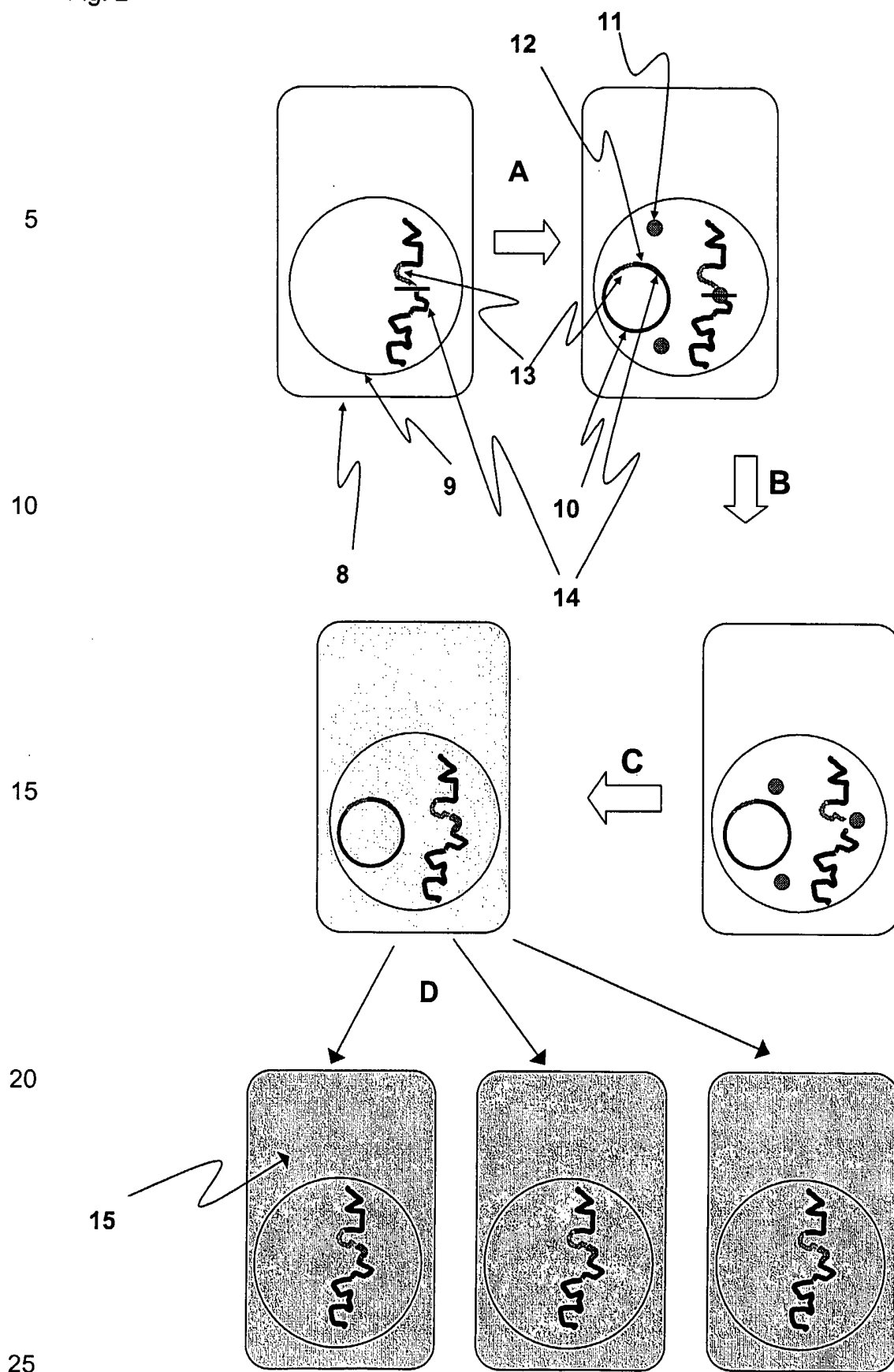


Fig. 3

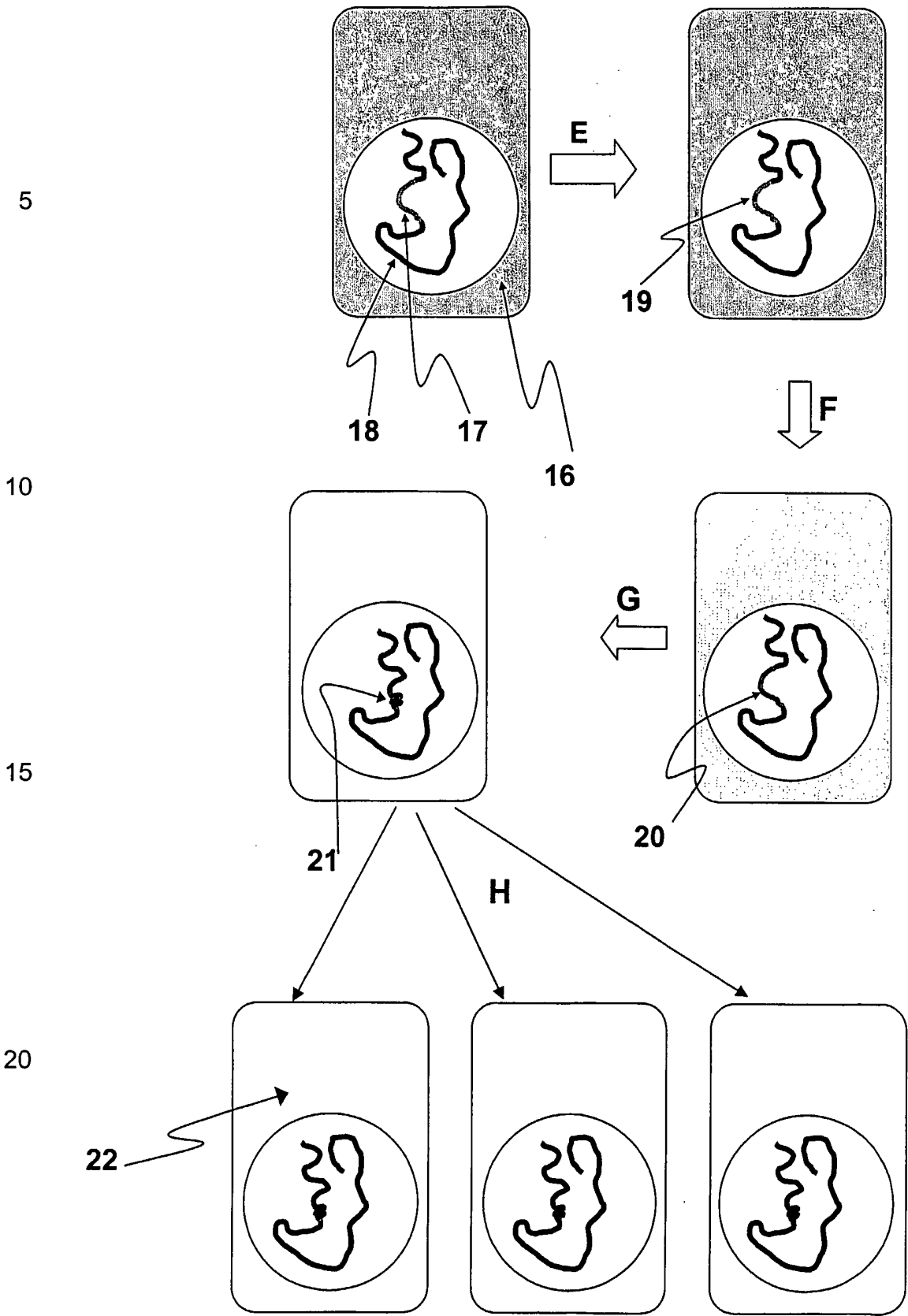


Fig. 4

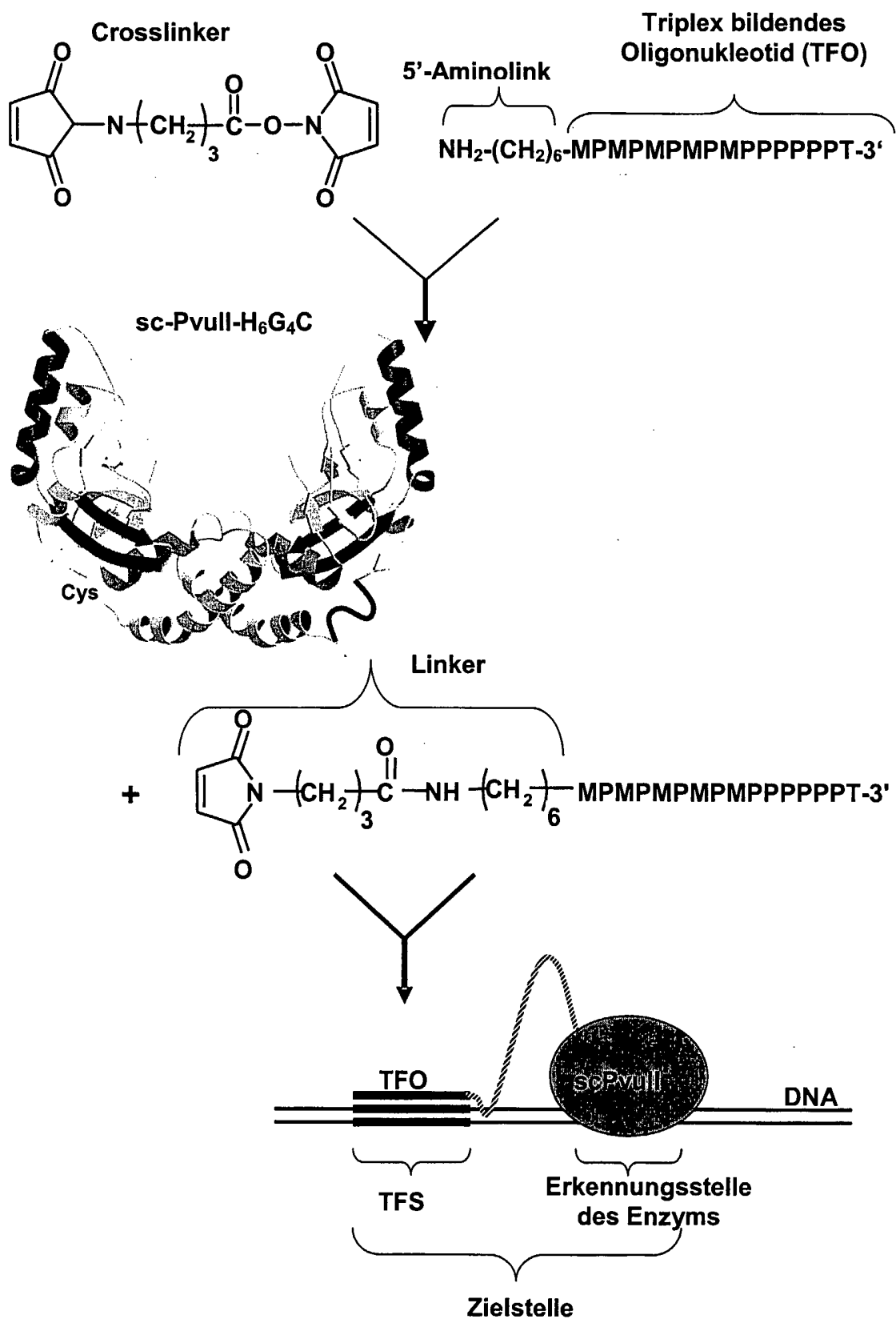


Fig. 5a

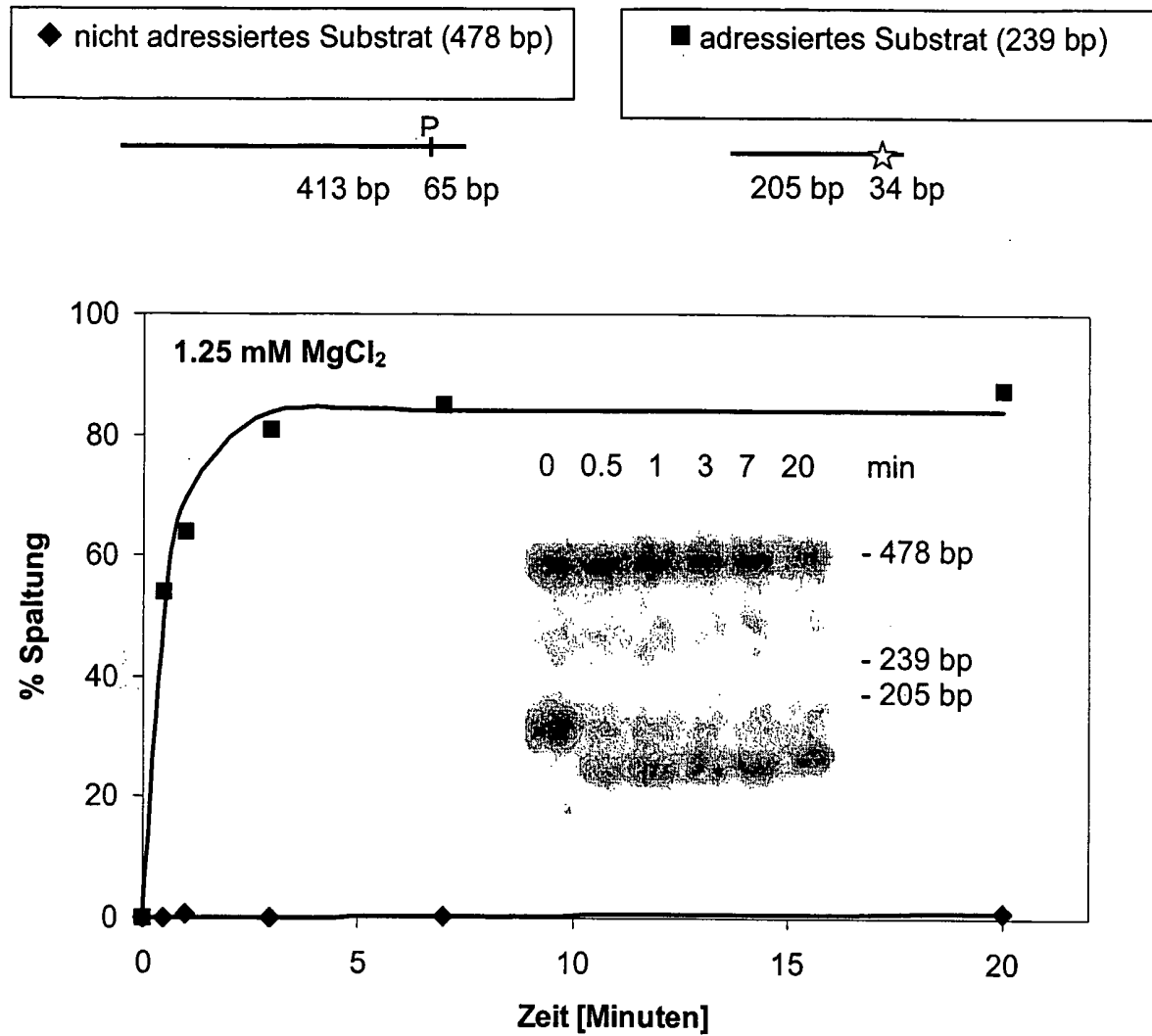
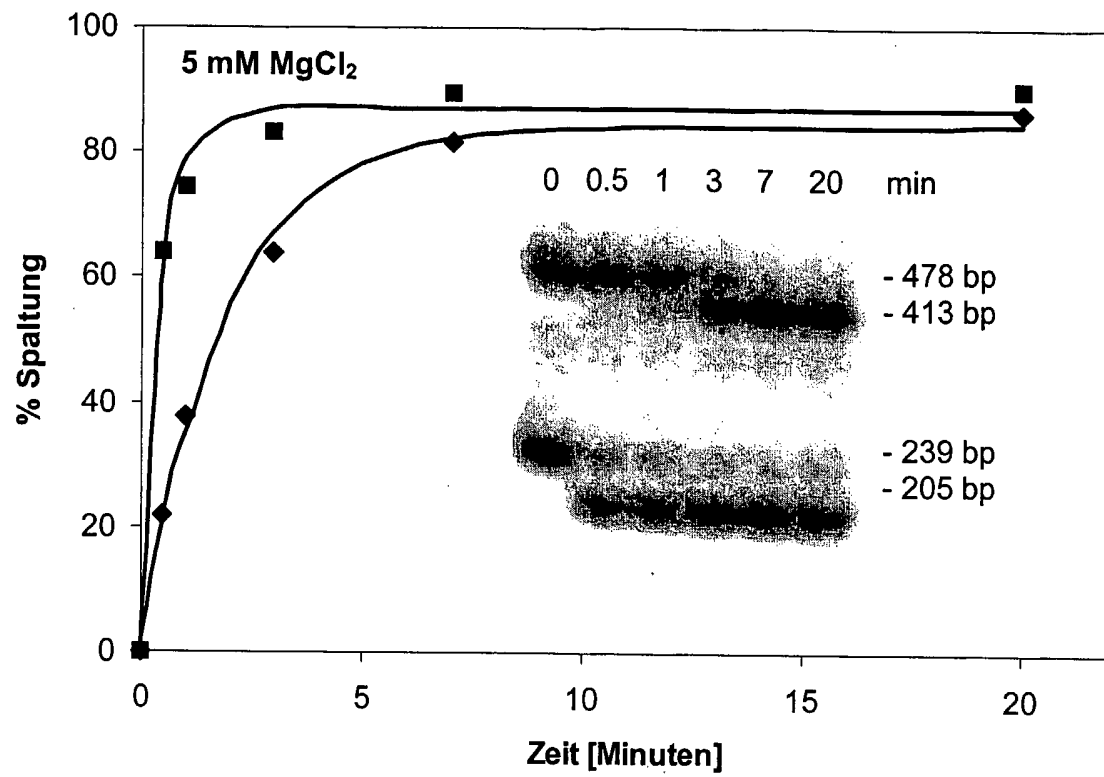


Fig. 5b



5 Fig. 6

