

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

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/02908 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Januar 2000 (20.01.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02185 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. Juli 1999 (13.07.99) (30) Prioritätsdaten: 198 31 043.9 13. Juli 1998 (13.07.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69129 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BOEHM, Thomas [DE/DE]; Freiburger Strasse 30, D-79279 Vorstetten (DE). SCHLAKE, Thomas [DE/DE]; Gartenweg 1, D-79194 Gundelfingen (DE). MEIER, Natalia [DE/DE]; Gluckstrasse 9, D-79104 Freiburg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: INHIBITION OF ALOPECIA (54) Bezeichnung: HEMMUNG VON ALOPEZIE (57) Abstract The invention relates to a method for inhibiting alopecia in which cellular quantities of hair keratins are increased. The invention also relates to a system for identifying substances which inhibit alopecia. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Mengen von Haarkeratinen und ein System zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Substanzen.		

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	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Hemmung von Alopezie

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie und ein System zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Substanzen.

5

Alopezie ist eine weit verbreitete Erkrankung des Haares, bei der vollständiger Haarverlust eintreten kann. Die Ursachen von Alopezie sind nicht bekannt. Insofern ist es auch nicht möglich, gezielt in diese Erkrankung einzugreifen.

10

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde ein Mittel bereitzustellen, mit dem dieses erreicht werden kann.

15

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände der Patentansprüche erreicht.

20

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß bestimmte Formen der Alopezie auf einer gestörten Keratinisierung des Haares beruhen. Ferner hat er erkannt, daß bei Alopezie die mRNA verschiedener Gene, nicht vorhanden, z.B. des Ha3-Gens, oder unterrepräsentiert, z.B. der Ha1-, Ha2- und Ha4-Gene, ist (vgl. Figuren 1 und 2). Die Genprodukte der Ha1-, Ha2-, Ha3- und Ha4-Gene sind Haarkeratine. Der Anmelder hat gefunden, daß die Expression des Ha3-Gens durch ein Genprodukt des whn-Gens reguliert wird. Insbesondere hat er gefunden, daß durch Expression des whn-Gens die Expression des Ha3-Gens induziert werden kann (vgl. Fig. 3). Auch hat er gefunden, daß die Expression anderer Haarkeratin-Gene durch das Genprodukt des whn-Gens wesentlich beeinflusst wird. Der Anmelder hat weiterhin gefunden, daß die Expression des whn-Gens im Verlauf des Haarzyklus schwankt.

25

30

Insbesondere hat er gefunden, daß die whn-Expression in der Telogenphase des Haarzyklus auf nicht mehr detektierbare Spiegel absinkt. Ferner hat er gefunden, daß das whn-Gen von zwei Promotoren transkribiert werden kann. Der Anmelder hat
5 seine Erkenntnisse mit Hilfe von Nacktmäusen und Hela-Zellen gewonnen.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders für ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie genutzt, das die Erhöhung
10 der zellulären Menge von Haarkeratinen umfaßt.

Der Ausdruck "Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen" weist darauf hin, daß in Zellen die Menge von ein oder mehreren Haarkeratinen, insbesondere von Ha1, Ha2, Ha3 und
15 Ha4, die gering oder gar nicht vorhanden sein kann, erhöht wird. Dies kann durch übliche Verfahren bzw. Substanzen erreicht werden. Beispielsweise können den Zellen ein oder mehrere Haarkeratine, insbesondere Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4, als solche oder in Form von sie kodierender DNA zugegeben werden.
20 Die DNA kann in üblichen Expressionsvektoren vorliegen. Auch können Substanzen zugegeben werden, welche die Expression von ein oder mehreren Haarkeratinen, insbesondere von Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4, aktivieren. Solche Substanzen sind z.B. das Genprodukt des whn-Gens oder eine hierfür kodierende DNA.
25 Diese kann in üblichen Expressionsvektoren vorliegen. Ferner können Substanzen zugegeben werden, welche die Expression des whn-Gens aktivieren. Diese können ebenfalls als solche oder in Form von sie kodierender DNA vorliegen, wobei letztere auch in üblichen Expressionsvektoren vorliegen kann. Der Ausdruck
30 "Zellen" umfaßt Zellen jeglicher Art und Abstammung. Ferner umfaßt er Gewebe und Organismen, insbesondere Tiere und den Menschen.

Die Verabreichung von Substanzen, die Alopezie hemmen, kann in
35 üblicher Weise, vorzugsweise lokal erfolgen. Auch können die Substanzen in üblichen Formulierungen vorliegen. Bei lokaler Verabreichung der Substanzen eignen sich z.B. Cremes, Salben, Shampoos und Haarwasser. Auch können die Substanzen in

Partikeln vorliegen, die leicht aufgenommen werden. Beispiele solcher Partikel sind Liposome. Der Fachmann kennt Verfahren, um für die einzelnen Substanzen die geeigneten Formulierungen bzw. Verabreichungsformen zu finden.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein System zur Identifizierung von Substanzen, die sich zur Hemmung von Alopezie eignen. Ein solches System umfaßt die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen und/oder von
10 ihre Genexpression aktivierenden Substanzen. Insbesondere umfaßt das System Tiere oder Zellen, wobei Zellen bevorzugt sind, in denen ein oder mehrere exprimierbare Haarkeratin-Gene und/oder ein oder mehrere exprimierbare Gene, deren Genprodukte die Genexpression von Haarkeratinen aktivieren,
15 jeweils fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen. Die Haarkeratin-Gene können insbesondere jene von Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 sein. Ferner ist es günstig, wenn die die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanz ein Genprodukt des wln-Gens ist. Desweiteren können die
20 vorstehenden Gene eine Wildtyp- oder eine veränderte Sequenz aufweisen, wobei sich letztere von der Wildtyp-Sequenz durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheiden kann. Die Unterschiede können in Form von Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von Basenpaaren vorliegen.
25 Ferner kann ein vorstehendes Reporter-Gen jegliches sein, insbesondere kann es für ein Enzym, z.B. alkalische Phosphatase, oder ein fluoreszierendes Protein, z.B. GFP, kodieren. Desweiteren können die Fusionsgene extrachromosomal vorliegen oder im Zell-Genom, insbesondere anstelle eines oder
30 beider Allele der Haarkeratine und/oder der Gene, deren Genprodukte die Expression von Haarkeratinen aktivieren. Ferner kann das System Stoffe enthalten, die sich zum Nachweis der exprimierten Haarkeratine und/oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen bzw. der Fusionsgene, eignen. Solche
35 Stoffe können sich zum Nachweis auf dem Nukleinsäure- bzw. Protein-Level eignen.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich Alopezie zu

hemmen. Ferner ist es möglich Alopezie zu diagnostizieren, in dem z.B. die Genexpression von Haarkeratinen und/oder von Substanzen bestimmt wird, welche diese aktivieren. Des weiteren ist es möglich Substanzen zu finden, die sich zur Hemmung von Alopezie eignen. Hierfür wird ein System bereitgestellt, das sich zum schnellen und zuverlässigen Screenen von verschiedensten Substanzen eignet. Damit stellt die vorliegende Erfindung Mittel bereit eine weit verbreitete Erkrankung des Haares zu diagnostizieren und zu therapieren.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt eine in situ RNA-Hybridisierung mit einer Sonde für mHa3 in normalen (whn +/+) und mutanten (whn -/-) Mäusen. Die Transkripte für mHa3 (sichtbar als braune Silberkörner) sind in Haarfollikeln der Nacktmaus nicht nachweisbar. Die Linie entspricht 100 μ m.

Fig. 2 zeigt die Expression von whn und Haarkeratinen im Haarfollikel der Maus.

A. Northern Filter-Hybridisierung mit RNA aus Gesamthaut von normalen Mäusen (whn +/+) und Nacktmäusen (whn -/-) mittels Sonden für hpvt- und whn-Gene sowie Ha1-, Ha3-, Ha4-Gene zu drei Zeitpunkten nach der Geburt dP7, 7 Tage nach Geburt etc.).

B. In situ RNA-Hybridisierung in Haut aus normalen (whn +/+) und Nacktmäusen (whn -/-) mit Sonden für Ha1-, Ha3- und Ha4-Gene. Ein Autoradiogramm von Hautschnitten am Tag 7 nach der Geburt ist gezeigt.

Fig. 3 zeigt die Regulation der Keratin-Gen-Expression. Hela-Zellen wurden mit einem whn-Expressions-Konstrukt transient transfiziert (+) und die

Anwesenheit von Ha3-spezifischer mRNA wurde über eine RT-PCR nachgewiesen. Die Molekulargewichtsmarker sind in bp angegeben.

5

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

10

Beispiel 1: Nachweis des Verlustes der Expression des Ha3-Gens in Mäusen mit Alopezie.

15

Es wurde das "Representational Difference Analysis" (RDA)-Verfahren durchgeführt. Dieses Verfahren umfaßt die Isolierung von mRNA aus Hautzellen von (whn +/+)-Mäusen bzw. (whn -/-)-Mäusen (Alopezie aufweisende Mäuse, die keine Expression des whn-Gens aufweisen), die Umschreibung der mRNA in cDNA und die Differenzierung der cDNA, wodurch solche identifiziert wird, die in (whn -/-)-Mäusen unter- bzw. überexprimiert wird.

20

25

A) Sequenz der Oligonukleotidadaptoren

Folgende Oligonukleotidadaptorenpaare wurden für die RDA benötigt:

30

R-Bgl-12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'

R-Bgl-24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'

R-Bgl-12: 5'-GATCTGTTCATG-3'

R-Bgl-24: 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'

35

N-Bgl-12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'

N-Bgl-24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

B) Herstellung von poly A-mRNA aus den miteinander zu vergleichenden Geweben

5 Zunächst wurde RNA aus der Haut von (whn +/-)-
bzw. (whn -/-)-Mäusen nach der "Single-Step
RNA-Extraction"-Methode (Chomczynski and
Sacchi, 1987) gewonnen. Die poly A-mRNA-
Fraktionen aus den beiden RNA-Populationen wur-
den anschließend mit Hilfe von Dynabeads
10 Oligo(dT) nach dem entsprechenden Protokoll der
Firma Dynal isoliert.

C) Synthese doppelsträngiger cDNA

15 Zur Synthese von doppelsträngiger (whn +/-)-
bzw. (whn
-/-)-cDNA wurde das "Ribo Clone cDNA Synthesis
Kit" der Firma Promega verwendet. Jeweils 4 µg
poly A-mRNA wurden eingesetzt, um ungefähr 2 µg
20 cDNA zu erhalten.

D) Differenzanalyse

25 1. Restriktionsverdau der doppelsträngigen
cDNAs

30 a) Ungefähr 2 µg jeder cDNA wurden in einem
100 µl-Reaktionsansatz mit der
Restriktionsendonuklease DpnII 2 h bei
37°C verdaut.

35 b) Die Reaktionslösungen wurden anschließend
zweimal mit einem Phenol/Chloroform-
Gemisch (1:1) und einmal mit 100%igem
Chloroform extrahiert.

c) Die in den wäßrigen Phasen der beiden
Reaktionsansätze enthaltene DNA wurde

jeweils mit 2 μg Glykogen, 50 μl 10 M Ammoniumacetat und 650 μl 100% Ethanol versetzt und 20 min auf Eis gefällt.

5 Nach 14-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 upm wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung der
10 alkoholischen Phase wurde die getrocknete DNA in 20 μl TE-Puffer resuspendiert.

2. Ligation der cDNAs an das R-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

15

a) In einem Reaktionsgefäß wurden vereinigt:
20 μl geschnittene cDNA (gesamter Reaktionsansatz aus Punkt D)1c)

20

8 μg R-Bgl-24

4 μg R-Bgl-12

6 μl 10 x Ligase Puffer

x μl Wasser

57 μl Endvolumen

25

b) Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (Peltier Thermocycler PTC-200, MJ Research) auf 50°C erhitzt, 1 min auf dieser Temperatur gehalten und dann im Laufe einer Stunde wieder auf 10°C
30 abgekühlt (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

30

c) Nach Hinzufügen von 3 μl T4 DNA Ligase (1 U/ μl) wurde das Gemisch über Nacht bei 16°C inkubiert.

35

3. Synthese von "Repräsentationen" der miteinander zu vergleichenden cDNA-

Populationen

- 5 a) Zur Generierung sog. "Repräsentationen" der ligierten cDNAs wurde zunächst das Volumen der Ligationsansätze aus Punkt 2c) durch Zugabe von jeweils 140 μ l Wasser auf 200 μ l ergänzt.

10 Aus dieser verdünnten Lösung wurden dann pro cDNA-Population (whn +/+)- bzw. (whn -/-)-Haut 30 Reaktionen zu jeweils 200 μ l angesetzt.

15 Einem solchen Ansatz wurden der Reihe nach folgende Reaktanden zugegeben:

143 μ l Wasser
20 μ l 10x PCR-Puffer
20 μ l 2 mM dNTPs
10 μ l 25 mM Mg-Chlorid
20 2 μ l R-Bgl-24 (1 μ g/ μ l)
4 μ l verdünnter Ligationsansatz

- 25 b) PCR:
3 min: 72°C
Hinzufügen von 1 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)
20 x: 5 min: 95°C
3 min: 72°C
zuletzt: Abkühlen auf 4°C.

30 c) Zur Aufbereitung der Reaktionslösungen wurden jeweils 4 Reaktionsansätze in einem Gefäß vereinigt.

35 Extraktion: 2 x mit jeweils 700 μ l Phenol/Chloroform (1:1), 1 x mit Chloroform 100%;
Fällung: Zugabe von 75 μ l 3 M Na-

Acetatlösung (pH 5,3) und 800 μ l 2-Propanol zu jedem Reaktionsgefäß, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5 μ g/ μ l resultierte.

4. Restriktionsverdau der "Repräsentationen"

a) Zur Entfernung der R-Bgl-Oligonukleotidadaptoren wurden 300 μ g jeder Repräsentation (whn +/-)-Haut bzw. (whn -/-)-Haut einem Restriktionsverdau unterzogen. Es wurde nach Zugabe der folgenden Reaktanden 4 h bei 37°C inkubiert:

600 μ l cDNA-Repräsentation (0,5 μ g/ μ l)

140 μ l 10 x DpnII-Puffer

100 μ l DpnII (10 U/ μ l)

560 μ l Wasser.

b) Der Restriktionsverdau-Ansatz wurde vor dessen Aufbereitung auf 2 Gefäße aufgeteilt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%;

Fällung: Zugabe von 70 μ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 700 μ l 2-Propanol zu jedem Gefäß, 20 min Eis;

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5 μ g/ μ l

resultierte.

Die so erhaltene, DpnII-verdaute (whn +/+)-Haut-cDNA-Repräsentation stellte die in der subtraktiven Hybridisierung einzusetzende Driver-DNA-Population dar.

5. Synthese der Tester-DNA-Population

a) 20 µg der mit DpnII verdauten (whn -/-)-Haut-cDNA-Repräsentation (= Tester-DNA) wurden in einem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt:

40 µl Tester-DNA (0,5 µg/µl)

50 µl Te-Puffer

10 µl 10 x Loading Buffer

wurden auf ein 1,2% Agarose-TAE-Gel aufgetragen. Es wurde solange Spannung an das Gel gelegt, bis die Bromphenolblau-Komponente des Loading Buffers ungefähr 2 cm weit gewandert war.

b) Anschließend wurden die Repräsentations-DNA enthaltenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des "Agarose Gel DNA Extraction Kits" der Firma Boehringer Mannheim eluiert.

Die DNA-Extrakte wurden vereinigt, so daß insgesamt 60 µl Lösung erhalten wurden. Die Konzentration dieser Lösung wurde durch Elektrophorese von 5 µl in einem 1% Agarose-Gel abgeschätzt.

c) Zuletzt erfolgte eine Ligation der Tester-DNA mit dem J-Oligonukleotid-Paar:

2 µg Tester-DNA-Eluat

6 μ l 10 x Ligase Puffer

4 μ l J-Bgl-24 (2 μ g/ μ l)

4 μ l J-Bgl-12 (1 μ g/ μ l)

x μ l Wasser

5

57 μ l Endvolumen

d) Überführung des Reaktionsansatzes in Thermocycler:

1 min: 50°C

10

Abkühlen auf 10°C in 1 h (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

e) Nach Hinzufügen von 3 μ l T4 DNA Ligase (1 U/ μ l) Inkubation bei 16°C über Nacht.

15

f) Einstellung der Konzentration der Tester-DNA auf ungefähr 10 ng/ μ l durch Zugabe von 120 μ l Wasser.

20

6. Subtraktive Hybridisierung

a) 80 μ l Driver-DNA (40 μ g) aus Schritt 4. und 40 μ l (0,4 μ g) verdünnte, mit J-Oligonukleotiden ligierte Tester-DNA aus Schritt 5. wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 2 x mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform 100% extrahiert.

30

b) Fällung durch Zugabe von 30 μ l 10 M Ammoniumacetat, 380 μ l Ethanol 100%; 10 min -70°C.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

35

Anschließend: 2 x Waschen des Pellets

mit Ethanol 70%, kurze Zentrifugation nach jedem Waschschrift; Trocknen des DNA-Pellets.

5

c) Die Resuspension der DNA erfolgte in 4 μ l EE x3-Puffer (30 mM EPPS, pH 8,0 bei 20°C (Firma Sigma), 3 mM EDTA) - hierbei wurde ungefähr 2 min auf- und abpipettiert, dann 5 min auf 37°C erwärmt, kurz "gevortext" und zuletzt die Lösung durch Zentrifugieren wieder am Gefäßboden vereinigt. Zuletzt wurde die Lösung mit 35 μ l Mineralöl überschichtet.

15

d) Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:
5 min: 98°C,
Abkühlen auf 67°C und sofortige Zugabe von 1 μ l 5 M NaCl zur DNA,
20 h Inkubation bei 67°C.

20

7. Synthese des ersten Differenzprodukts

25

a) Nachdem das Mineralöl möglichst vollständig entfernt worden war, wurde die DNA schrittweise verdünnt:

30

1. Zugabe von 8 μ l TE (+ 5 μ g/ μ l Hefe-RNA),
2. Zugabe von 25 μ l TE - danach gründliches Mischen,
3. Zugabe von 362 μ l TE - Vortex.

35

b) Für jede subtraktive Hybridisierung wurden 4 PCRs angesetzt. Pro Reaktion:
127 μ l Wasser
20 μ l 10 x Puffer

20 μ l 2 mM dNTPs

5 μ l 25 mM Mg-Chlorid

20 μ l verdünnte Hybridisierungslösung (aus Schritt 7a))

5

c) PCR-Programm:

3 min: 72°C

Zugabe von 1 μ l Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)

10

5 min: 72°C

Zugabe von 2 μ l Primer J-Bgl-24 (1 μ g/ μ l)

10 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C

zuletzt: 10 min: 72°C; dann Abkühlen auf Raumtemperatur.

15

d) Die 4 Reaktionsansätze wurden in einem 1,5 ml-Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

20

Nach Zugabe von 2 μ g Glykogen Carrier:

Fällung mit 75 μ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800 μ l 2-Propanol, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

25

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Nach Trocknen der DNA Resuspension in 40 μ l Wasser.

e) 20 μ l der resuspendierten DNA aus d) wurden einem "Mung Bean Nuclease-Verdau" (=MBN) unterzogen:

30

20 μ l DNA

4 μ l 10 x Mung Bean Nuclease Buffer (Fa. NEB)

35

14 μ l Wasser

2 μ l Mung Bean Nuclease (10 U/ μ l; Fa. NEB)

14

35 min, 30°C.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 160 μ l
50 mM Tris-HCl (pH 8,9) und 5-minütige
Inkubation bei 98°C abgebrochen. Anschlie-
ßend wurde das Gefäß bis zum nächsten
Schritt auf Eis gesetzt.

f) Während der MBN-Inkubation wurden 4
weitere PCRs angesetzt (auf Eis):

127 μ l Wasser20 μ l 2 mM dNTPs10 μ l 25 mM Mg-Chlorid2 μ l J-Bgl-24 (1 μ g/ μ l)20 μ l MBN-verdaute DNA.

g) PCR-Programm:

1 min: 95°C

Abkühlenlassen auf 80°C, Zugabe von 1 μ l
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l),

18 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C,

zuletzt: 10 min: 72°C; Abkühlenlassen auf
4°C.

h) Die 4 PCR-Ansätze wurden in einem Gefäß
vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform
(1:1), 1 x Chloroform
100%.

Fällung: 75 μ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3),
800 μ l 2-Propanol, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Resuspension der DNA in 100 μ l Wasser
(resultierende Konzentration: 0,5 μ g/ μ l);

die auf diese Weise erhaltene Lösung stellte das erste Differenzprodukt dar.

8. Austausch der Oligonukleotidadaptoren des Differenzprodukts

a) Entfernung der Oligonukleotidadaptoren durch Restriktionsverdau mit DpnII:

40 μ l Differenzprodukt 1 (0,5 μ g/ μ l)

30 μ l 10 x DpnII Puffer

15 μ l DpnII (10 U/ μ l)

215 μ l Wasser

2 h 37°C.

b) Aufarbeitung des Reaktionsansatzes:

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 33 μ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800 μ l Ethanol 100%, 20 min - 20°C.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des Pellets in Ethanol 70% und Resuspension in 40 μ l Wasser.

c) Ligation des Differenzprodukts an N-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

1 μ l der aufgearbeiteten DNA-Lösung aus Schritt b) wurde mit 9 μ l Wasser zu einer Konzentration von 50 ng/ μ l verdünnt; 4 μ l dieser Lösung wurden in folgender Reaktion eingesetzt:

4 μ l DpnII verdautes Differenzprodukt 1 (200 ng)

6 μ l 10 x Ligase Puffer

2,5 μ l N-Bgl-24 (3,5 μ g/ μ l)

2 μ l N-Bgl-12 (2 μ g/ μ l)

42,5 μ l Wasser.

- d) Nach Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:

5

1 min: 50°C,

Abkühlenlassen innerhalb einer Stunde auf 10°C (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

- e) Nach Hinzugeben von 3 μ l T4 DNA Ligase (1 μ /μl), Inkubation bei 16°C über Nacht.

10

9. Synthese des 2. Differenzprodukts

15

Der Ligationsansatz aus Schritt 8e) wurde durch Zugabe von 100 μ l Wasser auf eine Konzentration von 1,25 ng/ μ l verdünnt. 40 μ l dieser Verdünnung (50 ng) wurden mit 80 μ l Driver-DNA (siehe Punkt 4.) gemischt und erneut gemäß den Schritten 6. bis 8. behandelt. Beim Wechsel der Oligonukleotidadaptoren (Schritt 8.) wurden dieses Mal die J-Bgl-Oligonukleotide an das neu entstandene Differenzprodukt 2 ligiert.

20

25

10. Synthese des 3. Differenzprodukts

30

Die Konzentration des mit den J-Bgl-Oligos ligierten Differenzprodukts 2 wurde auf eine Konzentration von 1 ng/ μ l reduziert. 10 μ l dieser Lösung wurden wiederum mit 990 μ l Wasser (+ 30 μ g Hefe-RNA) verdünnt, so daß die Konzentration nunmehr 10 pg/ μ l betrug. Die subtraktive Hybridisierung wurde mit 100 pg (10 μ l) J-ligiertem Differenzprodukt 2 und 40 μ g (80 μ l) Driver-DNA aus Schritt 4.) durchgeführt.

35

Ansonsten wurde wie beim 1. und 2. Differenzprodukt nach den Schritten 6. bis 8. vorgegangen. Eine Ausnahme bildete die PCR nach der MBN-Reaktion (Punkt 7.g) - hier wurden nur 18 statt 22 Cyclen durchgeführt.

11. Klonierung des 3. Differenzprodukts

Das 3. Differenzprodukt wurde zunächst einem Restriktionsverdau mit DpnII unterzogen, wodurch die Oligonukleotidaptoren entfernt wurden. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend auf ein TAE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die getrennten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und in einen mit BamHI geschnittenen Vektor (pBS Not) kloniert.

12. Charakterisierung der Differenzprodukte

Um zu bestätigen, daß es sich bei den klonierten DNA-Fragmenten nicht um Methodenartefakte handelte, sondern um Sequenzen, die tatsächlich in den untersuchten DNA-Repräsentationen enthalten waren, wurden Southern Analysen durchgeführt, bei denen die untersuchten cDNA-Repräsentationen mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert wurden.

Anschließend wurden diejenigen DNA-Fragmente, die sich in der Southern Analyse als "echte" Differenzprodukte erwiesen hatten, mittels Northern Hybridisierungen untersucht: es wurden RNAs aus

den untersuchten Geweben (whn +/+)-Haut-cDNA und (whn -/-)-Haut-cDNA) geblottet und mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert. Hierdurch wurde die differentielle Expression dieser Sequenzen in den untersuchten Geweben bestätigt. Eine Analyse der Sequenzen ergab, daß in nu/nu-Mäusen (Alopezie aufweisende Mäuse) das Ha3-Gen nicht exprimiert wird (vgl. Fig. 1).

Beispiel 2: Expression von Haarkeratin- und whn-Genen in normalen und Alopezie aufweisenden Mäusen.

Aus der Haut von unterschiedlich alten normalen (whn +/+) und nackten (whn -/-) Mäusen wurde RNA isoliert, in Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit genspezifischen Sonden hybridisiert.

Die verwendeten Sonden waren wie folgt:

mHa1: Nukleotide 1331 - 1551; Genbank "Accession"-Nr. M27734

mHa3: Nukleotide 1007 - 1204; Genbank "Accession"-Nr. X75650

mHa4: Nukleotide 1303 - 1542, vgl. Bertolino, A.P. et al., J. Invest. Dermatol. 94, (1990) 297 - 303

whn: Nukleotide 1141 - 1374; Genbank "Accession"-Nr. X81593

Es zeigte sich, daß Haarkeratin- und whn-Gene in Alopezie aufweisenden Mäusen nicht bzw. nur schwach exprimiert werden.

Beispiel 3: Nachweis der Expressions-Induktion des Ha3-Gens durch das Genprodukt des whn-Gens.

Ein am N-terminalen Epitop "getaggt" whn-Gen wurde in den Expressionsvektor pTRE (Clontech) inseriert. Das erhaltene DNA-Konstrukt wurde für eine transiente Transfektion der Hela Tet-On Zell-Linie (Clontech) mittels des Calciumphosphat-Copräzipitations-Verfahrens verwendet. Die Zellen wurden unmittelbar danach mit 5 µg/ml Docyclin behandelt. 24 h später wurde 1 mM Natriumbutyat zugegeben. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und einem RT-PCR-Verfahren unterzogen. Die im PCR-Verfahren verwendeten Primer waren wie folgt:

hHa3:

5'-CTGATCACCAACGTGGAGTC-3',

5'-TACCCAAAGGTGTTGCAAGG-3'.

Das PCR-Verfahren umfaßte 35-40 Zyklen mit jeweils 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 58°C und 1 min bei 72°C.

Es zeigte sich, daß durch die Expression des whn-Gens eine Expression des Ha3-Gens induziert wurde. Parallele Kontrollen, in denen keine Transfektion mit dem whn-Gen erfolgte, führten zu keiner Induktion der Ha3-Gen-Expression.

Beispiel 4: Herstellung eines erfindungsgemäßen Systems

Aus einer BAC-Bibliothek der Firma Genome Systems (St. Louis, Missouri, USA;) wurde ein mit BAC-whn bezeichneter BAC-Klon isoliert, der das gesamte whn-Gen der Maus umfaßt (vgl. Schorpp, M. et al., Immunogenetics 46, (1997), 509-515).

Ferner wurde ein mit pMB096-whn-GFP bezeichneter Shuttle-Vektor verwendet, der das whn-Gen der Maus enthielt, wobei bei diesem in Exon3 das Reporter-Gen GFP vorlag (vgl. Nehls, M. et al., Science 272, (1996), 886-889).

BAC-whn wurde zur Transformation des recA⁺ E.coli-Stammes CBTS verwendet. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation. Klone wurden isoliert und mit pMB096-whn-GFP mittels Elektroporation transformiert. Es erfolgte eine homologe Rekombination zwischen dem BAC-Klon und dem Shuttle-Vektor im Bereich des whn-Gens, wodurch ein mit BAC-whn-GFP bezeichneter Vektor erhalten wurde. Dieser wies im whn-Gen das Reporter-Gen GFP auf.

BAC-whn-GFP wurde zur Transfektion von COS-Zellen verwendet. Die Transfektion erfolgte mittels des Calciumphosphat-Coprecipitations-Verfahrens. Es wurden COS-Zellen erhalten, die für ein Fusionsgen aus whn und GFP kodierten.

Es zeigte sich, daß diese Zellen geeignet waren, Substanzen zu identifizieren, welche die Genexpression von whn induzieren konnten. Solche Substanzen eigneten sich zur Hemmung von Alopezie.

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei den Zellen Haarkeratine zugegeben werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Haarkeratine in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.

15

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, wobei den Zellen die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen zugegeben werden.

20

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Substanzen in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, wobei die Haarkeratine Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.

25

7. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Substanzen das Genprodukt des whn-Gens und/oder die Expression des whn-Gens aktivierende Substanzen umfassen.

30

8. System zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Stoffen, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen und/oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen.

35

9. System nach Anspruch 8, wobei das System Zellen umfaßt, in denen ein oder mehrere exprimierende Haarkeratin-Gene fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.

10. System nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Haarkeratine,

Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.

- 5 11. System nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei das System Zellen umfaßt, in denen ein oder mehrere exprimierbare die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.
- 10 12. System nach einem der Ansprüch 8 - 11, wobei die Substanzen ein Genprodukt des whn-Gens umfassen.
13. System nach einem der Ansprüche 9 - 12, wobei das Reporter-Gen für ein Enzym kodiert.
- 15 14. System nach einem der Ansprüche 9-12, wobei das Reporter-Gen für ein fluoreszierendes Protein kodiert.
- 20 15. System nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene extrachromosomal vorliegen.
16. System nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene im Zell-Genom integriert sind.
- 25 17. System nach einem der Ansprüche 9-16, wobei ferner Stoffe zum Nachweis der exprimierten Haarkeratine und/oder von ihre Genexpression aktivierende Substanzen bzw. der Fusionsgene vorliegen.

1/3

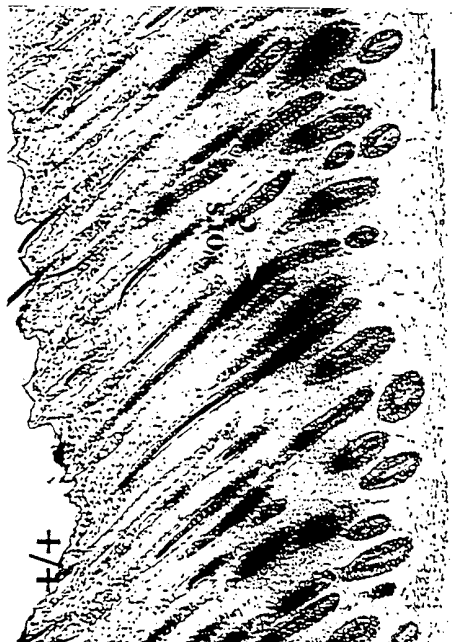


Fig. 1

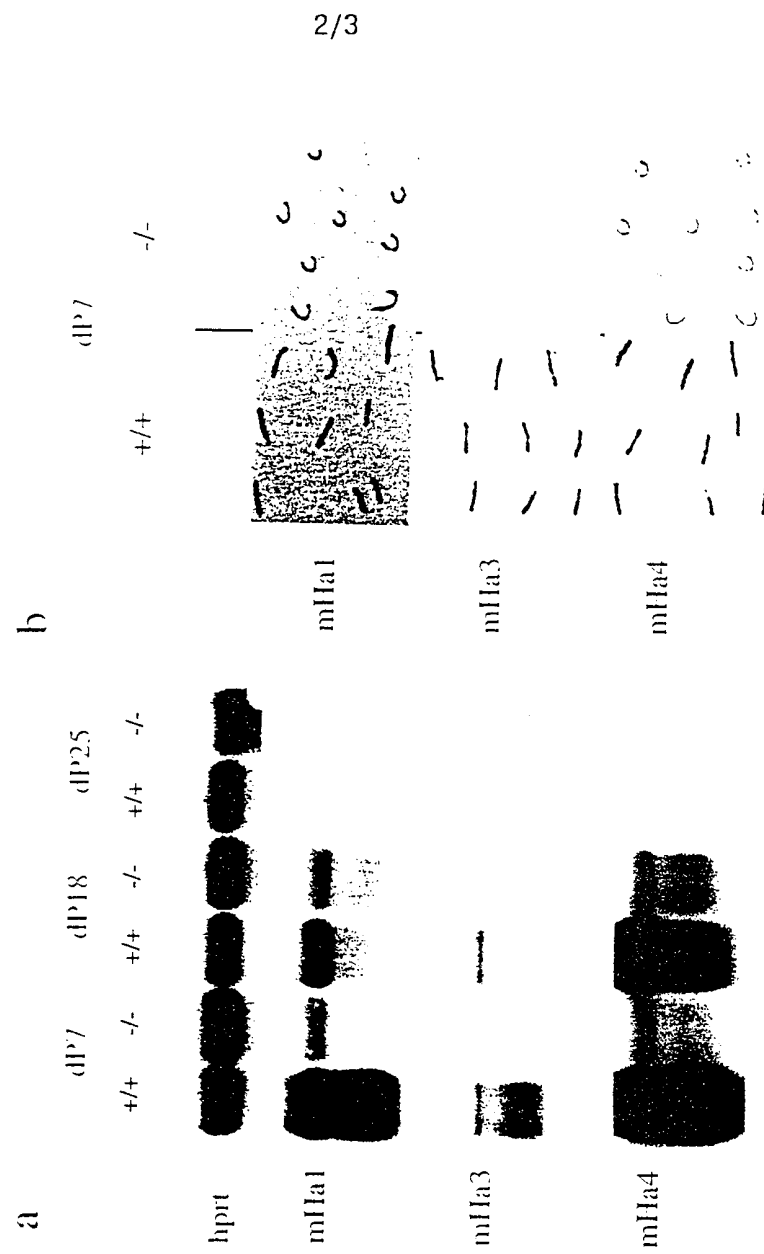


Fig. 2

3/3



Fig. 3