



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2007 040 718 B3** 2008.08.07

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 040 718.3**
 (22) Anmeldetag: **29.08.2007**
 (43) Offenlegungstag: –
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **07.08.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, 23562 Lübeck, DE

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 24105 Kiel

(72) Erfinder:
Jahn, Nancy, 23552 Lübeck, DE;
Kretschmer-Kazemi Far, Rosel, Dr., 23552 Lübeck, DE;
Sczakiel, Georg, Prof. Dr., 23627 Groß Grönau, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
LEHNERTZ, B. u.a.: Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. Current Biology (2003) 13 (14) 1192-1200;
Supplemental Data zu Dokument (1), erhältlich unter
<http://download.current-biology.com/supplementarydata/curbio/13/14/1192/DC1/Lehnertz.pdf>
(recherchiert am 06.03.2008);

(54) Bezeichnung: **Oligonukleotide zur Hemmung und Detektion von "mouse major satellite"-Sequenzen**

(57) Zusammenfassung: Verwendung eines Oligonukleotids mit der unter SEQ ID:NO 1, SEQ ID:NO 2 oder SEQ ID:NO 3 dargestellten Sequenz zur Reduktion der "mouse major satellite"-Transkriptmenge.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Oligonukleotide und deren Verwendung zur Hemmung von „major satellite repeat“-Transkripten.

[0002] Das die Zentromere aller Chromosomen der Maus (mit Ausnahme des Y-Chromosoms) umgebende (perizentromere) Heterochromatin ist in langen Folgen von repetitiven DNA-Sequenzen („major satellite repeats“) organisiert, die jeweils 234 Basenpaare (bp) umfassen und dabei insgesamt rund 3% des Maus-Genoms ausmachen. Obwohl diese Region eine hochgradig kompakte Struktur aufweist, ist sie transkriptionell aktiv. Die hierbei entstehenden RNA-Transkripte scheinen an der Aufrechterhaltung der perizentromeren Integrität beteiligt zu sein. Diese Situation ist in höheren Säugern und beim Menschen vergleichbar. Inwieweit die biologische Funktion von „major satellite repeat“-Transkripten bei fehlgesteuerten zellulären Prozessen, die mit Erkrankungen des Menschen begleitend oder kausal verknüpft sind, korreliert ist, kann gegenwärtig nicht beantwortet werden. Das Wissen über die biologische Bedeutung der „major satellite repeat“-Transkripte ist derzeit noch völlig unzureichend, wenngleich bekannt ist, dass Methylierung dieser DNA-Abschnitte einen Einfluss auf die Transkriptionsrate hat (Lehnertz, B. u. a.: Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Current Biology* (2003 13 (14) 1192–1200 und Supplemental Data zu dieser Veröffentlichung, abrufbar unter <http://download.current-biology.com/supplementarydata/current-bio/13/14/1192/DC1/Lehnertz.pdf> [recherchiert am 06.03.2008]). Aus der zuvor zitierten Veröffentlichung ist auch ein Verfahren zur Klonierung von mouse major und mouse minor satellites bekannt.

[0003] Eine in der Molekularbiologie weit verbreitete Methode, die biologische Funktion eines bestimmten Gens zu untersuchen, besteht in dessen gezielter Ausschaltung unter Beobachtung des sich hieraus ergebenden Phänotyps. Neben der Verwendung von kurzer doppelsträngiger „small interfering“ (si)RNA hat sich hierbei in der Vergangenheit der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden als besonders wirkungsvoll erwiesen. Hierbei handelt es sich um einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle, die sequenzspezifisch gegen die RNA-Transkripte der jeweiligen Gene gerichtet sind, mit diesen interagieren und dabei z. B. deren Translation in Proteine sterisch inhibieren („steric block“) oder zu einem beschleunigten Abbau der Transkripte führen.

[0004] Bis heute sind entsprechende Untersuchungen zur biologischen Funktion der „major satellite repeat“-Transkripte in geeigneten Versuchsmodellen, z. B. in der Maus, mangels geeigneter „molekularer Werkzeuge“ für deren Hemmung nicht möglich. Auch

die erwartungsvolle Entwicklung von siRNA lieferte bis heute keine wirksamen Konstrukte gegen „major satellite repeat“-Transkripte.

[0005] Aufgabe der Erfindung ist es daher, spezifische Inhibitoren für „major satellite repeat“-Transkripte bereitzustellen.

[0006] Die Aufgabe wird gemäß Anspruch 1 gelöst. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung an.

[0007] Der Erfindung liegt die Entwicklung und Erprobung hochwirksamer inhibitorisch aktiver Oligonukleotide gegen „major satellite repeat“-Transkripte der Maus (sog. „mouse major satellite“-Transkripte) zu Grunde. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind in Teilbereichen gegen offene Sekundärstrukturen der „mouse major satellite“-Transkripte gerichtet, die in dem in [Fig. 1](#) als I bezeichneten Repeat-Abschnitt lokalisiert sind. Bei der unter der SEQ ID:NO 1 dargestellten Sequenz handelt es sich um ein Oligonukleotid, das gegen das „sense“-Transkript des „mouse major satellites“ gerichtet ist (dies würde bei gewöhnlichen, für Proteine codierenden Genen der Sequenz der mRNA entsprechen). Das gleiche gilt für das unter der SEQ ID:NO 2 angegebene Oligonukleotid. Dieses ist jedoch gegen eine Sequenz des „mouse major satellite“ gerichtet, die etwas weiter Zentromerwärts liegt und sich nur in fünf Nucleotiden mit dem unter der SEQ ID:NO 1 dargestellten Oligonukleotid überschneidet. Das unter der SEQ ID:NO 3 angegebene Oligonukleotid entspricht in seiner Zielregion der des unter der SEQ ID:NO 1 aufgeführten Oligonukleotids, ist jedoch im Gegensatz hierzu gegen das „antisense“-Transkript des „mouse major satellite“ gerichtet.

[0008] Nach einem Hitzeschock wird in Mäusezellen fast ausschließlich das „sense“ Transkript des „mouse major satellite“ Bereiches hergestellt (wie in [Fig. 4](#) dargestellt). Diese Erhöhung kann durch Transfektion mit dem Oligonukleotid gemäß SEQ ID:NO 1 auf 10% gehemmt werden, im Vergleich zu mit Kontrolloligonukleotid transfizierten Zellen. Mit dem Oligonukleotid gemäß SEQ ID:NO 3 transfizierten Zellen weisen einen Rückgang der Transkriptmenge um knapp 20% auf (wie in [Fig. 5](#) dargestellt).

[0009] Wie aus [Fig. 2](#) hervorgeht, weisen sowohl das gegen die Zielregion T1 des „sense“-Transkriptes als auch das gegen die Zielregion T2 gerichtete Oligonukleotid eine deutliche Dosis-abhängige Hemmung des „mouse major satellite“-Transkriptes auf. Dabei hat sich das gegen die Zielregion T1 gerichtete Oligonukleotid bei niedrigeren Konzentrationen als geringfügig effektiver erwiesen.

[0010] Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide bestehen bevorzugt aus einzelsträngiger DNA. Diese

einzelsträngigen DNA-Moleküle können entweder unmodifiziert oder bevorzugt chemisch modifiziert eingesetzt werden. Bezüglich der verwendeten „Chemie“ der Oligonukleotide kommen zum Beispiel (i) jede Form von „Gapmer-Chemie“, (ii) LNA, (iii) PNA, (iv) 2'-alkyl-Derivate, (v) 2'-fluoro-Derivate, etc. in Frage. Besonders bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um Phosphorothioat-modifizierte DNA. Durch die Phosphorothioat-Modifikation wird die Stabilität der Oligonukleotide erhöht und deren zelluläre Aufnahme erleichtert. Das Phosphatrückgrad der Oligonukleotide kann dabei nur an einer Stelle, bevorzugt jedoch an mehreren, besonders bevorzugt vollständig Phosphorothioat-modifiziert sein.

[0011] Neben ihrem bevorzugten Einsatz als effektive Inhibitoren von „mouse major satellite“-Transkripten können die erfindungsgemäßen Oligonukleotide darüber hinaus auch zu deren Detektion, z. B. über einen Northern-Blot, eingesetzt werden, bzw. zur Markierung von genomischen „mouse major satellite“-Sequenzen, z. B. über einen Southern-Blot, dienen.

[0012] Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide stellen somit molekulare Werkzeuge dar, die einzeln oder als Teil von Kits vermarktet werden können.

[0013] Die Erfindung wird anhand von Zeichnungen näher erläutert. Dabei zeigen:

[0014] [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung der Struktur von „mouse major satellites“, der erfindungsgemäßen Oligonukleotide sowie der Zielsequenzen des „mouse major satellite“-Transkriptes gegen die diese gerichtet sind;

[0015] [Fig. 2](#) die konzentrationsabhängige Hemmung von „mouse major satellite“-Transkripten durch Transfektion von NIH3T3-Zellen mit gegen die Zielsequenzen T1 bzw. T2 von „sense“-Transkripten gerichteten Oligonukleotiden;

[0016] [Fig. 3](#) die zeitabhängige Hemmung von „mouse major satellite“-Transkripten durch gegen die Zielsequenz T1 in „sense“- und „antisense“-Transkripten gerichtete Oligonukleotide;

[0017] [Fig. 4](#) die Hitzeschock-vermittelte Induktion von „sense“-„mouse major satellite“-Transkripten; und

[0018] [Fig. 5](#) die Blockierung der Hitzeschock-vermittelte Induktion von „sense“-„mouse major satellite“-Transkripten durch gegen diese bzw. durch gegen „antisense“-Transkripte gerichtete Oligonukleotide.

[0019] Wie aus [Fig. 1](#) zu ersehen ist, bestehen „mouse major satellites“ aus einer Vielzahl sich wiederholender DNA-Sequenzen (Repeats) von jeweils

234 bp Länge. Diese sind chromosomal zwischen den codierenden Bereichen und dem Zentromer lokalisiert. Die einzelnen Repeats werden wiederum in 4 Bereiche unterteilt (in der Abbildung als römische Ziffern I bis IV dargestellt). In dem Repeat-Bereich I existieren zwei Sequenzabschnitte, die in den entsprechenden Transkripten offene RNA-Sekundärstrukturen ausbilden. Diese offenen Sequenzabschnitte sind in den entsprechenden „sense“- bzw. „antisense“-RNA-Sequenzen jeweils unterstrichen dargestellt. Als Zielregionen wurden daher Transkriptsequenzen ausgewählt, die zumindest in Teilbereichen mit diesen offenen RNA-Sekundärstrukturen übereinstimmen und hier als T1 und als T2 bezeichnet und in der Abbildung als dunkelgrauer bzw. hellgrauer Balken dargestellt sind. Die Oligonukleotide 3'-TACCGCTCTTTTGACTTTTA-5' (entspricht SEQ ID:NO 1) und 3'-TTTTAGTGCCTTTTACTCTT-5' (entspricht SEQ ID:NO 2) sind dabei komplementär zu ihren jeweiligen Zielregionen T1 bzw. T2 auf dem „sense“-Transkript, das Oligonukleotid 5'-ATGGC-GAGAAAAGTAAAAT-3' (entspricht SEQ ID:NO 3) hingegen ist komplementär zu der Zielsequenz T1 auf dem „antisense“-Transkript.

[0020] In [Fig. 2](#) ist gezeigt, dass in NIH3T3-Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von gegen die „sense“-Zielsequenzen T1 bzw. T2 gerichteten Oligonukleotiden (siehe SEQ ID:NO 1 bzw. SEQ ID:NO 2, hier nur als T1 bzw. T2 bezeichnet) transfiziert wurden, ein deutlicher konzentrationsabhängiger Rückgang der Menge an „mouse major satellite“-Transkript nachweisbar ist. So reduziert eine Oligonukleotidkonzentration von 200 nmol/l die Menge an „mouse major satellite“-Transkript um 60% (T1) bzw. 50% (T2), die Erhöhung der Konzentration auf 500 nmol/l bewirkte für beide Oligonukleotide eine Transkript-Hemmung um 75% (bezogen auf das Kontroll-Oligonukleotid 5'-ATCAGATGCGTGCCCTAGTG-3'). Die Transfektion der Zellen erfolgte wie in den Ausführungsbeispielen angegeben. Die Bestimmung der jeweiligen Transkriptmengen erfolgte 40 Stunden nach Transfektion über quantitative RT-PCR, wie in den Ausführungsbeispielen beschrieben.

[0021] [Fig. 3](#) beschreibt den zeitlichen Verlauf der Hemmung von „mouse major satellite“-Transkripten in NIH3T3-Zellen, die mit gegen die Zielsequenz T1 gerichteten Oligonukleotiden (200 nmol/l) transfiziert worden sind. Dabei handelt es sich zum einen um das gegen das „sense“-Transkript gerichtete Oligonukleotid gemäß der SEQ ID:NO 1 (hier als T1-antisense bezeichnet) und zum anderen um das gegen das „antisense“-Transkript gerichtete Oligonukleotid gemäß der SEQ ID:NO 3 (hier entsprechend als T1-sense bezeichnet). Während die „mouse major satellite“-Transkriptmenge in mit dem Oligonukleotid T1-sense transfizierten Zellen zunächst ansteigt und dann allmählich auf ca. 60% der Transkriptmenge in

den Kontrollzellen sinkt, ist für Zellen, die mit dem Oligonukleotid T1-antisense transfiziert wurden, innerhalb von 24 Stunden eine starke Hemmung der „mouse major satellite“-Transkriptmenge um ca. 90% zu verzeichnen. In der Folgezeit schwächt sich der inhibierende Effekt wieder etwas ab: 72 Stunden nach Transfektion liegt die „mouse major satellite“-Transkriptmenge bei ca. 30% (bezogen auf das Kontroll-Oligonukleotid 5'-ATCAGATGCGTGG-CCTAGTG-3'). Die Bestimmung der jeweiligen Transkriptmengen erfolgte über quantitative RT-PCR, wie in den Ausführungsbeispielen beschrieben.

[0022] Wie in **Fig. 4** dargestellt ist, reagieren NIH3T3-Zellen auf einen Hitzeschock (siehe Ausführungsbeispiele) innerhalb kurzer Zeit mit einer verstärkten Expression der perizentromeren „mouse major satellite“ Sequenzen. So konnte über quantitative RT-PCR z. B. innerhalb von 2 Stunden nach einem Hitzeschock ein Anstieg der entsprechenden Transkriptmenge auf mehr als das Fünffache nachgewiesen werden (**Fig. 4a**). Wie aus dem in **Fig. 4b** dargestellten Northern-Blot ersichtlich ist, ist dieser Anstieg fast ausschließlich strangspezifisch auf die verstärkte Bildung von „sense“-Transkripten zurückzuführen. Als Kontrolle dienten hierbei Zellen, die weiter bei 37°C inkubiert und somit keinem Hitzeschock ausgesetzt worden sind.

[0023] Zellen hingegen, die 24 Stunden vor dem Hitzeschock mit dem Oligonukleotid T1-antisense (200 nmol/l) transfiziert worden sind, zeigten keinen Anstieg der „mouse major satellite“-Transkriptmenge, wie aus **Fig. 5** ersichtlich ist. Der Einsatz von gegen das „antisense“-Transkript gerichteten Oligonukleotiden (T1-sense) zeigte hierbei keinen signifikanten inhibitorischen Effekt, wie sowohl die quantitativen RT-PCR-Daten in **Fig. 5a**, als auch die strangspezifische Northern-Blot-Analyse in **Fig. 5b** zeigen.

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL

1) Herstellung der Oligonukleotide:

[0024] Die verwendeten Oligonukleotide wurden bezogen von der Firma biomers.net GmbH Sedanstr. 14; D-89077 Ulm; Deutschland.

2) Transfektion von Zellen mit Oligos:

[0025] Die Maus-Zelllinie NIH3T3 (DSMZ no.: ACC 59) wurde in DMEM⁺ GlutaMAXTM-I (GIBCO Invitrogen Cell Culture, Invitrogen LTD; 3 Fountain Drive; Inchinnan Buismess Park Paisley PA4 9RF; UK) + 10% FKS (PAA Laboratories GmbH; Haidmannweg 9; A-4061 Pasching; Austria) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Der Hitzeschock wurde für eine Stunde bei 42°C und 5% CO₂ induziert. Die Transfektion erfolgte mittels LipofectamineTM 2000 (Invitrogen LID; 3 Fountain Drive; Inchinnan Buismess Park Paisley PA4

9RF; UK) und den angegebenen Konzentrationen an Oligonukleotiden nach dem Protokoll des Herstellers.

3) RT-qPCR:

[0026] Die Isolierung von RNA erfolgte mittels RNeasy[®] mini Kit (Quiagen, QIAGEN GmbH; QIAGEN Strasse 1; 40724 Hilden; Deutschland) und abgeschlossener DNase Verdauung (TURBO DNaseTM Ambion, An Applied Biosystems Business; 2130 Woodward St.; Austin, TX 78744-1832; USA). Isolierte RNA wurde unter Verwendung von SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen LID; 3 Fountain Drive; Inchinnan Buismess Park Paisley PA4 9RF; UK) in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer-PCR (qPCR Core kit for SYBR[®] Green I, Eurogentec, Eurogentec Deutschland GmbH; Cäcilienstrasse 46; 50667 Köln; Deutschland) analysiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer für „mouse major satellite“ waren: forward: 5'-GACGACTTG-AAAAATGACGAAATC-3'; reverse: 5'-CATATTC-CAGGTCCTTCAGTGTGC-3' [1]. Das Primerpaar für β -Aktin war: forward: 5'-ATGGAATCCTGTGGCATC-CAT-3'; reverse: 5'-TTCTGCATCCTGTTCAG-CAATG-3'

4) Northern-Blot:

[0027] Die gelelektrophoretisch getrennte und auf eine Nylon-Membran übertragene RNA wurde mit radioaktiv markierten Primern spezifisch für „mouse major satellite“ Transkripte [1] und 7SK RNA [2] nach Standardprotokoll von Sambrook & Russel [3] hybridisiert.

Literatur:

[1]: Lehnertz et al., Current Biology 13, 1192–2000, 2003

[2]: Robb et al., Nature Structural & Molecular Biology 12(2), 1–5, 2005

[3]: Sambrook & Russel, Molecular cloning, a laboratory manual. 3. Auflage (1), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Oligonukleotids mit der unter SEQ ID:NO 1, SEQ ID:NO 2 oder SEQ ID:NO 3 dargestellten Sequenz zur Reduktion der „mouse major satellite“-Transkriptmenge.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch ge-

kennzeichnet, dass das Oligonukleotid Phosphorothioat-modifiziert ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

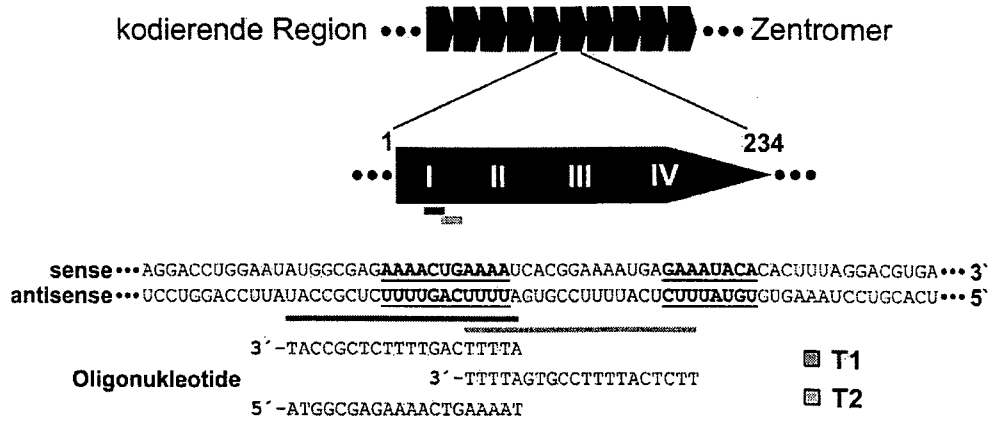


Fig. 1

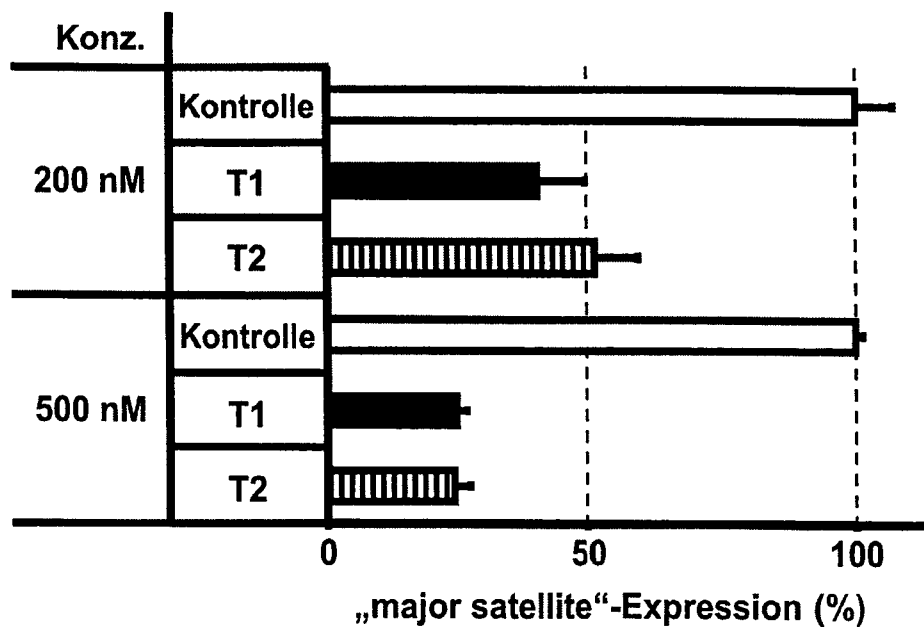


FIG. 2

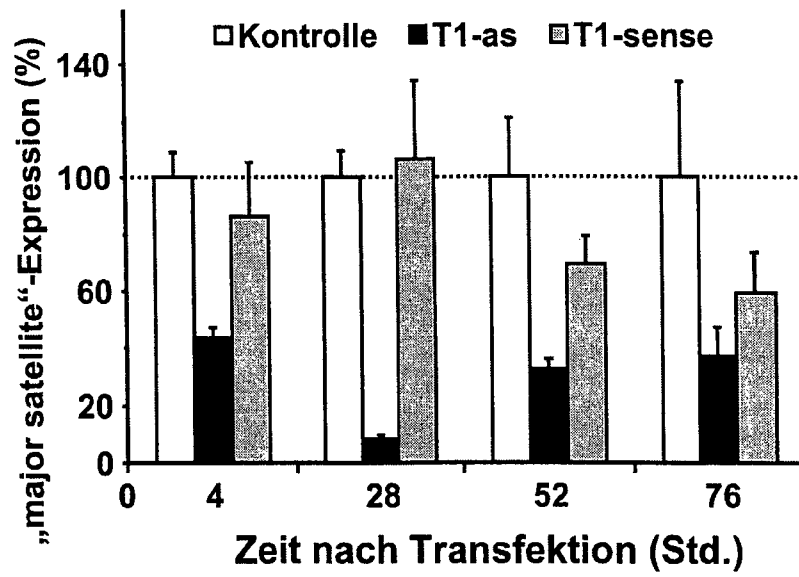


FIG. 3

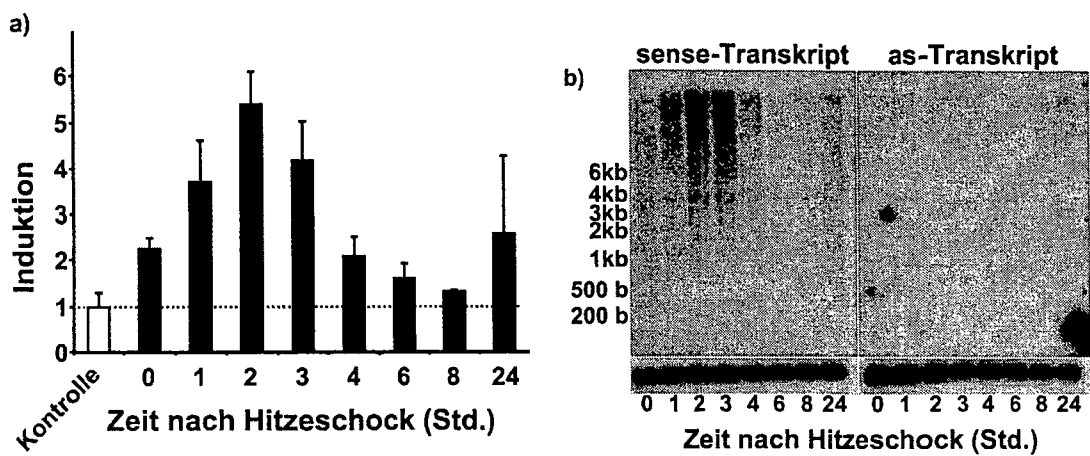


FIG. 4

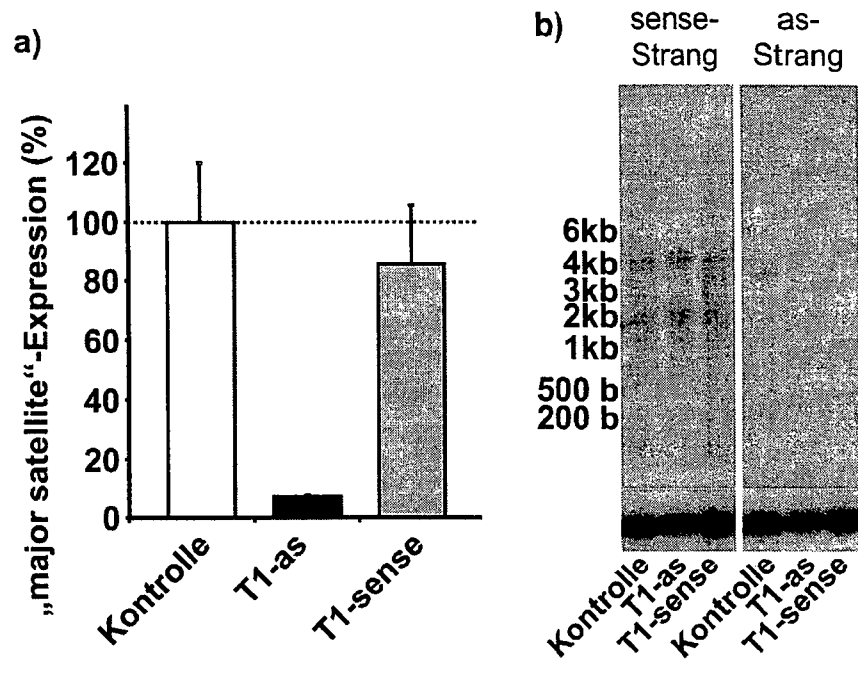


FIG. 5