

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig

**Hemmung der ICAM-1-Genexpression durch
Triplehelix-Oligonukleotide**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Robert Besch
aus
München
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Degitz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. P. B. Becker
Mitberichterstatter:	Priv.-Doz. G. Hartmann
	Prof. Dr. Th. Brocker
Betreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. C. Marschall
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	28.7.2003

**Hemmung der
ICAM-1-Genexpression durch
Triplehelix-Oligonukleotide**

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikation:

Besch, R., Giovannangeli, C., Kammerbauer, C., Degitz, K.

Specific inhibition of ICAM-1 expression mediated by gene targeting with triplex-forming oligonucleotides

J. Biol. Chem. 2002; 277: 32473-32479

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG

1. Entdeckung von Triplehelixstrukturen	1
2. Genhemmung mit Oligonukleotiden	2
2.1 Genhemmung mit Triplehelix-Oligonukleotiden	2
2.2 Genhemmung mit Antisense-Oligonukleotiden	3
3. Struktur der Triplehelix	4
4. Zielsequenzen für Triplehelix-Oligonukleotide	5
5. Triplehelix-Oligonukleotide	6
5.1 Grundsätzliche Aspekte beim Design von Triplehelix-Oligonukleotiden	6
5.1.1 Orientierung der Basentriplets	6
5.1.2 Bindungswinkel und -längen von Basentriplets	7
5.1.3 Eigenschaften und Stabilität einzelner Basentriplets	8
5.2 Triplehelix-Oligonukleotide	8
5.2.1 Triplehelix-Oligonukleotide vom Pyrimidin-Typ	9
5.2.2 Triplehelix-Oligonukleotide vom Purin-Typ	9
6. Modifikationen von Triplehelix-Oligonukleotiden	10
6.1 Modifikationen der Basen	10
6.2 Modifikationen des Rückgrats	10
6.3 Modifikationen der Enden	11
7. Triplehelix-Technologie	13
7.1 Biologische Aktivität von Triplehelix-Oligonukleotiden	13
7.2 Nachweis einer Triplehelixbildung	14

8. Zelladhäsionsmoleküle	14
Immunglobulin-Superfamilie	15
Integrine	16
Selektine	16
Cadherine	17
9. Das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1	17
9.1 Vorkommen und Regulation von ICAM-1	17
9.2 Immunologische Funktion von ICAM-1	18
9.3 Medizinische Bedeutung der Hemmung von ICAM-1	19
9.3.1 Entzündliche Hauterkrankungen.....	20
9.3.2 Andere entzündliche Erkrankungen	21
9.3.3 Abwehr der Abstoßung von transplantierten Organen	21
9.4 Die Proteinstruktur von ICAM-1	22
9.5 Die Genstruktur von ICAM-1	23

MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien	24
1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	24
1.2 Enzyme	25
1.2.1 Restriktionsenzyme	25
1.2.2 Sonstige Enzyme	25
1.3 Antikörper	25
1.4 Plasmide	26
1.5 Biologisches Material	26
1.5.1 Prokaryote Zellen	26
1.5.2 Eukaryote Zellen	26
1.6 Medien und Medienzusätze zur Kultivierung eukaryoter Zellen	26

1.7 Oligonukleotide	27
1.7.1 Triplehelix- und Kontroll-Oligonukleotide	27
1.7.2 Zur Herstellung von Zielsequenzen eingesetzte Oligonukleotide ..	27
1.7.3 Als Primer verwendete Oligonukleotide	28
1.8 Kommerzielle Komplettsysteme	29
1.9 Verbrauchsmaterialien	29
1.10 Geräte	30
1.11 Software	30
2. Methoden	31
2.1 DNA-Techniken	31
2.1.1 Allgemeine Handhabung von Nukleinsäuren	31
2.1.1.1 DNA-Aufreinigung durch Phenolextraktion	31
2.1.1.2 DNA-Fällung	31
2.1.1.3 Gelelektrophorese mit Agarosegelen.....	31
2.1.1.4 Densitometrische Auswertung von DNA-Banden	32
2.1.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.1.1.6 DNA-Aufreinigung mit Silikatmembranen	33
2.1.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.1.2 Präparation genomischer DNA aus A431-Zellen	33
2.1.2.1 Präparation genomischer DNA mit Anionenaustauscher-Säulen.....	34
2.1.2.2 Präparation genomischer DNA mit Silikatmembran-Säulen.....	34
2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion	35
2.1.4 Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin (DIG)	36
2.1.4.1 Interne Markierung von Nukleinsäuren	36
2.1.4.2 Markierung der 3'-Enden von Nukleinsäuren	36
2.1.5 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen (Blotting)	37
2.1.6 Hybridisierung von DNA mit DIG-markierten Sonden (Southern blots)	37
2.1.7 Detektion von DIG-markierten Nukleinsäuren	37

2.1.8 Rekombinante DNA-Techniken	38
2.1.8.1 Verdauung mit Restriktionsenzymen	38
2.1.8.2 Erzeugung von glatten Enden (blunt ends) doppelsträngiger DNA	38
2.1.8.3 Abspaltung von 5'-Phosphatgruppen (Dephosphorylierung)	38
2.1.8.4 Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.1.8.5 Transformation kompetenter Bakterien	39
2.1.8.6 Präparation von Plasmiden	40
2.1.9 Sequenzierung	41
2.2 Proteinchemische Methoden	42
2.2.1 Messung der Gesamtproteinmenge.....	42
2.2.2 Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität ...	42
2.2.3 Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität	43
2.3 Zellbiologische Techniken.....	43
2.3.1 Kultivierung von A431-Zellen	43
2.3.2 Transiente Transfektion von Oligonukleotiden.....	44
2.3.2.1 Transfektion mit SuperFect™	44
2.3.2.2 Transfektion mit Lipofectin™	44
2.3.3 Transfektion von Plasmiden	45
2.3.4 Durchflußzytometrie	45
2.3.5 Isolierung von Zellkernen	46
2.3.6 Immunfluoreszenz	46
2.4 Triplehelix-spezifische Methoden	46
2.4.1 Identifikation von Zielsequenzen für Triplehelix-Oligonukleotide	46
2.4.2 Design von Triplehelix-Oligonukleotiden	48
2.4.3 Modifikationen von Triplehelix-Oligonukleotiden	49
2.4.3.1 Endmodifikationen mit Psoralen.....	49
2.4.3.2 Endmodifikationen mit Triethylenglykol	49
2.4.3.3 Endmodifikationen mit Biotin.....	50
2.4.4 Inkubation von Nukleinsäuren mit Triplehelix-Oligonukleotiden	50
2.4.5 Bestrahlung mit UVA	50

2.5 Triplehelixnachweise	51
2.5.1 Gelretardation	51
2.5.2 Hemmung von Restriktionsenzymen	52
2.5.3 Hemmung einer PCR-Reaktion	52
2.5.4 Triplehelixnachweis durch magnetische Separation	53
2.5.4.1 Triplehelixnachweis an isolierter genomischer DNA	54
2.5.4.2 Triplehelixnachweis in Zellkernen	55

ERGEBNISSE

1. Zielsequenzen für Triplehelix-Oligonukleotide im ICAM-1-Gen	56
1.1 Identifikation geeigneter Zielsequenzen	56
1.2 Auswahl besonders geeigneter Zielsequenzen	57
2. Design von Triplehelix-Oligonukleotiden.....	59
2.1 Triplehelix-Oligonukleotide für die Zielsequenz 13.....	59
2.2 Triplehelix-Oligonukleotide für die Zielsequenz 17.....	61
2.3 Design von Kontrolloligonukleotiden.....	62
3. Bindungsstudien	63
3.1 Bindungsstudien mit Triplehelix-Oligonukleotiden für die Zielsequenz 13	63
3.1.1 Bindungsstudien an Oligonukleotid-Zielsequenzen.....	63
3.1.2 Bindungsstudien am Plasmid	65
3.1.2.1 Herstellung des Plasmides pCM55 mit der Zielsequenz 13.....	65
3.1.2.2 Triplehelixnachweis durch Hemmung von EcoN I.....	66
3.1.3 Bindungsstudien an genomischen DNA-Präparationen	69
3.1.3.1 Hemmung des Restriktionsenzym Bfa I	69
3.1.3.2 Triplehelixnachweis mittels magnetischer Separation	70
3.1.4 Bindungsstudien an Zellkernpräparationen.....	72
3.2 Bindungsstudien mit Triplehelix-Oligonukleotiden für die Zielsequenz 17	76

3.2.1 Bindungsstudien an Oligonukleotid-Zielsequenzen	76
3.2.2 Bindungsstudien an Plasmiden	79
4. Biologische Aktivität von Triplehelix-Oligonukleotiden	81
4.1 Inhibition der ICAM-1-Expression	81
4.1.1 Etablierung von Transfektionsbedingungen für Oligonukleotide..	81
4.1.2 Inhibition von ICAM-1 durch TFO13GT	82
4.1.3 Inhibition von ICAM-1 durch bTFO13CU	86
4.1.4 Untersuchungen zu zytotoxischen Effekten	87
4.2 Inhibition von Reportergenen	89
4.2.1 Klonierung des Reporterplasmides	89
4.2.2 Inhibition der CAT-Expression und der Einfluß von UVA-Strahlung.....	92
4.2.3 Zusätzliche Untersuchungen zum Nachweis der triplehelixvermittelten Geninhibition	94
 DISKUSSION	
1. Bindungsfähigkeit von Triplehelix-Oligonukleotiden	96
1.1 Studien an zielsequenzhaltigen Oligonukleotiden	96
1.2 Studien an zielsequenzhaltigen Plasmiden	98
1.3 Studien an genomischer DNA	99
2. Die Hemmung von ICAM-1	102
3. Die Aktivität von Triplehelix-Oligonukleotiden im Modellsystem	105
4. Einfluß von UVA-Strahlung auf die Genhemmung mit Triplehelix-Oligonukleotiden	106
5. Ausblick	108
ZUSAMMENFASSUNG	110
LITERATURVERZEICHNIS	113
ANHANG	126

Einleitung

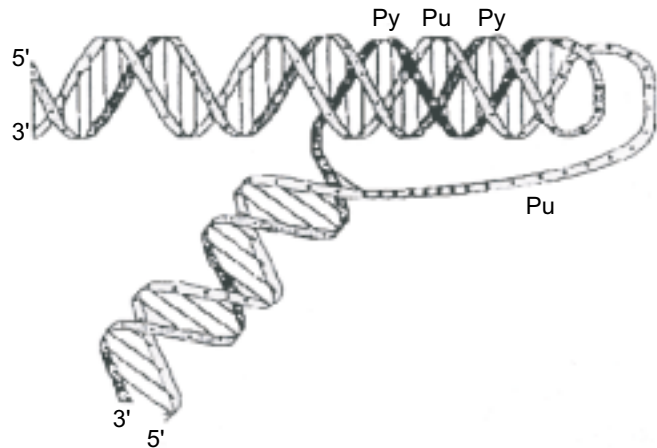
1. Entdeckung von Triplehelixstrukturen

Obwohl Nukleinsäuren bereits 1869 in Zellkernen von F. Miescher entdeckt wurden, wurde erst 1944 die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger der genetischen Information von O.T. Avery identifiziert. In den 50er Jahren stand die strukturelle Aufklärung der Desoxyribonukleinsäure im Fokus vieler Arbeitsgruppen. Verschiedene Hypothesen wurden aufgestellt, in welcher Form die Stränge der Nukleinsäuren miteinander assoziiert sind. Aufgrund der Verknüpfung zwischen Zucker und Phosphordiestergruppe wurde eine gedrehte Struktur vermutet. 1953 wurde beispielsweise von Pauling und Corey anhand von Röntgendiagrammen eine dreikettige Struktur postuliert, die aus drei ineinander verdrehten, protonierten DNA-Strängen besteht, bei denen die Phosphatgruppen in der Achse und die Basen am Außenrand liegen.

In dieser Zeit mutete die Hypothese einer zweikettigen Struktur von Watson und Crick relativ radikal an. Sie gingen davon aus, daß die Röntgendiagramme dem Salz der DNA und nicht der Säure entstammen. Sie vermuteten, daß die beiden gedrehten Stränge gegenläufig (antiparallel) um eine Achse verlaufen, wobei die Basen innen und die Phosphatgruppen außen liegen (Doppelhelix). Revolutionär an der These war, daß die beiden Ketten durch die Basen zusammengehalten werden. Die Basen sind paarweise miteinander verbunden, wobei Purinbasen immer an Pyrimidinbasen binden. Entscheidend war weiterhin die Erkenntnis, daß in dieser Doppelhelixstruktur aufgrund nur einer plausiblen tautomeren Konfiguration ausschließlich zwei Basenpaarungen möglich sind: Adenin an Thymin und Guanin an Cytosin. Diese Paarung erfolgt über zwei beziehungsweise drei Wasserstoffbrücken die später als *Watson/Crick*-Wasserstoffbrücken bezeichnet wurden. Watson und Crick erkannten, daß, wenn die Sequenz eines DNA-Stranges bekannt ist, automatisch die Sequenz des Gegenstrangs bestimmt werden kann. Sie erkannten auch, daß durch diese spezifische Basenpaarung die Möglichkeit zur Vervielfältigung von DNA durch Kopieren eines Stranges gegeben war. Damit waren Struktur und Eigenschaften der Desoxyribonukleinsäure im Jahr 1953 im Wesentlichen aufgeklärt (Watson et al. 1953). Nur wenige Jahre später wurde entdeckt, daß Polynukleotide auch dreikettige Strukturen (*Triplehelix*) ausbilden können (Felsenfeld et al. 1957). In Kokristallen aus Adenin- und Thyminderivaten wurde gezeigt, daß diese dreikettigen Strukturen ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbildung entstanden, die aber nicht den *Watson/Crick*-Wasserstoffbrücken in der Doppelhelix entsprachen (Hoogsteen 1959). Diese zusätzlichen Wasserstoffbrücken die zur Anbindung eines dritten DNA-Stranges an eine Doppelhelix beteiligt sind und damit zur Triplehelixbildung führen, werden als *Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken bezeichnet.

Deutlich später wurde eine natürlich vorkommende dreikettige Struktur entdeckt, die an bestimmten Stellen in der DNA auftrat. Sie wurde als *H-DNA* (*hinged DNA*) bezeichnet und man vermutete, daß diese Triplehelixstruktur regulatorische Funktionen in der Zelle haben könnte (Htun et al. 1989, Abbildung 1).

Abb. 1: *Hinged-DNA* (H-DNA). H-DNA wird unter superhelikalem Stress an spiegelbildlichen Wiederholungen von Purin/Pyrimidinabschnitten gebildet. Dabei faltet sich der Pyrimidinstrang (schwarz dargestellt) auf die Doppelhelix zurück und bildet eine Triplehelix. Pu bedeutet Purinabschnitt, Py Pyrimidinabschnitt.

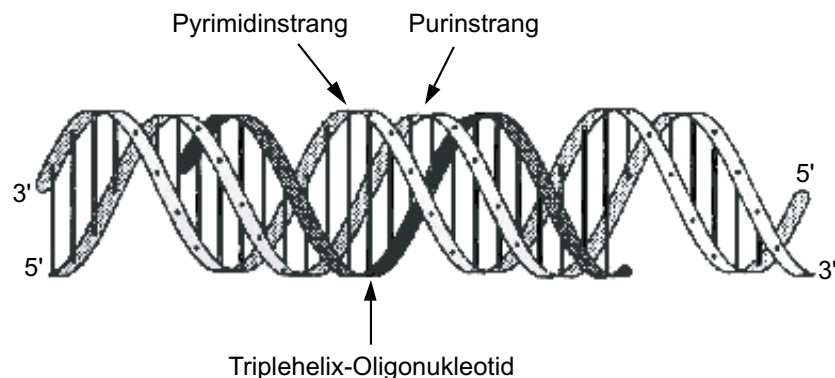


2. Genhemmung mit Oligonukleotiden

2.1 Genhemmung mit Triplehelix-Oligonukleotiden

Natürlich vorkommende dreikettige DNA-Strukturen sollten auch künstlich mit Oligonukleotiden herstellbar sein. Eine lokale Triplehelix mit einem Oligonukleotid, das an einer geeigneten Stelle in einem bestimmten Zielgen bindet, sollte die Expression dieses Gens beeinflussen können (Le Doan et al. 1987, Moser et al. 1987, Abbildung 2).

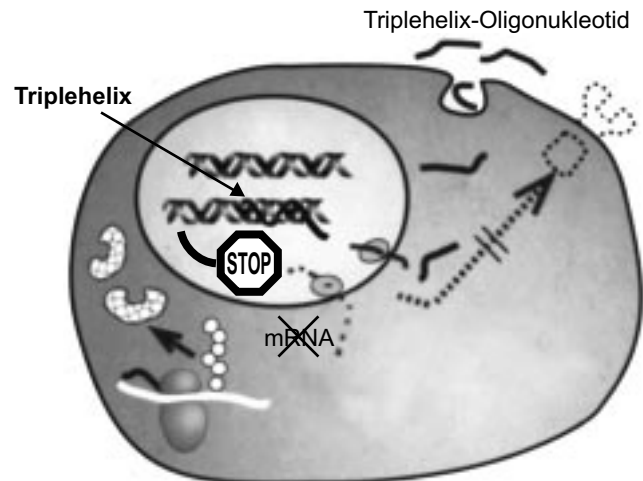
Abb. 2: Triplehelixbildung eines Oligonukleotides. Ein Oligonukleotid bindet unter Ausbildung von *Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken an Purinbasen eines Stranges der Doppelhelix. Dabei lagert sich das Oligonukleotid in der großen Furche der Doppelhelix ein.



Die Möglichkeit einer spezifischen Genregulation mit triplehelixbildenden Oligonukleotiden (*triple helix-forming oligonucleotide*, TFO) hat zu einem großen Interesse an der Chemie und der biologischen Wirkung von Oligonukleotiden und Oligonukleotidanaloga geführt. Dieser Ansatz, bei dem ein DNA-Abschnitt eines bestimmten Gens als Ziel ausgewählt wird, wird auch als *Anti-Gen*-Strategie bezeichnet. Die Triplehelixbildung kann die Transkription eines Zielgens über zwei Mechanismen beeinflussen: 1. Findet die

Triplehelixbildung im transkribierten Bereich des Gens statt, kann eine Genhemmung durch Behinderung von RNA-Polymerasen während der Transkription verursacht werden, wobei der Elongationsschritt behindert wird (Wang et al. 1997). 2. Findet die Triplehelixbildung im Promotor statt, kann eine Genhemmung durch Blockieren des Transkriptionsstarts verursacht werden, indem das Triplehelix-Oligonukleotid die Anbindung von Transkriptionsfaktoren verhindert (Ritchie et al. 2000).

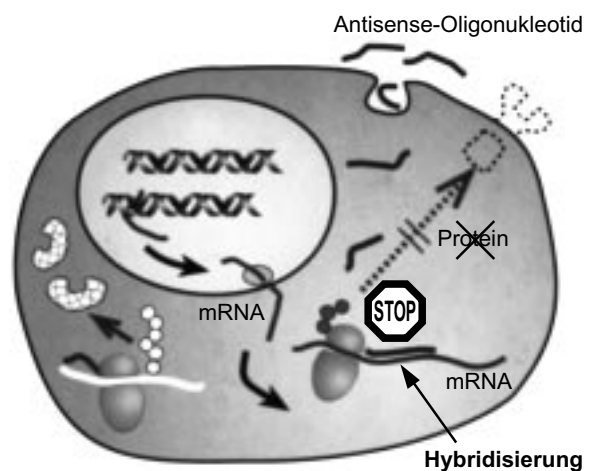
Abb. 3: *Anti-Gen-Strategie*. Bei der *Anti-Gen-Strategie* werden Oligonukleotide eingesetzt, die durch Anlagerung an die Doppelhelix eines bestimmten Zielgens über *Hoogsteen-Wasserstoffbrücken* eine Triplehelix bilden. Das Oligonukleotid muß dazu in den Zellkern gelangen. Durch das gebundene Triplehelix-Oligonukleotid wird die Transkription dieses Gens gehemmt (Abbildung modifiziert nach Schlingensiepen et al. 1997).



2.2 Genhemmung mit Antisense-Oligonukleotiden

Die Triplehelix-Technologie unterscheidet sich von einem weiteren Ansatz, der ebenfalls auf synthetischen Oligonukleotiden basiert. Dieser wird als *Antisense-Strategie* bezeichnet. Hier werden Oligonukleotide eingesetzt, deren Sequenz komplementär zur mRNA eines bestimmten Zielgens ist (Lebedeva et al. 2001). Durch sequenzspezifische Hybridisierung des Antisense-Oligonukleotides mit der mRNA kann die Proteinbildung behindert werden. Dies geschieht entweder durch Behinderung der Translation in den Ribosomen oder durch die Degradation durch RNase H, eine Nuklease, die Oligonukleotid-DNA/mRNA-Hybride spaltet (Abbildung 4).

Abb. 4: *Antisense-Strategie*. Bei der *Antisense-Strategie* werden Oligonukleotide eingesetzt, deren Sequenz komplementär zur mRNA eines bestimmten Zielgens ist. Durch sequenzspezifische Hybridisierung über *Watson-Crick-Wasserstoffbrücken* des Oligonukleotides mit der mRNA im Zytosol der Zelle wird die Translation der mRNA gehemmt (Abbildung modifiziert nach Schlingensiepen et al. 1997).



Der Forschungsstand mit Antisense-Oligonukleotiden ist bereits weit fortgeschritten. Viele Gene konnten erfolgreich gehemmt werden. Medikamente, die auf Antisense-Oligonukleotiden basieren, sind bereits in der klinischen Erprobung (Yacyshyn et al. 1998). Ein erstes Antisense-Arzneimittel, das bei viralen Infekten im Auge eingesetzt wird, ist auf dem deutschen Markt (Formvirsen, Vitravene™).

Trotz aussichtsreicher Perspektiven der *Antisense*-Strategie erscheint die Beschäftigung mit der *Anti-Gen*-Strategie lohnenswert, da hier die Anzahl der Zielsequenzen limitiert ist. Antisense-Effekte können durch Neusynthese von mRNA kompensiert werden, während genomische DNA nicht nachsynthetisiert wird (Guieysse et al. 2000, Vasquez et al. 2000). Aus diesem Grund könnte der Effekt von Triplehelix-Oligonukleotiden nachhaltiger sein.

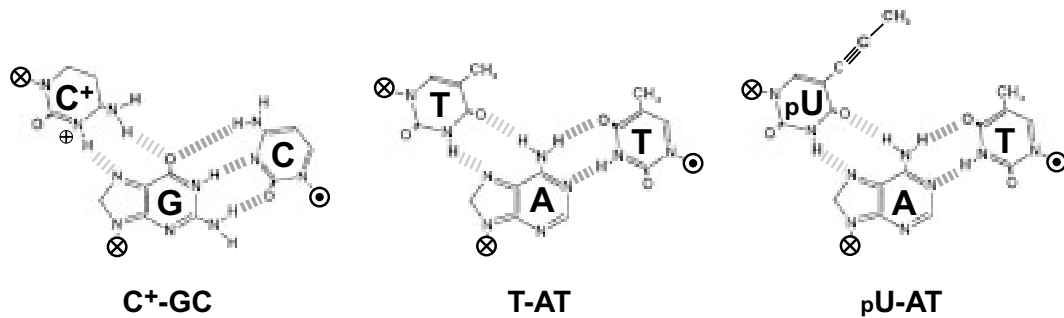
3. Struktur der Triplehelix

Die Paarung zweier Basen in der DNA-Doppelhelix beruht auf Wasserstoffbrücken, die als *Watson/Crick*-Wasserstoffbrücken bezeichnet werden. Adenin und Thymin (AT) sind mit zwei, Guanin und Cytosin (GC) mit drei Wasserstoffbrücken verbunden.

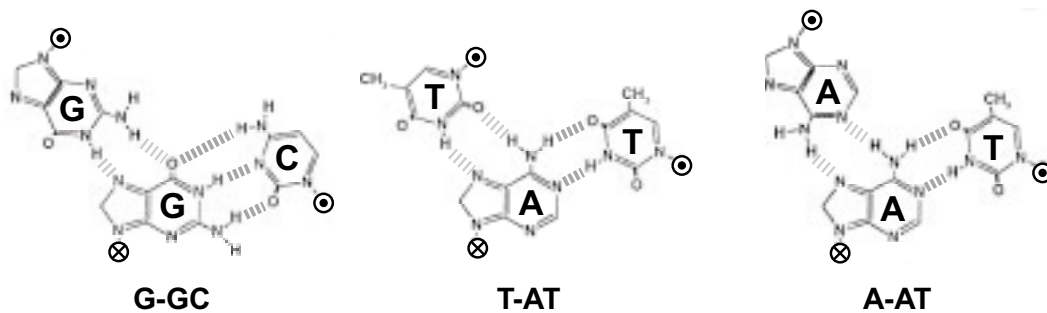
Die Anlagerung einer dritten Base an ein *Watson/Crick*-Basenpaar wird als *Basentriplet* bezeichnet. Sie erfolgt ebenfalls in Form von Wasserstoffbrücken, die als *Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken bezeichnet werden. Für diese Anlagerung müssen die Basen der Doppelhelix neben den *Watson/Crick*-Wasserstoffbrücken zusätzliche Wasserstoffbrücken ermöglichen. Dies ist nur bei den Purinbasen Adenin und Guanin, nicht aber bei Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin möglich (Abbildung 5, nächste Seite).

Die Anbindung der dritten Base kann in zwei verschiedenen isomeren Konformationen erfolgen. Eine Konformation entspricht der von Hoogsteen entdeckten Struktur und wird deshalb als *Hoogsteen*-Bindung bezeichnet. Triplets in *Hoogsteen*-Bindung sind in Abbildung 5 oben dargestellt. Bei der zweiten Konformation ist die dritte Base um 180° gedreht. Diese Konformation (unterer Teil der Abbildung) wird als *reverse Hoogsteen*-Bindung bezeichnet.

Die Anlagerung mehrerer Basen eines Oligonukleotides an benachbarte Purinbasen in einem Strang der Doppelhelix führt schließlich zur spezifischen Einlagerung des Oligonukleotides in die große Furche der Doppelhelix und damit zur Bildung einer Triplehelix.



Hoogsteen-Bindung



reverse Hoogsteen-Bindung

Abb. 5: Basentriplets. Strukturen, die bei der Anlagerung einer dritte Base an ein Watson/Crick-Basenpaar entstehen werden als Basentriplets bezeichnet. Die stabileren Watson/Crick-Wasserstoffbrücken sind dunkelgrau, die weniger stabilen Hoogsteen-Wasserstoffbrücken der dritten Base hellgrau dargestellt. Die Bindung der dritten Base erfolgt grundsätzlich über zwei Wasserstoffbrücken, wobei zwei Konformationen eingenommen werden können: Die Bindung kann über Hoogsteen-Wasserstoffbrücken (oberer Teil der Abbildung) oder über *reverse Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken erfolgen (unterer Teil der Abbildung), in der die Basen des dritten Stranges um 180° gedreht sind. Cytosin als dritte Base muß für eine Bindung am N3-Stickstoff protoniert sein (oben links in der Abbildung). Dargestellt sind die für diese Arbeit relevanten Basentriplets. Die Zeichen ⊗ oder ⊙ symbolisieren eine der beiden Strangrichtungen (5′-3′ oder 3′-5′) senkrecht zur Papierebene. pU bedeutet 5-Propynyluracil.

4. Zielsequenzen für Triplehelix-Oligonukleotide

Die Spezifität von Triplehelix-Oligonukleotiden und damit das Potential einer genselektiven Wirkung beruht also auf zwei Komponenten: Der Komponente einer spezifischen Paarung von TFO-Basen mit Doppelhelix-Basen und einer sterischen Komponente, die eine stabile Einlagerung des Oligonukleotides in der großen Furche der Doppelhelix unter Ausbildung einer Triplehelix nur zuläßt, wenn die Basen in der geeigneten Reihenfolge vorkommen (Sequenzspezifität). Diese Spezifität ist vergleichbar mit der Watson/Crick-Basenpaarung der DNA-Stränge in der Doppelhelix ist, die auch auf der Kombination dieser zwei Komponenten beruht.

Da die Paarung des Triplehelix-Oligonukleotides nur an Purinbasen (Adenin und Guanin) der Doppelhelix erfolgen kann, eignen sich nur Abschnitte in einem Gen, in denen ein Strang ausschließlich Purinbasen aufweist (*Homopurinabschnitt*). Solche Abschnitte werden als *Zielsequenz* bezeichnet. Eine Reihenfolge von mindestens 17 Basen ist für eine selektive, einmalige Bindung im menschlichen Genom mit etwa 3 Milliarden Basenpaaren nötig (Thoung et al. 1993). Eine Zielsequenz sollte also aus einem Homopurinabschnitt etwa dieser Länge bestehen um eine selektive Wirkung des Triplehelix-Oligonukleotides zu ermöglichen. Diese Voraussetzung stellt den wichtigsten limitierenden Faktor für die Triplehelix-Technologie dar.

Optimal ist es, wenn der Homopurinabschnitt vollständig auf einem Strang der Doppelhelix liegt. Eine Triplehelixbildung kann aber auch stattfinden wenn die Purinabschnitte abschnittsweise auf beiden Strängen der Doppelhelix liegen. Dazu müssen allerdings speziell modifizierte Triplehelix-Oligonukleotide konstruiert werden. Diese binden dann abwechselnd an den Strang der Doppelhelix, der die Purinbasen enthält (de Bizemont et al. 1996, Marchand et al. 1998, Olivas et al. 1994). An Homopurinabschnitten, die durch einzelne Pyrimidinbasen unterbrochen sind kann ebenfalls eine Triplehelixbildung stattfinden (Mergny et al. 1991). Triplehelix-Oligonukleotide für solche Zielsequenzen müssen allerdings an der *Mismatch*-Stelle in geeigneter Weise modifiziert werden (Kukreti et al. 1997, Kukreti et al. 1998, Xodo et al. 1993).

5. Triplehelix-Oligonukleotide

5.1 Grundsätzliche Aspekte beim Design von Triplehelix-Oligonukleotiden

Das Design von Triplehelix-Oligonukleotiden wird von drei grundsätzlichen Aspekten bestimmt. Dies sind die Orientierung der dritten Base, andere sterische Aspekte wie Bindungswinkel und -längen, sowie die Bindungsstärke der verschiedenen Basentriplets.

5.1.1 Orientierung der Basentriplets

Die Anbindung der dritten Base in einem Basentriplet kann in zwei Konformationen erfolgen: in *Hoogsteen*-Konformation oder in *reverse Hoogsteen*-Konformation (siehe Abbildung 5). Eine Einlagerung eines Oligonukleotides ist nur möglich, wenn alle Basen in der gleichen Konformation binden können. Je nach Konformation der Basentriplets führt das zu einer bestimmten 5'-3'-Orientierung des Oligonukleotides bezogen auf den Purinstrang der Doppelhelix. Binden die Oligonukleotidbasen in *Hoogsteen*-Konformation, führt das zu einer *parallelen* Orientierung des Oligonukleotides an den Purinstrang in der Doppelhelix. Erfolgt die Bindung dagegen in *reverse Hoogsteen*-

Konformation, führt das zu einer *antiparallelen* Orientierung des Oligonukleotides bezogen auf den Purinstrang der Doppelhelix (Praseuth et al. 1988, Le Doan et al. 1987).

Während Basentriplets bei denen die dritte Base Thymin, Cytosin oder Guanin ist, beide Konformationen einnehmen können, können Basentriplets mit Adenin als dritter Base nur die *reverse Hoogsteen*-Konformation einnehmen. Deshalb können Triplehelix-Oligonukleotide, die Adenin enthalten, nur in *antiparalleler* Orientierungen an die Doppelhelix binden, während die adeninfreie Triplehelix-Oligonukleotide sowohl in *parallel* als auch in *antiparalleler* Orientierung binden können.

5.1.2 Bindungswinkel und -längen von Basentriplets

Ein an die Doppelhelix bindendes Triplehelix-Oligonukleotid lagert sich in der großen Furche der DNA ein. Für die Stabilität einer Triplehelix ist deshalb eine minimale Verformung des Rückgrats von Oligonukleotid oder Doppelhelix wichtig. Aus diesem Grund sollten die Basen des Oligonukleotides so gewählt werden, daß die Bindungswinkel und Bindungslängen der dritten Base in den verschiedenen Basentriplets möglichst ähnlich sind. Sind die Bindungswinkel und -längen identisch werden die Basentriplets als *isomorph* bezeichnet. Die Einlagerung des Oligonukleotides ist dann optimal. Anhand der C1'-Kohlenstoffatome der Nukleotide in einem Basentriplet lassen sich die Bindungswinkel und -längen darstellen. Da die Position der Nukleotide der *Watson-Crick*-Basen durch die Doppelhelix vorgegeben sind, ergeben sich unterschiedliche Positionen für die Basen im dritten Strang, die in Abbildung 6 dargestellt sind.

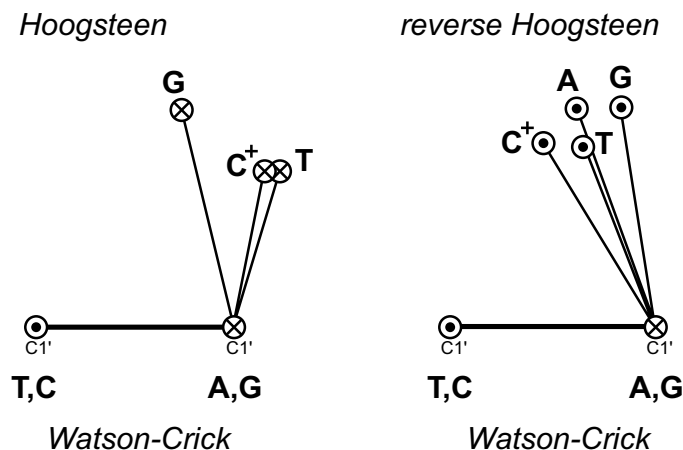


Abb. 6: Bindungswinkel und -längen der dritten Base in Basentriplets. Die sterischen Verhältnisse in verschiedenen Basentriplets sind anhand der C1'-Kohlenstoffatome der jeweiligen Nukleotide schematisiert. Die C1'-Atome der *Watson/Crick*-Basenpaare sind in der Abbildung unten waagrecht mit der jeweiligen räumlichen Position der dritten Base dargestellt. Triplets in *Hoogsteen*-Konformation sind links, Triplets in *reverse Hoogsteen*-Konformation sind rechts dargestellt. Ähnliche Winkel und Abstände der Nukleotide erhöhen die Isomorphie der Triplets und führen damit zu einer besseren Einlagerung des Oligonukleotides, wenn es aus diesen Basen besteht. Die Zeichen ⊗ oder ⊙ symbolisieren eine der beiden Strangrichtungen (5'-3' oder 3'-5') senkrecht zur Papierebene.

Die Abbildung zeigt, daß nur zwei Basentriplets isomorph sind: C⁺-GC und T-AT in *Hoogsteen*-Bindung. Oligonukleotide aus Cytosin und Thymin weisen also die optimalen sterischen Voraussetzungen für eine Triplehelixbildung auf. Alle anderen Kombinationen haben unterschiedliche Bindungswinkel und -längen und führen so zu einer Verdrehung des Rückgrats mit entsprechenden energetischen Nachteilen.

5.1.3 Eigenschaften und Stabilität einzelner Basentriplets

Die Stabilität verschiedener Basentriplets wurde in Thermodenaturierungsexperimenten ermittelt. Dabei zeigten besonders die Basentriplets T-AT und G-GC in *Hoogsteen*-Bindung eine hohe Stabilität (Beal et al. 1992, Gondeau et al. 1998, Mills et al. 1999, Fox 2000).

Eine Besonderheit muß beim C⁺-GC Triplet beachtet werden: Es kann nur gebildet werden, wenn Cytosin im Triplehelix-Oligonukleotid protoniert ist (Abbildung 5 links oben, Seite 5). Dies ist nur bei niedrigen pH-Werten der Fall. Die Stabilität von Triplehelices mit cytosinhaltigen Triplehelix-Oligonukleotiden nimmt deshalb mit steigendem pH-Wert ab. Sie binden im sauren Milieu gut, bei physiologischen pH-Werten ist dagegen die Bindung reduziert. Zusätzlich sind durch die Protonierung von Cytosin elektrostatische Effekte zu berücksichtigen: Die gegenseitige Abstoßung benachbarter, protonierter Cytosine kann eine ungünstige Situation für die Anlagerung des Oligonukleotides in die Doppelhelix schaffen.

5.2 Triplehelix-Oligonukleotide

Ausgehend von der hohen Stabilität der T-AT und G-GC Triplets in Thermodenaturierungsexperimenten wurden anfangs *parallel* bindende Triplehelix-Oligonukleotide aus Guanin und Thymin untersucht. Allerdings schlugen Versuche mit diesen Oligonukleotiden eine Triplehelix zu bilden fehl, da die Bindungswinkel der Basentriplets in *Hoogsteen*-Konformation zu unterschiedlich sind (Abbildung 6 links, Seite 7). Daraufhin konzentrierte sich die Forschung auf Triplehelix-Oligonukleotide aus Cytosin und Thymin in *Hoogsteen*-Konformation, deren Basentriplets isomorph sind.

Bei Oligonukleotiden aus Guanin und Thymin, die in *reverse Hoogsteen*-Konformation binden, ist dagegen der Nachteil fehlender Isomorphie nicht so ausgeprägt wie in *Hoogsteen*-Konformation (Abbildung 6 rechts). In *antiparalleler* Orientierung können deshalb solche Oligonukleotide eine Triplehelix bilden. Zu beachten ist auch, daß der energetische Nachteil durch Verformung der Rückgrate aufgrund fehlender Isomorphie bei Homopurinabschnitten, in denen die Basen Guanin und Adenin häufig wechseln (viele GpA und ApG Abschnitte) stärker ausgeprägt ist, als in Abschnitten, in denen die Basen selten wechseln (Sun et al. 1991).

Diese Aspekte haben zu zwei Grundtypen von Triplehelix-Oligonukleotiden geführt, die im Methodenteil anhand eines Beispiels (Abschnitt 2.4.2, Seite 48) dargestellt sind: Pyrimidinhaltige Triplehelix-Oligonukleotide, die mittels *Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken in *paralleler* Orientierung an die Doppelhelix binden (Pyrimidin-TFOs) und purinhaltige Triplehelix-Oligonukleotide die mittels *reverse Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken in *antiparalleler* Orientierung binden (Purin-TFOs). Die Triplehelixbildung beider Grundtypen hängt von unterschiedlichen Faktoren ab und führt so zu spezifischen Vor- und Nachteilen der Oligonukleotide.

5.2.1 Triplehelix-Oligonukleotide vom Pyrimidin-Typ

Parallel bindende Pyrimidin-TFOs aus Cytosin und Thymin binden nur bei niedrigen pH-Werten gut, da eine Bindung nur bei protoniertem Cytosin möglich ist. Bei physiologischen pH-Werten ist die –an sich sehr stabile– Bindung herabgesetzt. Durch verschiedene Modifikationen wurde deshalb versucht diesen Nachteil zu minimieren, wobei die wichtigste Modifikation die Methylierung von Cytosin am C5-Atom ist (Xodo et al. 1991). Ein Vorteil von Pyrimidin-TFOs ist, daß die Triplehelixbildung nicht von monovalenten Kationen wie Kalium beeinträchtigt wird.

5.2.2 Triplehelix-Oligonukleotide vom Purin-Typ

Die Triplehelixbildung *antiparallel* bindender Purin-TFOs aus Guanin und Adenin ist bei physiologischen pH-Werten gut, hängt aber stark von der Kationenkonzentration ab. Während für die Triplehelixbildung eine Mindestkonzentration divalenter Kationen nötig ist, wirken monovalente Kationen hemmend. Die intrazelluläre Konzentration von Magnesium reicht für eine Triplehelixbildung aus, die hohen intrazellulären Kaliumkonzentrationen wirken aber deutlich hemmend (Rougee et al. 1992, Cheng et al. 1993). Besonders ausgeprägt ist dies bei Triplehelix-Oligonukleotiden, die mehr als vier Guanine in Reihe enthalten, da durch monovalente Kationen die Ausbildung von Sekundärstrukturen wie G-Quartetten verstärkt wird, die eine Triplehelixbildung verhindern können (Rao et al. 1995). Ein weiterer Effekt, der bei Purin-TFOs auftritt, die aus Guanin und Adenin bestehen, ist die kationenabhängige Neigung zur Bildung von selbst-assoziierten Dimeren, die mit der Triplehelixbildung konkurrieren können (Noonberg et al. 1995a). Verschiedene TFO-Modifikationen wurden deshalb beschrieben, um diese Nachteile zu minimieren (Olivas et al. 1995, Rao et al. 1995).

Oft wird bei diesen Oligonukleotiden Adenin durch die Pyrimidinbase Thymin ersetzt, da das T-AT Triplet in *reverse Hoogsteen*-Konformation eine relativ hohe Stabilität aufweist, die den Nachteil der niedrigeren Isomorphie kompensieren kann. Aufgrund ihrer

antiparallelen Orientierung werden solche G/T-reichen Triplehelix-Oligonukleotide trotzdem zu den Purin-TFOs gezählt. Die meisten Triplehelix-Oligonukleotide in dieser Arbeit bestehen aus Guanin und Thymin und binden in reverse Hoogsteen-Konformation (Materialenteil, Abschnitt 1.7.1, Seite 27).

6. Modifikationen von Triplehelix-Oligonukleotiden

Im Hinblick auf eine optimierte intrazelluläre Wirkung wurde eine Vielzahl an Modifikationen von Triplehelix-Oligonukleotiden eingeführt. Diese Modifikationen zielen darauf ab, die Aufnahme des Oligonukleotides in die Zelle zu erhöhen, das Oligonukleotid resistenter gegen eine intrazelluläre Degradation zu machen oder die Triplehelixbildung zu verbessern. Dabei werden die Basen, das Rückgrat oder die Enden des Oligonukleotides modifiziert (Thoung und Hélène 1993).

6.1 Modifikationen der Basen

Verschiedene Basenmodifikationen wurden beschrieben, um die spezifischen Nachteile bei der Triplehelixbildung zu minimieren.

Basenmodifikation von Pyrimidin-TFOs dienen in erster Linie der Verbesserung der Triplehelixbildung bei physiologischen pH-Bedingungen. Dies betrifft den Ersatz von Cytosin durch 5-Methylcytosin (Xodo, Manzini et al. 1991), durch 2-Amino-5-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)pyridin (Bates et al. 1996) oder durch N6-Methyl-8-oxo-2'-deoxyadenosin (Krawczyk et al. 1992). Aber auch der Ersatz von Thymin durch 5-Propynyluracil kann die Triplehelixbildung verbessern (Lacroix et al. 1999).

Basenmodifikationen von Purin-TFOs dienen im allgemeinen zur Minimierung der störenden Ionenabhängigkeit. Dies betrifft den Ersatz von Guanin durch 6-Thioguanin (Rao et al. 1995, Olivas et al. 1995) oder Imidazol (Gee et al. 1995) und den Ersatz von Adenin durch 7-Deazaxanthin (Faruqi et al. 1997, Milligan et al. 1993).

6.2 Modifikationen des Rückgrats

Modifikationen des Rückgrates dienen neben der Verbesserung der Triplehelixbildung auch dem Schutz des Triplehelix-Oligonukleotides vor Degradation.

Die wichtigsten Modifikationen des TFO-Rückgrates betreffen die Veränderung der Phosphodiesterbindung. Triplehelix-Oligonukleotide mit Phosphoamidatbindung bilden stabilere Triplehelices (Escude et al. 1996), die Verwendung eines Thioatrückgrates macht das Oligonukleotid resistenter gegen den Abbau durch intrazelluläre Nukleasen

(Lacoste et al. 1997). Besonders stabile, nukleaseresistente Triplehelixstrukturen bilden Oligonukleotide bei denen die Desoxyribose/Phosphodiesterkette durch eine Pseudopeptidkette aus Aminoethylglycinen ersetzt ist (*Peptide nucleic acids*, PNAs; Demidov et al. 1995). Weitere Rückgratmodifikationen betreffen den Ersatz von Desoxyribose durch Ribose (Escude et al. 1993) und die Verwendung von nukleaseresistenten α -Anomeren (Noonberg et al. 1995b).

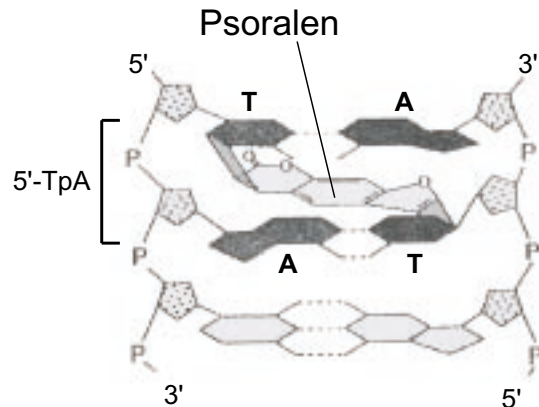
6.3 Modifikationen der Enden

Durch Kopplung von Molekülen an die Enden von Triplehelix-Oligonukleotiden kann eine Stabilisierung des Oligonukleotides unter intrazellulären Bedingungen oder eine bessere TFO-Aufnahme in die Zelle erreicht werden.

Da die Degradation von Triplehelix-Oligonukleotiden in erster Linie durch intrazelluläre 3'-Exonukleasen verursacht wird, werden grundsätzlich die 3'-Enden der Oligonukleotide modifiziert, um einen vorzeitigen biologischen Abbaus zu verhindern. Dabei wird meist Triethylenglykol oder Propanolamin verwendet (Zendegui et al. 1992). Von einer besseren Oligonukleotidaufnahme in Zellen durch Kopplung an lipophile Substanzen wie zum Beispiel Cholesterol wurde berichtet (Godard et al. 1995).

Die Kopplung *funktionaler* Moleküle an die Oligonukleotide hat besonders großes Interesse hervorgerufen. Zu diesen Molekülen gehören Substanzen, die sich in DNA einlagern können (Helene et al. 1985). Wenn diese Substanzen an das Triplehelix-Oligonukleotid gekoppelt werden, können sie durch die Einlagerung (Interkalation) eine Triplehelixstruktur stabilisieren. Am häufigsten werden dabei Akridin (Sun et al. 1989) und Psoralen verwendet. Die spezielle Eigenschaft von Psoralen durch Bestrahlung mit langwelligem UVA-Licht kovalente Bindungen an DNA auszubilden, hat zur häufigen Verwendung von psoralengekoppelten Triplehelix-Oligonukleotiden geführt (Takasugi et al. 1991, Barre, Giovannangeli et al. 1999). Da es Teil dieser Arbeit war die Effekte von psoralengekoppelten Oligonukleotiden in Verbindung mit UVA-Licht zu untersuchen, soll auf die Wechselwirkungen zwischen Psoralen und DNA näher eingegangen werden: Psoralene sind in vielen Pflanzen enthalten und entsprechen chemisch einer linearen Kondensation eines Furanrings mit einem Coumarinring. Psoralene lagern sich im Zellkern in die DNA-Doppelhelix ein (*Interkalation*). Durch UV-Strahlung werden Psoralene energetisch angeregt. Durch diese Aktivierung erfolgt eine Reaktion des eingelagerten Psoralens mit Pyrimidinbasen der Doppelhelix, die zu einer kovalenten Quervernetzung der DNA-Stränge führt (*Photoaddukt*, Abbildung 7, nächste Seite).

Abb. 7: Einlagerung von Psoralen in DNA. Psoralen lagert sich in DNA an 5'-TpA-Stellen ein. Die Basen Adenin und Thymin sind schwarz dargestellt. Durch UVA-Strahlung wird eingelagertes Psoralen aktiviert. Es werden kovalente Bindungen zwischen dem Furanring des Psoralens und einer Thyminbase ausgebildet (rechter Strang der Abbildung). Nach weiterer Aktivierung durch UVA werden zusätzliche kovalente Bindungen zwischen Pyronring des Psoralens und Thyminbase des Gegenstranges ausgebildet (linker Strang). Es kommt zur Quervernetzung beider DNA-Stränge.



Dieser Effekt kann auch mit Psoralen, das an ein Triplehelix-Oligonukleotid gekoppelt wurde, herbeigeführt werden: Hat eine Triplehelixbildung mit einem psoralengekoppelten Oligonukleotid stattgefunden, kann sich Psoralen in die Doppelhelix einlagern. Wenn dort an geeigneter Stelle eine 5'-TpA-Stelle vorhanden ist und mit UVA-Licht bestrahlt wird, reagiert Psoralen mit Pyrimidinbasen in der Doppelhelix entsprechend Abbildung 7. Das Oligonukleotid wird dann an der Triplehelixstelle kovalent mit der Doppelhelix verbunden. Die Aktivierung durch UVA-Strahlung erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten, die zu unterschiedlichen Photoaddukten führen:

Im ersten Schritt reagiert der Furanring des interkalierten Psoralens mit der Thyminbase eines Stranges der Doppelhelix (*Monoaddukt*). Dies ist vornehmlich der Homopurinstrang, an den das Triplehelix-Oligonukleotid gebunden hat (Barre, Asseline et al. 1999, Gasparro et al. 1994). Es kommt somit zu einer kovalenten Anbindung des Triplehelix-Oligonukleotides an einen Strang der Doppelhelix.

In einem zweiten Schritt erfolgt abhängig von der UVA-Strahlung eine weitere Reaktion: Der Pyronring des Psoralens reagiert mit der Thyminbase des Gegenstranges (Pyrimidinstrang). Damit werden beide Stränge der Doppelhelix mit dem Triplehelix-Oligonukleotid verbunden, es kommt zu kovalent quervernetzten *Bisaddukten*.

Freie, nicht konjugierte Psoralene (5- oder 8-Methoxypsoralen) werden in der PUVA Therapie (Psoralene in Kombination mit langwelligem UVA-Licht) schon länger in der Dermatologie eingesetzt. Die durch Psoralen und UVA-Licht hervorgerufenen DNA-Quervernetzungen hemmen die Replikation von Keratinozyten und wirken so antiproliferativ. Zusätzlich dürften Photo-Bisaddukte auch einen direkten phototoxischen, apoptotischen Effekt auf das kutane leukozytäre Infiltrat haben und so entzündungshemmend wirken (Hoenigsmann et al. 1999). Diese Effekte werden zur Therapie von Psoriasis vulgaris und zahlreichen weiteren entzündliche Dermatosen ausgenutzt (zum

Beispiel Lichen ruber planus, schwere Verlaufsformen der atopischen Dermatitis). Auch maligne Hauterkrankungen, insbesondere das kutane T-Zell-Lymphom (Mycosis fungoides), können durch PUVA-Therapie gebessert werden (Hoenigsmann et al. 1999). Neben den gewünschten antiinflammatorischen und antiproliferativen Effekten zeigen Psoralene eine Reihe von unerwünschten Wirkungen. Insbesondere werden - dosisabhängig - phototoxische Reaktionen (Erytheme und Juckreiz) und bei systemischer Applikation Nausea und Vomitus beobachtet. Ein weiterer unerwünschter Effekt der PUVA-Therapie ist ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung spinozellulärer Karzinome der Haut, vor allem nach langerjähriger Behandlung und Applikation hoher UVA-Dosen (Stern et al. 1994).

7. Triplehelix-Technologie

7.1 Biologische Aktivität von Triplehelix-Oligonukleotiden

Es existiert eine Reihe von Berichten, in denen eine Genhemmung mit Triplehelix-Oligonukleotiden in Zellkulturexperimenten beobachtet wurde.

An Plasmiden mit integrierten Reportergenen wurde eine triplehelixvermittelte Hemmung der Transkription gezeigt. Dabei waren sowohl Oligonukleotide, die an Zielsequenzen im Promotor binden effektiv (Cogoi et al. 2000), als auch Oligonukleotide, die an Zielsequenzen zwischen Promotor und Gen binden (Bailey et al. 2000). Eine Hemmung mit Triplehelix-Oligonukleotiden, die im transkribierten Bereich eines Gens binden wurde ebenso beschrieben. In vitro konnte gezeigt werden, daß die RNA-Synthese tatsächlich an der Triplehelixstelle abbricht (Hemmung der *Elongation*, Rando et al. 1994, Wang und Rana 1997). In Zelllinien dagegen wurde die Blockade der RNA-Elongation erst kürzlich an Plasmiden (Faria et al. 2001) und auch an chromosomal integrierten Zielsequenzen beschrieben (Faria et al. 2000).

Die Hemmung der Expression eines chromosomal integrierten Gens wurde bisher selten beobachtet. Bei endogenen Genen wurde dies am *TNF- α* -Gen (Aggarwal et al. 1996), am *GM-CSF*-Gen (Kochetkova et al. 1997), sowie am *c-myc*-Gen (Catapano et al. 2000) gezeigt. Eine Studie berichtet von der Hemmung eines chromosomal integrierten Reportergens (Faria et al. 2000).

7.2 Nachweis einer Triplehelixbildung

Die sequenzspezifische Bildung einer Triplehelix des Oligonukleotides mit seiner Zielsequenz muß nachgewiesen werden, um die Spezifität eines biologischen Hemmeffektes zu bestätigen. Insbesondere die Evaluierung der selektiven Triplehelixbildung innerhalb des menschlichen Genoms im chromosomalen Umfeld ist wichtig, um das Potential einer therapeutischen Anwendung am Menschen zu demonstrieren. Daß eine chromosomal integrierte Zielsequenz für Triplehelix-Oligonukleotide zugänglich sein kann, wurde in verschiedenen experimentellen Systemen gezeigt:

Ein direkter Nachweis der spezifischen Bindung des Oligonukleotides an seine Zielsequenz wurde mittels kompetitiver PCR oder Restriktionsenzymhemmung (Giovannangeli et al. 1997) oder mittels Primerextensionexperimenten (Belousov et al. 1998, Oh et al. 1999) erbracht. Indirekte Nachweise erfolgten durch die Detektion genomischer Modifikationen (Mutationen) an der Zielsequenz, die durch Triplehelix-Oligonukleotide verursacht wurden. Solche Mutationen wurden sowohl in Zelllinien (Barre et al. 2000, Luo et al. 2000) als auch in Mäusen (Vasquez et al. 2000) festgestellt.

Eine chromosomale Bindung in einem endogenen Gen bei gleichzeitiger biologischer Effektivität eines Triplehelix-Oligonukleotides konnte allerdings bis jetzt noch nicht gezeigt werden.

8. Zelladhäsionsmoleküle

Eine der Grundlagen für die Entstehung mehrzelliger Organismen sind Mechanismen, die auf Zelladhäsion und Zellerkennung beruhen. Während der Ontogenese steuern Adhäsionsmoleküle interzelluläre Wechselwirkungen und dienen als Zellkontaktmoleküle dem Aufbau komplexer Gewebeverbände. Im erwachsenen Organismus gewährleisten Adhäsionsmechanismen einerseits die Aufrechterhaltung der morphologischen und funktionellen Integrität von Geweben und tragen andererseits zu dynamischen physiologischen Prozessen bei. Insbesondere ihre Funktion bei der Wundheilung oder Immunabwehr steht im Fokus der Forschung (Klein 1994, Gumbiner 1996).

Zelladhäsion wird durch membranständige Zelloberflächenproteine vermittelt, die mit entsprechenden Rezeptoren auf anderen Zellen oder mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix interagieren. Adhäsionsmoleküle lassen sich nach ihrer Proteinstruktur und Bindungsweise in Hauptgruppen unterteilen, unter anderem der Immunglobulin-Superfamilie, Integrine, Selektine und Cadherine (Elangbam et al. 1997, Abbildung 8, nächste Seite).

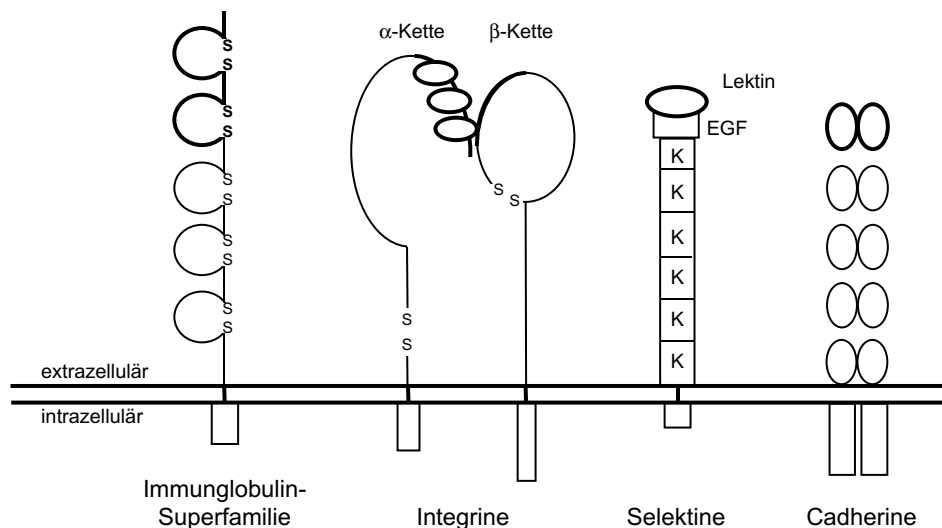


Abb. 8: Struktur von Adhäsionsmolekülen: Adhäsionsmoleküle sind transmembranäre Glykoproteine. Die für die Bindung an die entsprechenden Liganden verantwortlichen Regionen sind fett hervorgehoben. SS bedeutet Disulphidbrücke, *K* komplementbindende Domäne und *EGF* Epidermal-growth-factor-artige Domäne.

Immunglobulin-Superfamilie

Die zur Immunglobulin-Superfamilie gehörigen Moleküle zeichnen sich durch eine oder mehrere extrazelluläre Domänen aus, die den Domänen der Immunglobuline ähneln. *Immunglobulinartige* Domänen bestehen aus etwa 100 Aminosäuren und sind im wesentlichen aus zwei β -Faltblattstrukturen aufgebaut. Diese werden durch eine Disulfidbrücke in ihrer Lage zueinander stabilisiert. Die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie erfüllen Kommunikationsaufgaben im Immunsystem: Zur Immunglobulin-Superfamilie gehören der T-Zell-Antigenrezeptor, einige Proteinketten des für die T-Zell-Aktivierung wichtigen CD3-Komplexes sowie weitere Moleküle, die bei der T-Zell-Aktivierung eine Rolle spielen (CD2, Thy-1). Auch die für die differentielle Erkennung von Histokompatibilitätsmolekülen notwendigen T-Zell-Oberflächenproteine CD4 und CD8 sowie Histokompatibilitätsmoleküle (Klasse I und II, einschließlich des β_2 -Mikroglobulins) enthalten immunglobulinartige Domänen. Auch die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM und PECAM-1 gehören zur Familie der Immunglobulin-Superfamilie. Da sie als hochregulative Moleküle eine Schlüsselfunktion bei immunologischen Reaktionen spielen stellen sie ein interessantes Ziel zur Therapie von entzündlichen- und immunologisch bedingten Krankheiten dar und stehen somit stark im Fokus der Forschung.

Integrine

Integrine vermitteln Adhäsion zwischen Zellen oder zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix. Sie sind Heterodimere, die aus zwei Proteinketten (α - und β -Untereinheit) bestehen, die nichtkovalent miteinander assoziiert sind und zusammen einen funktionsfähigen Transmembranrezeptor ergeben. Ein vielen Integrinen gemeinsames Merkmal ist ihre Fähigkeit zur Bindung an Moleküle, die spezifische Aminosäureabfolgen, sogenannte RGD-Sequenzen, aufweisen, wobei die Bindungsstelle unter Beteiligung beider Integrinketten gebildet wird. Es sind zahlreiche α - und β -Ketten beschrieben worden, die vielfältig miteinander kombiniert sind und so zu einer großen Anzahl an unterschiedlichen Integrinen führt. Die Klassifizierung der Integrine erfolgt nach deren β -Untereinheit klassifiziert. Unter den β_1 - und den β_3 -Integrinen finden sich viele Zell-Matrix-Rezeptoren. Exprimiert auf fast allen Zelltypen tragen sie zur Steuerung der Morphogenese und der Wundheilung bei. Die β_2 -Integrine *LFA-1* (CD11a/CD18) und *Mac-1* (CD11b/CD18) werden ausschließlich auf Leukozyten exprimiert und sind an vielen zellvermittelten Funktionen des Immunsystems beteiligt. Insbesondere LFA-1 stellt für viele immunologische Adhäsionsvorgänge ein Schlüsselmolekül dar. Exprimiert wird LFA-1 auf Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, sowie auf T- und B-Lymphozyten. Als Bindungspartner für LFA-1 fungieren die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3. Im Gegensatz zu LFA-1 bindet Mac-1 nicht ausschließlich an die Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, sondern ist auch ein Ligand für den Komplementfaktor C3b sowie für Fibrinogen und unterstützt dadurch Mechanismen des Komplementsystems. Durch die Bindung an seinen Hauptliganden ICAM-1 sind sowohl LFA-1 als auch Mac-1 an der Extravasation chemotaktisch angelockter Leukozyten durch die Wand von Blutgefäßen beteiligt.

Selektine

Selektine sind monomere Oberflächenproteine, die an Kohlenhydratstrukturen auf anderen Zellen binden. Sie sind heterophile Adhäsionsmoleküle, deren extrazellulärer Bereich aus einer aminoterminalen Lektindomäne, einer EGF-ähnlichen Domäne und aus einer variablen Anzahl von Proteindomänen, die für komplementbindende Proteine typisch sind, besteht. Die Einteilung der Selektine erfolgt nach ihrem Hauptvorkommen: E-Selektin auf Endothelzellen, L-Selektin auf Leukozyten und P-Selektin auf Thrombozyten. Selektine vermitteln Zell-Zell-Adhäsion dadurch, daß ihre N-terminale Lektindomäne proteoglykanassoziierte Oligosaccharide auf anderen Zellen erkennt. Zu den bindungsrelevanten Zuckern gehören sialylierte und fukosylierte Saccharide (Sialyl-Le^x, Sialyl-Le^a), sowie phosphorylierte und sulfatierte Saccharide. Bei immunologischen Reaktionen sind Selektine beim Abbremsen der in den Gefäßen zirkulierenden Leukozyten beteiligt (*leukocyte rolling*, Rosen et al. 1994).

Cadherine

Die Cadherine sind eine Gruppe von Adhäsionsmolekülen, welche in der Regel stabilen Kontakt zwischen Zellen herstellen und somit an der Organisation von Geweben (Morphogenese) beteiligt sind. Dabei interagieren meist nur gleiche Cadherinmoleküle miteinander. Nach dem Prinzip eines Reißverschlusses findet die Adhäsion an benachbarte Zellen über Cadherin-Dimere statt (Gumbiner 1996). Es wurde gezeigt, daß Autoantikörper gegen ein Cadherin auf Keratinozyten an der Pathogenese blasenbildender Krankheiten (Pemphigus vulgaris) beteiligt sind (Amagai et al. 1991). Ferner wird den Cadherinen eine Bedeutung bei der Metastasierung von Tumoren zugeschrieben (Nesbit et al. 1994).

9. Das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1

9.1 Vorkommen und Regulation von ICAM-1

ICAM-1 ist auf hämatopoetischen Zellarten zu finden, unter anderen auf T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen. Im Gegensatz zu seinen Bindungspartnern LFA-1 und Mac-1 wurde ICAM-1 auch auf nichthämatopoetischen Zellen gefunden. Aufgrund dieser Gewebsverteilung kann ICAM-1 Zellkontakt unter Leukozyten und zwischen Leukozyten und anderen Zellarten vermitteln (Boyd et al. 1988, Dustin und Springer 1988, Makgoba et al. 1988, Mazerolles et al. 1994).

Leukozyten und Endothelzellen weisen eine geringe, basale Expression von ICAM-1 auf, die jedoch durch bestimmte Mediatoren auf diesen Zellen superinduziert werden kann. Auf vielen anderen Zellarten, auf denen es physiologischerweise nur in sehr geringen Mengen oder nicht nachweisbar ist, kann es durch die gleichen Mediatoren auch de novo induziert werden. Die rasche Induktion von ICAM-1 während entzündlicher Vorgänge ist ein wichtiges funktionelles Regulativ, da viele Zellarten erst durch die Induktion von ICAM-1 für die Immunüberwachung zugänglich werden. Aufgrund der geringen Basalexpression von ICAM-1 auf Keratinozyten beispielsweise können T-Zellen nicht an sie binden. Erst nach Induktion der ICAM-1-Expression wurde eine Bindung von T-Zellen an Keratinozyten festgestellt (Dustin, Singer et al. 1988), wodurch die Erkennung und Elimination viral transformierter oder maligne entarteter Zellen ermöglicht wird.

Zahlreiche ICAM-1-induzierende Faktoren sind bekannt. Dazu gehören Entzündungsmediatoren wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, IL-1, aber auch exogene Stimuli wie Phorbolster und Lipopolysaccharide und UVB-Strahlung (Dustin et al. 1986, Dustin, Singer et al. 1988, Rothlein et al. 1988, Griffiths et al. 1990, Krutmann et al. 1990, Barker et al. 1991). Umgekehrt kann die Expression von ICAM-1 durch Zytokine wie IL-10 sowie durch Glukokortikoide oder Retinoide gehemmt werden (Van de Stolpe et al. 1996). Es bestehen

Hinweise dafür, daß die ICAM-1-Induktion auf Ebene der Gentranskription angreift, da Actinomycin D, eine DNA-interkalierende Substanz, die IFN γ -induzierte ICAM-1-Expression auf Keratinozyten unterbindet.

9.2 Immunologische Funktion von ICAM-1

Eine der wichtigsten immunologischen Funktionen von ICAM-1 besteht darin Zelladhäsion zwischen Zellen des Immunsystems und anderen Zellen zu vermitteln. Dabei wird immunologische Zelladhäsion nicht als Bindung zweier Liganden aneinander verstanden, sondern als komplexe Abfolge fein abgestimmter Signalvorgänge, die eine entzündungsangepaßte Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten bewirken (Zimmermann et al. 1992, Mackay et al. 1993). Dies soll am Vorgang der Extravasation von Leukozyten aus dem Gefäßendothel erläutert werden. Dieser Prozeß erfolgt sequenziell in mehreren Schritten, die in Abbildung 9 dargestellt sind.

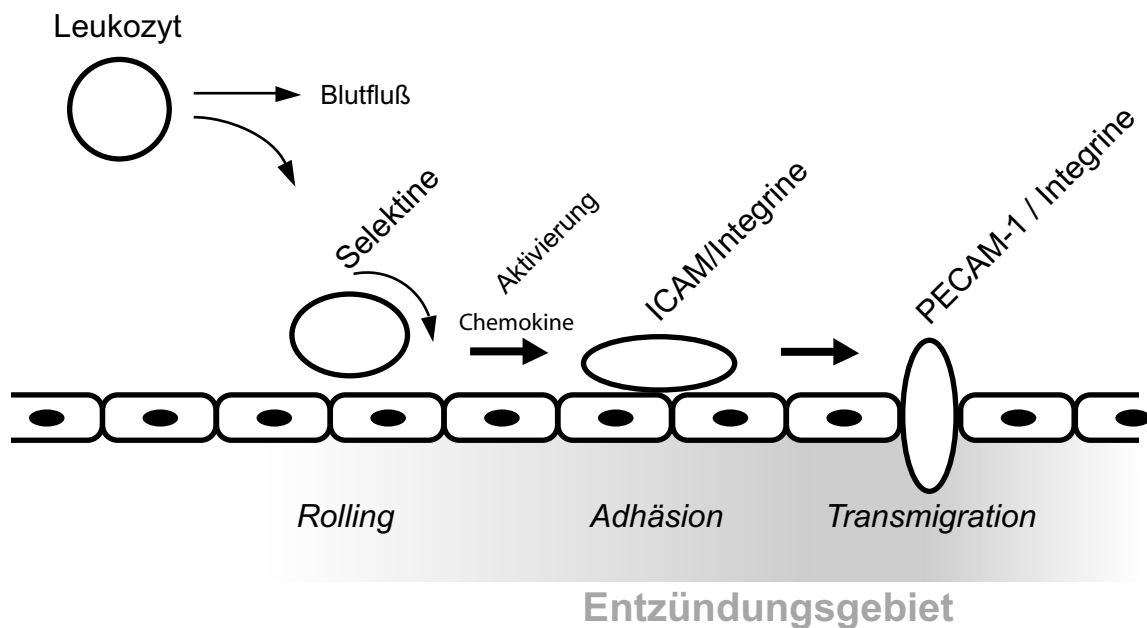


Abb. 9: Extravasation von Leukozyten. Dargestellt ist die schrittweise Extravasation von Leukozyten aus den Gefäßen von Entzündungsgebieten (grau unterlegt). Links ist die selektinvermittelte Abbremsung eines Leukozyten dargestellt, die zum Entlangrollen an der Endothelwand führt (*Rolling*). Durch das Einwirken von Entzündungsmediatoren und Chemokinen auf den Leukozyten kommt es zu dessen Aktivierung, die schließlich zur festen Anheftung (*Adhäsion*) des Leukozyten an das Gefäßendothel führt. Sie wird durch Wechselwirkung zwischen aktivierten Integrinen und Immunglobulin-Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) vermittelt. Rechts in der Abbildung ist die nachfolgende Migration des Leukozyten durch die Endothelwand in die extrazelluläre Matrix (*Transmigration*) dargestellt, die ebenfalls auf Wechselwirkung zwischen Integrinen und Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie (besonders PECAM-1) beruht.

In Entzündungsgebieten führen unterschiedliche Reize zur Exozytose von P-Selektin aus den Weibel-Palade-Körperchen. P-Selektin bindet an Oligosaccharide auf Leukozyten. Die Bindung ist nicht sehr stark, wird sehr schnell gebildet und wieder gelöst und führt so zu einem Abbremsen des Leukozyten an der Gefäßwand, das als *Leukocyte rolling* bezeichnet wird. Dieser Vorgang wird auch durch Leukozyten-Selektin (L-Selektin), das an endothelzellständige Oligosaccharide bindet, unterstützt. Im Entzündungsgebiet werden Mediatoren wie IL-8 oder Platelet activating factor gebildet, die ins Gefäßlumen gelangen und dort an Proteoglykanen auf der Oberfläche von Endothelzellen immobilisiert werden (Zimmermann et al. 1992). Die immobilisierten Entzündungsmediatoren können an ihre spezifischen Rezeptoren auf zirkulierenden Leukozyten binden. Dies ist aber erst dann möglich, wenn die Leukozyten vorher durch Selektine abgebremst wurden (Springer 1994). Die Bindung der endothelzellständigen Entzündungsmediatoren an ihre spezifischen Rezeptoren auf den Leukozyten führt durch intrazelluläre Signalübertragung zur *Aktivierung* der Leukozytenintegrine LFA-1 oder VLA-4 (Inside out signaling). Die dadurch erhöhte Affinität der Leukozytenintegrine zu ihren Endothelzellliganden ICAM-1 und VCAM-1 bewirkt eine intensivere Leukozyten-Endothelzell-Verbindung, bei der Leukozyten am Gefäßendothel immobilisiert werden (*Adhäsion*). Anschließend erfolgt die eigentliche Extravasation (*Transmigration*) des Leukozyten durch die Endothelwand, die durch Wechselwirkungen zwischen Integrinen und Immunglobulin-Adhäsionsmolekülen (besonders PECAM-1) und proteolytischen Mechanismen vermittelt wird. Die stark regelbare Expression von Integrinen ermöglicht durch sukzessive Öffnung und Lösung von Adhäsionsprozessen eine Extravasation des Leukozyten ohne daß das Blutgefäß undicht wird (Bianchi et al. 1997). Die weitere Migration des Leukozyten durch die extrazelluläre Matrix zur entzündeten Stelle wird durch eine differenzielle Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren auf den verschiedenen Leukozytentypen gesteuert, was eine gezielte Einwanderung des geeigneten Leukozytensubtyps in das entsprechende Gewebe ermöglicht.

9.3 Medizinische Bedeutung der Hemmung von ICAM-1

Da viele Zellarten erst durch die Induktion von ICAM-1 für die Immunüberwachung zugänglich werden, stellt die Hemmung von ICAM-1 einen neuen Therapieansatz bei entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen dar. Die meisten Forschungsansätze, in denen eine Hemmung der ICAM-1-Funktion angestrebt wird, dienen der Entwicklung zukünftiger Therapien von entzündlichen Erkrankungen und zur Abwehr von Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen.

9.3.1 Entzündliche Hauterkrankungen

Im Gegensatz zu Gefäßendothelien exprimieren epidermale Keratinozyten keine nennenswerten Mengen ICAM-1. In vitro kann aber die ICAM-1-Synthese de novo durch verschiedene Stimuli auf Keratinozyten induziert werden (Griffiths et al. 1989, Griffiths et al. 1990). Erst nachdem Keratinozyten ICAM-1 induzierenden Entzündungsmediatoren (vor allem IFN γ und TNF α) ausgesetzt wurden, wurde eine Bindung von T-Zellen an Keratinozyten ermöglicht (Dustin, Singer et al. 1988). Diese Bindung kann durch Inkubation von T-Zellen mit Anti-LFA-1-Antikörpern und durch Inkubation von Keratinozyten mit Anti-ICAM-1-Antikörpern weitgehend unterbunden werden (Nickoloff et al. 1988). Antikörper gegen andere auf T-Zellen und Keratinozyten vorkommende Liganden (MHC-Klasse II, LFA-3, CD2) zeigten dagegen nur geringen oder keinen Effekt, so daß man davon ausgeht, daß der Kontakt von T-Zellen mit Keratinozyten überwiegend von der ICAM-1/LFA-1-Interaktion abhängt (Dustin, Singer et al. 1988).

Bei einer Reihe entzündlicher Dermatosen, insbesondere bei allergischer Kontaktdermatitis, der atopischer Dermatitis, Psoriasis vulgaris oder Lichen simplex chronicus wurde eine erhöhte Expression von ICAM-1 immunhistologisch dokumentiert. Die Induktion des Adhäsionsmoleküls korrelierte dabei, im Gegensatz zur MHC-Klasse II-Induktion, räumlich mit dem T-Zell-Infiltrat (Singer et al. 1989).

Zur Therapie der Schuppenflechte (Psoriasis) befinden sich inzwischen verschiedene Stoffe zur Hemmung von ICAM-1 in der klinischen Prüfung: Ein monoklonaler Antikörper gegen die α -Kette des ICAM-1-Liganden LFA-1 (Efalizumab, XanelimTM) wird zur Zeit in Phase III-Studien getestet. Durch die Bindung des Antikörpers wird die ICAM-1-vermittelte Adhäsion verhindert. Erste Resultate zweier Studien wurden 2001 am „Second Joint Meeting of the International Psoriasis Symposium and European Congress on Psoriasis“ in San Francisco vorgestellt. Dabei zeigten Patienten mit mäßiger bis starker Plaque-Psoriasis, denen der Antikörper über 12 Wochen subkutan gespritzt wurde, eine 75%ige Verbesserung gegenüber der Plazebo-Kontrolle. Bei Patienten mit milder bis mäßiger Plaque Psoriasis befindet sich die topische Formulierung eines Antisense-Oligonukleotides gegen ICAM-1 in der klinischen Erprobung. Kürzlich wurden Phase II-Studien eingeleitet, nachdem eine Hemmung von ICAM-1 an SCID-Mäusen mit transplantiertem menschlicher Haut erzielt wurde (Mehta et al. 2000). Erste Ergebnisse zeigten eine hohe Oligonukleotid-Konzentration auf der Haut nach topischer Anwendung. Systemische Applikation durch intravenöse Infusion zeigte dagegen nur eine geringe Oligonukleotid-Konzentration in der Haut, und eine nur schwache Wirkung bei Psoriasis-Patienten.

9.3.2 Andere entzündliche Erkrankungen

Zur Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen (Morbus Crohn) werden Antisense-Oligonukleotide gegen ICAM-1 getestet. Ein plazebokontrollierter klinischer Versuch bei Morbus-Crohn-Patienten zeigte eine Verbesserung im Vergleich zum Plazebo. Die Kortikoidgabe konnte durch die Verabreichung des Oligonukleotides gesenkt werden. Dabei wurde das Oligonukleotid intravenös verabreicht (Yacyshyn et al. 1998).

Weitere Untersuchungen mit Antisense-Oligonukleotiden oder Antikörpern gegen ICAM-1 wurden auch bei entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Kavanaugh et al. 1994), Pneumonien (Kumasaka et al. 1996), und Colitis (Bennett et al. 1997) untergenommen.

9.3.3 Abwehr der Abstoßung von transplantierten Organen

Abstoßungsreaktionen stellen eine Antwort des Immunsystems auf körperfremde Stoffe dar, an der ICAM-1 beteiligt ist. So sind chronisch-irreversible Abstoßungsprozesse nach Organtransplantationen von einer hohen ICAM-1-Expression begleitet. Nach Lebertransplantationen markiert z.B. die Induktion des Moleküls in den perivenulären Hepatozyten oder dem Endothel des Organs den Beginn einer Immunantwort. Transplantierte Patienten zeigen bei einer Abstoßungsreaktion erhöhte Serumwerte an löslichem ICAM-1 (sICAM-1, Bricio et al. 1996). Eine Hemmung von ICAM-1 könnte daher die Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen senken. Im Tiermodell konnte dies mit Antikörpern gegen ICAM-1 oder dessen Liganden LFA-1 gezeigt werden (Miwa et al. 1997). Eine Studie an 262 Patienten nach Nierentransplantation mit einem Antikörper gegen ICAM-1 ergab allerdings keine reduzierte Abstoßungsrate im Vergleich zum Plazebo (Salmela et al. 1999). Mit Antisense-Oligonukleotiden gegen ICAM-1 dagegen wurde am Tiermodell gezeigt, daß die Zeit bis zur Abstoßung eines Transplantats verlängert werden kann (Stepkowski et al. 1997). Die Wirkstärke war dabei ähnlich gut oder etwas besser als klassische Immunsuppressiva wie Ciclosporin A oder Rapamycin, wobei ein synergistischer Effekt bei der Kombination mit diesen beobachtet wurde. Besonders effektiv war eine Kombination des Antisense-Oligonukleotides mit einem Antikörper gegen LFA-1 (Stepkowski et al. 1998, Stepkowski et al. 1994).

9.4 Die Proteinstruktur von ICAM-1

Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) ist ein Zelloberflächenglykoprotein, dessen Molekulargewicht sich, abhängig von gewebsspezifischer Glykosylierung, zwischen 76 und 114 kD bewegt (Abbildung 10).

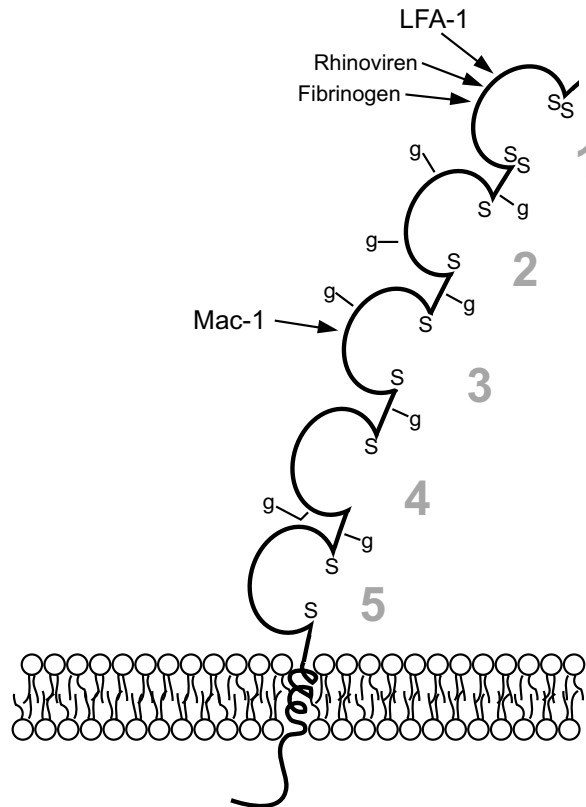


Abb. 10: Das Protein ICAM-1. Das Protein ICAM-1 hat eine angelrutenartige Struktur und ist 18,7 nm lang. Es besteht aus fünf immunoglobulinartigen Domänen (grau numeriert), einem hydrophoben transmembranären und einem kurzen intrazellulären, C-terminalen Abschnitt. Jede Domäne enthält etwa 90-100 Aminosäuren, die aus zwei antiparallelen β -Ketten bestehen. Alle Domänen (mit Ausnahme der vierten) werden durch Disulfidbrücken hochkonservierter Cysteine gebildet (mit S symbolisiert). Glykosylierungsstellen sind mit g bezeichnet, die Bindungsstellen für die wichtigsten Liganden sind mit Pfeilen markiert.

ICAM-1 besteht aus 505 Aminosäuren, wobei 453 Aminosäuren für die fünf immunoglobulinähnlichen Domänen des extrazellulären Bereichs, 24 Aminosäuren für den transmembranären Bereich und 28 Aminosäuren für den kurzen zyttoplasmatischen Bereich kodieren. Die Epitope für die Liganden LFA-1 und Fibrinogen befinden sich auf der N-terminalen Domäne, das Epitop für Mac-1 auf der dritten Domäne. Ein weiterer Ligand für ICAM-1 ist Hyaluronan. Zusätzlich nützen verschiedene fremde Pathogene ICAM-1 als Bindungspartner auch für ihre Anheftung mit nachfolgender Infektion. So enthält ICAM-1 auch Epitope für Rhinoviren, Coxsackie A13-Viren und malarieinfizierte Erythrozyten.

9.5 Die Genstruktur von ICAM-1

Das ICAM-1-Gen besteht aus 7 Exons, die von 6 Introns unterbrochen sind (Abbildung 11).

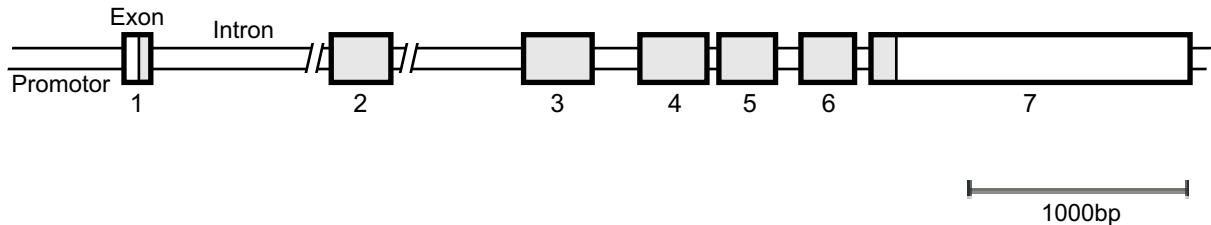


Abb. 11: Das Gen ICAM-1. Proportionale Darstellung des ICAM-1 Gens, wobei Exons als nummerierte Kästchen hervorgehoben sind. Zum Zeitpunkt der Arbeit nicht veröffentlichte Bereiche im ersten und zweiten Intron sind mit Schrägstrichen gekennzeichnet. Die Gesamtlänge des ersten Introns beträgt etwa 4 kb, das zweite Intron ist länger als 2,6 kb. Der translatierte Bereich ist grau, nicht translatierte Bereiche weiß dargestellt.

Außer einigen geringfügigen Überschneidungen wird jede immunglobulinartige Domäne des Proteins von einem der etwa 300 bp langen Exons kodiert (Degitz et al. 1991). So entsprechen die extrazellulären Domänen 1-5 den Exons 2-6, während der transmembrane und intrazelluläre Teil des Proteins von Exon 7 kodiert wird (Voraberger et al. 1991). Die starke Korrelation zwischen genomischer Organisation und der Unterteilung des Proteins in Domänen ist typisch für die Immunglobulin-Superfamilie (Staunton et al. 1988).

Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Bezeichnung	Quelle
7-Amino-Actinomycin (7-AAD)	BD Biosciences (Heidelberg)
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Qbiogene (Heidelberg)
Acrylamid:Bisacrylamid 29:1 zur Sequenzierung	Biorad (München)
Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
Antifadelösung (DAKO)	DAKO (Carpinteria, USA)
Aqua bidest (Ampuwa™)	Fresenius (Bad Homburg)
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase, Fab-Fragment	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ammoniumpersulfat (APS) zur Sequenzierung	Amresco (Ohio, USA)
Blocking-Reagent	Roche Diagnostics (Mannheim)
CSPD™-Substrat	Roche Diagnostics (Mannheim)
DAC-30™ zur Transfektion	Eurogentec (Heidelberg)
DIG Easy Hyb	Roche Diagnostics (Mannheim)
DNA-Längenstandard (Smart Ladder)	Eurogentec (Heidelberg)
Formamid zur Sequenzierung	Amresco (Ohio, USA)
Interferon gamma	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Luria Broth-Agar	Life Technologies (Karlsruhe)
Luria Broth-Medium	Life Technologies (Karlsruhe)
Lichrosolv™-Wasser zur Sequenzierung	Merck Eurolab (Darmstadt)
Lipofectin™	Life Technologies (Karlsruhe)
Reporter Lysis Buffer	Promega (Mannheim)
Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Roche Diagnostics (Mannheim)
Superfect™	Qiagen (Hilden)
TBE-Pulver zur Sequenzierung	Amresco (Ohio, USA)
Tetramethylenethyldiamin (TEMED) zur Sequenzierung	Amresco (Ohio, USA)

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden entweder von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder von Merck Eurolab (Darmstadt) bezogen und waren von analytischem, beziehungsweise molekularbiologischem Reinheitsgrad.

1.2 Enzyme

1.2.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von Roche Diagnostics (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), MBI Fermentas (St.Leon-Rot) oder von Hybaid-AGS (Heidelberg) bezogen.

1.2.2 Sonstige Enzyme

Bezeichnung	Quelle
Alkalische Phosphatase aus Garnelen	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Klenow Fragment der DNA Polymerase I	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase (proofreading Polymerase)	peqlab (Erlangen)
T4 DNA Ligase	Promega (Heidelberg)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	peqlab (Erlangen)
Terminale Transferase	Roche Diagnostics (Mannheim)

1.3 Antikörper

Spezifität	Markierung	Quelle
Menschliches ICAM-1	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)	MedSystems Diagnostics (Wien, Österreich)
Menschliches HLA-DR	R-Phycoerythrin (PE)	BD Biosciences (Heidelberg)
Maus-IgG1	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)	Beckmann Coulter (Unterschleissheim-Lohhof)
Maus-IgG1	R-Phycoerythrin (PE)	BD Biosciences (Heidelberg)

1.4 Plasmide

Ausgangsplasmide zur Klonierung von Reporterplasmiden waren pCATTM-Basic und pSVTM- β -Galactosidase Control (Promega, Heidelberg). Ein ICAM-1-cDNA-Plasmid (pG4H1), bestehend aus pGEMTM-4Z (Promega, Heidelberg), in das ein 2980 bp-Fragment der ICAM-1-cDNA mittels *EcoRI* und *SalI* einkloniert wurde, stammte von Staunton et al. 1988.

1.5 Biologisches Material

1.5.1 Prokaryote Zellen

Zur Plasmidvermehrung wurden *Escherichia coli* (Stamm *DH5 α*) verwendet.

1.5.2 Eukaryote Zellen

Alle Versuche erfolgten an A431 Zellen, die von ATCC (Rockville, Maryland, USA) bezogen wurden.

1.6 Medien und Medienzusätze zur Kultivierung eukaryoter Zellen

Bezeichnung	Quelle
Amphotericin B	Life Technologies (Karlsruhe)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Life Technologies (Karlsruhe)
Fötale Kälberserum (FKS)	ccpro (Neustadt/Weinstraße)
Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS)	Life Technologies (Karlsruhe)
L-Glutamin	Life Technologies (Karlsruhe)
Penicillin	Life Technologies (Karlsruhe)
Streptomycin	Life Technologies (Karlsruhe)
Trypsin(0,25%)/EDTA(1mM)	Life Technologies (Karlsruhe)

1.7 Oligonukleotide

1.7.1 Triplehelix- und Kontroll-Oligonukleotide

Triplehelix-Oligonukleotide und Kontroll-Oligonukleotide waren an den Enden modifiziert und wurden von Qbiogene (Heidelberg) bezogen. Eine Ausnahme bilden Triplehelix-Oligonukleotide aus 5-Propynyluracil und 5-Methylcytosin, die von Eurogentec (Heidelberg) bezogen wurden. Alle Oligonukleotide sind tabellarisch aufgeführt. Bei den Triplehelix-Oligonukleotiden ist die Nummer der entsprechenden Zielsequenz im ICAM-1-Gen in der rechten Spalte aufgeführt, während bei den Kontroll-Oligonukleotiden das entsprechende Triplehelix-Oligonukleotid aufgeführt ist. Alle Zielsequenzen mit deren Position im ICAM-1-Gen sind im Ergebnisteil (Abschnitt 1.1, Seite 56) tabellarisch aufgelistet. Die Basenbezeichnungen in den Tabellen sind A für Adenin, G für Guanin, U für 5-Propynyluracil und C für 5-Methylcytosin.

Triplehelix-Oligonukleotide

Bezeichnung	5'-Modifikation	Sequenz (5' nach 3')	3'-Modifikation	ICAM-1 Zielsequenz
TFO17GA	Psoralen	GAAGGAGGGGAAGGGGGG	Triethylenglykol	17
TFO17GT	Psoralen	GTTGGTGGGTTGGGGGG	Triethylenglykol	17
TFO13GT	Triethylenglykol	GGTTTGTGTGTGGGT	Psoralen	13
bTFO13GT	Biotin	GGTTTGTGTGTGGGT	Psoralen	13
bTFO13CU	Psoralen	UCCUCUCUCUUUCC	Biotin	13

Kontroll-Oligonukleotide

Bezeichnung	5'-Modifikation	Sequenz (5' nach 3')	3'-Modifikation	TFO
COsc1GT	Psoralen	GGTGTGGGGTGGTGGGT	Triethylenglykol	TFO17GT
COsc2GT	Triethylenglykol	TGTGGGTGTTGGTGT	Psoralen	TFO13GT
bCOsc2GT	Biotin	TGTGGGTGTTGGTGT	Psoralen	bTFO13GT
bCOinvCU	Psoralen	CCUUUCUUCUCCCU	Biotin	bTFO13CU

1.7.2 Zur Herstellung von Zielsequenzen eingesetzte Oligonukleotide

Oligonukleotide, die zur Herstellung von doppelsträngigen Zielsequenzen verwendet wurden, wurden von Metabion (München) oder MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen und waren nicht modifiziert. Die Zielsequenzen wurden entweder zur Herstellung einer Triplehelixbindungsstelle bei der Klonierung von Plasmiden verwendet oder in Gel-retardationsexperimenten eingesetzt.

Zielsequenz	Sequenz (5' nach 3')	Typ	Verwendung
13	CACACCTTTCTTCTCTCCCTAGTC GACTAGGGAGAGAAGAAAGGTGTG	Strang Gegenstrang	Gelretardationen
13	CCTTTCTTCTCTCCCTAGTCCAGGT CTAGACCTGGACTAGGGAGAGAAGAAAGGTGCA	Strang Gegenstrang	Klonierung
17	CTTATTCCTCCCTTCCCCCAT CTAGATGGGGGAAGGGAGGAATAAGTGCA	Strang Gegenstrang	Gelretardationen und Klonierung
17	GGCCTTATTCCTCCCTTCCCCCAAACCTG CAGTTTTGGGGGAAGGGAGGAATAAGGCC	Strang Gegenstrang	Gelretardationen

1.7.3 Als Primer verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide, die als Primer in PCR- oder Sequenzierreaktionen eingesetzt wurden, sind nachstehend aufgelistet. Bezugsquellen waren Metabion (München) oder MWG-Biotech (Ebersberg).

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	Primertyp
pSV 324	TTTATTTATGCAGAGGCCGAGG	vorwärts
pCM51-250	ATTCCGGATGAGCATTTCATCAG	rückwärts
ICAM-3334	CCCAAGGGCTGGAGCTGTTT	vorwärts
ICAM-4019	GCGCCGGAAAGCCTGGAATA	rückwärts
ICAM-3526	AGGCTGCTGAGT	vorwärts
ICAM-3614	GCAGACAGGGAT	rückwärts
ICAM-3555	TCGCAGGAGGGGGAATGAAATG	vorwärts
ICAM-3679	GGACCCGGGGCTGACAAGTT	rückwärts
ICAM-2013	ATTGGGTATGCTGAGGCC	vorwärts
ICAM-2649	ACTGCAGGAACTGGAGC	rückwärts
ICAM-1815	GGCCATGGTACCTGCACA	vorwärts
ICAM-2308	GGCACTCTCCTGCAGTGT	rückwärts
ICAM-3102	GAACTGGCACCCCTCCCCTCTT	vorwärts
ICAM-3490	CCGGGGCCACACCCATCTCAA	rückwärts
ICAM-1813	CCAGTCGACGCTGAGCTCCTCT	vorwärts
ICAM-2612	CCTCTTCCCTAGCTGGGCTGGA	rückwärts

1.8 Kommerzielle Komplettsysteme

Bezeichnung	Quelle
BCA Protein Assay Kit	Pierce (Rockford, Illinois, USA)
Blood & Cell Culture DNA Kit	Qiagen (Hilden)
CAT-Elisa	Roche Diagnostics (Mannheim)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics (Mannheim)
DIG Gel Shift Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
DNA Sequencing Kit	Perkin-Elmer (Überlingen)
DNeasy™ Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep™ Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep™ Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep™ Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)

1.9 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Quelle
CentriSep™ -Säulen	Perkin-Elmer (Überlingen)
DIG Easy Hyb Granules	Roche Diagnostics (Mannheim)
Einmalpipetten 5, 10, 25ml	Greiner (Frickenhausen)
Einmalreaktionsgefäße (1,5ml; 2,2ml)	Eppendorf (Hamburg)
Einmalreaktionsgefäße (15ml; 50ml)	Falcon (Heidelberg)
Einmalspritzen	GLW (Würzburg)
Filterpapier	Whatman (Maidstone, UK)
Kryoröhrchen	Falcon (Heidelberg)
Küvetten, 1ml	Sarstedt (Nürnberg)
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Diagnostics (Mannheim)
Objektträger	Schubert und Weiss (München)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
PCR Mikroreaktionsgefäße (0,5ml)	peqlab (Erlangen)
Petrischalen (für Bakteriologie)	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	peqlab (Erlangen)
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL™)	Amersham (Braunschweig)
Sterilfilter (0,2µm; 0,45µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Streptavidinbeads (Dynabeads M-280™)	Dynal (Hamburg)
Zellkulturflaschen (Fläche 75cm ²)	Nunc (Wiesbaden)
Zellkulturlochplatten (6-; 24-Well)	Nunc (Wiesbaden)
Zellschaber	Costar (Bodenheim)

1.10 Geräte

Bezeichnung (Markenname)	Quelle
CO ₂ -Inkubator (Heracell™)	Heraeus (Hanau)
Elektrophoresekammern und Zubehör	Biorad (München)
Elektroporator (Gene Pulser™ 2)	Biorad (München)
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop™)	Zeiss (Jena)
Hybridisierungssofen (400 HY-E™)	Bachofer (Reutlingen)
Magnetständer (MPC-E)	Dynal (Hamburg)
PCR-Gerät (GenAmp™ 9700)	Perkin Elmer (Überlingen)
Photometer (SmartSpec™ 3000)	Biorad (München)
Schwenker (Swip™-KL2)	Bühler (Hechingen)
Sequenzierautomat (ABI PRISM™-373)	Perkin Elmer (Überlingen)
Speedvac (univapo™ 150 H)	Uniequip (München)
Sterilwerkbank (Herasafe™)	Heraeus (Hanau)
Thermomixer (5436)	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge (5415 C)	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge, gekühlt (5810 R)	Eppendorf (Hamburg)
UV-Crosslinker	Amersham (Braunschweig)
UV-Transilluminator (GelDoc 2000™)	Biorad (München)
UVA-Lampe (2mW, PUVA-200™)	Waldmann (Villingen-Schwenningen)
UVA-Lampe (5mW, Supersun 5000™)	Mutzhas (München)
Zentrifuge, mitteltourig, gekühlt (RC5B)	Sorvall (Bad Homburg)
Zentrifugenrotoren (F16/250; SS34)	Sorvall (Bad Homburg)

1.11 Software

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
ABI PRISM Sequencing Analysis™	Sequenzanalyse	Perkin Elmer (Überlingen)
CELLQuest™	Durchflußzytometrie	BD Biosciences (Heidelberg)
EditSeq™	DNA-Analyse	DNASar (Madison, WI, USA)
MapDraw™	DNA-Analyse	DNASar (Madison, WI, USA)
Quantity One™	Densitometrie	Biorad (München)

2. Methoden

2.1 DNA-Techniken

2.1.1 Allgemeine Handhabung von Nukleinsäuren

2.1.1.1 DNA-Aufreinigung durch Phenolextraktion

Die Aufreinigung von DNA aus proteinhaltigen Lösungen erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumens einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (Volumenverhältnis 25:24:1). Nach Durchmischung und Zentrifugation (1 min, 13.000 Upm, RT) wurde die DNA-haltige, obere, wäßrige Phase abgenommen. Der Extraktionsschritt wurde einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA mit Ethanol.

2.1.1.2 DNA-Fällung

Nukleinsäuren in Lösung wurden durch Zugabe von 0,1 Vol. einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und von 2,2 Vol. Ethanol gefällt (mind. 30 min, -70 °C). Das Präzipitat wurde sedimentiert (15 min, 13.000 Upm, 4°C) und mit 70 % Ethanol gewaschen, um Verunreinigungen durch Salze zu entfernen. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in einem geeigneten Volumen von destilliertem Wasser aufgenommen.

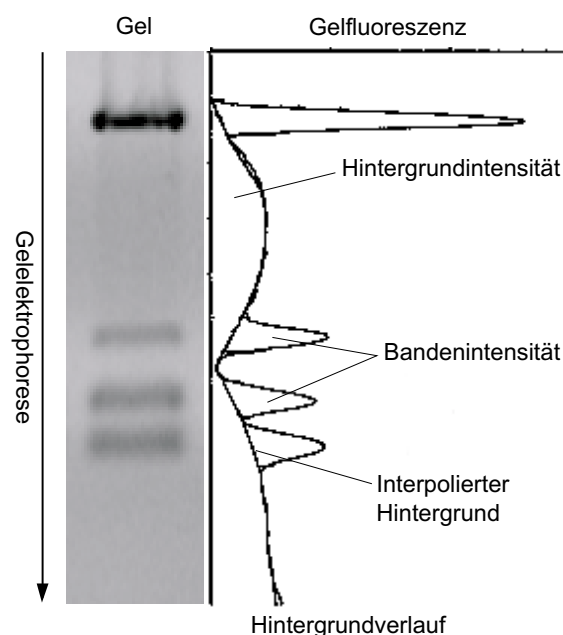
2.1.1.3 Gelelektrophorese mit Agarosegelen

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden horizontale, nicht denaturierende Agarosegele verwendet. Die Agarosekonzentration betrug in der Regel 1,0 %, bei der lineare DNA-Fragmente mit einer Länge von 0,2 bis 10 kb aufgetrennt werden. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA pH 8,0) durchgeführt. Die Agarose wurde in der gewünschten Konzentration in TBE-Puffer gegeben und durch Erhitzen im Mikrowellenherd geschmolzen. Nach Abkühlung der Lösung auf etwa 50 °C wurde das Gel gegossen, nach Erkalten mit TBE-Puffer überschichtet und die zu analysierende DNA-Probe in Auftragungspuffer (5 % Bromphenolblau; 5 % Xylencyanol; 10 % Sucrose) in die Geltaschen einpipettiert. Die Sucrosekonzentration des Auftragungspuffers erleichtert durch ein höheres spezifisches Gewicht die Einbringung der Probe in die Geltaschen. Die Elektrophorese erfolgte abhängig von der zu trennenden Fragmentlänge für 30 bis 90 min bei einer Spannung von 10 V/cm. Nach dem Lauf wurde das Gel in eine wäßrige Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gegeben. Ethidiumbromid lagert sich in Nukleinsäuren ein und fluoresziert bei 302 nm, so daß DNA-Fragmente unter UV-Licht als Bande sichtbar werden. Nach einer Einwirkdauer von 10 min wurde das Gel für 20 min in Wasser gegeben um nicht interkaliertes Ethidiumbromid zu entfernen. Anschließend wurde das Gel bei 302 nm im UV-Transilluminator mit Hilfe einer Digitalkamera mit Orangefilter fotografiert.

2.1.1.4 Densitometrische Auswertung von DNA-Banden

Anhand der Fluoreszenzintensität elektrophoretisch aufgetrennter, ethidiumbromid-gefärbter DNA-Fragmente kann auf die DNA-Menge geschlossen werden. Die Analyse der Fluoreszenzintensität erfolgte mit dem Programm *Quantity One*TM. Zur exakten Bestimmung der Intensität der DNA-Banden wurde der Intensitätsverlauf des Hintergrundes im Gel ermittelt. Anschließend wurde die Intensität der DNA-Banden um die Hintergrundintensität korrigiert (Abbildung 12). Die Helligkeit des Gelfotos wurde so gewählt, daß der Bereich zwischen Minimal- und Maximalfluoreszenz innerhalb des Meßbereichs der Auswertungssoftware war.

Abb. 12: Densitometrische Auswertung von DNA-Banden. Links ist die elektrophoretische Auftrennung einer DNA-Probe in vier Banden dargestellt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurde die Stärke der Fluoreszenz (Intensität) ermittelt. Der Verlauf der Intensität im Gel ist rechts als Diagramm dargestellt, in dem die DNA-Banden als Peaks sichtbar werden. Da ein ethidiumbromidgefärbtes Gel neben diesen Peaks auch eine Hintergrundintensität aufweist, muß diese ermittelt und von der gemessenen Intensität der Peaks abgezogen werden. Zur Feststellung der Hintergrundintensität wurde der Fluoreszenzverlauf des gesamten Gels gemessen. Anhand dieses Verlaufs wurde der Hintergrund an den Peaks interpoliert (Hintergrundverlauf). Die Differenz zwischen Peak und Hintergrund entspricht der durch die DNA hervorgerufenen Fluoreszenz (Bandenintensität) und damit der DNA-Menge.



2.1.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits*. Der Bereich des Agarosegels, welcher das zu isolierende Fragment enthielt, wurde ausgeschnitten, zerkleinert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und nach Zugabe der dreifachen Menge an Lösungspuffer bei 50 °C geschmolzen. Die Lösung wurde auf eine *QIAquick*-Säule aufgebracht und die Säule 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Zum Waschen der an die Säule gebundenen DNA wurden 750 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und nach Inkubation (5 min) bei Raumtemperatur zweimal für 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte nach Inkubation (1 min) mit 30 µl destilliertem Wasser durch erneute Zentrifugation (13.000 Upm) in ein neues 1,5 ml-Gefäß.

2.1.1.6 DNA-Aufreinigung mit Silikatmembranen

Zur Trennung der DNA von Enzymen, Salzen und Nukleotiden wurden Silikatmembran-Säulen verwendet. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren bei Anwesenheit kaotroper Salze und bei saurem pH-Milieu an Silikate zu binden. Im Bereich unter pH 7,5 wird etwa 95 % der DNA an die Silikatmembran adsorbiert, im alkalischen Bereich und bei niedrigen Salzkonzentrationen (destilliertes Wasser) löst sich die DNA wieder von der Membran ab. Diese unterschiedliche Affinität wird unter Verwendung entsprechender Puffer ausgenützt.

Zur Aufreinigung von DNA-Lösungen wurde der *QIAquick PCR Purification* Kit verwendet. Dabei wurde die aufzureinigende DNA-Lösung mit dem fünffachen Volumen eines Puffers mit hoher Salzkonzentration (Zusammensetzung als Bestandteil des *QIAquick PCR Purification* Kits nicht bekanntgegeben) vermischt, auf eine *QIAquick*-Säule aufgetragen und die Säule für 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Waschen und Elution der an die Säule gebundenen DNA erfolgte in der gleichen Weise wie bei der Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Abschnitt 2.1.1.5, vorherige Seite).

2.1.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde UV-spektralphotometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine Extinktion von 1,0 einer Konzentration von etwa 50 µg doppelsträngiger DNA, 40 µg einzelsträngiger DNA oder 20 µg Oligonukleotid pro ml. Die Bestimmung des Verhältnisses der Extinktionen bei 260 und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) erlaubt eine Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäurelösung. Lösungen in denen sich keine signifikanten Phenol- oder Protein-Reste befinden, ergeben ein Extinktionsverhältnis von 1,8 bis 2,0.

2.1.2 Präparation genomischer DNA aus A431-Zellen

Im allgemeinen wurde zur Präparation von genomischer DNA und zur Isolierung von DNA aus Zellkernen Anionenaustauscher-Säulen verwendet, mit denen genomische DNA in hoher Qualität mit Fragmentlängen zwischen 20.000 und 150.000 bp gewonnen werden kann.

In einigen Experimenten, insbesondere bei der Präparation genomischer DNA aus Zellen oder Zellkernen die mit Triplehelix-Oligonukleotiden behandelt worden waren, wurden Silikatmembran-Säulen verwendet, die DNA mit einer kürzeren Fragmentlänge (durchschnittlich 30.000 bp) liefern.

2.1.2.1 Präparation genomischer DNA mit Anionenaustauscher-Säulen

80 % konfluente Zellen aus zwei 150 cm²-Zellkulturflaschen wurden trypsinisiert, zentrifugiert (5 min, 1.000 Upm, 4 °C), zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄/7H₂O; 1,4 mM KH₂PO₄) gewaschen und in 2 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 2 ml eiskalter Lysepuffer 1 (1,28 M Sucrose; 40 mM TrisHCl, pH 7,5; 20 mM MgCl₂; 4 % Triton X-100) und 6 ml eiskaltes destilliertes Wasser zugegeben. Die Mischung wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Unter diesen (hypotonen) Bedingungen erfolgt die Lyse der Zellen. Danach wurden die Zellkerne pelletiert (15 min, 4.000 Upm, 4 °C) und mit einer Mischung aus 1 ml Lysepuffer 1 und 3 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Präparation von DNA aus Zellkernen erfolgte durch Zugabe von 5 ml Lysepuffer 2 (800 mM GuanidinHCl; 30 mM TrisHCl, pH 8,0; 30 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 % Triton X-100) und 500 µl Protease K (20 µg/µl). Bei der Inkubation (60 min bei 50 °C) erfolgt die Lyse der Zellkerne und der Abbau von Proteinen des Zellkerns durch die Protease. Zellkernreste wurden durch Zentrifugation (10 min bei 8.000 Upm) entfernt. Das Lysat wurde anschließend auf eine mit 4 ml Equilibrierungspuffer (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % Isopropanol; 0,15 % Triton X-100) equilibrierten *Qiagen Genomic-tip 100/G*-Säule (Anionenaustauscher-Säule) gegeben. Nach Abtropfen des Lysats wurde zweimal mit 7,5 ml Waschpuffer (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % Isopropanol) gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der an die Säule gebundenen DNA mit 5 ml 55 °C-warmen Elutionspuffer (1 M NaCl; 50 mM TrisHCl, pH 8,5; 15 % Isopropanol). Die eluierte DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und über Nacht in 100 µl destilliertem Wasser gelöst.

2.1.2.2 Präparation genomischer DNA mit Silikatmembran-Säulen

Silikatmembran-Säulen wurden zur DNA-Präparation aus Zellen oder aus Zellkernen eingesetzt, die mit Triplehelix-Oligonukleotiden versetzt wurden. Hierzu wurde der *Blood & Cell Culture DNA Kit* (Qiagen) verwendet. Wenn DNA aus Zellen isoliert wurde, dann wurden subkonfluente Zellen einer 3,5 cm-Schale nach Trypsinisierung zentrifugiert (5 min, 1.000 Upm, 4 °C), zweimal mit 1 ml eiskalten PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert. Wenn DNA aus Zellkernen isoliert wurde, dann wurden die Zellkerne von 500.000 Zellen pelletiert (15 min, 4.000 Upm, 4 °C) und in 200 µl eiskalten PBS aufgenommen.

Die Lyse der Zellen oder Zellkerne erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer und 20 µl Protease K. Nach Durchmischung bis zur Homogenität wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurden 200 µl Ethanol (100 %) zugegeben, die Mischung auf eine Silikatmembran-Säule (*DNeasy*-Säule) gegeben und zentrifugiert (1 min, 8.000 Upm, RT). Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 500 µl Waschpuffer 1 (1 min, 8.000 Upm,

RT) und anschließend mit 500 µl Waschpuffer 2 (3 min, 14.000 Upm, RT) gewaschen. Danach erfolgte die Elution mit zweimal 100 µl destilliertem Wasser pH 9,0 (1 min, 8.000 Upm, RT). Das Eluat wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge auf 40 µl eingengt. Die Zusammensetzungen der Puffer sind als Bestandteil des *Blood & Cell Culture DNA Kits* nicht bekannt gegeben.

2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Herstellung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR, Saiki et al. 1988) eingesetzt. Mit dieser Methode läßt sich ein definierter DNA-Abschnitt einer vorgegebener DNA (*Template-DNA*), gezielt vervielfältigen. Dies wird durch den Einsatz zweier Oligonukleotide (*Primer*) erreicht, deren Sequenz so gestaltet ist, daß sie sich an den Enden des DNA-Abschnittes in der *Template-DNA* anlagern. Zur Vervielfältigung wird eine hitzestabile DNA-Polymerase eingesetzt, die den Gegenstrang einzelsträngiger, denaturierter *Template-DNA* synthetisiert. Die Synthese kann nur stattfinden, wenn die DNA am Synthesestart doppelsträngig vorliegt. Bei einer geeigneten Temperatur wird die Anlagerung der Primer ermöglicht und die Polymerase kann den Abschnitt zwischen diesen Stellen synthetisieren. Alle Reagentien werden in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und allein durch die Wahl der Temperatur können die einzelnen Reaktionsschritte gesteuert werden: Durch Erhitzen wird die *Template-DNA* denaturiert, durch ein leichtes Erniedrigen der Temperatur wird eine Anlagerung der Primer ermöglicht und anschließend erfolgt die Synthese des Gegenstranges bei einer für die Polymerase optimalen Temperatur. Durch Wiederholung dieser drei Temperaturschritte (*Zyklus*) wird die Synthese erneut durchgeführt. Da bei jedem Syntheseschritt auch die Menge an vorgegebener DNA erhöht wird, steigt mit jedem Zyklus die Kopienzahl des DNA-Abschnitts exponentiell an und ermöglicht so die Herstellung großer Mengen eines DNA-Abschnittes aus einer sehr kleinen Menge an vorgegebener DNA.

Im allgemeinen wurde die PCR in einem Reaktionsvolumen von 30 µl mit 400 nM Primer, 200 µM dNTPs und 2 U *taq*-Polymerase in einem PCR-Puffer (20 mM TrisHCl, pH 8,55; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) durchgeführt. Die Konzentration von MgCl_2 wurde in Vorversuchen für die jeweiligen Primer optimiert und in Konzentration zwischen 0,5 und 2,5 mM eingesetzt. Die Zykluszahl richtete sich nach dem Ziel des Experiments und nach der Art der *Template-DNA*. Genomische DNA wurde mit 30-35 Zyklen, Plasmid-DNA mit 10-15 Zyklen amplifiziert. Die als Primer verwendeten Oligonukleotide sind im Materialenteil (Abschnitt 1.7.3, Seite 28) aufgeführt.

2.1.4 Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin (DIG)

2.1.4.1 Interne Markierung von Nukleinsäuren

Intern markierte Nukleinsäuren wurden als Sonden in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt (Methodenteil, Abschnitt 2.1.6, Seite 37). Die Markierung mit Digoxigenin erfolgte durch den Einbau DIG-markierter Nukleotide (DIG-11-dUTP) in einer PCR-Reaktion (Markierungsreaktion). Als Ausgangsmaterial diente ein DNA-Fragment, das aus genomischer DNA mit Hilfe einer PCR-Reaktion hergestellt wurde. Um Amplifikationsfehler bei der Herstellung dieses Fragmentes zu vermeiden, die sich auf die Hybridisierungseigenschaften der Sonde auswirken können, wurde eine *proof-reading*-Polymerase (*pwo*-Polymerase) eingesetzt.

Die Herstellung des DNA-Fragmentes erfolgte mit 600 nM der Primer ICAM-3334 und ICAM-4019, 200 µM dNTPs und 2,5 U *pwo*-Polymerase in einem Puffer von 10 mM TrisHCl, pH 8,8; 5 mM (NH₄)₂SO₄; 25 mM KCl und 0,5 mM MgSO₄ bei 30 Zyklen (15 s/94 °C, 30 s/61 °C, 3 min/72 °C). Dabei wurden 120 ng *Xho* I-verdaute genomische DNA in einem Volumen von 30 µl eingesetzt. Das dabei entstehende 685 bp-Fragment wurde durch Gelextraktion aufgereinigt. Die Markierungsreaktion erfolgte unter Verwendung des *PCR DIG Probe Synthesis* Kits mit den Primern ICAM-3526 und ICAM-3614, die einen 89 bp-Bereich des Fragmentes amplifizieren. In der Markierungsreaktion mit DIG-11-dUTP wurden 4 µl des Geleluats in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. 30 Zyklen wurden durchgeführt mit 400 nM Primer; 200 µM dATP; 200 µM dCTP; 200 µM dGTP; 130 µM dTTP; 70 µM DIG-11-dUTP; 1,56 U Polymerase (*ExpandTM High Fidelity* Enzym Mix); PCR-Puffer mit MgCl₂ (*ExpandTM High Fidelity* Puffer, Zusammensetzung nicht bekanntgegeben). Anschließend wurde die amplifizierte DIG-markierte Sonde durch Gelextraktion aufgereinigt und in einem *Dot-Blot* auf ihre DIG-Markierung überprüft.

2.1.4.2 Markierung der 3'-Enden von Nukleinsäuren

Die 3'-Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin erfolgte mit dem Enzym Terminale Transferase unter Verwendung eines DIG-markierten Didesoxy-Nukleotides (DIG-11-ddUTP), das einmal, aber nicht nicht mehrfach eingebaut werden können. Mit dieser Methode wurden doppelsträngige Oligonukleotide markiert.

Die Markierungsreaktion erfolgte mit 4 pmol Oligonukleotid, 50 U Terminale Transferase und 0,2 mM DIG-11-ddUTP in einem Puffer aus 200 mM Kaliumkacodylat; 25 mM TrisHCl, pH 6,6; 0,25 mg/ml BSA und 5 mM CoCl₂. Nach Inkubation in einem Volumen von 20 µl für 15 min bei 37 °C wurde die DNA gefällt und in 100 µl TEN-Puffer (10 mM TrisHCl; 1 mM EDTA; 0,1 M NaCl, pH 8,0) aufgenommen.

2.1.5 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen (Blotting)

Der Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen erfolgte als Kapillarblot mit 0,25fach konzentriertem TBE-Puffer (22,5 mM Tris-Borat; 0,5 mM EDTA pH 8,0) oder mit 20fach konzentriertem SSC (3 M NaCl; 300 mM Na-Citrat, pH 7,0) wenn anschließend die Hybridisierung mit einer Sonde erfolgte. Ein 3 mm-Whatmanpapierstreifen in der Breite der zu blottenden Membran wurde auf eine Glasplatte gelegt. Die überstehenden Enden des Whatmanstreifens tauchten in einen Behälter mit einem Pufferreservoir. Auf den getränkten Streifen wurde das DNA-haltige Gel gelegt. Auf das Gel wurde die puffergetränkte, positiv geladene Nylonmembran gelegt. Anschließend wurde die Membran mit einer Schicht trockener Whatmanblätter und einer Schicht an Saugpapier überschichtet und mit einer Glasplatte mit Gewicht versehen. Am nächsten Tag wurde der Aufbau abgebaut und die DNA auf der Membran durch Bestrahlung mit UVB (35 mJ/cm²) fixiert.

2.1.6 Hybridisierung von DNA mit DIG-markierten Sonden (Southern blots)

Southern blots wurden entweder mit 10 µg genomischer DNA oder mit 1 ng Plasmid-DNA durchgeführt. Nach Gelelektrophorese (Agarosegel) erfolgte bei genomischer DNA die Denaturierung und Neutralisation. Dazu wurde das Gel zweimal für 15 min bei Raumtemperatur in Denaturierungslösung (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl) geschwenkt. Nach kurzer Wässerung erfolgte die Neutralisation in gleicher Weise mit einer gepufferten Lösung (0,5 M TrisHCl pH 7.5; 3 M NaCl).

Nach Überprüfung des pH-Wertes wurde die DNA in 20fach konzentriertem SSC-Puffer (3 M NaCl; 300 mM Na-Citrat, pH 7,0) auf eine Nylonmembran gebロットet. Nach Fixierung der DNA auf der Membran durch UVB-Strahlung erfolgte die Prähybridisierung (30 min im Rollglas mit 25-30 ml Hybridisierungslösung [*DIG Easy Hyb*, Roche] bei 37-42 °C). 15 µl der DIG-markierten Sonde wurde durch Erhitzen für 10 min auf 95 °C denaturiert und in 20 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung mit dieser Lösung erfolgte dann über Nacht bei 37-42 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 20 min in 2fach konzentriertem SSC mit 0,1 % SDS und zweimal für 20 min in 0,5fach konzentriertem SSC mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen.

2.1.7 Detektion von DIG-markierten Nukleinsäuren

Der Nachweis von Nukleinsäuren, die mit Digoxigenin markiert wurden, beruht auf der spezifischen Bindung eines anti-Digoxigenin-Antikörpers, der an Alkalische Phosphatase gekoppelt ist (anti-DIG-AP-Konjugat). Ein geeignetes Substrat (CSPD-Substrat) wird durch die Alkalische Phosphatase dephosphoryliert und setzt dabei Licht frei.

Die auf Nylonmembranen geblottete DIG-markierte DNA wurde 1-5 min in 75 ml Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3 % Tween 20) gewaschen und 30 min in 75 ml Blockierungspuffer (1 % Blockingreagent; 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl) inkubiert, um unspezifische Protein-Bindungsstellen abzublocken. Anschließend wurde anti-DIG-AP-Konjugat (anti-DIG-AP, Fab-Fragment 1:10.000 in Blockierungspuffer) zugegeben. Nach 30 min Inkubation unter leichtem Schütteln wurde ungebundenes anti-DIG-AP-Konjugat durch zweifaches Waschen der Membran mit Waschpuffer entfernt. Nach Equilibrierung (5 min) in alkalischem Puffer (0,1 M TrisHCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5) wurde die Membran blasenfrei in einen Gefrierbeutel gelegt und 2-3 ml CSPD-Lösung (CSPD-Substrat 1:100 verdünnt mit 0,1 M TrisHCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5) zupipettiert. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C wurde der Gefrierbeutel zugeschweißt, in einer Belichtungsbox fixiert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde abhängig von der Signalstärke nach 15-60 min Belichtungszeit entwickelt.

2.1.8 Rekombinante DNA-Techniken

2.1.8.1 Verdauung mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsenzyme verwendet. Die Inkubation erfolgte in einem für das jeweilige Enzym optimierten Puffer bei 37 °C. Die zur vollständigen DNA-Spaltung von Plasmid-DNA benötigte Enzymmenge wurde im Überschuß zugegeben. Bei der Verdauung von DNA zur Präparation bestimmter DNA-Fragmente wurde typischerweise 5-20 µg, bei der Verdauung zu analytischen Zwecken etwa 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Fragmente des Restriktionsansatzes wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die zur Klonierung benötigten Fragmente extrahiert.

2.1.8.2 Erzeugung von glatten Enden (blunt ends) doppelsträngiger DNA

Das Auffüllen von 5'-überhängenden Enden von Restriktionsfragmenten erfolgte mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I. Nach Aufreinigen der DNA-Fragmente mittels *QIAquick PCR Purification Kits* wurden 10 µl des Eluats mit 10 U Klenow-Fragment und 50 mM dNTPs in einem Reaktionspuffer von 50 mM TrisHCl, pH 8,0; 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung (10 min bei 70 °C) erfolgte die Aufreinigung der DNA mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits*.

2.1.8.3 Abspaltung von 5'-Phosphatgruppen (Dephosphorylierung)

Um die Eigenligation von Plasmiden oder Konkatamerbildung von einzuklonierenden doppelsträngigen Oligonukleotiden zu vermeiden, wurden 5'-terminale Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (Shrimp alkaline

phosphatase) entfernt. Dazu wurden 80 pmol 5'-Enden mit 1 U Alkalischer Phosphatase in einem Puffer von 20 mM TrisHCl, pH 8,0; 10 mM MgCl₂) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der Phosphatase (10 min bei 65 °C) wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* aufgereinigt.

2.1.8.4 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden unter Verwendung von T4-DNA-Ligase verknüpft. Für die Ligation von Plasmid-Fragmenten wurden die Fragmente in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Bei der Ligation von doppelsträngigen Oligonukleotiden in Plasmide war das molare Verhältnis Plasmid zu Oligonukleotid 1:3. Dabei wurden 0,062 pmol Plasmid-Fragment mit der entsprechenden Menge Oligonukleotid mit 3 U Ligase in 10 µl Ligase-Puffer (30 mM TrisHCl, pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP) inkubiert.

Für das Aneinanderlagern der DNA-Enden sind niedrige Temperaturen vorteilhaft, die optimale Temperatur für die Ligase liegt aber bei 25 °C. Die Ligation wurde deshalb in der PCR-Maschine durchgeführt. Dabei wurden 30 Zyklen (30 s/25 °C, 50 s/18 °C, 2 min/5 °C) durchgeführt, die beide Temperaturoptima zur Verfügung stellen. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Ligase durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min.

2.1.8.5 Transformation kompetenter Bakterien

Ein 40 µl-Aliquot einer Glycerinsuspension kompetenter *Escherichia coli* Bakterien (Stamm DH5α) wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl des Ligationsansatzes (etwa 1 pg Plasmid) vermischt. Anschließend erfolgte die Elektroporation in einer 0,2 cm-Küvette mit 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV, wobei eine Pulsdauer von etwa 4-5 ms erzeugt wurde. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Proben 1 h bei 37 °C im Brutschüttler inkubiert. Die Herstellung des SOC-Mediums erfolgte durch Lösen von 20 g Bacto Trypton, 5 g Hefeextrakt und 0,5 g NaCl in 1000 ml destilliertem Wasser und anschließender Sterilisierung. Kurz vor Gebrauch des Mediums wurden 125 µl einer 1 M MgCl₂, 125 µl einer 1 M MgSO₄-Lösung und 200 µl einer 20%igen, sterilen Glukoselösung pro 10 ml Medium zugegeben. Die Transformationsansätze wurden anschließend auf LB-Ampicillin-Agar-Platten (18 g LB-Agar; destilliertes Wasser ad 500 ml und Sterilisierung, Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin nach Abkühlung auf 50 °C vor dem Gießen der Platten) ausgestrichen. Auf diesen Platten wachsen nur Bakterien, die erfolgreich mit dem Plasmid transformiert wurden, da dieses ein Resistenzgen gegen Ampicillin enthält (Selektionsgen). Nach ein bis zwei Tagen bei 37 °C bildeten sich sichtbare Kolonien transformierter Bakterien.

2.1.8.6 Präparation von Plasmiden

Für die Schnellextraktion von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken (*Miniprep*) wurde der *QIAprep Spin Miniprep Kit*, der auf Silikatmembran-Säulen beruht, verwendet. 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (10 g LB-Broth in 500 ml destilliertem Wasser und 50 µg/ml Ampicillin) wurden mit einer Kolonie beimpft und über Nacht im Bakterienschüttler kultiviert. Nach Zentrifugation (2 min bei 13.000 Upm) wurde das Bakterienpellet in 250 µl Puffer 1 (100 µg/µl RNase A; 50 mM TrisHCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer 2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) erfolgte die Lyse der Bakterienzellen (5 min, RT). Anschließend wurden chromosomale DNA, Membranfragmente und Proteine durch Zugabe von 500 µl Puffer 3 (3,0 M K-Acetat, pH 5,5) gefällt (5 min, auf Eis). Nach Zentrifugation der Suspension (10 min bei 13.000 Upm) wurde der klare Überstand abgenommen, auf eine *QIAprep*-Säule gegeben und zentrifugiert (2 min bei 13.000 Upm). Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 750 µl Waschpuffer (Zusammensetzung nicht bekanntgegeben) gewaschen (zweimal 1 min bei 13.000 Upm) und mit 50 µl destilliertem Wasser eluiert.

Die Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (*Maxiprep*) wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit Anionenaustauscher-Säulen (*QIAGEN Plasmid Maxi Kit*) durchgeführt. Dabei wurden 500 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit transformierten Bakterien angeimpft und 12-20 h bei 37 °C im Bakterienschüttler kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien in der Sorvall-Zentrifuge in einem GS3-Rotor sedimentiert (15 min, 4 °C, 15.000 Upm). Nach Dekantieren des Überstands wurde das Bakterienpellet in der verbleibenden Restflüssigkeit resuspendiert, in SS34-Röhrchen überführt und mit 10 ml Puffer 1 gemischt. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 10ml Puffer 2 und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Mit 10 ml kaltem Puffer 3 wurden Zellbestandteile, chromosomale DNA und Proteine (20 min Inkubation auf Eis) gefällt und sedimentiert (30 min, 4 °C, 15.000 Upm, SS34-Rotor). Die Zusammensetzung der Puffer ist als Bestandteil des *QIAGEN Plasmid Maxi Kits* nicht bekanntgeben.

Der Überstand wurde auf eine mit 10 ml Equilibrierungspuffer (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % Isopropanol; 0,15 % Triton X-100) equilibrierte *QIAGEN-tip 500*-Säule gegeben (DNA bindet an die Säule) und zweimal mit je 30 ml Waschpuffer (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % Isopropanol) gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit 15ml Elutionspuffer (Zusammensetzung nicht bekanntgegeben) und die Fällung der Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und Zentrifugation (30 min, 13.000 Upm, 4 °C, SS34-Rotor). Die DNA wurde einmal mit 70 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 400 µl destilliertem Wasser gelöst.

2.1.9 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden entsprechend dem Kettenabbruchverfahrens nach Sanger durchgeführt. Dabei wurde der Sequenzierautomat *ABI-PRISM 373* unter Verwendung des *DNA Sequencing Kits* eingesetzt. Bei diesem System wird die zu sequenzierende DNA nach Art einer PCR-Reaktion denaturiert und der Gegenstrang mit Hilfe eines Primers und einer Polymerase synthetisiert (Kettenverlängerung). Dabei wird eine Reaktionsmischung (*BigDye-Premix*) eingesetzt, die neben den Desoxy-Nukleotiden (dNTPs) zur Kettenverlängerung auch *Didesoxy-Nukleotide (ddNTPs)* enthält, die zum Kettenabbruch führen. Dabei ist jedes Didesoxy-Nukleotid (ddATP, ddGTP, ddCTP und ddTTP) unterschiedlich fluoreszenzmarkiert. Bei der Kettenverlängerung entstehen daher in zufälliger Weise unterschiedlich lange Fragmente abhängig davon, wann ein ddNTP eingebaut wurde, das zum Kettenabbruch führt. Da bei einer bestimmten Länge immer das gleiche Didesoxy-Nukleotid eingebaut wird, wird jedes Fragment basenspezifisch markiert. Durch eine basengenaue Auftrennung in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel kann dann anhand Fluoreszenz und Reihenfolge der Banden die Basensequenz ermittelt werden.

Es wurden 500 ng des zu sequenzierenden Plasmides in einer PCR-Reaktion mit 10-20 pmol eines Primers eingesetzt. Zur Strangsequenzierung wurde bei allen Plasmiden der Primer pSV 324, zur Gegenstrangsequenzierung der Primer pCM51-250, verwendet. Die Reaktion wurde mit 25 Zyklen (10 s/96 °C, 5 s/56 °C, 4 min/60 °C) in einem Volumen von 10 µl mit 2 µl *BigDye-Premix* durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zur Entfernung der überschüssigen Nukleotide mit Hilfe von Sephadexsäulen (*CentriSep*-Säule) aufgereinigt. Dazu wurde der Reaktionsansatz zusammen mit 10 µl destilliertem Wasser auf die vorequilibrierte Säule gegeben. Nach Zentrifugation (2 min, 3.000 Upm) wurde das Eluat in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Auftrennung der Proben wurden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Zur Herstellung eines Gels wurden 30 g Harnstoff in 12 ml Acrylamid:Bisacrylamid Lösung (30 %; 29:1), 12 ml 5fach konzentriertem TBE und 14 ml *Lichrosolv*-Wasser gelöst. Nach Zugabe von 320 µl Ammoniumpersulfat und 50 µl TEMED wurde das Gel gegossen. Nach 1,5-2 h Polymerisation wurde das Gel in den Sequenzierautomaten eingesetzt und ein einstündiger Vorlauf in TBE-Puffer bei 30 W (22 mA bei 1340 V und 47 °C) durchgeführt. Vor Auftrag der Proben wurden diese durch Zugabe des gleichen Volumens einer 5:1-Mischung aus Formamid und 25 mM EDTA (pH 8,0) gelöst und durch Erhitzen für 2 min auf 94 °C denaturiert. Der Gellauf erfolgte über Nacht unter den gleichen Bedingungen wie der Vorlauf. Die Auswertung der Daten wurde mit der *ABI PRISM Sequencing Analysis-Software* durchgeführt.

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Messung der Gesamtproteinmenge

Die Bestimmung der Gesamtmenge an Protein eines Zellkulturansatzes diente zur Abschätzung der Gesamtzahl an Zellen einzelner Ansätze in einer Versuchsreihe und wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* durchgeführt. Dabei wird zweiwertiges Kupfer in Anwesenheit von Protein zu einwertigem Kupfer reduziert (Biuret-Reaktion). Einwertiges Kupfer bildet mit Bicinchonsäure einen violett gefärbten Komplex, der colorimetrisch ausgewertet werden kann. Diese Methode hat den Vorteil gegenüber der Coomassie-Färbung, daß sie nicht von Detergentien beeinflusst wird (Puffer, die zur Lyse von Zellen dienen, enthalten im allgemeinen Detergentien).

Vor dem Versuch wurde eine bicinchonsäurehaltige Lösung (Reagent A) mit einer kupferhaltigen Lösung (Reagent B) im Verhältnis 50:1 gemischt (die exakte Zusammensetzung der Reagenzien ist nicht bekanntgegeben). Zu 1 ml dieser Mischung wurden 20 µl eines Zellysates gegeben und etwa 30 min bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA als Standardprotein hergestellt. Die colorimetrische Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm.

2.2.2 Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität

Die Menge an Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) wurde mit Antikörperkonjugaten in Form eines ELISA-Verfahrens ermittelt. Dabei wurden Microtiterplatten eingesetzt, die mit einem anti-CAT-Antikörper beschichtet sind. Dadurch wird das CAT-Protein an der Microtiterplatte gebunden. Dann wird ein Antikörper gegen CAT zugegeben, der DIG-markiert ist. Anschließend wird ein anti-DIG-Antikörper zugegeben, der an Peroxidase (POD) konjugiert ist. Dieses Konjugat bindet an die DIG-Markierung des an der Microtiterplatte gebundenen anti-CAT-Antikörpers (Sandwich-ELISA). Die Peroxidase ermöglicht schließlich durch Zugabe eines entsprechenden Substrats eine Farbreaktion, die colorimetrisch ausgewertet werden kann.

A431-Zellen in 3 cm-Schalen wurden zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer (*Reporter lysis buffer*) lysiert. Nach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur im Schwenker wurden die lysierten Zellen zur Entfernung der restlichen Zellbestandteile zentrifugiert (2 min, 14.000 Upm, 4 °C). 200 µl des Lysates (Überstand) wurden in die Mikrotiterplatte einpipettiert, 1 h bei 37 °C inkubiert und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 (2 µg/ml DIG-markierter anti-CAT-Antikörper) wurde wieder 1 h bei 37 °C inkubiert und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Dieser Schritt wurde mit Lösung 3 (20 U/ml POD-gekoppelter anti-DIG-Antikörper) wiederholt. Anschließend wurde 200 µl POD-Substrat (ABTS™-

Substrat in Lösung) zugegeben und bei Raumtemperatur bis zur leichten Grünfärbung inkubiert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Reagentien sind als Bestandteil des *CAT Elisa Kits* bekanntgegeben. Die colorimetrische Messung erfolgte bei 405 nm, als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von CAT verwendet. Die gemessene CAT-Aktivität eines Ansatzes wurde auf die Gesamtmenge an Protein normalisiert. Da die Proteinmenge proportional zur Zellzahl ist konnten dadurch Unterschiede der CAT-Aktivität aufgrund unterschiedlicher Zellzahlen in den einzelnen Ansätzen ausgeglichen werden.

2.2.3 Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität

Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das im Zytosol aller Zellen, nicht aber extrazellulär vorkommt. In der Zellkultur kann daher durch Messung der LDH-Konzentration im Medium auf die Menge abgestorbener Zellen geschlossen werden, da diese LDH ins Medium abgeben (Zytotoxizitätstest). Die LDH-Messung erfolgte enzymatisch in zwei Schritten: Im ersten Schritt wird zugegebenes Lactat durch LDH in Pyruvat umgewandelt, wobei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Im zweiten Schritt wird mit einem Katalysator (Diaphorase) schwach gelbes Tetrazoliumchlorid zu rotem Formazanhydrochlorid reduziert, wobei NADH/H^+ zu NAD^+ oxidiert wird und colorimetrisch ausgewertet.

Zur Durchführung wurden alle Reagenzien gemischt und 100 μl der Mischung zu 10 μl eines zentrifugierten Zellüberstandes in einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min erfolgte die Messung der Absorption bei 490 nm. Als Maximalwert (100 %) wurde ein Ansatz verwendet, bei dem alle Zellen durch Zugabe von 1 % Triton X100 lysiert wurden. Die genaue Zusammensetzung der Reagentien ist vom Hersteller nicht bekanntgegeben (*Cytotoxicity Detection Kit*).

2.3 Zellbiologische Techniken

2.3.1 Kultivierung von A431-Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 in einem kupferbewandeten Brutschrank bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Das zur Kultivierung verwendete Medium (Vollmedium) war *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, 4,5g/l Glucose, Glutamin) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS). Dem Medium wurde L-Glutamin (2 mM) sowie Streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Penicillin (50 U/ml) zugegeben. In manchen Versuchen wurde ein reduziertes Medium (Minimalmedium) eingesetzt, in dem sich A431-Zellen nicht vermehren. Es entsprach dem Vollmedium ohne FKS-Zugabe.

Zweimal wöchentlich wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen, durch Inkubation mit einer trypsinhaltigen Lösung (DMEM mit 0,05 % Trypsin und 0,02 mM EDTA) abgelöst und mit frischem Medium 1:10 bis 1:20 verdünnt wieder ausgesetzt.

Zur Lagerung wurden die Zellen nach dem Trypsinieren sedimentiert, in Einfriermedium (DMEM mit 15 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert und bei -70 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Frisch aufgetaute Zellen (5 min bei 37 °C) wurden in Vollmedium ausgesetzt. Am folgenden Tag wurde das Medium ausgetauscht. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Auszählen im Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer).

2.3.2 Transiente Transfektion von Oligonukleotiden

2.3.2.1 Transfektion mit SuperFect™

SuperFect ist ein positiv geladenes, baumartiges Makromolekül (Dendrimer), das negativ geladene DNA bindet, kompakt macht und eine Aufnahme in die Zelle dadurch erleichtert, daß die insgesamt positiv geladenen DNA/SuperFect-Komplexe an negativ geladene Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden (im allgemeinen sialylierte Glycoproteine in eukaryotischen Zellen).

Am Tag vor der Transfektion wurden 200.000-300.000 A431-Zellen in 3 cm-Schalen in 2 ml Vollmedium ausgesetzt. Die Transfektion erfolgte bei etwa 70 % Konfluenz. Dazu wurde die entsprechende Menge Oligonukleotid mit Minimalmedium ohne Streptomycin- und Penicillinzusatz auf ein Volumen von 400 µl verdünnt und mit 10 µl SuperFect komplexiert (10 min Inkubation bei Raumtemperatur). Anschließend wurde Minimalmedium auf ein Volumen von 1000 µl zugegeben und die Mischung zu den gewaschenen Zellen gegeben. Nach 3-4 h Kultivierung der Zellen wurde das Medium ausgewechselt um überschüssiges Oligonukleotid zu entfernen.

2.3.2.2 Transfektion mit Lipofectin™

Lipofectin ist eine Zubereitung aus liposomenbildenden Substanzen. Positiv geladene Liposomen reagieren spontan mit (negativ geladener) DNA und bilden Komplexe, die mit der Zellmembran fusionieren können. Daraus resultiert eine effiziente Aufnahme der DNA.

Die Transfektion von A431-Zellen erfolgte in 3 cm-Schalen bei 70 % Konfluenz. Dabei wurden 6 µg Lipofectin auf ein Volumen von 50 µl und die entsprechende Menge Oligonukleotid auf ein Volumen von 100 µl mit Minimalmedium verdünnt. Anschließend wurden beide Lösungen gemischt und zur Liposomenbildung 20 min bei Raum-

temperatur inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit 2 ml Minimalmedium gewaschen, mit 850 µl Minimalmedium überschichtet und die DNA/Liposomenmischung vorsichtig zupipettiert (ad 1 ml). Die Zellen wurden 18 h (über Nacht) inkubiert, anschließend erfolgte ein Mediumwechsel zur Entfernung überschüssiger Oligonukleotide.

2.3.3 Transfektion von Plasmiden

70 % konfluente A431-Zellen wurden in 3 cm-Schalen einer 6-Well-Platte in 2 ml Vollmedium ausgesetzt. In den Experimenten wurden 1,8 µg Plasmid, das mit Triplehelix-Oligonukleotiden inkubiert worden war, transfiziert. Dazu wurde der gesamte Inkubationsansatz (10 µl) mit 65 µl Minimalmedium ohne Streptomycin- und Penicillin-Zusatz verdünnt und für 10 min bei Raumtemperatur mit 9 µl SuperFect komplexiert. Anschließend wurde mit Minimalmedium auf 800 µl aufgefüllt und die Mischung zu den mit 1 ml Minimalmedium gewaschenen Zellen gegeben. Nach 2 h Inkubation der Zellen wurde das Medium ausgewechselt.

2.3.4 Durchflußzytometrie

Die Oberflächenexpression der Proteine ICAM-1 und HLA-DR wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Spezifische monoklonale Antikörper waren entweder mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) oder mit PE (R-Phycoerythrin) markiert. Da FITC und PE bei unterschiedlicher Wellenlänge fluoreszieren, können in einem Ansatz beide Proteine gleichzeitig gemessen werden.

Zellen wurden trypsinisiert und durch Zentrifugation (3 min, 2.000 Upm, 4 °C) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml Waschpuffer (10 % Natriumazid in PBS) wurden die Zellen in 20 µl Waschpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min entweder mit dem spezifischen oder mit einem isotypgleichen Antikörper mit gleicher Markierung auf Eis inkubiert (die Antikörper sind als Fertiglösung für die FACS-Analyse angeboten, deren Konzentration nicht angegeben ist). Nach der Inkubation wurden die Ansätze zweimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen, in 200 µl Waschpuffer resuspendiert und im Durchflußzytometer analysiert.

Zur Bestimmung der Anzahl toter Zellen wurden Substanzen verwendet die durch geschädigte Zellmembranen in tote Zellen eindringen und sich in DNA einlagern können. Dabei wurde sowohl Propidiumjodid als auch 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) eingesetzt, da sie bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren. Sie wurden kurz vor der Analyse zugegeben (30 µl Propidiumjodid-Lösung [5 µg/ml in PBS] oder 5 µl 7-AAD-Lösung [50 µg/ml 7-Amino-Actinomycin; 0,09 % Na-Azid in PBS]).

2.3.5 Isolierung von Zellkernen

Zur Isolierung von Zellkernen wurden 80 % konfluente A431-Zellen aus zwei 150 cm²-Flaschen trypsinisiert, sedimentiert (5 min, 1.000 Upm, 4 °C), zweimal mit 5 ml eiskalten PBS gewaschen und in 2 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 2 ml eiskalter Lysepuffer (1,28 M Sucrose; 40 mM TrisHCl, pH 7,5; 20 mM MgCl₂; 4 % Triton X-100) und 6 ml eiskaltes destilliertes Wasser zugegeben. Die Mischung wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Dabei erfolgt die Lyse der Zellen bei gleichzeitiger Stabilisierung der Zellkerne. Nach Pelletierung (15 min, 4.000 Upm, 4 °C) wurden die Zellkerne mit 1 ml Lysepuffer und 3 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Lagerung der Zellkerne erfolgte bei -20 °C. Wurden Zellkerne mit Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert, wurden sie vorher 10 min auf Eis im entsprechenden Inkubationspuffer equilibriert.

2.3.6 Immunfluoreszenz

Die Aufnahme FITC-markierter Triplehelix-Oligonukleotide in A431-Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Zellen in 3 cm-Schalen einer 6-Well-Platte wurden auf einem sterilen Deckgläschen in 2 ml Vollmedium kultiviert. Am nächsten erfolgte die Transfektion bei etwa 70 % Konfluenz mit SuperFect. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das Deckgläschen mit Antifade-Eindecklösung (0,1 % p-Phenyldiamin; 90 % Glycerol; 0,1fach konzentriertem PBS; eingestellt mit NaH₂CO₃ auf pH 8,0) auf einen Objektträger gesetzt und mit Nagellack abgedichtet. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenz-Mikroskop (Absorptionswellenlänge 488 nm) bei 200-500facher Vergrößerung.

2.4 Triplehelix-spezifische Methoden

2.4.1 Identifikation von Zielsequenzen für Triplehelix-Oligonukleotide

Nur Purinbasen (Guanin und Adenin) in der Doppelhelix stellen die Bindungsstellen zur Triplehelixbildung bereit. Zur Identifikation möglicher Zielsequenzen müssen deshalb alle verfügbaren Sequenzabschnitte des zu hemmenden Gens nach Abschnitten mit Purinbasen durchsucht werden. Um eine „einmalige“ Bindung des Oligonukleotides im menschlichen Genom zu gewährleisten, sollten diese etwa 17 Purinbasen in einer Reihe enthalten (Homopurinabschnitt). Dabei lassen sich drei verschiedene Zielsequenztypen unterscheiden, die anhand eines Beispiels in Abbildung 13 (nächste Seite) dargestellt sind.

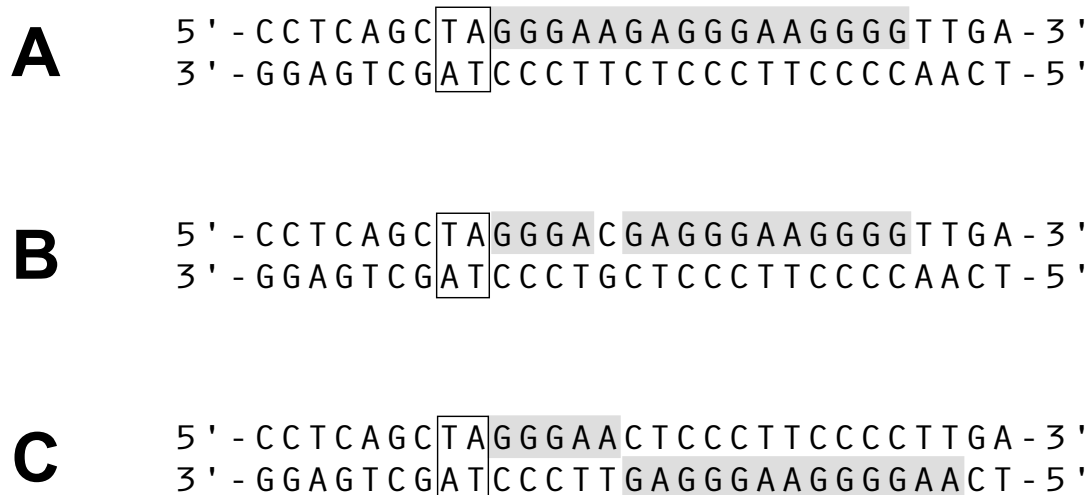


Abb. 13: Zur Triplehelixbildung geeignete Zielsequenzen. Abbildung 13 A zeigt einen Homopurinabschnitt von ausreichender Länge. Die Purinbasen des Abschnittes, an die ein Triplehelix-Oligonukleotid binden kann, sind grau unterlegt. Eine zur Psoraleninterkalation geeignete 5'-TpA-Stelle ist mit einem Kästchen markiert. Abbildung 13 B zeigt einen von einer einzelnen Pyrimidinbase (*Mismatch*-Base) unterbrochenen Homopurinabschnitt. Abbildung 13 C zeigt ein Beispiel für Homopurinabschnitte, die abwechselnd auf beiden Strängen der Doppelhelix liegen. Solche Abschnitte eignen sich für *alternierende* Triplehelix-Oligonukleotide.

Zuerst wird das Gen nach Homopurinabschnitten durchsucht, die auf einem Strang der Doppelhelix liegen, und für eine Triplehelixbildung am besten geeignet sind (Abbildung 13 A). Von diesen Abschnitten, werden jene bevorzugt, die eine flankierende 5'-TpA-Stelle aufweisen, da sie sich für psoralen-konjugierte Triplehelix-Oligonukleotide eignen und somit bessere Nachweismethoden ermöglichen. Falls sich keine reinen Homopurinabschnitte ausreichender Länge identifizieren lassen wird das Gen nach unterbrochenen oder abwechselnden Homopurin/Homopyrimidinabschnitten durchsucht: Homopurinabschnitte, deren Purinsequenz von einzelnen Pyrimidinbasen (*Mismatch*-Basen) unterbrochen sind, sind als Zielsequenz geeignet, wenn die Pyrimidinbase durch geeignetes Design des Triplehelix-Oligonukleotides überbrückt wird. Dabei sollte nicht mehr als eine *Mismatch*-Base im Homopurinabschnitt vorkommen (Abbildung 13 B). Ferner sind Homopurinabschnitte geeignet, die abwechselnd auf beiden Strängen der Doppelhelix liegen. Entsprechend gestaltete Triplehelix-Oligonukleotide (*alternierende* Triplehelix-Oligonukleotide) binden dann an den Purinbasen des jeweiligen Stranges in der Doppelhelix (Abbildung 13 C).

2.4.2 Design von Triplehelix-Oligonukleotiden

Damit alle Basen binden können, muß sich ein Triplehelix-Oligonukleotid in der großen Furche der Doppelhelix einlagern. Ein gleichmäßiger Aufbau des Oligonukleotides ist dafür vorteilhaft. Dies ist bei Oligonukleotiden optimal, die entweder nur aus Purinbasen oder nur aus Pyrimidinbasen bestehen. Dies hat zur Unterscheidung von zwei Grundtypen von Triplehelix-Oligonukleotiden geführt, die unterschiedliche Bindungscharakteristiken aufweisen: Triplehelix-Oligonukleotide vom Purin-Typ und Triplehelix-Oligonukleotide vom Pyrimidin-Typ (Abbildung 14).

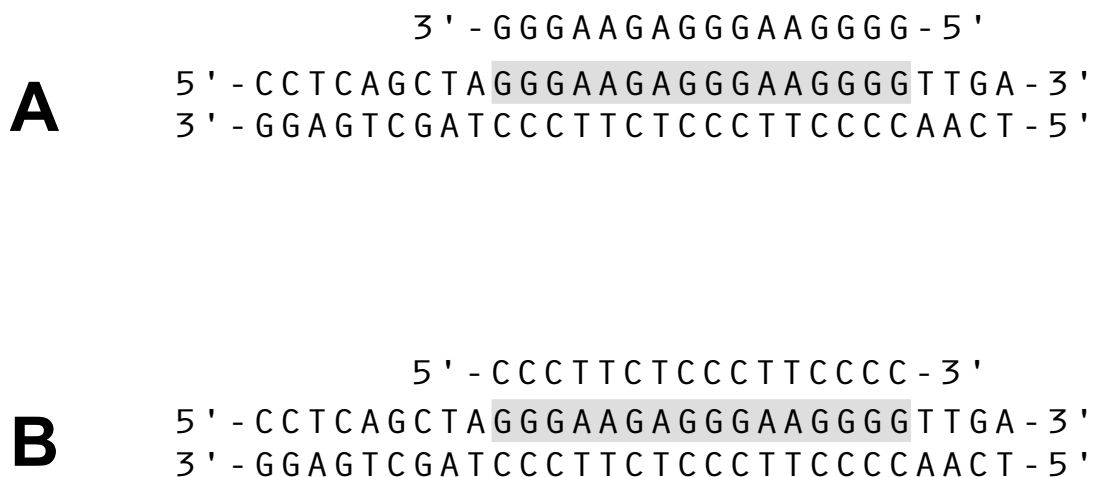


Abb. 14: Grundtypen von Triplehelix-Oligonukleotiden. Abbildung 14 A zeigt ein Beispiel für ein *antiparallel* an den (grau unterlegten) Purinstrang der Doppelhelix bindendes Triplehelix-Oligonukleotid vom Purin-Typ, bestehend aus Adenin und Guanin. Abbildung 14 B zeigt ein Beispiel für ein *parallel* bindendes Triplehelix-Oligonukleotid vom Pyrimidin-Typ, das aus den Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin besteht.

Triplehelix-Oligonukleotide vom Purin-Typ, die vornehmlich aus Purinbasen bestehen, binden in *antiparalleler* Orientierung an den Purinstrang der Doppelhelix unter Ausbildung von *reverse Hoogsteen*-Bindungen. Ein Beispiel für ein in *antiparallel* bindendes Purin-TFO ist in Abbildung 14 A dargestellt.

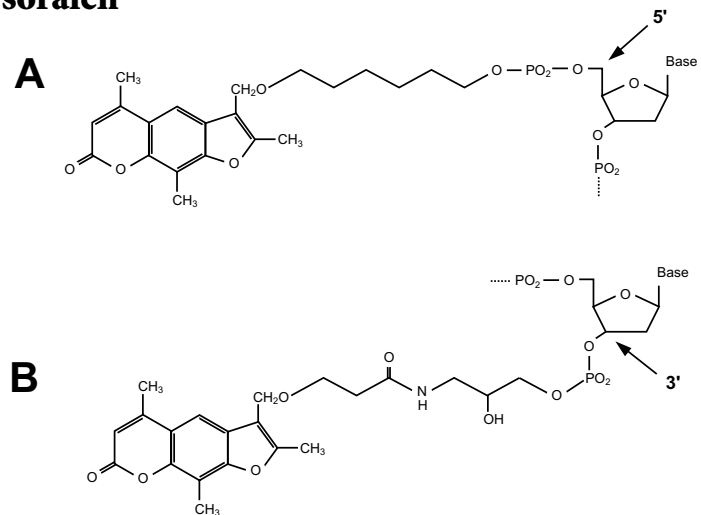
Triplehelix-Oligonukleotide vom Pyrimidin-Typ, bestehen vornehmlich aus Pyrimidinbasen, bilden *Hoogsteen*-Bindung aus und binden in *paralleler* Orientierung an den Purinstrang der Doppelhelix. Ein Beispiel für ein *parallel* bindendes Pyrimidin-TFO ist in Abbildung 14 B dargestellt.

2.4.3 Modifikationen von Triplehelix-Oligonukleotiden

Endmodifikationen wurden vorgenommen, um UVA-induzierte kovalente Bindungen des Triplehelix-Oligonukleotides zu ermöglichen (Psoralen), um eine bessere intrazelluläre Stabilität (Triethylenglykol) zu erreichen oder um bestimmte Nachweise anzuwenden (Biotin).

2.4.3.1 Endmodifikationen mit Psoralen

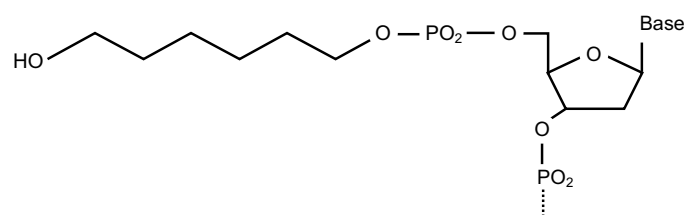
Abb. 15: Endmodifikation mit Psoralen. 4'-Hydroxymethyl-4,5,8-trimethylpsoralen wurde an der 4'-Hydroxygruppe über eine Brücke aus sechs Kohlenstoff (C6-Linker) an das Oligonukleotid gekoppelt. Die unterschiedlichen Brücken bei den Kopplungen an das 5'-Ende oder an das 3'-Ende des Oligonukleotides sind in Abbildung 14 A und 15 B dargestellt.



4'-Hydroxymethyl-4,5,8-trimethylpsoralen wurde über eine funktionelle Brücke an das Oligonukleotid gekoppelt um eine Interkalation zu ermöglichen (Kumaresan et al. 1992).

2.4.3.2 Endmodifikationen mit Triethylenglykol

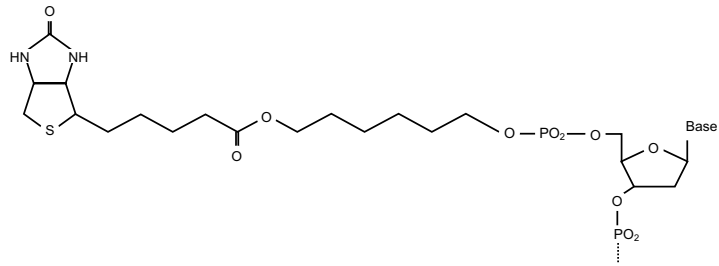
Abb. 16: Endmodifikation mit Triethylenglykol.



Triethylenglykol wurde eingesetzt um das Triplehelix-Oligonukleotid vor dem Abbau durch intrazelluläre Exonukleasen zu schützen (Zendegui et al. 1992, Catapano et al. 2000). Obwohl diese prinzipiell nur 3'-Enden angreifen, wurden alle freien TFO-Enden mit Triethylenglykol modifiziert. Dadurch war eine optimale Ähnlichkeit von Triplehelix-Oligonukleotiden mit Kontroll-Oligonukleotiden gegeben, da alle freien Enden modifiziert waren.

2.4.3.3 Endmodifikationen mit Biotin

Abb. 17: Endmodifikation mit Biotin. Biotin über eine Triethylenglykolbrücke mit sechs Kohlenstoffatomen (C6-Linker) gekoppelt.



Oligonukleotide, deren Enden mit Biotin modifiziert wurden, wurden in Triplehelix-nachweisen mittels magnetischer Separation eingesetzt. Dabei wird die Bindung von streptavidinbeschichteten, magnetischen Kügelchen (Streptavidinbeads) an Biotin ausgenützt (Methodenteil, Abschnitt 2.5.4, Seite 53). Die Kopplung von Biotin über eine Brücke ermöglicht eine bessere Bindung an Streptavidinbeads.

2.4.4 Inkubation von Nukleinsäuren mit Triplehelix-Oligonukleotiden

Zur Bildung einer Triplehelix wurde das Triplehelix-Oligonukleotid mit DNA oder Zellkernen inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 90 min in einem Volumen von 10 µl. Als Inkubationspuffer wurden zwei verschiedene Puffer eingesetzt: Ein kaliumfreier Puffer (10 mM MgCl₂; 1 mM Spermidin; 10 mM TrisHCl, pH 7,5) der für eine Triplehelixbildung optimal ist, aber nicht dem Milieu innerhalb der Zelle entspricht, oder aber ein kaliumhaltiger Puffer (140 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM Spermidin; 10 mM TrisHCl, pH 7,5) dem Kalium in physiologischer Konzentration zugesetzt wurde.

Isolierte Zellkerne, die mit Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert wurden, wurden alle 30 min resuspendiert, um eine Sedimentation der Zellkerne während der Inkubation zu verhindern. Das Volumen betrug in diesem Fall 100 µl.

2.4.5 Bestrahlung mit UVA

Zielsequenzen, die eine benachbarte 5'-TpA-Stelle haben, eignen sich für psoralenkonjugierte Triplehelix-Oligonukleotide, die mittels UVA-Strahlung quervernetzt werden können. Die Bestrahlung erfolgte im Anschluß an die Inkubation des Triplehelix-Oligonukleotides mit der Zielsequenz.

Die Bestrahlung erfolgte bei Raumtemperatur mit einer UVA-Lampe, deren Emissionsspektrum zwischen 315 und 365 nm liegt (PUVA 200). Um unerwünschte UVB-Anteile zu entfernen wurde unter einer Glasscheibe bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis wurde mit einem UV-Meßgerät überprüft, wobei eine Leistung von 2 mW/cm² bei einem Abstand von 19 cm ermittelt wurde. Sollten höheren UVA-Dosen appliziert werden, wurde eine

leistungsstärkere UVA-Lampe (Supersun 5000, 5 mW/cm²) eingesetzt, um die Bestrahlungsdauer kürzer zu halten. Zellen, die mit Triplehelix-Oligonukleotiden transfiziert wurden, wurden in PBS bestrahlt, da das Kulturmedium die UVA-Strahlung teilweise absorbierte.

2.5 Triplehelixnachweise

Um eine Triplehelix nachzuweisen sind verschiedene Methoden etabliert, die bestimmte Effekte eines an seine Zielsequenz gebundenen Oligonukleotides ausnützen (Gelretardation, Hemmung von Restriktionsenzymen, Primerextension). Werden psoralenkonjugierte Triplehelix-Oligonukleotide in Verbindung mit UVA-Strahlung eingesetzt, erweitert sich das Spektrum an Nachweismöglichkeiten aufgrund der stabilen, kovalenten Quervernetzung des Oligonukleotides mit der Zielsequenz (PCR-Inhibition, Gelretardation unter denaturierenden Bedingungen). Neben bereits etablierten Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit auch ein neues Nachweisverfahren entwickelt, mit dem der Nachweis einer Triplehelixbildung im Genom gelang.

2.5.1 Gelretardation

Hat ein Triplehelix-Oligonukleotid an seine Zielsequenz gebunden, führt das zu einer Retardation der Zielsequenz bei der Gelelektrophorese. Als Ziel-DNA werden doppelsträngige Oligonukleotide eingesetzt. Die markierte Zielsequenz wird mit dem Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert und anschließend eine Elektrophorese durchgeführt. Durch die Bindung des Oligonukleotides an die Zielsequenz wird diese im Gel retardiert. Gelretardationsexperimente ermöglichen einen direkten, Nachweis von Triplehelices und triplehelixvermittelter Psoralenaddukte.

Verschiedene TFO-Konzentrationen wurden in 10 µl-Ansätzen mit 60 fmol DIG-markierter Ziel-DNA inkubiert und anschließend auf ein 16 %-Polyacrylamidgel (Gel: 16 % Acrylamid; 10 % Glycerin; 10 mM MgCl₂ in 0,5fach konzentriertem TBE, Laufpuffer: 0,5fach konzentrierter TBE; 10 mM MgCl₂) aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurden die Ansätze mittels DIG-Detektion analysiert.

Werden psoralenkonjugierte Triplehelix-Oligonukleotide in Verbindung mit UVA-Strahlung eingesetzt, kann das Triplehelix-Oligonukleotid mit der Zielsequenz kovalent verbunden werden. Solche Photoaddukte (Mono- und Bisaddukte, Einleitungsteil, Abschnitt 6.3, Seite 11) lassen sich mit einer Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) nachweisen, da sie auch unter diesen Bedingungen retardiert werden, während (nicht kovalent verbundene) Triplehelices zerstört werden. Verschiedene TFO-Konzentrationen wurden in 10 µl-Ansätzen mit 60 fmol DIG-markierter Zielsequenz

inkubiert und anschließend bestrahlt. Die Ansätze wurden vor dem Gelauftrag für 5 min auf 65 °C erhitzt um nicht quervernetzte Triplehelices zu zerstören. Anschließend wurden die Ansätze auf ein denaturierendes 16 %-Polyacrylamidgel (Gel: 16 % Acrylamid; 10 % Glycerin; 7 M Harnstoff in 0,5fach konzentriertem TBE, Laufpuffer: 0,5fach konzentrierter TBE) aufgetragen. Nach Blot auf eine Nylonmembran wurden die Ansätze analysiert.

2.5.2 Hemmung von Restriktionsenzymen

Ein an seine Zielsequenz gebundenes Triplehelix-Oligonukleotid kann, wenn sich die Zielsequenz mit der Erkennungstelle eines Restriktionsenzym überschneidet, die Verdauung an dieser Stelle verhindern. Das dadurch veränderte Fragmentmuster kann mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Ein Plasmid (2 µg), das eine solche Zielsequenz enthält, wurde mit einem 3-1.000fachen molaren Überschuß an Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 2 J/cm² UVA bestrahlt um das Triplehelix-Oligonukleotid mit seiner Zielsequenz kovalent zu verbinden. Nach der Bestrahlung wurden die Ansätze mittels *QIAquick PCR Purification Kits* aufgereinigt, um den Triplehelix-Inkubationspuffer zu entfernen. 10 µl des Eluats wurden mit 4,5 U des entsprechenden Restriktionsenzym über Nacht bei 37 °C verdaut und das entstandene Fragmentmuster im Agarosegel analysiert.

2.5.3 Hemmung einer PCR-Reaktion

Ein psoralenkonjugiertes Triplehelix-Oligonukleotid kann eine PCR-Reaktion hemmen, wenn es kovalent an mit seiner Zielsequenz vernetzt wurde, da dadurch die Denaturierung der DNA verhindert wird. Wird ein Bereich in dem die Zielsequenz liegt amplifiziert, sollte DNA, die mit Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert und bestrahlt wurde, weniger PCR-Produkt ergeben als DNA mit einem Kontroll-Oligonukleotid.

Die Versuche wurden mit einem zielsequenzhaltigen Plasmid durchgeführt. Pro Ansatz wurden 300 ng Plasmid mit einem 10 bis 10.000fachen molaren Überschuß an Triplehelix-Oligonukleotid in einem Volumen von 10 µl inkubiert. Dabei wurde kaliumfreier oder kaliumhaltiger Inkubationspuffer eingesetzt. Die Bestrahlung erfolgte mit 5 J/cm². 100 ng des Plasmides wurden anschließend in einer PCR-Reaktion mit 12 Zyklen (40 s/94 °C, 40 s/56 °C, 40 s/72 °C) eingesetzt (Abbildung 41, Seite 79).

2.5.4 Triplehelixnachweis durch magnetische Separation

Eine neue Nachweismethode wurde entwickelt um die Triplehelixbildung in genomischer DNA nachweisen zu können. Sie basiert auf bifunktionalen Triplehelix-Oligonukleotiden bei denen ein Ende mit Psoralen und das andere Ende mit Biotin modifiziert wurde (Abbildung 18).

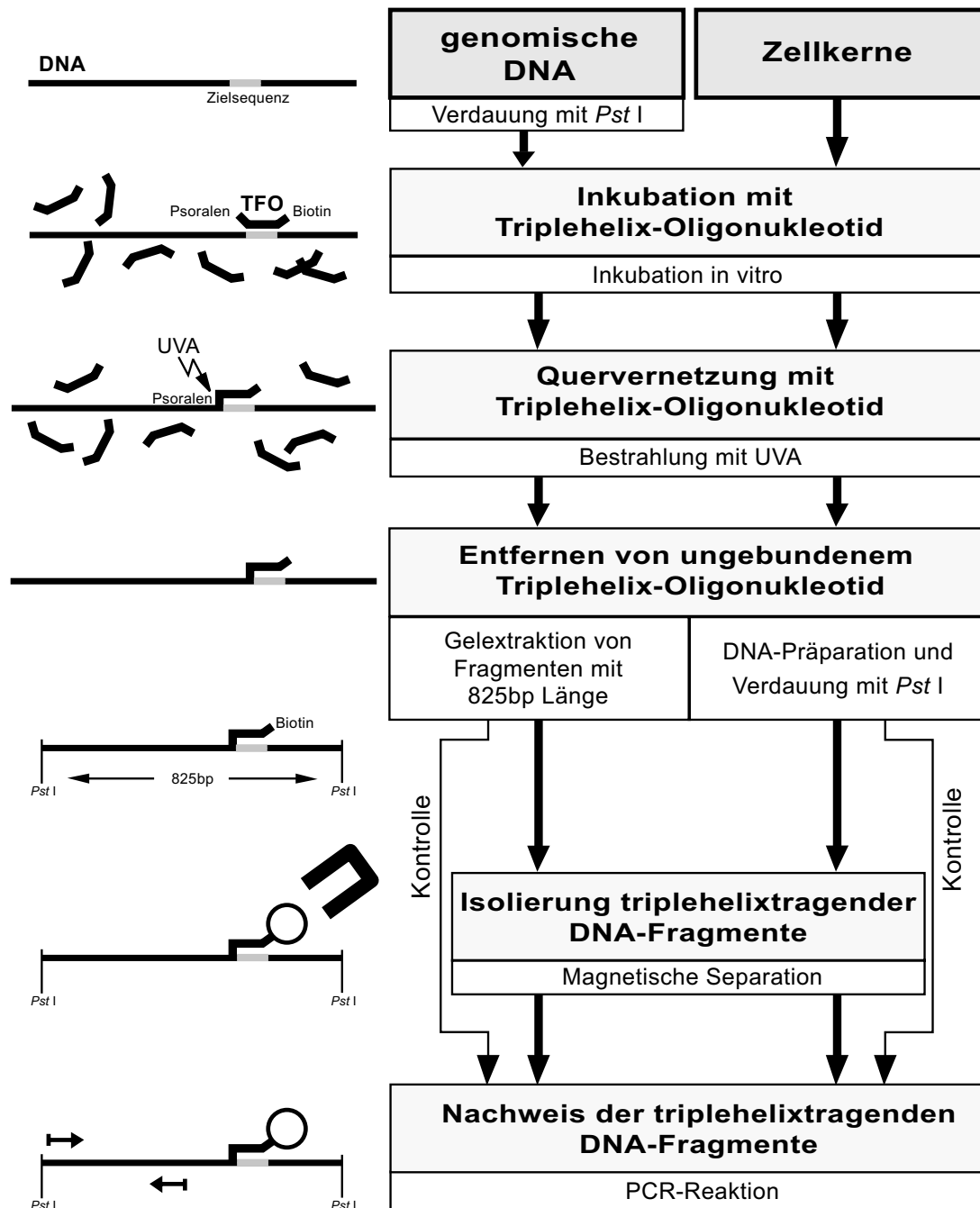


Abb. 18: Magnetische Separation. Die unterschiedlicher Abfolge der einzelnen Versuchsschritte (in grauen Kästen) bei der magnetischen Separation ist auf der rechten Hälfte der Abbildung dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildung ist das Prinzip der Psoralenquervernetzung und der Separation mittels Streptavidinbeads anhand eines 825 bp-*Pst I*-Fragmentes von ICAM-1 schematisch veranschaulicht.

Hat eine Triplehelixbildung stattgefunden, kann das Oligonukleotid aufgrund seiner Psoralenkopplung mit der Zielsequenz quervernetzt werden. Aufgrund der Biotinmodifikation können dann DNA-Abschnitte an denen das Oligonukleotid gebunden hat mit streptavidinbeschichteten, magnetischen Kügelchen (Streptavidinbeads) von restlicher DNA separiert werden (magnetische Separation). Die Identifikation separierter DNA erfolgt dann mit einer PCR-Reaktion, die einen Bereich des DNA-Fragments in der Nähe der Zielsequenz amplifiziert. Als Kontrolle dient ein psoralen- und biotinmodifiziertes Oligonukleotid mit durchmischter Sequenz. Versuche wurden an isolierter DNA und an isolierten Zellkernen durchgeführt.

2.5.4.1 Triplehelixnachweis an isolierter genomischer DNA

Bei der Anwendung der magnetischen Separation auf genomische DNA wird diese durch Verdauung mit einem Restriktionsenzym fragmentiert. Das Enzym muß dabei so gewählt werden, daß im Ziel-Gen ein Fragment entsteht, das die Zielsequenz enthält und einen ausreichend großen Bereich neben der Zielsequenz enthält, der mit einer PCR-Reaktion amplifiziert werden kann. Zu große Fragmente sind dagegen für eine magnetische Separation ungeeignet, da sie sich aufgrund der gleichen (negativen) Ladung gegenseitig abstoßen, wodurch die Bindung an die Streptavidinbeads behindert wird.

Im Falle der Zielsequenz 13 im ICAM-1-Gen wurde genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Pst* I verdaut, das ein 825 bp langes Fragment von ICAM-1 mit der Zielsequenz 13 erzeugt (eine Darstellung des Fragments findet sich in Abbildung 33, Seite 70). Nach Aufreinigung der verdauten DNA mittels Phenolextraktion wurden 2 µg genomische DNA unter kaliumfreien Bedingungen in einem Volumen von 20 µl mit dem 3'-psoralen- und 5'-biotinmodifizierten Triplehelix-Oligonukleotid oder Kontroll-Oligonukleotid in einer Konzentration von 10 µM inkubiert und bestrahlt (5 J/cm²). Als weitere Kontrolle für die magnetische Separation wurde ein Ansatz ohne Triplehelix-Oligonukleotid oder ein Ansatz, mit nicht biotinyliertem Oligonukleotid verwendet. Ungebundenes überschüssiges Triplehelix-Oligonukleotid muß entfernt werden, da es die Bindung der DNA-Fragmente an die Streptavidinbeads behindert. Dies erfolgte durch Gelextraktion des 825 bp-Fragments. Die aus dem Gel isolierten Fragmente wurden mit 30 µl destilliertem Wasser eluiert. 2 µl des Eluats wurden als Kontrolle in die PCR-Reaktion eingesetzt, um zu prüfen, ob das 825 bp-Fragment erfolgreich extrahiert worden war. Das restliche Eluat wurde einer magnetischen Separation unterzogen: 0,1 mg der nach Herstellerangaben mit 2 M LiCl aufbereiteten Streptavidinbeads (*Dynabeads M280*) wurden mit dem Eluat in einer 2 M LiCl-Lösung 1 h bei 37 °C in einem Volumen von 50 µl unter Schwenken inkubiert. Dabei erfolgt die Bindung der biotinylierten DNA-Fragmente an die Streptavidinbeads. Anschließend wurden die Streptavidinbeads mit den daran ge-

bundenen DNA-Fragmenten mit Hilfe eines Magneten von nicht-biotinylierten DNA-Fragmenten separiert. Dazu wurden die Ansätze für 2 min in einen Magnetständer (*MPC-E*) eingesetzt und der Überstand abpipettiert. Anschließend wurden die Beads dreimal mit 200 µl einer 10 mM TrisHCl-Lösung (pH 7,4) bei Raumtemperatur gewaschen und in 50 µl destilliertem Wasser resuspendiert. 20 µl der Suspension wurden in der PCR-Reaktion eingesetzt. Der Nachweis des PCR-Produktes erfolgte durch Elektrophorese in einem Agarosegel.

2.5.4.2 Triplehelixnachweis in Zellkernen

Bei der Anwendung der magnetischen Separation auf isolierte Zellkerne wurden Zellkerne von 2 Millionen A431-Zellen eingesetzt. Nach Isolierung der Zellkerne (Methodenteil, Abschnitt 2.3.5, Seite 46) wurden diese in 2 ml kaliumfreiem Triplehelix-Inkubationspuffer equilibriert, und anschließend mit Triplehelix- oder Kontroll-Oligonukleotiden in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Nach Bestrahlung (5 J/cm²) zur Fixierung des Triplehelix-Oligonukleotides an seine Zielsequenz wurde die genomische DNA aus den Zellkernen präpariert. Da bei der DNA-Präparation mit Silikatmembran-Säulen oder Anionenaustauscher-Säulen DNA-Fragmente mit einer Länge kürzer als 100 bp entfernt werden, konnte auf eine Entfernung des überschüssigen Triplehelix-Oligonukleotides durch Gelextraktion verzichtet werden. 2 µg DNA wurden in einem Volumen von 20 µl mit *Pst* I verdaut, um das gewünschte Fragment für die Separation zu erzeugen. Nach Inaktivierung des Restriktionsenzym durch Erhitzen für 20 min auf 80 °C wurden 2 µl der Verdauung als Kontrolle in die PCR-Reaktion eingesetzt. Der Rest wurde der magnetischen Separation unterzogen. Da in Vorversuchen eine Bindung von nicht-biotinylierter DNA an die Streptavidinbeads festgestellt wurde, wurden die Separationsbedingungen modifiziert. Durch Zugabe eines 20fachen Überschusses an Lachsspermien-DNA und strengeren Separationszeiten und -temperaturen konnte die Bindung nicht biotinylierter DNA verhindert werden: 2 µg *Pst* I verdaute DNA wurden mit 0,1 mg Streptavidinbeads in Anwesenheit von 40 µg Lachsspermien-DNA in einem Volumen von 40 µl LiCl (2 M) im Schwenker bei 37 °C für 30 min inkubiert. Vor der Inkubation waren die Beads 30 min bei 37 °C schwenkend mit 50fachen Überschuß von Lachsspermien-DNA in 2 M LiCl inkubiert worden, um unspezifische DNA-Bindungsstellen an den Beads zu blockieren. Die Separation erfolgte für 2 min im Magnetständer. Anschließend wurden die Beads dreimal mit 300 µl destilliertem Wasser für 5 min bei 60 °C gewaschen und in 20 µl destilliertem Wasser resuspendiert. 5 µl der Suspension wurden in der nachfolgenden PCR-Reaktion eingesetzt und das PCR-Produktes durch Gelelektrophorese nachgewiesen.

Ergebnisse

1. Zielsequenzen für Triplehelix-Oligonukleotide im ICAM-1-Gen

1.1 Identifikation geeigneter Zielsequenzen

Entsprechend den im Methodenteil dargestellten Kriterien zur Auswahl geeigneter Zielsequenzen für Triplehelix-Oligonukleotide (Abschnitt 2.4.1, Seite 46), wurden alle verfügbaren Sequenzen des ICAM-1-Gens nach Homopurinabschnitten durchsucht. Die identifizierten Zielsequenzen im ICAM-1-Gen sind in Abbildung 19 aufgelistet.

Name	5'	Sequenz	-3'	Ref.	Position
Zielsequenz 01	-	GGGGGTCTCCC	TA	<i>alt</i>	A 73-83
Zielsequenz 02	-	CCCCCAAGAAAAAA	TA	<i>alt</i>	A 489-504
Zielsequenz 03	-	GAGG <u>C</u> GGGGGAAA	TA	<i>mis</i>	A 535-547
Zielsequenz 04	-	TCCCCCTCCCCCTCCTC	-	A	956-972
Zielsequenz 05	-	CTTCCTTCCTTTTTCT	-	A	1056-1071
Zielsequenz 06	-	GAAAGGGGAAG <u>C</u> GAGGAGG	-	<i>mis</i>	A 1105-1123
Zielsequenz 07	-	TTTCCGGAGGGGAAGG	-	<i>alt</i>	A 1727-1742
Zielsequenz 08	-	GGGAAGGAGGGG <u>C</u>	TA	<i>mis</i>	A 2029-2041
Zielsequenz 09	-	GGAGAI <u>G</u> GAGGGGAGGGG	-	<i>mis</i>	A 2152-2169
Zielsequenz 10	TA	GGGAAGAGGGGAAGGGG	-	A	2604-2619
Zielsequenz 11	-	AGGGAGAAGG <u>I</u> GGGGG	-	<i>mis</i>	B 348-363
Zielsequenz 12	-	AGGAGGGGGAA <u>I</u> GAAA	-	<i>mis</i>	B 495-510
Zielsequenz 13	-	CCTTTCTTCTCTCCC	TA		B 556-570
Zielsequenz 14	TA	AGAAGGGG <u>C</u> AGGGG	-	<i>mis</i>	B 865-878
Zielsequenz 15	-	AAAAAGGGACCCCC	-	<i>alt</i>	B 1782-1795
Zielsequenz 16	-	CCTTTCCCAGAAAGGAG	-	<i>alt</i>	B 2527-2543
Zielsequenz 17	TA	TTCTCCCTTCCCCC	-		B 2622-2637
Zielsequenz 18	-	GGAGGACTCCCTCCC	-	<i>alt</i>	B 2864-2878
Zielsequenz 19	-	CTTCCTGGGGGAAGAAA	-	<i>alt</i>	B 3237-3254
Zielsequenz 20	TA	AAGACTCCTCTCCAGAAAA	-	<i>alt</i>	B 3336-3355

Abb. 19: Zielsequenzen für Triplehelix-Oligonukleotide im ICAM-1-Gen. Dargestellt ist jeweils der kodierende Strang von Abschnitten im menschlichen ICAM-1-Gen, die sich für eine Triplehelixbildung eignen. Der für die Bindung des Triplehelix-Oligonukleotides relevante Purinstrang kann sich auf dem kodierenden, aber auch auf dem komplementären (nicht dargestellten) Strang der Doppelhelix befinden. Die Positionsangabe in der letzten Spalte der Abbildung bezieht sich auf die in Referenz A (Wawryk et al. 1991) oder Referenz B (Voraberger et al. 1991) veröffentlichten ICAM-1-Sequenzen. Zielsequenzen bei denen die Homopurinabschnitte auf wechselnden DNA-Strängen liegen wurden mit *alt* (für *alternierend*) bezeichnet. Homopurinabschnitte die durch eine einzelne Pyrimidinbase (unterstrichen) unterbrochen sind mit *mis* (für *Mismatch*) gekennzeichnet. Die für eine Psoraleninterkalation wichtigen 5'-TpA-Stellen sind aufgeführt, sofern sie vorhanden sind. Die in dieser Arbeit experimentell untersuchten Zielsequenzen sind fett hervorgehoben.

Reine Purinsequenzen von ausreichender Länge, die aber über keine 5'-TpA Stelle verfügen, sind Zielsequenz 04 und 05. Zielsequenz 08 verfügt über eine 5'-TpA Stelle, die für eine Interkalation zur Verfügung steht, wenn die endständige *Mismatch*-Base überbrückt wird.

Sequenzabschnitte, bei denen der Homopurinabschnitt auf wechselnden Strängen liegt, sind Zielsequenz 01, 02, 07, 15, 16, 18, 19 und 20. Sie eignen sich für *alternierende* Triplehelix-Oligonukleotide, die an beide Stränge abwechselnd an den jeweiligen Purinstrang binden. Von diesen Sequenzen sind besonders Sequenz 01, 02 und 20 geeignet, da sie zusätzlich über eine 5'-TpA Stelle verfügen.

Sequenzen, die eine Unterbrechung des Homopurinabschnittes durch eine einzelne Base (*Mismatch*-Base) aufweisen, sind Zielsequenz 03, 06, 08, 09, 11, 12 und 14, wobei aufgrund der 5'-TpA Stelle die Zielsequenzen 03 und 08 besonders geeignet sind. Einzelne *Mismatch*-Basen können mit einer entsprechenden Modifikationen des Triplehelix-Oligonukleotides überbrückt werden.

1.2 Auswahl besonders geeigneter Zielsequenzen

Aus sterischen Gründen sind Homopurinabschnitte, bei denen die Purinbasen auf einem Strang liegen zu bevorzugen. Zusätzlich ist das Design von Triplehelix-Oligonukleotiden komplizierter, die an wechselnde Stränge der Doppelhelix binden. Ist der Homopurinabschnitt von einzelnen Pyrimidinbasen unterbrochen (*Mismatch*-Base) erfordert die Überbrückung dieser Basen aufwendige Validierungen geeigneter Basensubstitute im Triplehelix-Oligonukleotid (Mergny et al. 1991, Xodo, Alunni Fabbroni et al. 1993, Kukreti, Sun, Garestier et al. 1997). Daher kamen in dieser Arbeit vor allem Zielsequenzen ohne Strangwechsel und *Mismatch*-Base in die nähere Auswahl (Zielsequenz 04, 05, 10, 13 und 17).

Da es unter anderem Aufgabe dieser Arbeit war, den stabilisierenden Effekt von psoralenkonjugierten Triplehelix-Oligonukleotiden zu untersuchen, wurden Zielsequenzen bevorzugt, die eine 5'-TpA Stelle aufwiesen. Deshalb konzentrierten sich die Arbeiten im Wesentlichen auf die Zielsequenzen 13 und 17. Die Positionen dieser Zielsequenzen im ICAM-1-Gen sind in Abbildung 20 schematisiert.

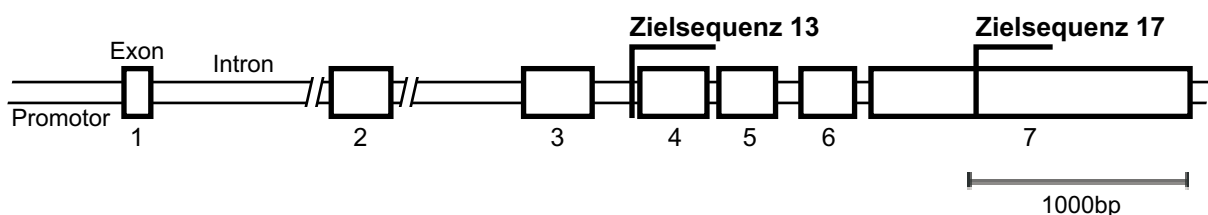


Abb. 20: Position von Triplehelix-Zielsequenzen im ICAM-1 Gen. Proportionale Darstellung des ICAM-1 Gens, mit den in dieser Arbeit untersuchten Zielsequenzen (Zielsequenz 13 und 17).

Im den folgenden Abbildungen (Abbildung 21 und 22) sind die Eigenschaften dieser zwei Zielsequenzen genauer dargestellt. Dabei ist die für das Design von Triplehelix-Oligonukleotiden wichtige Verteilung der Guanin- und Adeninbasen im Homopurinabschnitt (Anzahl der GpA-Abschnitte) und die Position der 5'-TpA Stelle für die Psoraleninterkalation beschrieben. Flankierende Restriktionsenzyme sind dargestellt, da dadurch die Möglichkeit besteht eine Triplehelix über die Restriktionsenzymhemmung nachzuweisen (Methodenteil, Abschnitt 2.5.2, Seite 52).

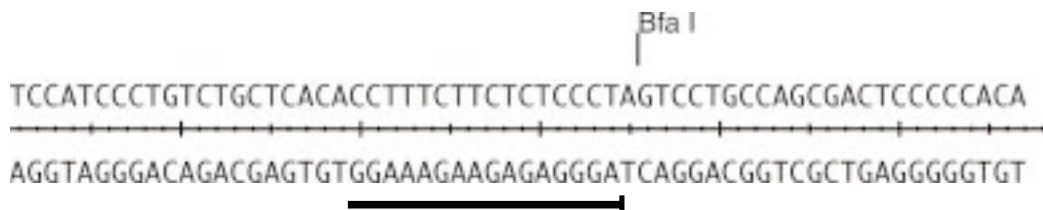


Abb. 21: Die Zielsequenz 13. Dargestellt ist ein 57 bp langer Bereich aus dem dritten Intron des humanen ICAM-1-Gens mit der Zielsequenz 13 und den Schnittstellen von Restriktionsenzymen im Zielsequenzbereich. Die Zielsequenz 13 befindet sich am Ende des dritten Introns. Der Homopurinabschnitt ist 16 Basenpaare lang und im nicht kodierenden Strang lokalisiert (mit einem Längsbalken markiert). Wechsel zwischen den beiden Purinbasen (GpA-Abschnitte) in dieser Zielsequenz sind relativ selten, eine 5'-TpA Stelle für eine Psoraleninterkalation befindet sich am 5'-Ende des Purinstranges (senkrechter Querbalken). Die Erkennungstelle des Restriktionsenzym *Bfa* I überlappt mit der Zielsequenz 13. Dadurch ist diese Zielsequenz für einen Triplehelix-Nachweis mittels Restriktionsenzymhemmung geeignet. Allerdings ist es nachteilig, daß 95 Basenpaare vor und 44 Basenpaare nach der Zielsequenz 13 weitere *Bfa* I-Schnittstellen lokalisiert sind. Dadurch entstehen bei einer Verdauung kurze Fragmente, die schwieriger nachweisbar sind.

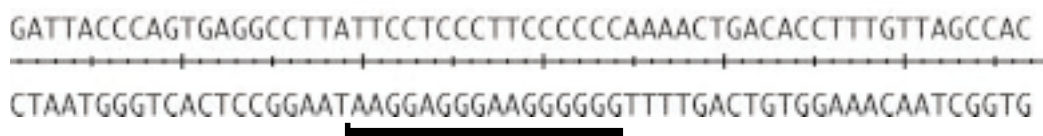


Abb. 22: Die Zielsequenz 17. Ein 57 bp langer Ausschnitt aus dem nicht translatierten Bereich von Exon 7 des ICAM-1-Gens ist dargestellt, der die Zielsequenz 17 enthält. Der dem Triplehelix-Oligonukleotid zur Verfügung stehende 16 Basen lange Homopurinabschnitt ist im nicht kodierenden Strang der Doppelhelix lokalisiert. Eine 5'-TpA Stelle ist am 3'-Ende des Homopurinstranges gelegen. Die Verteilung der Purinbasen sind ungleichmäßig, GpA-Abschnitte sind selten. Die Zielsequenz 17 weist keine flankierenden Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme auf.

2. Design von Triplehelix-Oligonukleotiden

Entsprechend der dargestellten Technik (Methodenteil, Abschnitt 2.4.2, Seite 48) wurden Triplehelix-Oligonukleotide für die ausgewählten Zielsequenzen gestaltet. Primär wurden Triplehelix-Oligonukleotide vom Purin-Typ, aber auch ein Triplehelix-Oligonukleotid vom Pyrimidin-Typ entwickelt. Da jedes Oligonukleotid an komplementäre mRNA in *Watson-Crick*-Paarung binden und auf diese Weise die Translation hemmen kann (*Anti-sense*-Effekt), wurde die Sequenz aller Triplehelix-Oligonukleotide auf ihre Hybridisierungsmöglichkeit mit ICAM-1-mRNA überprüft.

Triplehelix-Oligonukleotide wurden mit TFO (*Triple helix-forming oligonucleotide*), Kontroll-Oligonukleotide mit CO (*Control oligonucleotide*) bezeichnet. Anschließend folgte die Nummer der Zielsequenz und die Basenzusammensetzung des Oligonukleotides (G für Guanin, A für Adenin, T für Thymin, C für Cytosin und U für Uracil). Biotinylierte Oligonukleotide wurden mit bTFO oder bCO bezeichnet.

2.1 Triplehelix-Oligonukleotide für die Zielsequenz 13

Für die Zielsequenz 13 wurde sowohl ein *antiparallel* bindendes Triplehelix-Oligonukleotid vom Purin-Typ als auch ein *parallel* bindendes Triplehelix-Oligonukleotid vom Pyrimidin-Typ entwickelt.

Als *antiparallel* bindendes Triplehelix-Oligonukleotid wurde ein Oligonukleotid aus den Basen Guanin und Thymin (TFO13GT, Abbildung 23) hergestellt, weil die Bindung zwischen Thymin im Oligonukleotid und Adenin im Homopurinabschnitt besonders stark ist (Einleitungsteil, Abschnitt 5.2.2, Seite 9).

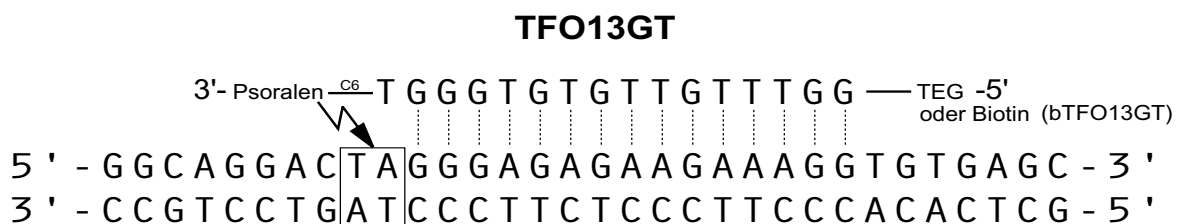


Abb. 23: Das *antiparallel* bindende Triplehelix-Oligonukleotid TFO13GT. Das Triplehelix-Oligonukleotid TFO13GT aus Guanosin und Thymin bindet in *antiparalleler* Orientierung unter Ausbildung von *reversen Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken an den Purinstrang der Zielsequenz 13. Die 3'-Enden wurden mit Psoralen, die 5'-Enden mit Triethylenglykol modifiziert. Der Pfeil symbolisiert die Quervernetzung des Psoralens mit den Thyminbasen der 5'-TpA-Stelle (Kästchen) nach UVA-Bestrahlung. C6 steht für die Kopplung des Psoralens über eine C6-Brücke, TEG für Triethylenglykol. In biotinkoppelter Form (bTFO13GT) wurde es in Bindungsstudien an genomischer DNA eingesetzt. Dabei wurde am 5'-Ende Triethylenglykol durch Biotin ersetzt.

Aufgrund der fehlenden Isomorphie der Basentriplets T-AT und G-GC ist die Einlagerung solcher Oligonukleotide verschlechtert, da sie eine Verformung des Rückgrates erfordert. Dieser Effekt wirkt sich besonders stark bei Zielsequenzen aus, in denen die beiden Purinbasen in der Zielsequenz häufig wechseln (viele GpA-Abschnitte), da sich dann das Rückgrat besonders häufig verformen muß. Da dies bei der Zielsequenz 13 nicht der Fall ist, wirken sich diese Effekte nicht sehr aus. Die 5'-TpA Stelle befindet sich in Nachbarschaft zum 5'-Ende des Purinstranges der Zielsequenz, daher wurde Psoralen an das 3'-Ende des Triplehelix-Oligonukleotides gekoppelt. Die freien 5'-Enden des Oligonukleotides wurden mit Triethylglykol oder Biotin modifiziert um eine Degradation zu verhindern.

Zusätzlich wurde ein *parallel* bindendes Triplehelix-Oligonukleotid vom Pyrimidin-Typ eingesetzt, das in Abbildung 24 dargestellt ist.

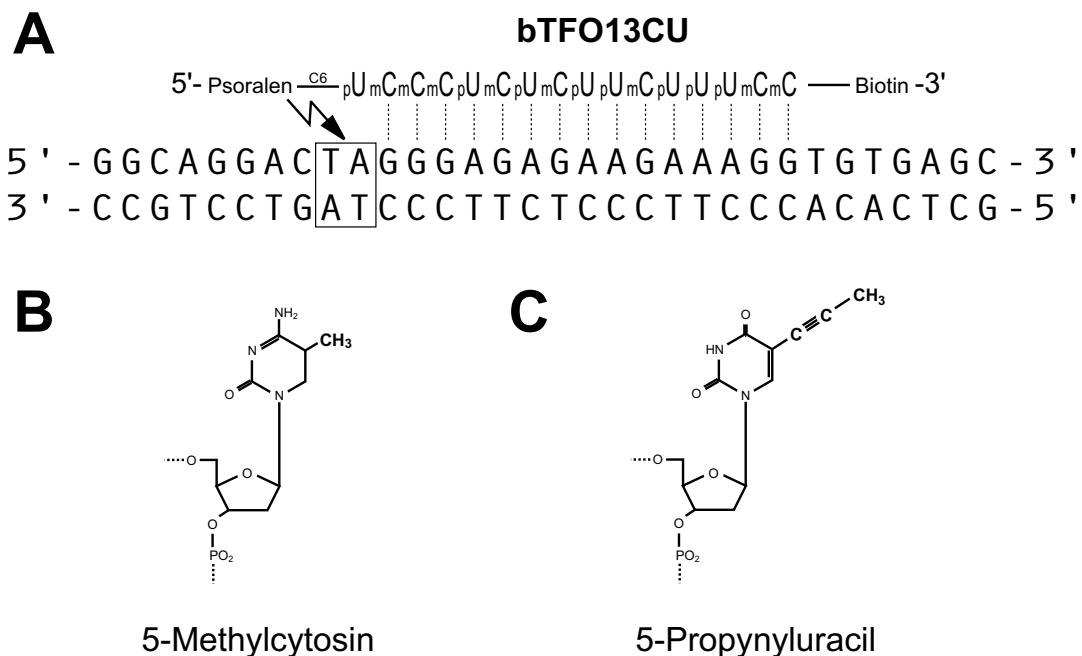


Abb. 24: Das *parallel* bindende Triplehelix-Oligonukleotid bTFO13CU. Abbildung 24 A zeigt das unter Ausbildung von *Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken an den Purinstrang bindende bTFO13CU. Es ist ausschließlich aus modifizierten Basen aufgebaut. Das an C5-Position methylierte Cytosin wurde mit mC, das an C5-Position mit einem Propynylrest modifizierte Uracil wurde mit pU bezeichnet. Die chemischen Formeln von 5-Methylcytosin und 5-Propynyluracil sind in Abbildung 24 B und C dargestellt, wobei Methylrest und Propynylrest fett hervorgehoben sind. Die Enden des Triplehelix-Oligonukleotides wurden mit Psoralen und Biotin modifiziert.

Da parallel bindende Triplehelix-Oligonukleotide aus Cytosin und Thymin im physiologischen pH-Milieu schlecht binden, wurde Cytosin durch 5-Methylcytosin und Thymin durch 5-Propynyluracil ersetzt, um die Bindungsfähigkeit zu verbessern (Lacroix et al. 1999, Wagner et al. 1993). Der parallelen Orientierung des Oligonukleotides entsprechend wurde Psoralen an das 5'-Ende gekoppelt. Das freie 3'-Ende wurde mit Biotin modifiziert.

2.2 Triplehelix-Oligonukleotide für die Zielsequenz 17

Für die Zielsequenz 17 wurden *antiparallel* bindende Triplehelix-Oligonukleotide vom Purin-Typ entwickelt. Sie bestanden aus Guanin und Adenin (TFO17GA, Abbildung 25 A) oder aus Guanin und Thymin (TFO17GT, Abbildung 25 B).

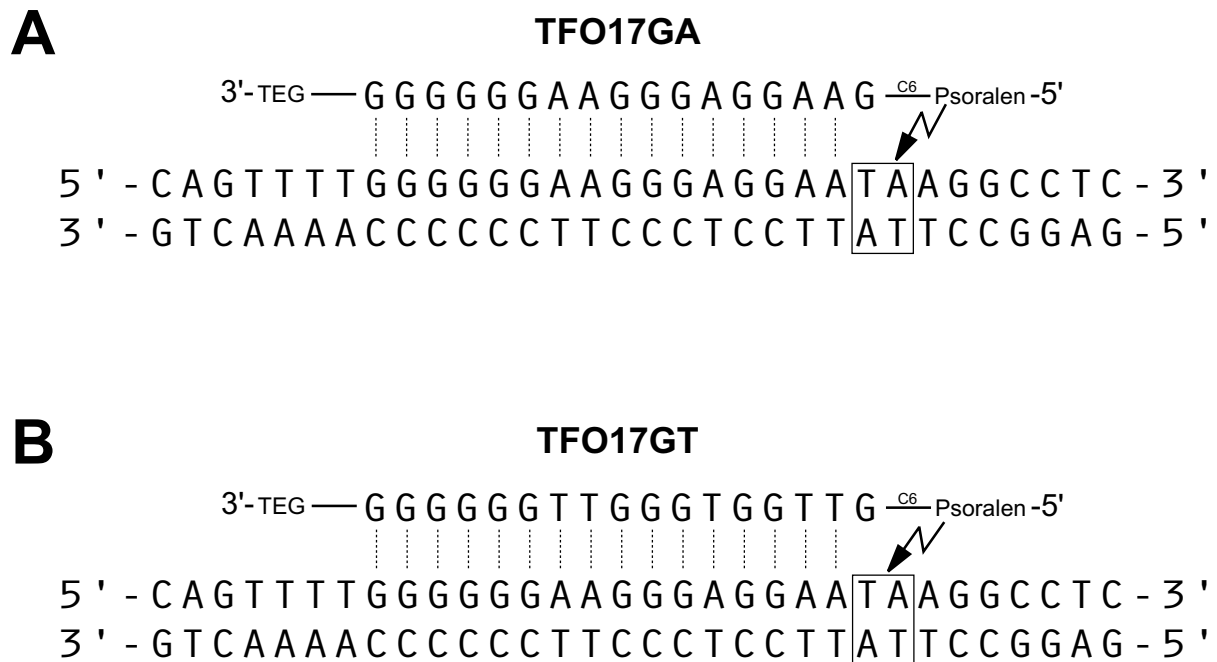


Abb. 25: Die Triplehelix-Oligonukleotide TFO17GT und TFO17GA. Abbildung 25 A zeigt das antiparallel an den Purinstrang der Zielsequenz 17 bindende TFO17GA, Abbildung 25 B das ebenfalls antiparallel bindende TFO17GT. Beide Oligonukleotide binden unter Ausbildung von reversen Hoogsteen-Wasserstoffbrücken an die Doppelhelix. Die 5'-Enden wurden mit Psoralen, die 3'-Enden mit Triethylenglykol modifiziert.

Da die 5'-TpA Stelle am 3'-Ende des Homopurinabschnittes liegt, wurde Psoralen an das 5'-Ende des Triplehelix-Oligonukleotides gekoppelt. Die Base Guanin im Triplehelix-Oligonukleotid wurde am 5'-Ende angefügt, um Psoralen in eine zur Interkalation geeignete Position zu bringen. Freie 3'-Enden wurden mit Triethylenglykol modifiziert.

2.3 Design von Kontrolloligonukleotiden

Als Kontrolle dienten Oligonukleotide mit durchmischter Sequenz, die die gleiche Länge und die gleiche Basenzusammensetzung wie die entsprechenden Triplehelix-Oligonukleotide haben (*scrambled control*). Dabei wurde darauf geachtet, daß auch die Verteilung der Basen den zugehörigen Triplehelix-Oligonukleotiden möglichst ähnlich ist. Für das Triplehelix-Oligonukleotid bTFO13CU, das ausschließlich in paralleler Orientierung binden kann, wurde als Kontrolle ein Oligonukleotid mit invertierter Sequenz gestaltet (3'- und 5'-Enden „vertauscht“). Invertierte Oligonukleotide weisen neben der gleichen Zusammensetzung auch die gleiche Verteilung der Basen auf. Sie wurden mit *inv* (für *inverted*) gekennzeichnet.

Ferner wurde darauf geachtet, daß die Modifikationen der Kontroll-Oligonukleotide denen der Triplehelix-Oligonukleotide entsprachen. Analog zu den Triplehelix-Oligonukleotiden wurde sichergestellt, daß auch die Kontroll-Oligonukleotide nicht zu einer Hybridisierung mit der ICAM-1-mRNA fähig waren (*antisense*-Effekte). Die Sequenz aller Kontroll-Oligonukleotide mit den entsprechenden Triplehelix-Oligonukleotiden, für die sie eingesetzt wurden, ist im Materialenteil (Abschnitt 1.7.1, Seite 27) dargestellt.

3. Bindungsstudien

Im Anschluß an das Design der Triplehelix-Oligonukleotide erfolgte die Überprüfung, ob sie zu einer spezifischen Triplehelixbildung an ihrer Zielsequenz fähig sind. Dazu wurden die Oligonukleotide zuerst an kurzen DNA-Fragmenten (doppelsträngige Oligonukleotide) und danach an längeren DNA-Fragmenten (Plasmide und genomische DNA) getestet, die höhere Anforderungen an die Selektivität der Oligonukleotide stellen.

3.1 Bindungsstudien mit Triplehelix-Oligonukleotiden für die Zielsequenz 13

3.1.1 Bindungsstudien an Oligonukleotid-Zielsequenzen

Bindungsstudien erfolgten zunächst an kurzen zielsequenzhaltigen DNA-Abschnitten von 20-30 bp Länge, die aus Oligonukleotiden hergestellt wurden. Mit solchen doppelsträngigen Oligonukleotid-Zielsequenzen wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Als Zielsequenz wurde ein 24 bp-Abschnitt des ICAM-1-Gens mit der Zielsequenz 13 eingesetzt (Abbildung 26).

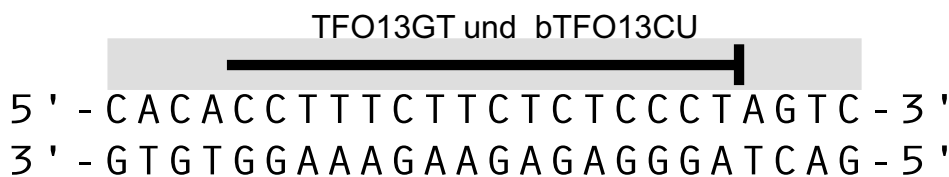


Abb. 26: Die Oligonukleotid-Zielsequenz 13. Die 24 bp lange Oligonukleotid-Zielsequenz wurde aus zwei komplementären Oligonukleotiden hergestellt die in äquimolarer Konzentration aneinandergelagert und mit Digoxigenin markiert wurden. Dazu wurden die Oligonukleotide gemischt, für 10 min auf 94 °C erhitzt und anschließend über 2 h langsam auf Raumtemperatur gekühlt. Anschließend erfolgte die Markierung der 3'-Enden mit Digoxigenin. Der mit der genomischen Sequenz von ICAM-1 identische Bereich ist grau gekennzeichnet. Der Bereich in dem das Triplehelix-Oligonukleotid bindet ist mit einem schwarzen Balken, die Interkalationsstelle für Psoralen mit einem senkrechten, schwarzen Strich markiert.

Nach Inkubation mit dem psoralenkonjugierten Triplehelix-Oligonukleotid wurden die Ansätze bestrahlt und die Bildung verschiedener Photoaddukte (*Monoaddukte* und *Bisaddukte*) durch Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen analysiert (Methodenteil, Abschnitt 2.5.1, Seite 51). Die Bildung von Photoaddukten des 24 bp-Abschnittes mit den Triplehelix-Oligonukleotiden TFO13GT und bTFO13CU ist in Abbildung 27 (nächste Seite) dargestellt.

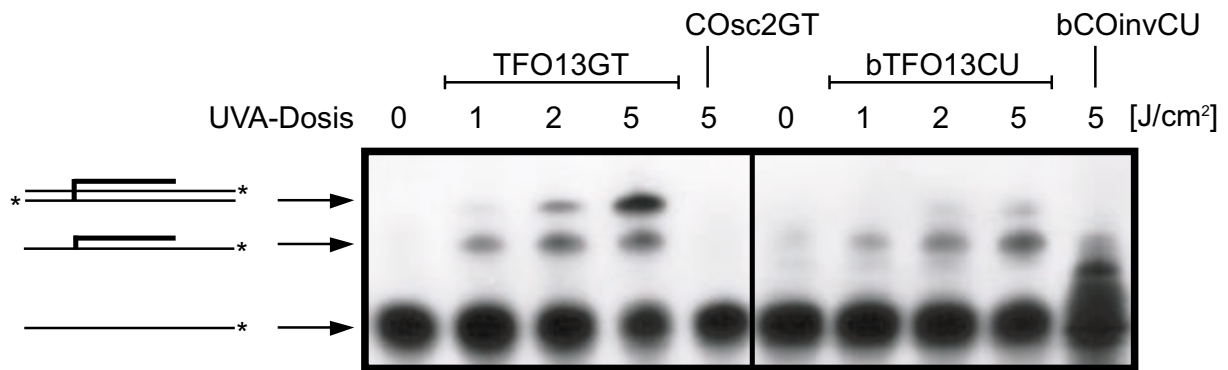


Abb. 27: Gelretardationsassay der Zielsequenz 13 bei unterschiedlichen UVA-Dosen. 1 μ M TFO13GT (linke Bildhälfte) oder bTFO13CU (rechte Bildhälfte) wurden in kaliumfreiem Puffer mit dem 24 bp-Abschnitt inkubiert und entweder nicht oder mit UVA-Dosen von 1, 2 oder 5 J/cm^2 bestrahlt. Kontroll-Oligonukleotide COsc2GT und bCOinvCU wurden mit 5 J/cm^2 bestrahlt. Der DIG-markierte 24 bp-Abschnitt ist schematisch als Doppelstrich mit einem Sternchen, das gebundene Triplehelix-Oligonukleotid als dickerer Einzelstrich dargestellt. Die Quervernetzung mit Psoralen mit einem Strang (*Monoaddukte*) oder beiden Strängen (*Bisaddukte*) der Zielsequenz ist mit einem dicken Querbalken symbolisiert.

Ansätze, in denen die Zielsequenz mit Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert, aber nicht bestrahlt wurde, zeigten aufgrund fehlender Photoadduktbildung keine Retardation. Entstandene Triplehelices wurden während der denaturierenden Gelelektrophorese zerstört, da sie nicht durch UVA-Bestrahlung quervernetzt wurden. Bei steigender UVA-Dosis (1, 2 und 5 J/cm^2) dagegen ist die Bildung von Photoaddukten zu erkennen. Dabei zeigte sich im Falle von TFO13GT die Menge von Monoaddukten auch bei hohen UV-Dosen (2 und 5 J/cm^2) konstant, während die Menge stärker retardierter Bisaddukte deutlich zunahm. Das Kontroll-Oligonukleotid COsc2GT dagegen führte auch bei hoher UV-Dosis zu keinen retardierten Produkten, was zeigt, daß Quervernetzungen nur nach vorheriger Triplehelixbildung stattgefunden haben.

Inkubation der Zielsequenz mit bTFO13CU führte ebenfalls abhängig von der UVA-Bestrahlung zur Entstehung von Photoaddukten: Bei steigender UV-Dosis traten zunehmend Mono- und Bisaddukte auf. Dabei war die Menge der Addukte deutlich geringer als bei TFO13GT, was entweder auf eine reduzierte Triplehelixbildung, oder eine reduzierte Psoraleninterkalation schließen läßt. Die Menge sowohl an Monoaddukten als auch an Bisaddukten nahm mit steigender UV-Dosis zu. Das Auftreten von retardierten Produkten wenn die Zielsequenz mit bCOinvCU inkubiert wurde ist nicht über die Bildung von Triplehelices entstandene Vernetzungen zurückzuführen. Hätte eine Quervernetzung nach Triplehelixbildung stattgefunden, wären nur zwei spezifische Banden entstanden, deren Laufhöhe den Mono- oder Bisaddukten entspricht. Die unterschiedliche Laufhöhe der Banden in diesem Ansatz ist deshalb auf andere, unspezifische Effekte zurückzuführen.

3.1.2 Bindungsstudien am Plasmid

Nachdem mit Oligonukleotid-Zielsequenzen eine sequenzspezifische Bindung der Triplehelix-Oligonukleotide an die Zielsequenz 13 nachgewiesen werden konnte, wurden weiterführende Bindungsstudien mit längeren DNA-Fragmenten durchgeführt. Dazu wurden zielsequenzhaltige Plasmide konstruiert. Da die Zielsequenz in diesen Plasmiden einmalig in einem DNA-Kontext von etwa 4500 bp vorkommt, sind die Anforderung an die entwickelten Triplehelix-Oligonukleotide hinsichtlich Affinität und Selektivität höher, als bei Oligonukleotid-Zielsequenzen.

3.1.2.1 Herstellung des Plasmides pCM55 mit der Zielsequenz 13

Der Nachweis der Triplehelix-Bildung sollte über die Hemmung eines Restriktionsenzym erfolgen (Methodenteil, Abschnitt 2.5.2, Seite 52). Dabei wurde ein DNA-Fragment so gestaltet, daß die Zielsequenz 13 mit der Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *EcoN* I überlappt (Triplehelixbindungsstelle, Abbildung 28). Diese Triplehelixbindungsstelle wurde in das Plasmid pCM51 inkloniert, dessen Herstellung im Zusammenhang mit anderen Ergebnissen dargestellt ist (Ergebnisteil, Abschnitt 4.2.1, Seite 89).

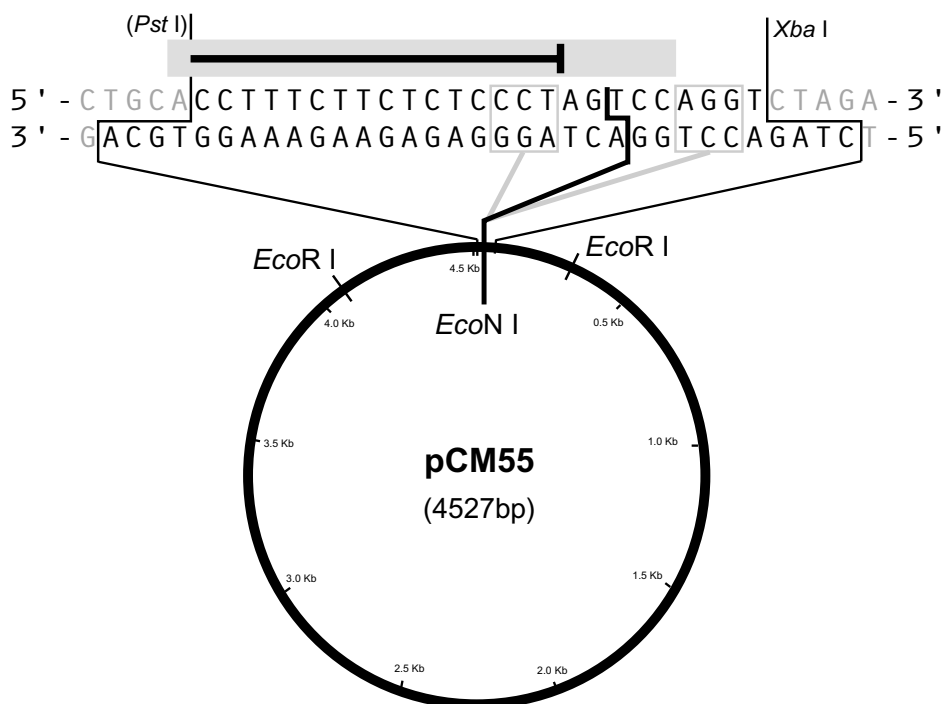


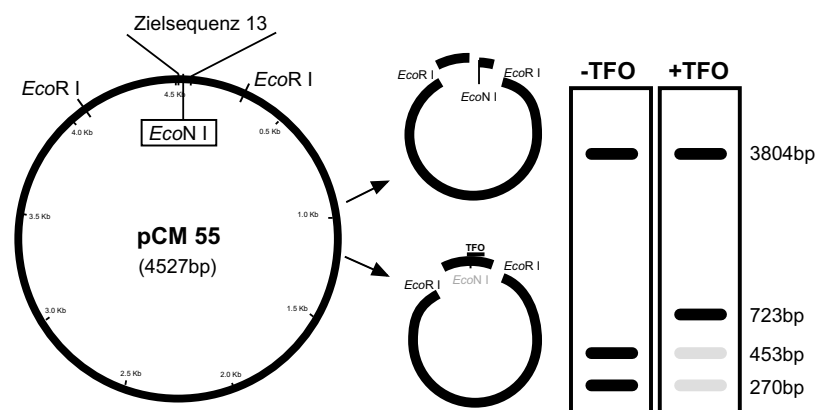
Abb. 28: Das Plasmid pCM55 mit der Zielsequenz 13. Die Triplehelixbindungsstelle wurde in das mit *Pst* I und *Xba* I verdaute Plasmid pCM51 inkloniert und das entstandene Konstrukt mit pCM55 bezeichnet. Der Bereich an den sich Triplehelix-Oligonukleotide anlagern können (Homopurinabschnitt) ist mit einem schwarzen Balken, die Psoreseninterkalationsstelle mit einem senkrechten Balken symbolisiert. Der Bereich zwischen ICAM-1-Gensequenz (Bereich grauer Balken) und *Xba* I-Schnittstelle wurde so modifiziert, daß eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *EcoN* I (graue Kästchen) erzeugt wird, die mit dem ICAM-1-Homopurinabschnitt überlappt.

Die Triplehelixbindungsstelle wurde mit Hilfe von komplementären Oligonukleotiden hergestellt, die im molaren Verhältnis von 1:1 aneinandergelagert wurden. Um ein Mehrfacheinbau der Triplehelixbindungsstelle zu vermeiden wurde diese dephosphoryliert. Das Plasmid pCM51 wurde mit *Pst* I und *Xba* I verdaut und das dabei entstehende 8 bp-Fragment durch Gelelektrophorese entfernt. Die Triplehelixbindungsstelle wurde anschließend im molaren Verhältnis von 3:1 mit dem aufgereinigten Plasmidfragment ligiert. Da die inklonierte Zielsequenz klein ist, und auch nicht keine geeignete, zusätzliche Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme bereitstellt, kann der Einbau nicht direkt über eine Restriktionsverdauung überprüft werden. Die Triplehelixbindungsstelle wurde daher so gestaltet, daß nach dem Einbau in das Plasmid die Erkennungsstelle für *Pst* I verloren geht (in Abbildung 28 in Klammern). Dadurch konnte der erfolgreiche Einbau unproblematisch durch Verdauung mit *Pst* I überprüft werden. Zusätzlich wurde der Bereich um die Zielsequenz sequenziert (Strang und Gegenstrang) um den korrekten Einbau der Triplehelixbindungsstelle mit der Zielsequenz zu bestätigen.

3.1.2.2 Triplehelixnachweis durch Hemmung von *Eco*N I

Die Bindungsfähigkeit der Triplehelix-Oligonukleotide für die Zielsequenz 13 wurde anhand ihrer Fähigkeit zur Hemmung des Restriktionsenzym *Eco*N I getestet. Dazu wurde das Plasmid pCM55 mit den Triplehelix-Oligonukleotiden oder Kontroll-Oligonukleotiden inkubiert. Es zeigte sich, daß der Inkubationspuffer mit den Restriktionsbedingungen von *Eco*N I interferierte und die Reaktionsansätze vor der Verdauung aufgereinigt werden mußten. Da bei der Aufreinigung Triplehelices zerstört werden, mußten die Triplehelices durch UVA-Strahlung fixiert werden. Das aufgereinigte Plasmid wurde dann mit *Eco*N I und *Eco*R I verdaut. Die bei der Verdauung entstehenden Fragmente sind in Abbildung 29 dargestellt.

Abb. 29: Fragmentmuster von pCM55. Eine vollständige Verdauung des Plasmides pCM55 mit *Eco*R I und *Eco*N I erzeugt drei Fragmente mit den Längen 270, 453 und 3804 bp. Ist die Verdauung mit *Eco*N I durch Triplehelixbildung gehemmt, entstehen nur zwei Fragmente von 723 und 3804 bp Länge. Bei einer Gelelektrophorese (rechts symbolisiert) verschiebt sich daher die Menge an 270 und 453 bp-Fragmenten zugunsten des 723 bp-Fragments (270 + 453 bp).



Untersuchungen mit TFO13GT zeigten eine Hemmung von *EcoN* I ab einem 3fachen molaren TFO-Überschuß, die ab einem 30fachen Überschuß zur vollständigen Hemmung führte (Abbildung 30 A). Höhere TFO-Konzentrationen führten zu keiner stärkeren Hemmung mehr. Hohe Überschußmengen von COsc2GT behinderten die Aktivität von *EcoN* I dagegen nicht, was auf eine effiziente, sequenzspezifische Bindung von TFO13GT an seine Zielsequenz hindeutet.

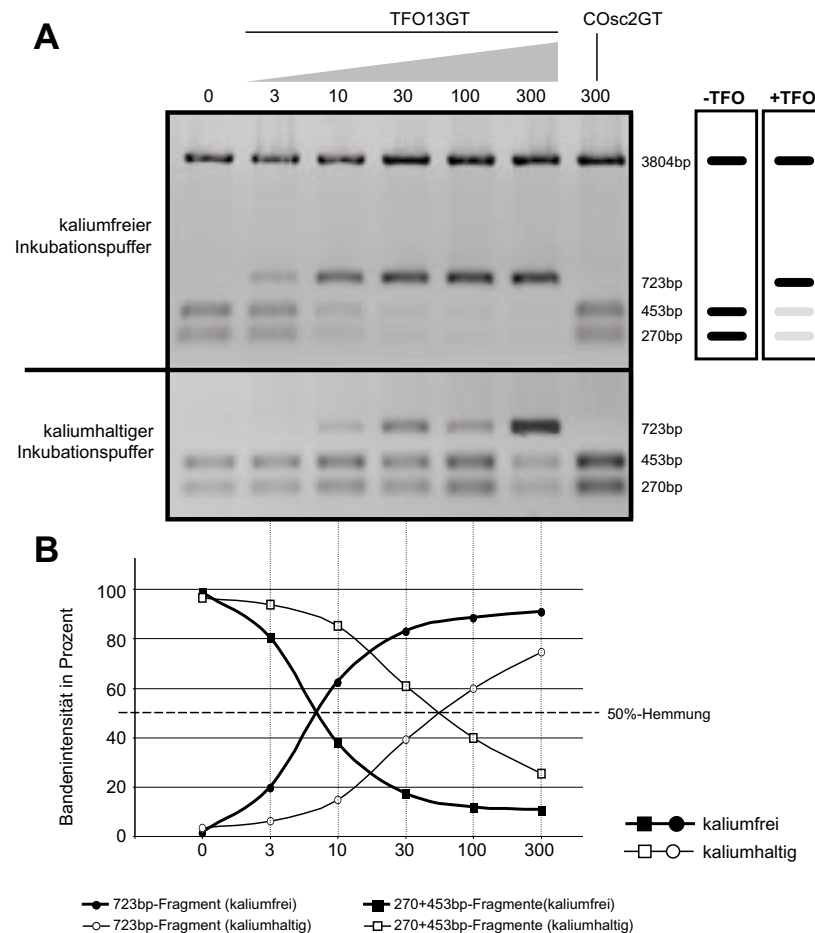


Abb. 30: Inhibition von *EcoN* I durch TFO13GT. Das Plasmid pCM55 wurde mit TFO13GT oder COsc2GT (3-300fachem molarem Überschuß Oligonukleotid) inkubiert. Abbildung 30 A zeigt die abnehmende Intensität der 270 und 453 bp-Banden durch Hemmung von *EcoN* I. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Hemmung von *EcoN* I nach Triplehelixbildung in kaliumfreiem, der untere Teil die Hemmung nach Triplehelixbildung in kaliumhaltigem Puffer (im unteren Teil ist das 3804 bp-Fragment nicht dargestellt).

Abbildung 30 B stellt die Intensitäten der entstandenen Fragmente nach densitometrischer Auswertung als Diagramm dar. Da bei der *EcoN* I-Hemmung die Intensitäten der 270- und 453 bp-Fragmente zugunsten der 723 bp-Fragmente verschoben sind, wurde das prozentuale Verhältnis zwischen Summe der 270 und 453 bp-Intensitäten (Kästchen) und der 723 bp-Intensität (Kreise) im Diagramm dargestellt. Kaliumfreie Ansätze sind schwarz mit dicker Linie, kaliumhaltige Ansätze weiß mit dünner Linie gekennzeichnet. Der Schnittpunkt des Intensitätsverlaufs, bei dem die Intensität der 270 und 453 bp Fragmente und die Intensität der 723 bp Fragmente gleich stark ist, entspricht einer 50%igen Hemmung (gestrichelte Linie). Der aus dem Reihe fallende Ansatz mit 100fachen TFO-Überschuß in kaliumhaltigen Inkubationspuffer wurde nicht gewertet und im Diagramm interpoliert.

In der Literatur ist mehrfach ein hemmender Effekt von Kalium in intrazellulären Konzentrationen auf die Triplehelixbildung beschrieben worden (Rougee et al. 1992, Cheng und Van Dyke 1993). Dies wurde untersucht, indem die Triplehelixbildung in kaliumfreiem Inkubationspuffer mit der Triplehelixbildung in kaliumhaltigem Puffer verglichen wurde. Die Anwesenheit von Kalium führte zu einer reduzierten, aber nicht verhinderten Triplehelixbildung von TFO13GT: Die densitometrische Auswertung der Gelbanden (Abbildung 30 B) bestätigt die Abnahme der 270 bp und 453 bp-Fragmente zugunsten des 723 bp-Fragments abhängig von der TFO-Konzentration. Eine 50%ige *EcoN* I-Hemmung zeigte sich bei einem 7,7fachen TFO-Überschuß zum Plasmid. In Anwesenheit von Kalium war eine 50%ige Inhibition erst bei einem 65fachen Überschuß festzustellen. Die Triplehelixbildung wurde daher durch physiologische Kaliumkonzentrationen um Faktor 8,5 reduziert.

Mit dem parallel bindenden Triplehelix-Oligonukleotid bTFO13CU konnte ebenfalls eine triplehelixvermittelte Inhibierung von *EcoN* I nachgewiesen werden. Eine schwache Hemmung wurde ab 3fachen Überschuß beobachtet, die durch Erhöhung der TFO-Konzentration gesteigert wurde (Abbildung 31). Im Gegensatz zu TFO13GT wurde keine vollständige Hemmung erzielt. Auch bei hohen TFO-Konzentrationen wurden 270 und 453 bp-Banden beobachtet, somit wurden nicht alle Zielsequenzen nach Triplehelixbildung quervernetzt.

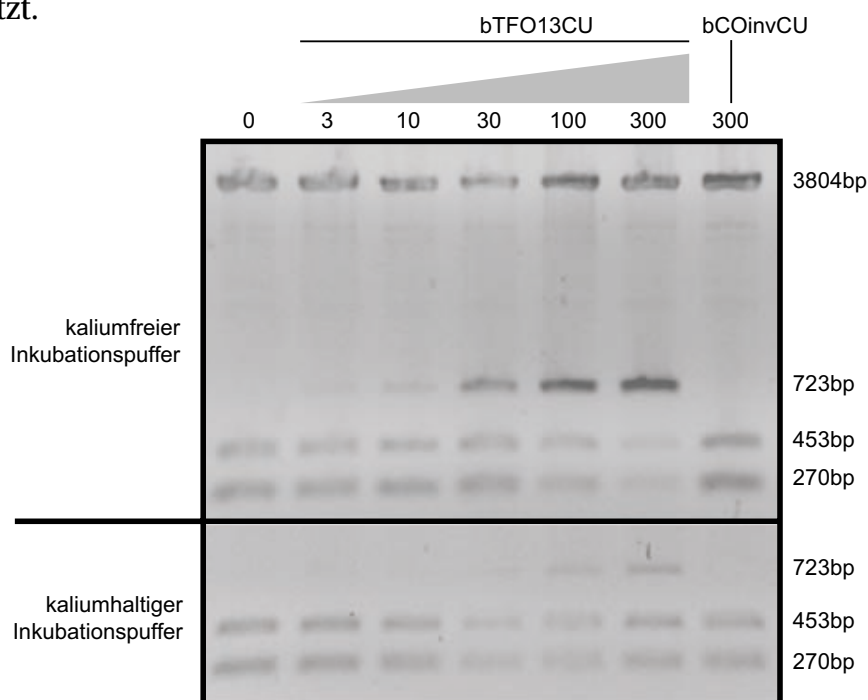


Abb. 31: Inhibition von *EcoN* I durch bTFO13CU. Das Plasmid pCM55 wurde mit bTFO13CU oder bCOinvCU (3-300fachem molarem Überschuß Oligonukleotid) inkubiert. Die Intensität der 270 und 453 bp-Banden durch Hemmung von *EcoN* I nimmt zugunsten der 723 bp-Bande ab. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Hemmung nach Inkubation in kaliumfreiem, der untere Teil die Hemmung nach Inkubation in kaliumhaltigem Puffer. Im unteren Teil ist das 3804 bp-Fragment nicht dargestellt.

In Anwesenheit von Kalium zeigte sich eine deutlich verminderte Triplehelixbildung. Erst ab einem 30fachen TFO-Überschuß wurde eine Hemmung beobachtet, die sich abhängig von der TFO-Konzentration weiter steigern ließ. Die Bindungsfähigkeit von bTFO13CU war in diesen Experimenten etwa um Faktor 10 schwächer als TFO13GT, wobei Kalium einen ähnlich hemmenden Effekt auf die Triplehelixbildung hatte.

3.1.3 Bindungsstudien an genomischen DNA-Präparationen

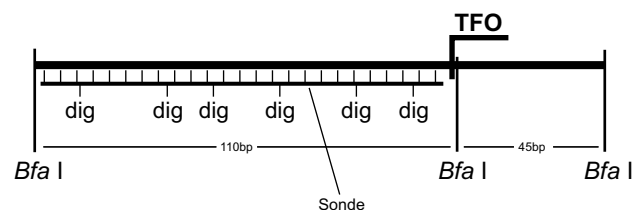
An kurzen Zielsequenzen und am Plasmid wurde eine Triplehelixbildung der Oligonukleotide gezeigt. Ziel der Arbeit war es, die ICAM-1-Genexpression zu hemmen, um zukünftige Therapeutika auf Triplehelix-Basis zu entwickeln. Daher war es wichtig eine Triplehelixbildung nicht nur im Kontext von künstlichen Systemen nachzuweisen, sondern auch im natürlichen Kontext, in der menschlichen Erbsubstanz, dem Genom, nachzuweisen. Eine selektive Triplehelixbildung in genomischer DNA stellt aufgrund der Länge (die menschliche DNA besteht aus etwa 3,3 Milliarden Basenpaaren) erheblich höhere Anforderungen an die Affinität und Selektivität des Triplehelix-Oligonukleotides. Aufgrund der geringen Anzahl an Zielsequenzen in genomischer DNA sind auch die Nachweisverfahren komplexer.

3.1.3.1 Hemmung des Restriktionsenzymes *Bfa* I

In den Experimenten am Plasmid pCM55 gelang der Triplehelixnachweis über die Hemmung von *Eco*N I, dessen Erkennungsstelle künstlich eingefügt worden war, in dem die flankierenden Basen der Zielsequenz modifiziert wurden (Abbildung 28, Seite 65).

Im der genomischen Sequenz des ICAM-1-Gens überlappt die Erkennungsstelle des Restriktionsenzymes *Bfa* I mit der Zielsequenz 13 (Abbildung 21, Seite 58). Analog zu den Versuchen am Plasmid wurden deshalb Experimente an isolierter genomischer DNA mit *Bfa* I durchgeführt. Die dabei entstehenden Fragmente sind in Abbildung 32 dargestellt. Die Fragmente sollten dann mit einer DIG-markierten Sonde nachweisbar sein, die im 5'-Bereich der Zielsequenz hybridisiert (Southern Blot).

Abb. 32: Inhibition des Restriktionsenzymes *Bfa* I in genomischer DNA. Dargestellt sind drei Schnittstellen von *Bfa* I im ICAM-1-Gen, wobei die mittlere Schnittstelle mit der Zielsequenz 13 überlappt. Wird die Verdauung mit *Bfa* I durch ein Triplehelix-Oligonukleotid gehemmt, entsteht ein Fragment von 155 bp Länge. Wird *Bfa* I nicht gehemmt entstehen zwei kürzere Fragmente mit einer Länge von 45 und 110 bp. Der Nachweis erfolgte mit einer 89 bp langen DIG-markierte Sonde, die im 5'-Bereich der Zielsequenz hybridisiert (Southern Blot).



Die Kürze der genomischen *Bfa* I-Fragmente bereitete bei der Detektion Schwierigkeiten. Beim Einsatz von TFO13GT konnten auch bei hohen TFO-Konzentrationen keine Fragmente detektiert werden. Als Ursache kommt in Betracht, daß die Sonde mit einer Länge von 89 bp relativ kurz und deren Signalstärke infolge der wenigen DIG-Markierungen zu schwach ist. Eine zusätzliche Markierung der 3'-Enden mit Digoxigenin erbrachte keine Verbesserung. Die Analyse der Sonde im Dot-Blot ergab zwar eine hinreichende Markierung, allerdings blieb unklar, ob die Signalstärke für den Nachweis genomischer DNA ausreichend ist. Auch niedrigere Temperaturen zur Hybridisierung der kurzen Fragmente erbrachten keine Verbesserung.

3.1.3.2 Triplehelixnachweis mittels magnetischer Separation

Da sich die *Bfa* I-Restriktionsstelle als ungeeignet erwies, wurden verschiedene Methoden erdacht um die Triplehelixbildung in genomischer DNA nachzuweisen.

Der Nachweis konnte schließlich mit einer neu entwickelten Methode erbracht werden, die im Methodenteil (Abschnitt 2.5.4, Seite 53) dargestellt ist. Dabei werden Triplehelix-Oligonukleotide eingesetzt, deren Enden sowohl mit Psoralen, als auch mit Biotin modifiziert sind. Hat eine Triplehelixbildung in genomischer DNA stattgefunden, kann das psoralenkonjugierte Oligonukleotid mit UVA-Strahlung mit seiner Zielsequenz quervernetzt werden. Nach Fragmentierung der DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym kann das triplehelixtragende, genomische Fragment über einen Streptavidin/Biotin-Mechanismus aufgereinigt und mittels PCR-Reaktion identifiziert werden.

Für die Nachweise an der Zielsequenz 13 im ICAM-1-Gen wurde zur Fragmentierung das Enzym *Pst* I gewählt. Es erzeugt bei der Verdauung von genomischer DNA ein 825 bp-Fragment des ICAM-1-Gens mit der Zielsequenz 13. Diese liegt im hinteren Teil des Fragmentes, so daß durch die Amplifikation eines 388 bp-Bereichs vor der Zielsequenz eine Identifikation des Fragmentes möglich ist (Abbildung 33).

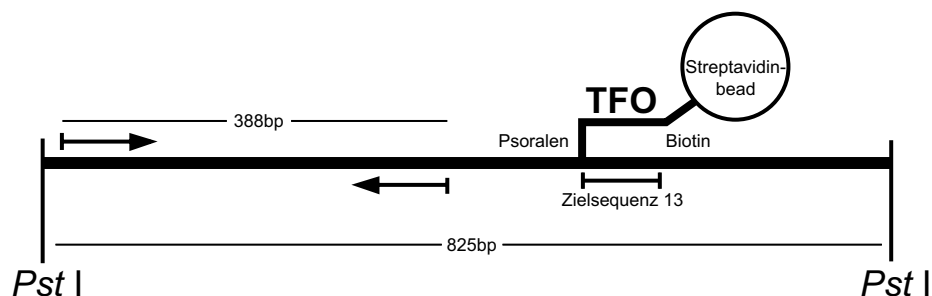


Abb. 33: Das 825 bp-*Pst* I-Fragment von ICAM-1 mit der Zielsequenz 13. Das mittels Psoralen und UVA quervernetzte Triplehelix-Oligonukleotid ist mit dem an dem biotinylierten Ende gebundenen Streptavidinbead dargestellt. Das Fragment kann so mittels magnetischer Separation von nicht biotinylierten Fragmenten getrennt und mittels PCR nachgewiesen werden. Positionen der für die PCR-Identifikation eingesetzten Primer sind mit Pfeilen symbolisiert. Es wurden die Primer ICAM-3102 und ICAM-3490 verwendet, die einen 388 bp-Bereich vor der Zielsequenz amplifizieren.

Aus A431-Zellen wurde genomische DNA präpariert und mit *Pst* I verdaut. Anschließend erfolgte die Inkubation der DNA mit den biotinylierten Triplehelix-Oligonukleotiden. Als Kontrolle dienten biotinylierte Kontroll-Oligonukleotide sowie nicht biotinylierte Triplehelix-Oligonukleotide. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.

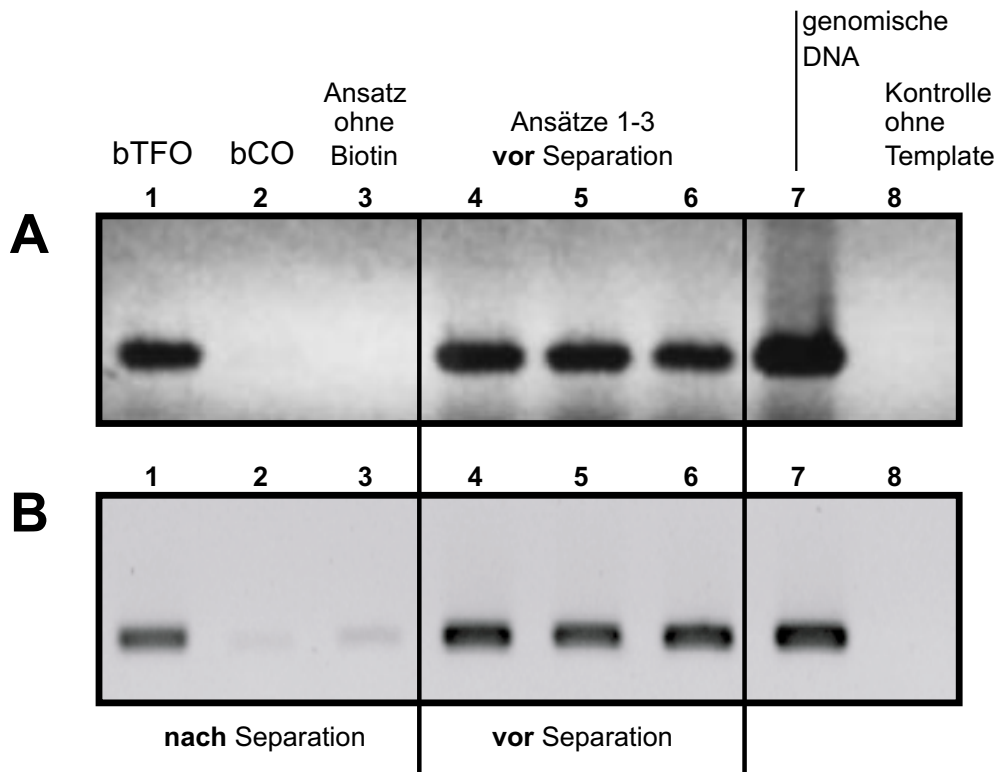


Abb. 34: Triplehelixnachweis in genomischer DNA mittels magnetischer Separation. Abbildung 34 A zeigt das PCR-Produkt von Ansätzen in denen *Pst* I-verdaute genomische DNA mit bTFO13GT, bCOsc2GT oder TFO13GT (ohne Biotin) inkubiert und bestrahlt wurde. Abbildung 34 B zeigt Ansätze von genomischer DNA, die mit den Oligonukleotiden bTFO13CU, bCOinvCU oder mit keinem Oligonukleotid inkubiert und bestrahlt wurden. Reihe 1-3 zeigen die PCR-Analyse der Ansätze nach magnetischer Separation, Reihe 4-6 die gleichen Ansätze bevor sie dem Separationsschritt unterzogen wurden. Kontrollansätze für die PCR-Reaktion mit genomischer DNA und ohne DNA wurden in Reihe 7 und 8 aufgetragen (Positiv- und Negativ-Kontrolle). Die PCR-Reaktion wurde mit den Primern ICAM-3102 und ICAM-3490 mit 35 Zyklen (30 s/94 °C, 30 s/63 °C, 30 s/72 °C) durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von dreifach durchgeführten Experimenten.

Ein PCR-Fragment als Nachweis der Triplehelixbildung zeigt der Ansatz mit dem anti-parallel bindenden Oligonukleotid bTFO13GT (Abbildung 34 A, Reihe 1). In Übereinstimmung mit der Sequenzspezifität der Triplehelixbildung wurde im Ansatz mit biotinyliertem Kontroll-Oligonukleotid kein PCR-Fragment amplifiziert (Reihe 2). Auch im Ansatz mit nicht biotinyliertem Triplehelix-Oligonukleotid war kein PCR-Fragment nachweisbar (Reihe 3). Dieser Ansatz erlaubt den Ausschluß unspezifischer, biotinunabhängiger Wechselwirkungen von DNA-Fragmenten mit den Streptavidinbeads, die zu

einem falsch-positives PCR-Signal führen könnten. Bei allen Oligonukleotiden war in Proben, die den Ansätzen vor der Separation entnommen wurden, ein PCR-Fragment nachweisbar (Reihe 4-6). Das 825 bp-ICAM-1-Fragment war somit erfolgreich aus dem Gel extrahiert worden und vor der Separation intakt.

Versuche mit dem parallel bindenden Oligonukleotid bTFO13CU ergab identische Ergebnisse (Abbildung 34 B).

Damit wurde nachgewiesen, daß beide Triplehelix-Oligonukleotide auch im Kontext von genomischer DNA in der Lage sind eine Triplehelix mit der Zielsequenz 13 zu bilden.

3.1.4 Bindungsstudien an Zellkernpräparationen

In der Zelle ist genomische DNA im Zellkern lokalisiert und dort in speziellen Kernstrukturen (Chromatingerüst) organisiert. Untersuchungen an histon gebundenen DNA-Fragmenten zeigten eine verminderte Triplehelixbildung bei bestimmten Positionen der Zielsequenz (Brown et al. 1998). Da mit der magnetischen Separation eine geeignete Nachweismethode für die Triplehelixbildung in genomischer DNA entwickelt wurde, konnte der Frage nachgegangen werden, ob die Zielsequenz 13 des ICAM-1-Gens auch innerhalb nukleärer Strukturen für ein Triplehelix-Oligonukleotid zugänglich ist. Dies wurde anhand von isolierten A431-Zellkernen getestet.

Die Nachweise erfolgten mittels magnetischer Separation (Methodenteil, Abschnitt 2.5.4.2, Seite 55) mit den Triplehelix-Oligonukleotiden bTFO13GT und bTFO13CU und den gleichen Kontrollen wie in den Experimenten mit genomischer DNA (Abbildung 35).

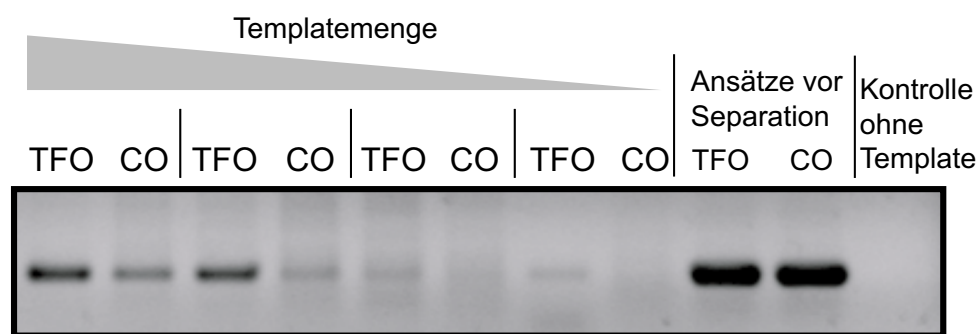


Abb. 35: Triplehelixnachweis in isolierten Zellkernen mittels magnetischer Separation. Gelelektrophorese von Ansätzen in denen isolierte A431-Zellkerne mit bTFO13GT (TFO) oder bCOsc2GT (CO) inkubiert und mit 5 J/cm² bestrahlt wurden. Aus den bestrahlten Zellkernen wurde die genomische DNA präpariert und mit *Pst*I verdaut. Der PCR-Nachweis erfolgte mit den Primern ICAM-3102 und ICAM-3490 und wurde mit 32 Zyklen (30 s/94 °C, 30 s/63 °C, 30 s/72 °C) durchgeführt. Die Ansätze nach Separation wurden in Form einer Verdünnungsreihe (graues Dreieck) in die PCR-Reaktion eingesetzt um auszuschließen, daß zu hohe Mengen an Ausgangs-DNA (Template) zu ungleichmäßigen PCR-Amplifikationen führen. Repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

In Abbildung 35 ist das PCR-Produkt einer Verdünnungsreihe von Ansätzen dargestellt, in denen Zellkerne mit bTFO13GT oder bCOsc2GT inkubiert worden waren. Nach Bestrahlung wurde genomische DNA präpariert, mit *Pst* I verdaut und die Separation vorgenommen. Analog zu den Experimenten mit isolierter DNA wurde im Ansatz mit Triplehelix-Oligonukleotid ein PCR-Fragment festgestellt. Die Verdünnungsreihe zeigt, daß die Menge des PCR-Fragmentes in Ansätzen mit Triplehelix-Oligonukleotid deutlich größer ist als in Ansätzen mit Kontroll-Oligonukleotid. Dieser Unterschied ist also auf sequenzspezifische Triplehelixbildung zurückzuführen. Die geringere PCR-Produktmenge mit Kontroll-Oligonukleotiden muß auf unspezifischen, sequenzunabhängigen Psoralenquervernetzung des Kontroll-Oligonukleotides beruhen, da Ansätze mit nicht biotinyliertem Oligonukleotid und Ansätze ohne UV-Bestrahlung zu keinem PCR-Produkt führten (nicht dargestellt).

Somit ist die Zielsequenz 13 auch innerhalb intakter Zellkernstrukturen zugänglich für Triplehelix-Oligonukleotide.

Zusätzlich wurde auch der *Reaktionsüberstand* bei der Separation untersucht um die Ergebnisse zu erhärten. Da bei der Separation ein Teil der ICAM-1-Fragmente durch Triplehelixbildung aus dem Reaktionsüberstand entfernt werden, sollte im Ansatz mit Triplehelix-Oligonukleotid eine geringere Menge an ICAM-1-Fragmenten vorhanden sein, als im Ansatz mit Kontroll-Oligonukleotid. Mit dem Triplehelix-Oligonukleotid bTFO13GT wurde dies untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt.

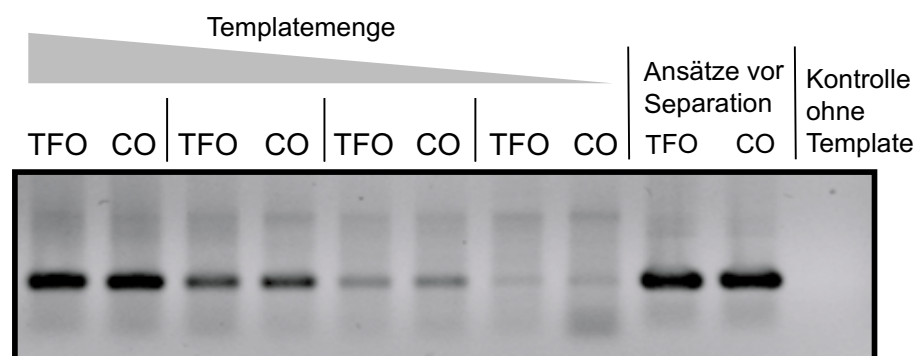


Abb. 36: Triplehelixnachweis in isolierten Zellkernen, *Analyse des Reaktionsüberstand*. Gel-elektrophorese von zwei Ansätzen in denen isolierte A431-Zellkerne in gleicher Weise wie in Abbildung 35 mit bTFO13GT (TFO) oder bCOsc2GT (CO) inkubiert wurden. Im Gegensatz zu Abbildung 35 wurde der Reaktionsüberstand bei der Separation mit Streptavidinbeads analysiert. Der PCR-Nachweis erfolgte in gleicher Weise wie in Abbildung 35. Die DNA-Ausgangsmenge wurde in Form einer Verdünnungsreihe in die PCR-Reaktion eingesetzt (graues Dreieck).

Abbildung 36 zeigt eine etwas geringere Menge an ICAM-1-Fragment in dem Ansatz mit Triplehelix-Oligonukleotid als im Ansatz mit Kontroll-Oligonukleotid. Auffällig ist, daß hier der Unterschied deutlich geringer ist, als bei der Analyse des separierten Anteils (Abbildung 35, Seite 72). Der geringere Unterschied ist auf die unvollständige Triplehelixbildung zurückzuführen: Im Reaktionsüberstand werden auch ICAM-1-Fragmente erfaßt, an denen keine Triplehelixbildung stattgefunden hat. Bei der Analyse des separierten Teils dagegen (Abbildung 35) werden diese Fragmente nicht erfaßt. Dies führt dann zu einem größeren Unterschied bei der PCR-Detektion.

Um die Hypothese von unspezifischen Quervernetzungen in den Ansätzen mit Kontroll-Oligonukleotid zu erhärten wurden zusätzliche Untersuchungen unternommen: Wenn tatsächlich unspezifische Psoralenquervernetzungen zu dem schwachen Fragment führten, dann sollten diese in zufälliger Verteilung überall in genomischer DNA vorkommen. Dann sollten auch andere DNA-Fragmente (in geringer Menge) biotinyliert und somit auch separiert werden. Durch Amplifikation eines Kontrollfragmentes mit einem zweiten Primerpaar wurde dies überprüft. Um Probleme durch unterschiedliche Amplifikationsraten in verschiedenen PCR-Ansätzen zu umgehen, wurde das zweite Primerpaar so gewählt, daß die PCR-Reaktion für beide Fragmente in einem Reaktionsgefäß durchführbar ist. Als Kontrollfragment wurde ein 799 bp-Bereich im ICAM-1-Gen ausgewählt, der etwa 2,8 kb vom *Pst* I-Fragment mit der Zielsequenz 13 entfernt ist. Das Ergebnis der Koamplifikation des ICAM-1-Fragments (Testfragment) mit dem Kontrollfragment ist in Abbildung 37 dargestellt.

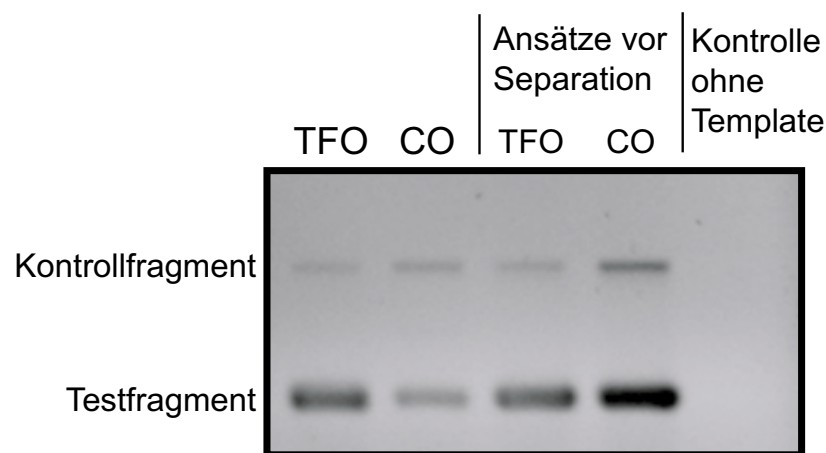


Abb. 37: Triplehelixnachweis mit bTFO13CU in Zellkernen mit Koamplifikation eines Kontrollfragmentes. A431-Zellkerne wurden in der gleichen Art mit bTFO13CU (TFO) oder bCOinvCU (CO) behandelt wie es in Abbildung 35 dargestellt ist. Der PCR-Nachweis erfolgte in einem Reaktionsgefäß mit zwei Primerpaaren, die neben dem 388 bp-Testfragment mit der Zielsequenz (Primer ICAM-3102 und ICAM-3490) ein zweites 799 bp-Kontrollfragment ohne Zielsequenz (Primer ICAM-1813 und ICAM-2612) amplifizierten. Die PCR-Reaktion erfolgte mit 32 Zyklen (30 s/94 °C, 30 s/63 °C, 30 s/72 °C).

Die Abbildung zeigt, daß das Kontrollfragment sowohl beim Triplehelix-Oligonukleotid (bTFO13CU), als auch beim Kontroll-Oligonukleotid (bCOinvCU) amplifiziert wurde. Somit haben auch an diesem Fragment unspezifische, sequenzunabhängige Psoralenquervernetzungen zu einer geringen Menge an PCR-Produkt geführt. Ähnlich schwach ausgeprägt ist dies im Ansatz mit Kontroll-Oligonukleotid bei beiden Fragmenten, da dies auch auf sequenzunabhängigen Wechselwirkungen beruhen muß. Die Amplifikation des ICAM-1-Fragments im Ansatz mit Triplehelix-Oligonukleotid führte dagegen zu einer deutlich größeren Menge an PCR-Produkt. Somit hat neben unspezifischen Quervernetzungen, die überall in der DNA stattfinden, auch eine spezifische, triplehelixvermittelte Quervernetzung stattgefunden.

Versuche mit dem Triplehelix-Oligonukleotid bTFO13GT und dem entsprechenden Kontroll-Oligonukleotid ergaben ein ähnliches Ergebnis, wobei die Triplehelixbildung schwächer ausgeprägt war.

Mit diesen Versuchen wurde nachgewiesen, daß die Triplehelix-Oligonukleotide in der Lage sind in isolierten Zellkernen an die Zielsequenz zu binden und dort mittels UVA und Psoralen quervernetzt werden können. Auch innerhalb der in nukleären Strukturen organisierten genomischen DNA ist die Zielsequenz 13 zugänglich für Triplehelix-Oligonukleotide und somit geeignet einen biologischen Effekt hervorzurufen. Die biologischen Effekte von Oligonukleotiden sind im Ergebnisteil (Abschnitt 4, Seite 81) beschrieben.

3.2 Bindungsstudien mit Triplehelix-Oligonukleotiden für die Zielsequenz 17

3.2.1 Bindungsstudien an Oligonukleotid-Zielsequenzen

Bindungsstudien an der Zielsequenz 17 erfolgten über Gelretardation von doppelsträngigen, zielsequenzhaltigen Oligonukleotiden (Methodenteil, Abschnitt 2.5.1, Seite 51). Die Elektrophorese wurde sowohl unter denaturierenden als auch unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Unter nicht denaturierenden Bedingungen wird die Zielsequenz im Gel durch die Triplehelixbildung retardiert und damit eine Triplehelix direkt nachgewiesen. Unter denaturierenden Bedingungen werden nur Photoaddukte retardiert, die nach Quervernetzung psoralenkonjugierter Triplehelix-Oligonukleotid mit UVA Strahlung entstanden sind, während Triplehelices zerstört werden. Die Bindung von TFO17GT an eine Oligonukleotid-Zielsequenz ist in Abbildung 38 dargestellt.

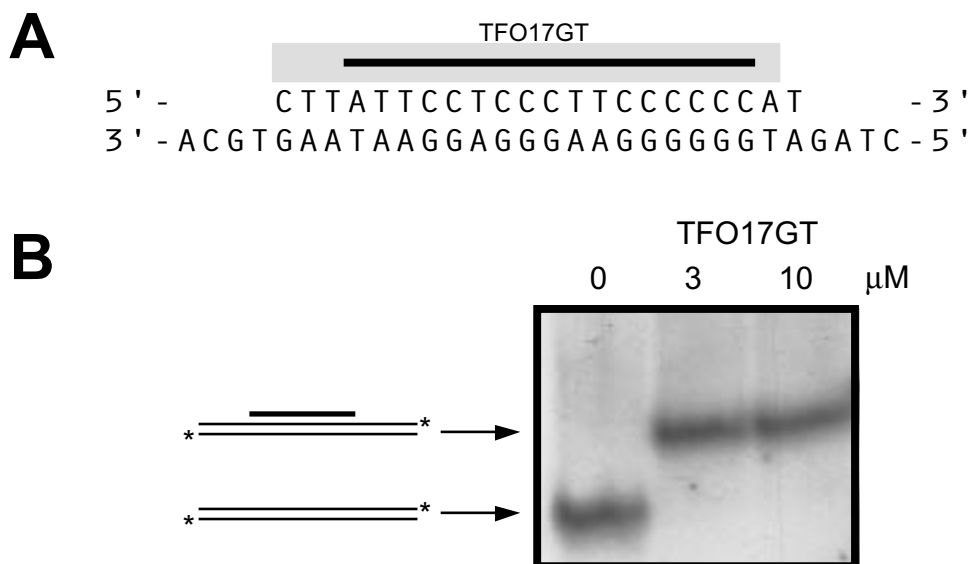


Abb. 38: Gelretardation der Zielsequenz 17 unter *nicht denaturierenden* Bedingungen. In Abbildung 38 A ist die verwendete doppelsträngige Oligonukleotid-Zielsequenz dargestellt. Die Herstellung einer Zielsequenz zwei komplementären Oligonukleotiden ist in Abbildung 26 (Seite 63) beschrieben. Anschließend erfolgte die Markierung der 3'-Enden mit Digoxigenin. Der mit der genomischen Sequenz von ICAM-1 identische Bereich ist grau, der Bereich in dem die Triplehelix-Oligonukleotide binden mit einem schwarzen Balken markiert.

Abbildung 38 B zeigt die Retardation der Zielsequenz durch Triplehelixbildung mit 3 und 10 μM TFO17GT (Reihe 2 und 3). Reihe 1 ist ein Ansatz ohne Triplehelix-Oligonukleotid. Die DIG-markierte Zielsequenz (Sternchen) ist schematisch als Doppelstrich, das gebundene Triplehelix-Oligonukleotid als dickerer Einzelstrich dargestellt.

Abbildung 38 zeigt eine Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen. Die doppelsträngige DIG-markierte Zielsequenz wird vollständig retardiert, wenn sie mit 3 oder 10 μM TFO17GT inkubiert wurde. Bei diesen TFO-Konzentrationen hat also eine Triplehelixbildung an allen verfügbaren Zielsequenzen stattgefunden.

Um die Bildung von Photoaddukten nach Triplehelixbildung zu untersuchen, wurden mit TFO17GA Gelretardationen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Verschiedene TFO-Konzentrationen und UVA-Dosen wurden getestet (Abbildung 39).

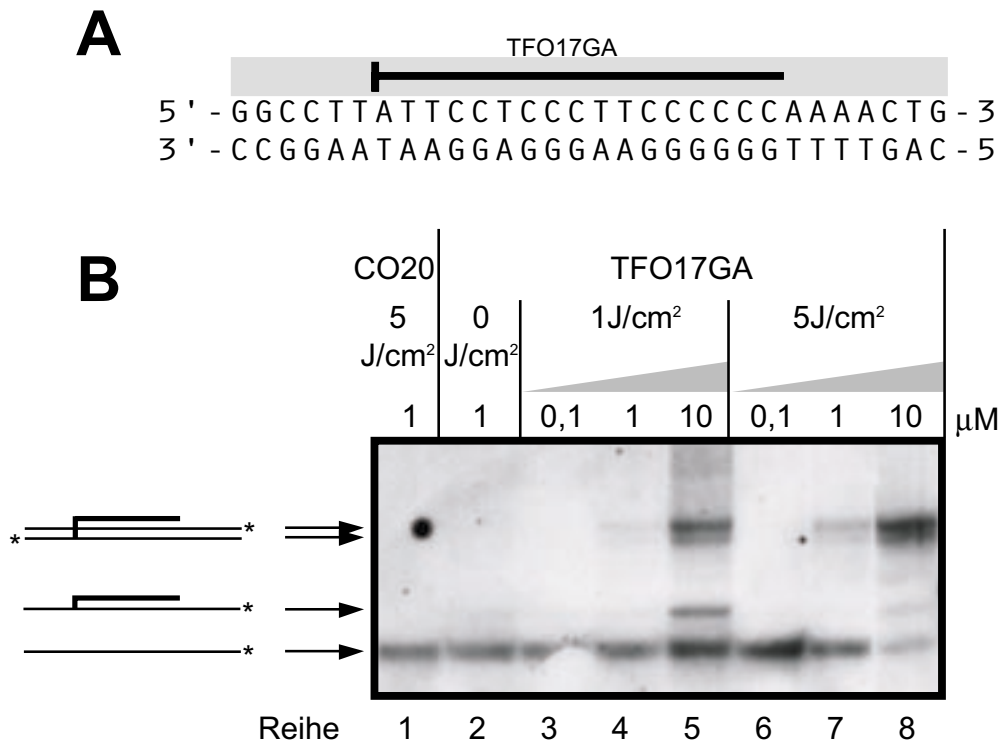


Abb. 39: Gelretardation der Zielsequenz 17 unter *denaturierenden* Bedingungen. In Abbildung 39 A ist die eingesetzte Oligonukleotid-Zielsequenz dargestellt. Die genomische Sequenz ist grau, der Bereich in dem das Triplehelix-Oligonukleotid bindet mit einem schwarzen, die Stelle an der Psoralen interkaliert mit einem senkrechten Balken markiert.

Abbildung 39 B zeigt die Retardation dieser Zielsequenz durch Photoaddukte, die nach Triplehelixbildung mit TFO17GA und UVA-Bestrahlung gebildet wurden. Nach Inkubation der Zielsequenz mit TFO17GA (0,1, 1 und 10 μM) wurde mit 1 J/cm² oder 5 J/cm² bestrahlt. In Reihe 1 wurde die Zielsequenz mit Kontroll-Oligonukleotid CO20 in einer Konzentration von 1 μM inkubiert und mit 5 J/cm² bestrahlt. Reihe 2 zeigt einen Ansatz mit 1 μM TFO17GA ohne Bestrahlung. Die doppelsträngige, DIG-markierte Zielsequenz ist schematisch als Doppelstrich mit einem Sternchen, das gebundene Triplehelix-Oligonukleotid als dickerer Einzelstrich dargestellt. Die Quervernetzung mit Psoralen mit einem Strang (Monoaddukte) oder beiden Strängen (Bisaddukte) der Zielsequenz ist mit einem senkrechten Balken symbolisiert. Das in diesem Experiment verwendete Kontroll-Oligonukleotid (CO20) war ein 20mer, das fünfmal die Basensequenz GATC enthielt.

Abbildung 39 zeigt die Bildung verschiedener Photoaddukte: Neben den denaturierten Einzelsträngen (untere Bande) wurden *Monoaddukte* (mittlere Bande) und *Bisaddukte* (obere Banden) identifiziert. Die Reihen 3-5 zeigen, daß die Menge an Mono- und Bisaddukten steigt, wenn die TFO-Konzentration erhöht wird. Die Bisaddukte erscheinen in Form einer Doppelbande auf dem Gel. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben und ist vermutlich auf unterschiedlichen Konformationen im Gel zurück-

zuführen (Yeung et al. 1988, Takasugi et al. 1991). Dabei scheint das Verhältnis von Mono- zu Bisaddukten bei einer UV-Dosis von 1 J/cm^2 unverändert zu sein. In Reihe 6-8 ist zu erkennen, daß auch bei höheren UVA-Dosen (5 J/cm^2) die Menge an Mono- und Bisaddukten von der TFO-Konzentration abhing. Das Verhältnis zwischen Mono- und Bisaddukten ist bei dieser Dosis allerdings zugunsten der Bisaddukte verschoben. Keine Addukte wurden mit dem Kontroll-Oligonukleotid auch bei hoher UV-Dosis (Reihe 1) festgestellt, das Auftreten von Photoaddukten war also ein sequenzspezifischer Effekt des Triplehelix-Oligonukleotides. Ein Ansatz in dem die Zielsequenz mit dem Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert, aber nicht bestrahlt wurde, zeigte ebenfalls keine Retardation, da die nicht quervernetzten Triplehelices unter den denaturierenden Bedingungen bei der Gelelektrophorese zerstört wurden (Reihe 2).

Diese Untersuchungen wurden in einem für die Triplehelixbildung optimierten, kaliumfreien Inkubationspuffer durchgeführt, der nicht dem intrazellulären Milieu entspricht. Es wurde deshalb die Photoadduktbildung im kaliumhaltigen Puffer bestimmt und mit der Adduktbildung im kaliumfreien Puffer verglichen (Abbildung 40).

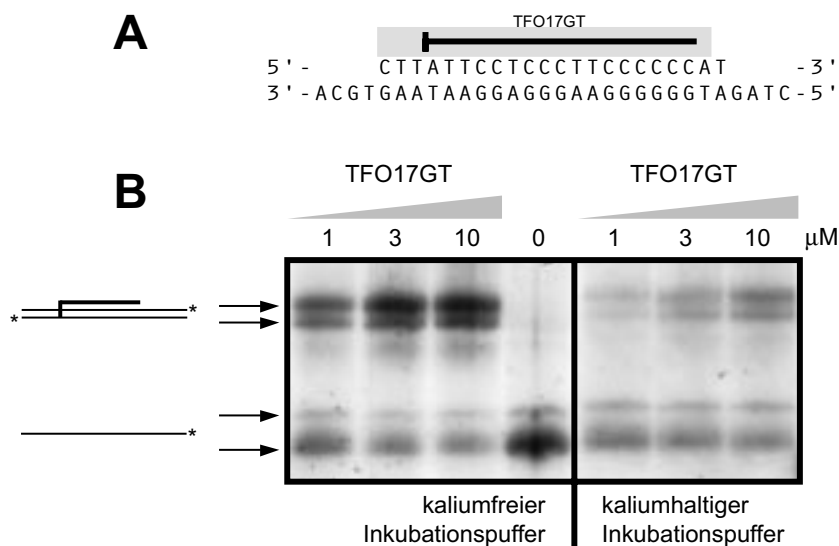


Abb. 40: Gelretardation unter *denaturierenden* Bedingungen in unterschiedlichen Inkubationspuffern. Gegenüberstellung der Retardation einer Oligonukleotid-Zielsequenz (Abbildung 40 A) bei Inkubation in Ab- oder Anwesenheit von 140 mM Kalium. Es wurde TFO17GT in Konzentrationen von $1, 3$ und 10 µM bei einer Bestrahlung von 2 J/cm^2 eingesetzt. Die beiden unteren Banden entsprechen den unterschiedlich langen Einzelsträngen der denaturierten Zielsequenz.

Abbildung 40 zeigt, daß das Verhältnis zwischen Einzelsträngen der Zielsequenz und Photoaddukten stark von dem verwendeten Puffer abhing. Es war im kaliumhaltigen Puffer zugunsten der Einzelstränge verschoben. Somit entstanden aus der Zielsequenz nur eine geringere Menge an Photoaddukten, was auf eine schlechtere, aber nicht verhinderte Triplehelixbildung in Anwesenheit von Kalium hinweist.

3.2.2 Bindungsstudien an Plasmiden

Die Gelretardationsexperimente unter denaturierenden Bedingungen zeigten, daß durch quervernetzte Triplehelix-Oligonukleotide die Denaturierung von DNA zu verhindert werden kann. In gleicher Weise sollte ein quervernetztes Triplehelix-Oligonukleotid eine PCR-Reaktion hemmen können, indem es den Denaturierungsschritt behindert (Methodenteil, Abschnitt 2.5.3, Seite 52).

Für diesen Bindungsnachweis wurde das Plasmid pG4H1, das die ICAM-1-cDNA mit der Zielsequenz 17 enthält, eingesetzt. Dieses Plasmid wurde mit Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert, und entstandene Triplehelices durch Bestrahlung mit UVA quervernetzt. Anschließend wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, die einen Bereich in dem die Zielsequenz liegt, amplifiziert (Abbildung 41 A). In der PCR-Reaktion wurde eine relativ hohe Plasmidmenge eingesetzt, die auch auf dem Gel sichtbar ist. Dadurch konnte die eingesetzte Plasmidmenge kontrolliert und eine niedrige Zykluszahl bei der PCR-Reaktion gewählt werden (Abbildung 41 B).

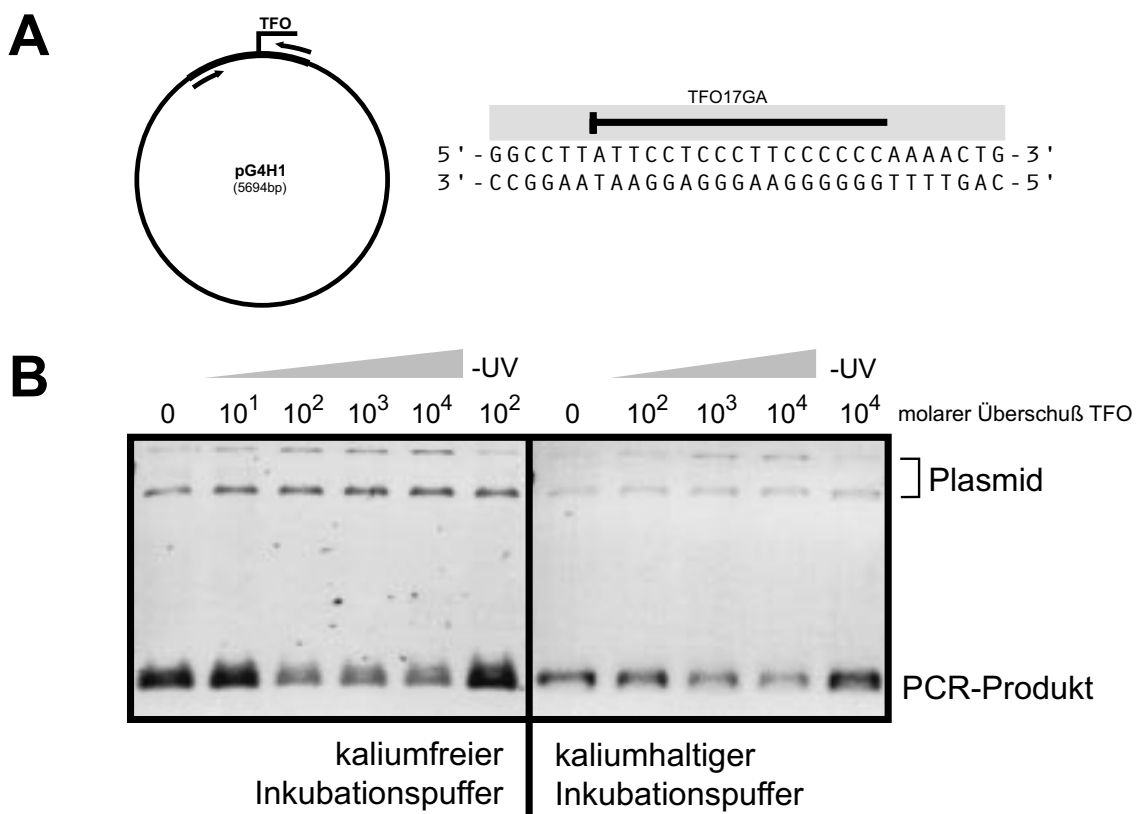


Abb. 41: Inhibition einer PCR-Amplifikation. Das Plasmid pG4H1 und die Zielsequenz 17 ist in Abbildung 41 A schematisiert. Der mit den Primern ICAM-2013 und ICAM-2649 amplifizierte Bereich in dem die Zielsequenz liegt ist mit Pfeilen markiert. Abbildung 41 B zeigt die PCR-Inhibition durch TFO17GA. Das Plasmid wurde mit 10¹ bis 10⁴fachen TFO-Überschuß mit oder ohne Kalium inkubiert und mit einer Dosis von 5 J/cm² bestrahlt. Die letzte Reihe zeigt jeweils einen Kontrollansatz ohne UVA-Bestrahlung. Auf dem Gel ist neben dem PCR-Produkt (unten) auch das Plasmid (oben) zu sehen.

Wurde TFO17GA mit dem Plasmid pG4H1 in (kaliumfreiem) Inkubationspuffer inkubiert und bestrahlt, war eine Inhibition der PCR-Reaktion ab einem 100fachen molaren Überschuss des Triplehelix-Oligonukleotides nachweisbar. Weitere Erhöhung der TFO-Menge bewirkte keine stärkere Inhibition. Zu beachten ist, daß die PCR-Reaktion nur verhindert wird, wenn beide DNA-Stränge quervernetzt wurden (Bisaddukte), da bei Monoaddukten immer noch der Gegenstrang der PCR-Amplifikation zur Verfügung steht. Eine vollständige PCR-Inhibition eines Reaktionsansatzes ist daher unwahrscheinlich. Fand die Inkubation im kaliumhaltigen Puffer statt, wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet, wobei eine Inhibition erst ab einem 1.000fachen TFO-Überschuß feststellbar war. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit der reduzierten Triplehelixbildung in den Gelretardationsexperimenten in Anwesenheit von Kalium. Ohne Bestrahlung war die PCR-Reaktion nicht inhibiert. Der Vergleich der Plasmid Banden zeigte, daß die eingesetzte Plasmidmenge in allen Ansätzen etwa gleich groß war und die Unterschiede in der PCR-Produktmenge auf einer PCR-Inhibition und nicht auf unterschiedlichen Mengen an eingesetztem Plasmid beruhen.

4. Biologische Aktivität von Triplehelix-Oligonukleotiden

4.1 Inhibition der ICAM-1-Expression

Der Nachweis einer biologischen Wirkung ist Voraussetzung für eine potentielle therapeutische Nutzung von Triplehelix-Oligonukleotiden. Deshalb wurden Oligonukleotide in Zellen eingebracht und deren Wirkung auf die ICAM-1 Expression gemessen. Zuerst wurden die Bedingungen für eine effektive Transfektion von Oligonukleotiden in A431-Zellen etabliert.

4.1.1 Etablierung von Transfektionsbedingungen für Oligonukleotide

Die Transfektionsbedingungen wurden mit einem FITC-markierten Oligonukleotid etabliert. Es entsprach dem Triplehelix-Oligonukleotid TFO13GT, dessen 5'-Ende mit FITC statt mit Triethylglykol modifiziert war. Nach der Transfektion wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Zur Transfektion wurde das Transfektionsreagenz SuperFect™, ein positiv geladenes Dendrimer, eingesetzt. Unabhängig von der TFO-Konzentration wurde eine konstante SuperFect-Menge eingesetzt, bei der keine zytotoxischen Effekte in A431-Zellen beobachtet wurden.

Ab einer TFO-Konzentration von 1 μM konnte eine Aufnahme des Triplehelix-Oligonukleotides in A321-Zellen nachweisbar (Abbildung 42).

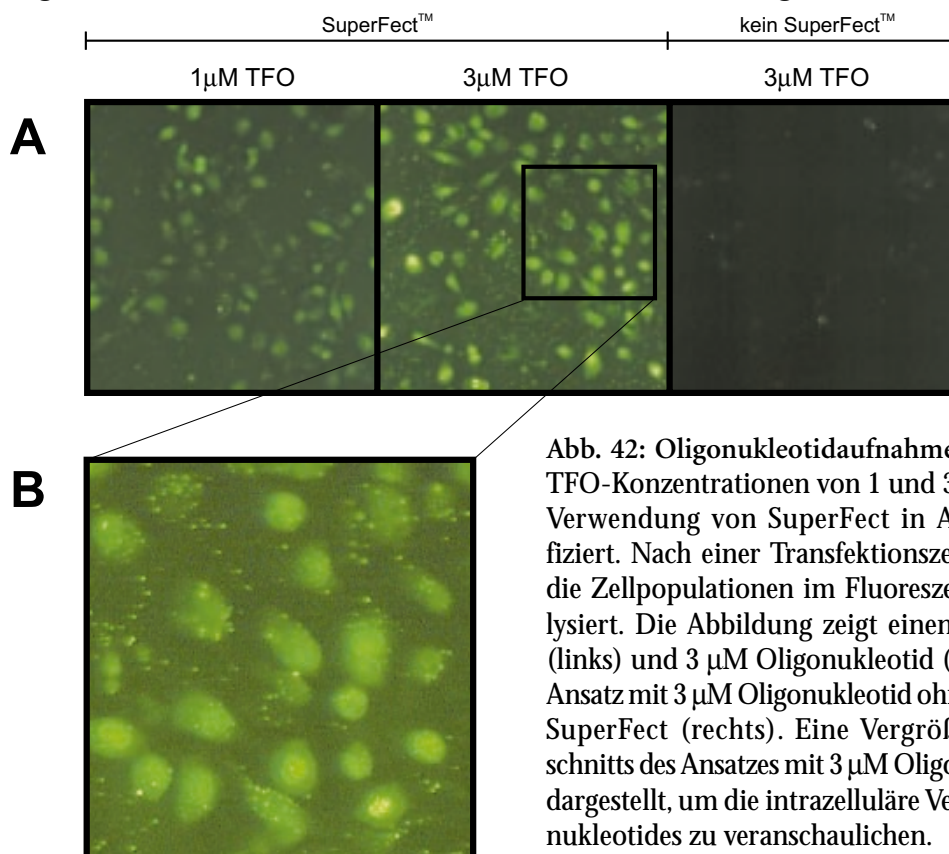


Abb. 42: Oligonukleotidaufnahme von A431-Zellen. TFO-Konzentrationen von 1 und 3 μM wurden unter Verwendung von SuperFect in A431-Zellen transfiziert. Nach einer Transfektionszeit von 3 h wurden die Zellpopulationen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Abbildung zeigt einen Ansatz mit 1 μM (links) und 3 μM Oligonukleotid (Mitte) sowie einen Ansatz mit 3 μM Oligonukleotid ohne Verwendung von SuperFect (rechts). Eine Vergrößerung eines Ausschnitts des Ansatzes mit 3 μM Oligonukleotid ist unten dargestellt, um die intrazelluläre Verteilung des Oligonukleotides zu veranschaulichen.

Bei einer TFO-Konzentration von 3 μM konnte eine Aufnahme des Triplehelix-Oligonukleotides in der Mehrzahl der Zellen nachgewiesen werden. Die erhöhte Fluoreszenz in den Zellkernen zeugt von einer nukleären Anreicherung des Oligonukleotid im Zellkern. Dies ist Voraussetzung für einen Effekt an genomischer DNA. Ohne Verwendung von SuperFect dagegen wurde trotz hoher TFO-Konzentration keinerlei Aufnahme beobachtet.

4.1.2 Inhibition von ICAM-1 durch TFO13GT

Nach Etablierung der Transfektionsbedingungen wurde der Effekt von Triplehelix-Oligonukleotiden auf die Expression von ICAM-1 getestet. Dazu wurden Zellen mit den Oligonukleotiden transfiziert und mit UVA bestrahlt (2 J/cm^2). Da A431-Zellen nur eine geringe Basalexpression von ICAM-1 aufweisen wurde die Expression nach der Transfektion durch Zugabe von $\text{IFN}\gamma$ (500 U/ml) induziert. Nach 18 h Kultivierung in Minimalmedium wurde die ICAM-1-Expression durchflußzytometrisch gemessen (Abbildung 43).

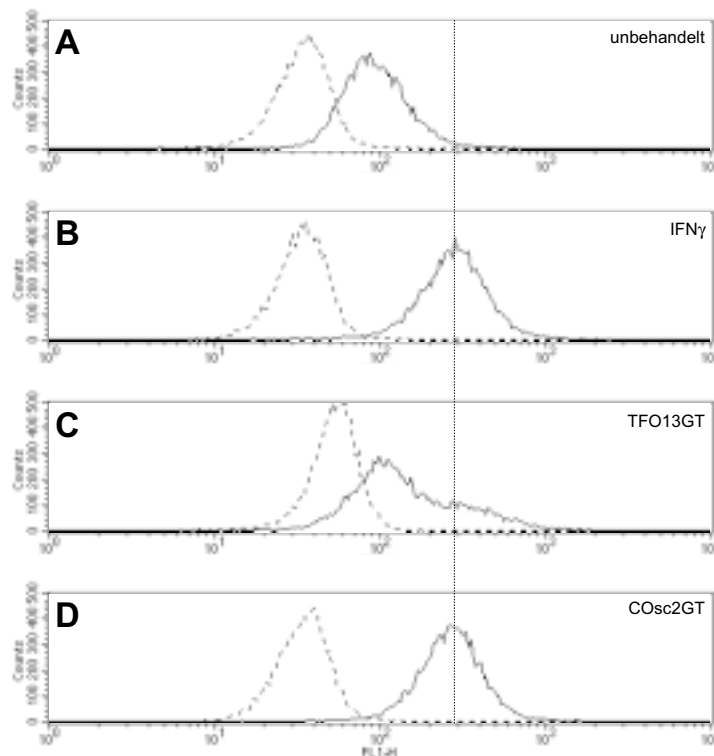


Abb. 43: ICAM-1-Expression nach Transfektion mit 2 μM TFO13GT. Durchflußzytometrische Analyse der ICAM-1-Expression von A431-Zellen. Die durchgezogenen Linien bedeuten Färbungen mit einem FITC-markierten Anti-ICAM-1-Antikörper. Die gestrichelten Linien bedeuten Kontrollfärbungen mit einem isotypgleichen FITC-markierten Antikörper mit irrelevanter Antigenspezifität. Abbildung 43 A zeigt die geringe, basale ICAM-1-Expression, Abbildung 43 B die induzierte ICAM-1-Expression nach 18 h Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$. Abbildung 43 C stellt die ICAM-Expression von Zellen dar, die wie in Abbildung 43 B behandelt wurden, aber 3 h zuvor mit 2 μM Triplehelix-Oligonukleotid (TFO13GT) transfiziert wurden. In Abbildung 43 D sind Zellen, die mit 2 μM Kontroll-Oligonukleotid COsc2GT behandelt wurden dargestellt. Repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Die IFN γ induzierte ICAM-1-Expression von Ansätzen, in denen die Zellen zuvor mit 2 μ M TFO13GT transfiziert wurden, zeigen eine deutliche Reduktion der ICAM-1-Expression (Abbildung 43 C). Die gleiche Menge des Kontroll-Oligonukleotides COsc2GT hatte dagegen keinen Einfluß auf die ICAM-1-Expression (Abbildung 43 D). Um zu prüfen, ob dieser Effekt von der TFO-Konzentration abhing, wurden Zellen mit unterschiedlichen TFO-Konzentrationen transfiziert (Abbildung 44).

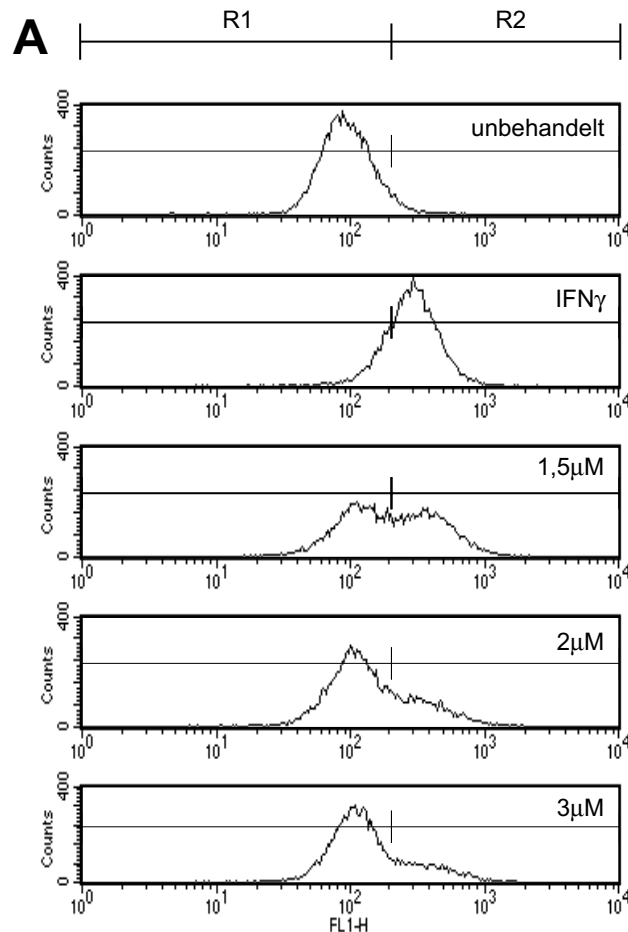


Abb. 44: Abhängigkeit der ICAM-1-Inhibition von der TFO-Konzentration. Abbildung 44 A zeigt Histogramme der ICAM-1-Expressionen von A431-Zellen nach Transfektion mit 1,5, 2 und 3 μ M TFO13GT. Zellen im Meßbereich R1 haben eine ICAM-1-Expression, die in etwa der Basalexpression unbehandelter Zellen entspricht. Zellen im Bereich R2 entsprechen dem IFN γ -induzierten Expressionsmuster. Die Gesamtzahl der Zellen (R1+R2), die Zahl inhibierter Zellen (R1) und die Zahl nicht inhibierter Zellen (R2) ist in Abbildung 44 B aufgeschlüsselt. Das prozentuale Verhältnis zwischen inhibierten und nicht inhibierten Zellen ist rechts dargestellt und fett hervorgehoben. Repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

B

	gesamt	Zellzahl		prozentualer Anteil	
		R1	R2	R1	R2
unbehandelt	10.021	9.543	543	95	5
IFN γ	10.043	2.257	8.003	22	78
1,5 μ M TFO	10.060	5.224	4.982	51	49
2 μ M TFO	10.082	7.206	3.002	71	29
3 μ M TFO	10.085	7.667	2.516	75	25

Abbildung 44 zeigt, daß das Ausmaß der ICAM-1-Inhibition von der eingesetzten Menge an Triplehelix-Oligonukleotid abhing. Der Anteil von Zellen mit hoher Expression nimmt mit zunehmender TFO-Konzentration ab, während der Anteil inhibierter Zellen zunimmt.

In Abbildung 45 ist der prozentuale Anteil inhibierter Zellen abhängig von der TFO-Konzentration als Diagramm dargestellt. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Der Anteil inhibierter Zellen beträgt bis zu 70 % (bei 3 μM Triplehelix-Oligonukleotid), wobei etwa 17 % der Zellen nicht mit $\text{IFN}\gamma$ stimulierbar waren.

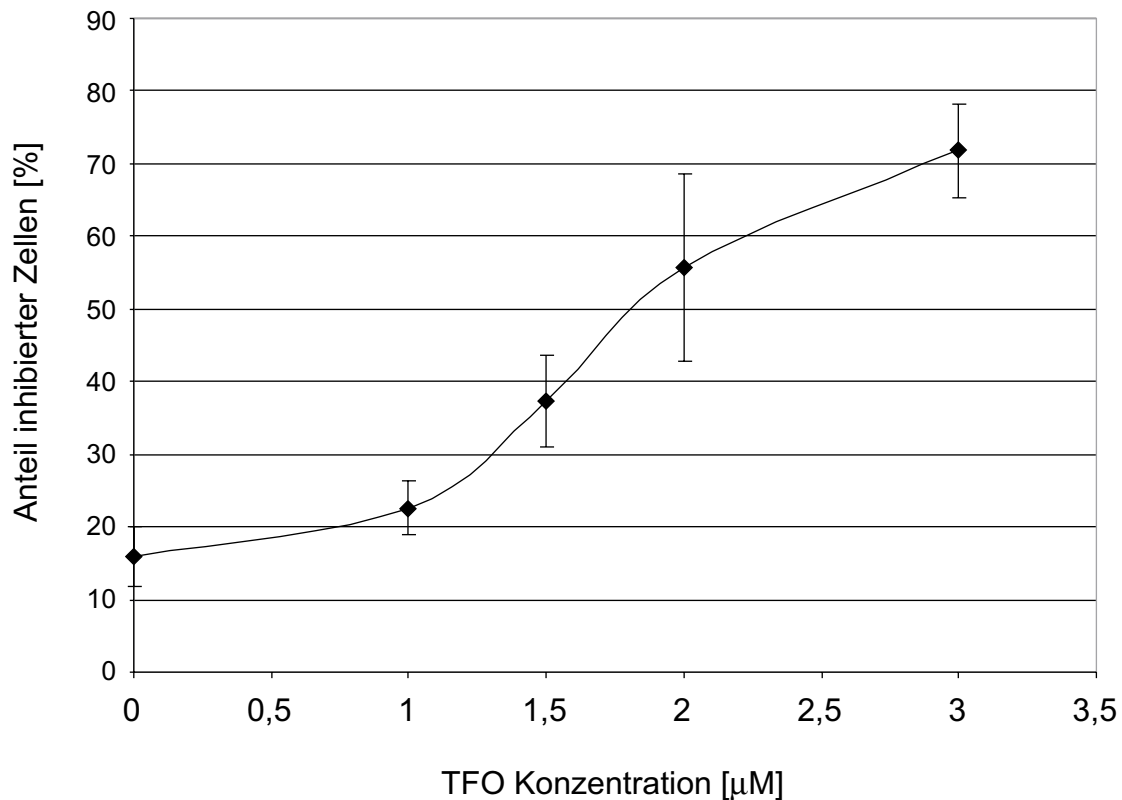


Abb. 45: ICAM-1-Inhibition abhängig von der TFO-Konzentrationen (Dosis/Wirkungskurve). Der prozentuale Anteil inhibierter A431-Zellen ist in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration von TFO13GT dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der durchschnittlichen absoluten Abweichung von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Es wurden auch Experimente durchgeführt, bei denen Zellen mit TFO13GT transfiziert, aber nicht bestrahlt wurden. Nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel zu Minimalmedium mit $\text{IFN}\gamma$ (500 U/ml), nach 18 h die Analyse im Durchflußzytometer. Es ergab sich, daß die ICAM-1-Expression der unbestrahlten Ansätze genauso inhibiert wurde wie in Experimenten, in denen UVA eingesetzt wurde (Daten nicht dargestellt). Die Bestrahlung mit UVA hatte also keinen verstärkenden Effekt auf die Geninhibition. Um zu prüfen wie lange der inhibierende Effekt anhält wurde die ICAM-1-Expression 27 h nach Transfektion gemessen. Der inhibierende Effekt hielt über diesen Zeitraum an, es wurde keine reduzierte Inhibition festgestellt. Auch hier war kein Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Ansätzen feststellbar (Daten nicht dargestellt).

Um sicherzustellen, daß die beobachtete Inhibition nicht auf unspezifischen, nicht triplehelixvermittelten Effekten beruht, wurde die Expression eines zweiten Gens analysiert. Somit konnte überprüft werden, ob der inhibierende Effekt von TFO13GT spezifisch für ICAM-1 ist. Hierfür wurde das HLA-DR-Gen, ein Gen aus dem MHC II-Komplex, ausgewählt, da dieses auch mit $\text{IFN}\gamma$ induziert und zusammen mit ICAM-1 durchflußzytometrisch gemessen werden kann (Abbildung 46).

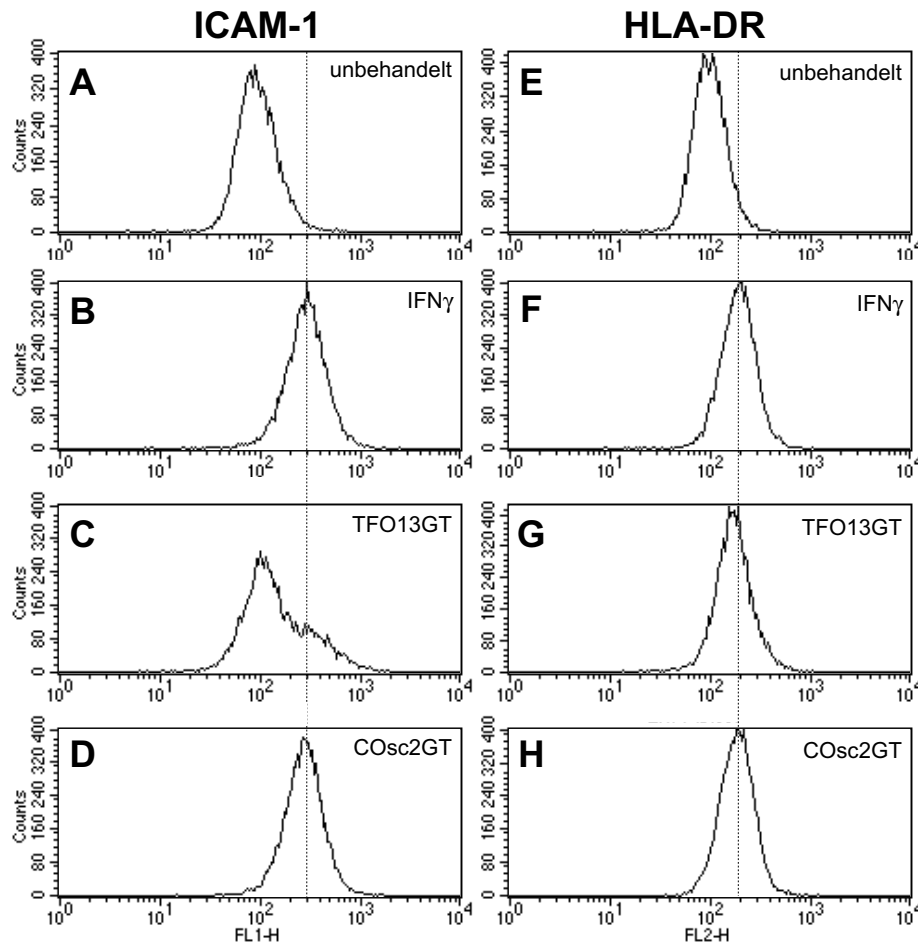


Abb. 46: HLA-DR-Expression und ICAM-1-Expression von A431-Zellen nach Transfektion mit TFO13GT. Die Histogramme auf der linken Seite zeigen die Färbungen mit einem FITC-markierten Anti-ICAM-1-Antikörper einer A431-Population. Die rechte Seite zeigt die Färbung der gleichen Zellpopulation mit einem PE-konjugierten Anti-HLA-DR-Antikörper. Die Zellen waren entweder unbehandelt (Abbildung 46 A und E), $\text{IFN}\gamma$ behandelt (Abbildung 46 B und F) oder vor $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung mit $2\ \mu\text{M}$ TFO13GT (Abbildung 46 C und G) oder $2\ \mu\text{M}$ COsc2GT (Abbildung 46 D und H) transfiziert worden. Repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

HLA-DR ließ sich auf A431-Zellen durch $\text{IFN}\gamma$ stimulieren. Die HLA-DR-Expression wurde aber – im Gegensatz zu ICAM-1 – nicht von TFO13GT beeinflusst (Abbildung 47 C und G). Das Kontroll-Oligonukleotid (COsc2GT) hatte weder einen Einfluß auf HLA-DR, noch auf ICAM-1. Daraus läßt sich schließen, daß sich der Effekt des Triplehelix-Oligonukleotides tatsächlich nur auf ICAM-1 beschränkt.

4.1.3 Inhibition von ICAM-1 durch bTFO13CU

Nachdem die ICAM-1-Expression durch das antiparallel bindende Triplehelix-Oligonukleotid TFO13GT gehemmt wurde, wurden Experimente mit dem parallel bindenden bTFO13CU durchgeführt. Auch dieses Oligonukleotid hatte einen hemmenden Effekt auf ICAM-1 (Abbildung 47).

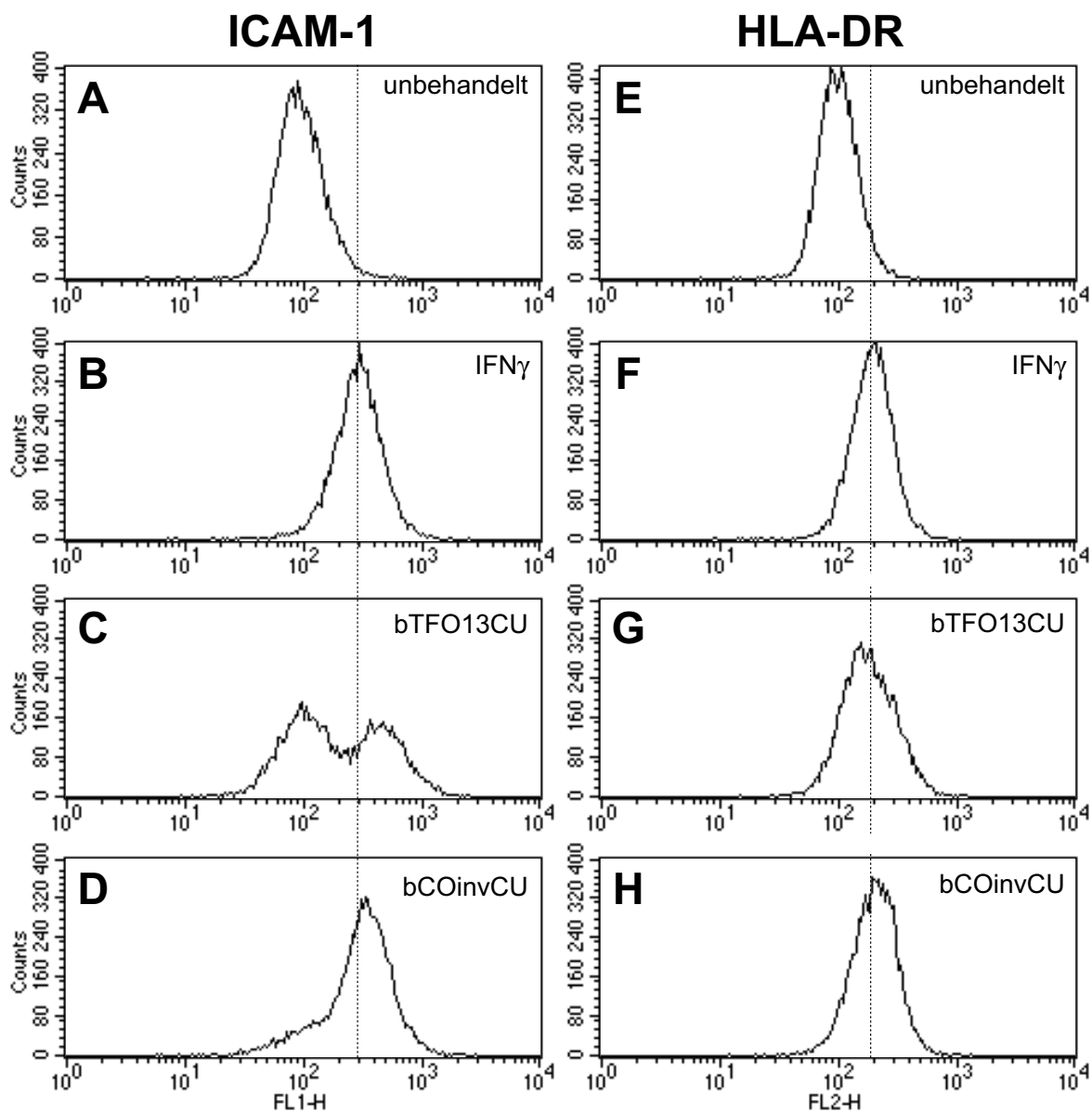


Abb. 47: HLA-DR-Expression und ICAM-1-Expression von A431-Zellen nach Transfektion mit bTFO13CU. Links sind die Färbungen mit einem FITC-markierten Anti-ICAM-1-Antikörper, rechts die Färbungen mit einem PE-konjugierten Anti-HLA-DR-Antikörper dargestellt. Die Zellen waren entweder unbehandelt (Abbildung 47 A und E), IFN γ behandelt (Abbildung 47 B und F) oder vor IFN γ -Behandlung mit 2 μ M bTFO13CU (Abbildung 47 C und G) oder 2 μ M bCOinvCU (Abbildung 47 D und H) transfiziert worden.

Auch bei der Transfektion mit bTFO13CU konnte ein inhibierender Effekt festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 2 μM wurde ICAM-1 inhibiert, während das Kontroll-Oligonukleotid bCOinvCU keinen Effekt hatte. Weder bTFO13CU noch bCOinvCU beeinflussten die Expression von HLA-DR (Abbildung 47 G und H). Der hemmende Effekt diesem Oligonukleotid scheint im Vergleich zu TFO13GT etwas weniger stark ausgeprägt.

4.1.4 Untersuchungen zu zytotoxischen Effekten

Zytotoxische Effekte von Triplehelix-Oligonukleotiden und anderer Faktoren während eines Experimentes wurden durchflußzytometrisch oder durch Messung der Lactat-Dehydrogenase-Konzentration (LDH) im Überstand einer Zellpopulation bestimmt.

Die durchflußzytometrische Bestimmung der Anzahl toter Zellen erfolgte durch Färbung mit Propidiumjodid oder mit 7-Amino-Actinomycin D. Diese Substanzen dringen durch geschädigte Zellmembranen in tote Zellen ein und lassen sich durchflußzytometrisch bestimmen. Der Anteil propidiumgefärbter Zellen im Vergleich zu ungefärbten Zellen bei der Transfektion verschiedener TFO-Konzentrationen ist in Abbildung 48 dargestellt.

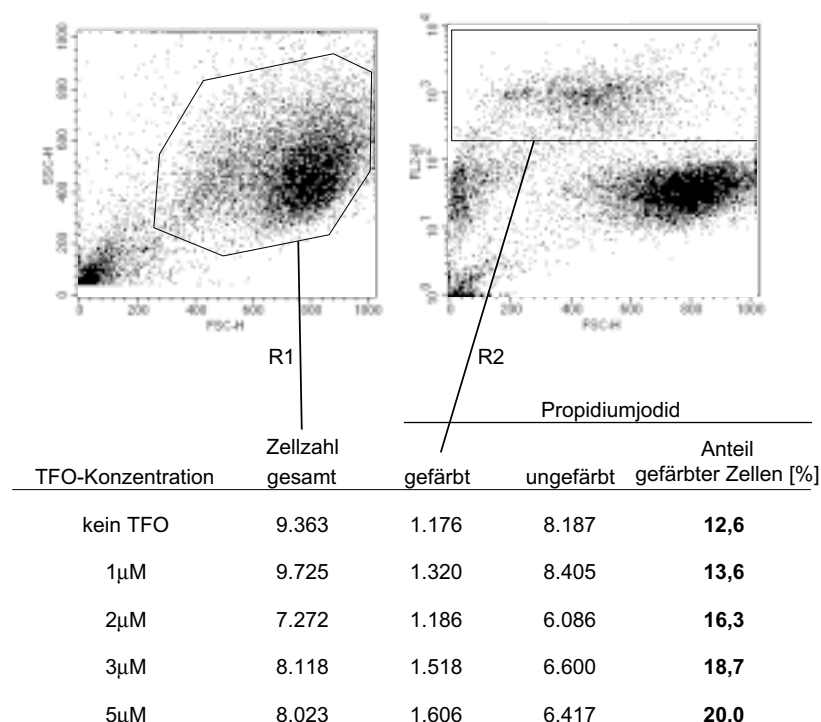


Abb. 48: Zytotoxische Effekte von Triplehelix-Oligonukleotiden. A431-Zellen wurden mit unterschiedlichen TFO-Konzentrationen transfiziert. Die durchflußzytometrische Analyse mit Propidiumjodid erfolgte 18 h nach Transfektion. Kleine und wenig dichte („untypische“) Zellen beziehungsweise Bruchstücke wurden ausgegrenzt (alles außer R1, linke Seite). Propidiumjodid-gefärbte Zellen sind rechts dargestellt (R2). Der prozentuale Anteil intakter Zellen sowie der Anteil geschädigter (propidiumjodidgefärbter) Zellen nach Transfektion mit verschiedenen TFO-Konzentrationen ist in der Tabelle aufgeführt. Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Da die Transfektionsbedingungen in allen Ansätzen gleich waren, sind Unterschiede in der Anzahl toter Zellen nur auf die TFO-Konzentration (zwischen 1 und 5 μM) zurückzuführen. Die Transfektion wurde von den Zellen gut vertragen und zeigte abhängig von der eingesetzten Konzentration keine oder nur geringe Zunahme propidiumjodidgefärbter Zellen. In einem Ansatz mit unbehandelten Zellen war ein Anteil von 12 % von mit Propidiumjodid anfärbbar. Dieser stieg bei einer TFO-Konzentration von 5 μM auf 20 % an.

Anhand der Lactat-Dehydrogenase-Konzentration (Methodenteil, Abschnitt 2.2.3, Seite 43) wurden die zytotoxische Effekte einzelner Faktoren in einem Transfektionsexperiment untersucht. Getestet wurde der Einfluß von SuperFect, UVA-Strahlung, $\text{IFN}\gamma$ und TFO-Konzentration (Abbildung 49).

Ansatz	SuperFect	UVA	$\text{IFN}\gamma$	Triton X	TFO13GT	LDH-Gehalt [%]
1	-	-	-	-	-	6,4
2	+	+	-	-	-	5,5
3	+	+	+	-	-	4,8
4	+	+	+	-	1 μM	8,5
5	+	+	+	-	2 μM	8,3
6	+	+	+	-	3 μM	10,3
7	+	-	+	-	2 μM	8,9
8	+	-	+	-	3 μM	9,5
9	-	-	-	+	-	100,0

Abb. 49: Toxische Effekte einzelner Faktoren in einem Transfektionsexperimentes. Die Transfektion erfolgte bei 70 % Konfluenz über 3 h. Es wurden 5 μl SuperFect eingesetzt. Die Bestrahlung erfolgte mit 2 J/cm^2 , die Induktion mit $\text{IFN}\gamma$ (500 U/ml). Der LDH-Gehalt eines Ansatzes von Zellen, die 18 h nach Aussetzen lysiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt (Ansatz 9).

Ein Ansatz mit unbehandelten Zellen zeigt, daß etwa 6 % der Zellen allein während der Kultivierung im Minimalmedium für die Dauer des Experimentes (18 h) sterben (Ansatz 1). Andere Faktoren wie UVA-Bestrahlung, SuperFect oder $\text{IFN}\gamma$ hatten keinen nennenswerten toxischen Effekt, die Unterschiede zu unbehandelten Zellen waren gering (Ansatz 2 und 3). Der Einsatz von Triplehelix-Oligonukleotiden dagegen erhöhte abhängig von der TFO-Konzentration den LDH-Gehalt und damit die Toxizität (Ansatz 4-6). Eine nochmals erhöhte Toxizität in Kombination mit UVA-Strahlung konnte dabei nicht festgestellt werden (Ansatz 7 und 8). Toxische Effekte während eines Transfektionsexperimentes hängen somit in erster Linie von der eingesetzten TFO-Menge ab, andere Faktoren spielen eine eher untergeordnete Rolle.

4.2 Inhibition von Reporter genen

Zusätzlich zur ICAM-1-Hemmung wurde die biologische Aktivität von Triplehelix-Oligonukleotiden anhand eines Modellsystems überprüft in dem die Triplehelix ex vivo gebildet werden kann und der Einfluß auf die Genexpression in vivo untersucht werden kann. Da mit einem solchen System nicht nur die Sequenz des Triplehelix-Oligonukleotides sondern auch die Zielsequenz mutiert werden kann, lassen sich noch detailliertere Informationen über die Interaktionen zwischen Triplehelix-Oligonukleotid und Zielsequenz-Interaktionen erarbeiten. Dazu wurde eine zielsequenzhaltige Triplehelixbindungsstelle zwischen Promotor und Reporter gen eines Expressionsplasmides einkloniert. Ein an dieser Stelle gebundenes Triplehelix-Oligonukleotid sollte die Expression des Reporter gens hemmen.

4.2.1 Klonierung des Reporter plasmides

Ziel war es ein Plasmid herzustellen, in dem das Reporter gen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) unter dem SV40-Promotor exprimiert wird. Als Ausgangs-plasmide dienten dazu der pSVTM- β -Galactosidase Control Vector und das pCATTM-Basic Plasmid (Abbildung 50).

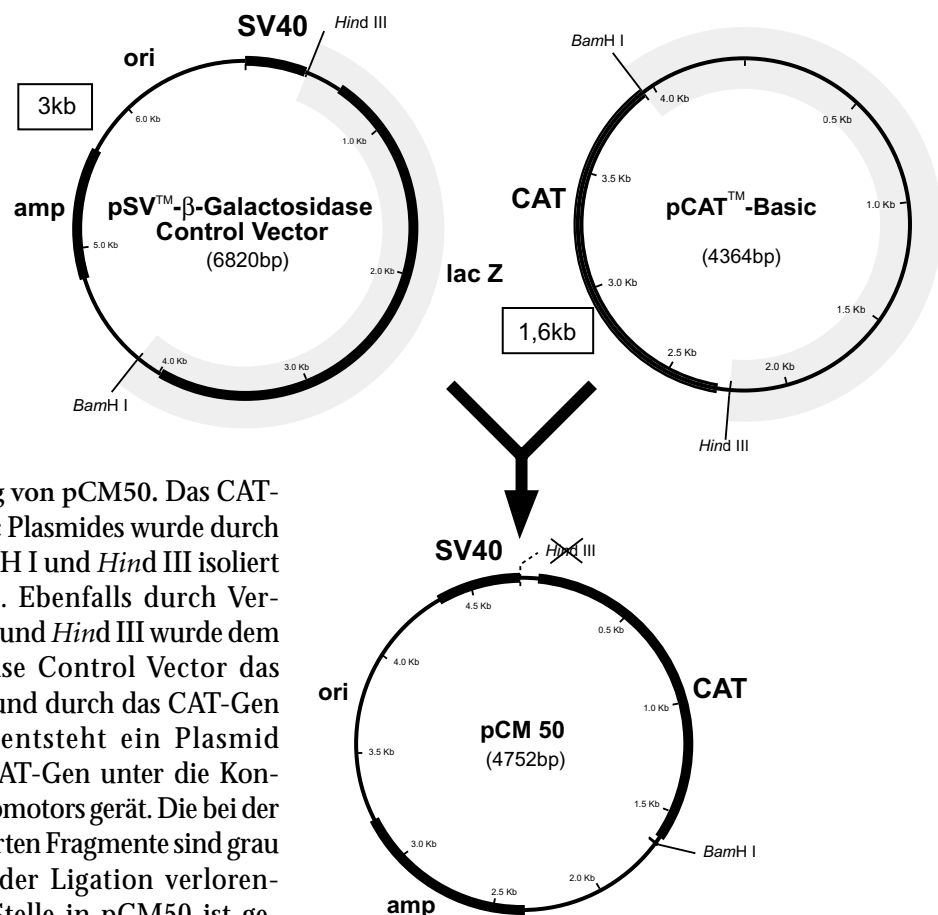


Abb. 50: Klonierung von pCM50. Das CAT-Gen des pCAT-Basic Plasmides wurde durch Verdauung mit *BamH I* und *Hind III* isoliert (1,6 kb-Fragment). Ebenfalls durch Verdauung mit *BamH I* und *Hind III* wurde dem pSV- β -Galactosidase Control Vector das lac Z-Gen entfernt und durch das CAT-Gen ersetzt. Dadurch entsteht ein Plasmid (pCM50), dessen CAT-Gen unter die Kontrolle eines SV40-Promotors gerät. Die bei der Klonierung eliminierten Fragmente sind grau unterlegt. Die bei der Ligation verlorengehende *Hind III*-Stelle in pCM50 ist gestrichelt dargestellt.

Beide Ausgangsplasmide wurden mit *Bam*H I und *Hind* III verdaut. Nach Gel-elektrophorese wurde das 1,6 kb-Fragment von pCAT-Basic (CAT-Gen) und das 3 kb-Fragment von pSV- β -Galactosidase Control Vector (SV40-Promotor, origin und β -Lactamasegen) aufgereinigt. Beide Fragmente wurden anschließend im Verhältnis von 1:1 ligiert, wobei bei der Ligation die *Hind* III-Schnittstelle verloren geht. Durch Verdauung mit *Bam*H I und *Hind* III wurde die Ligation überprüft. Das entstandene Plasmid wurde mit pCM50 bezeichnet.

Das 3 kb-Fragment des pSV- β -Galactosidase Control Vector-Fragmentes enthält eine multiple Klonierungsstelle, die im Plasmid pCM50 erhalten bleibt (Abbildung 51).

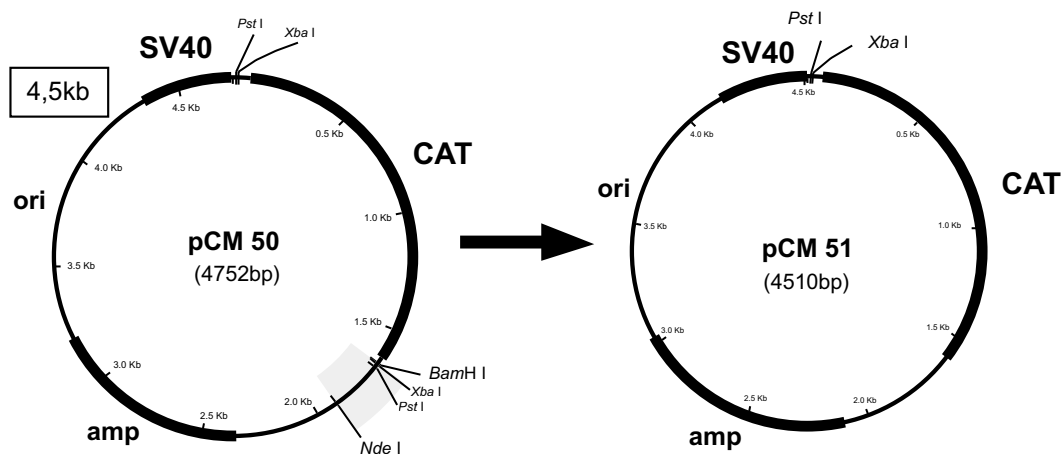


Abb. 51: Entfernung einer multiplen Klonierungsstelle, Klonierung von pCM51. pCM50 wurde mit *Bam*H I und *Nde* I verdaut. Das entfernte 246 bp-Fragment mit den störenden Schnittstellen von *Pst* I und *Xba* I ist grau unterlegt. Beide Enden wurden nach Behandlung mit Klenow-Fragment wieder ligiert.

Die darin enthaltenen Schnittstellen für *Pst* I und *Xba* I stören den Einbau der Triplehelix-bindungsstelle in die multiple Klonierungsstelle des pCAT-Basic-Fragmentes zwischen SV40-Promotor und CAT-Gen. Deshalb wurde das Plasmid pCM50 mit *Bam*H I und *Nde* I verdaut und das 246 bp-Fragment mit der multiplen Klonierungsstelle durch Gel-elektrophorese entfernt. Da bei einer Verdauung mit diesen Enzymen Enden mit 3'-überlappenden Strängen entstehen, die nicht miteinander ligierbar sind, wurde das Fragment mit Klenow-Fragment, der DNA Polymerase I behandelt, die überstehende 5'-Stränge auffüllt. Die entstehenden, gleichlangen Enden („blunt ends“) wurden anschließend ligiert. Durch Verdauung mit *Pst* I oder *Xba* I wurde die Entfernung der multiplen Klonierungsstelle überprüft und das entstandene Plasmid mit pCM51 bezeichnet.

Im nächsten Schritt wurde die Triplehelixbindungsstelle mit der Zielsequenz 17 inkloniert (Abbildung 52).

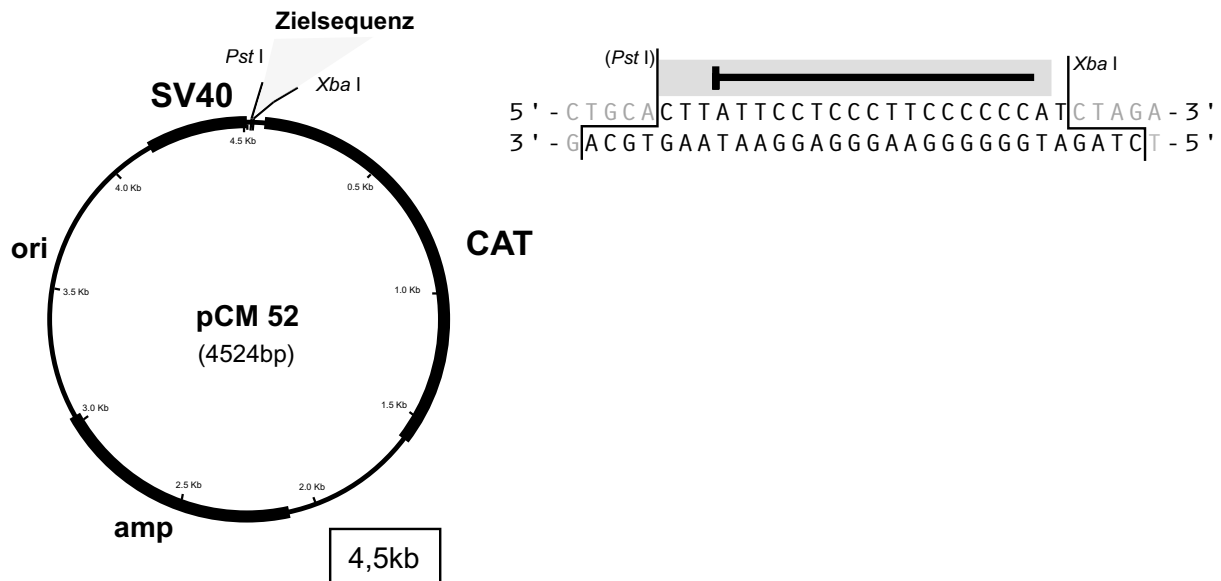


Abb. 52: Einklonierung der Zielsequenz 17, Klonierung von pCM52. Die Triplehelixbindungsstelle wurde durch Verdauung mit *Pst* I und *Xba* I in das Plasmid pCM51 inkloniert. Die Sequenz der Triplehelixbindungsstelle mit der Zielsequenz 17 ist rechts dargestellt. Die bei der Einklonierung der Triplehelixbindungsstelle verlorengelungene Erkennungsstelle von *Pst* I ist in Klammern gesetzt. Der mit der genomischen Sequenz von ICAM-1 identische Bereich ist grau, der Bereich an den sich ein Triplehelix-Oligonukleotid anlagert (Homopurinabschnitt) ist mit einem schwarzen Balken, die Psoraleninterkalationsstelle mit einem senkrechten Balken markiert.

Diese Bindungsstelle wurde aus komplementären Oligonukleotiden hergestellt, die im molaren Verhältnis von 1:1 aneinandergelagert wurden. Um ein Mehrfacheinbau zu vermeiden wurde diese dephosphoryliert. Das Plasmid pCM51 wurde mit *Pst* I und *Xba* I verdaut und das 8 bp-Fragment entfernt. Anschließend wurde die dephosphorylierte Triplehelixbindungsstelle im molaren Verhältnis von 3:1 mit dem Plasmidfragment ligiert. Da die inklonierte Bindungsstelle klein ist und keine zusätzliche Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme bereitstellt, kann der Einbau nicht direkt über Restriktionsverdauung überprüft werden. Daher wurde die Triplehelixbindungsstelle so gestaltet, daß nach Einbau in das Plasmid die Erkennungsstelle für *Pst* I verloren geht. Der erfolgreiche Einbau kann dann durch Verdauung mit *Pst* I überprüft werden. Da trotz Dephosphorylierung ein Mehrfacheinbau der Triplehelixbindungsstelle nicht völlig ausschließ-zuschließen ist, wurde sowohl Strang als auch Gegenstrang des Bereichs um die Zielsequenz sequenziert um den korrekten Einbau zu verifizieren. Das Plasmid wurde mit pCM52 bezeichnet.

Bei der Plasmidherstellung konnte auch ein Klon isoliert werden, bei dem in der Zielsequenz eine Base vertauscht war (*Mismatch*-Base, Abbildung 53).

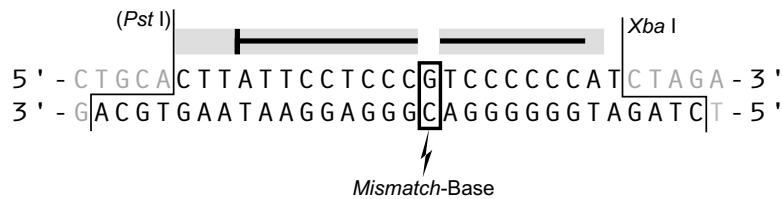


Abb. 53: Triplehelixbindungsstelle in pCM52m mit der Zielsequenz 17 und einer *Mismatch*-Base. Durch einen Replikationsfehler konnte ein Klon isoliert werden, bei dem eine Thyminbase im Gegenstrang der Zielsequenz durch Guanin ersetzt war. Die Unterbrechung im ICAM-1-Bereich (grau) sowie im Homopurinabschnitt (schwarzer Balken) ist markiert.

Da mit diesem Klon untersucht werden kann, wie exakt die Zielsequenz zur Triplehelix-Oligonukleotidsequenz passen muß, eignet sich der Klon zur Untersuchung der Spezifität von Triplehelix-Oligonukleotiden und wurde ebenfalls aufgereinigt und mit pCM52m bezeichnet.

Ferner wurden auch ein Plasmid kloniert, das die Zielsequenz 10 (Abbildung 19, Seite 56) enthält. Es wurde mit pCM54 bezeichnet und als Kontrolle eingesetzt.

4.2.2 Inhibition der CAT-Expression und der Einfluß von UVA-Strahlung

Mit dem Plasmid wurden Versuche unternommen, um zu prüfen, ob ein Triplehelix-Oligonukleotid in der Lage ist, die Expression des CAT-Reportergens zu hemmen. Das Plasmid wurde dazu (*ex vivo*) mit Triplehelix- oder Kontroll-Oligonukleotid inkubiert und bestrahlt. Anschließend wurde der gesamte Inkubationsansatz transient in A431-Zellen transfiziert und die CAT-Expression gemessen.

In diesen Experimenten wurde TFO17GT an dem Plasmid pCM52 getestet. Als Kontrolle diente COsc1GT und ein weiteres Oligonukleotid, das nicht an der Zielsequenz 17 bindet (TFO10GT). Zusätzlich wurde der Einfluß von UVA-Strahlung untersucht. Da beim CAT-ELISA die CAT-Aktivität einer gesamten Zellpopulation gemessen wird, können Fehler durch unterschiedliches Zellwachstum in den einzelnen Ansätzen verursacht werden. Um dies auszugleichen wurde neben der CAT-Konzentration auch die Menge an Gesamtprotein gemessen. Da die Gesamtproteinkonzentration proportional zur Zellzahl ist, wurde die gemessene CAT-Konzentration um diesen Wert korrigiert. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Die Inhibition mit den verschiedenen Oligonukleotiden ist in Abbildung 54 (nächste Seite) dargestellt.

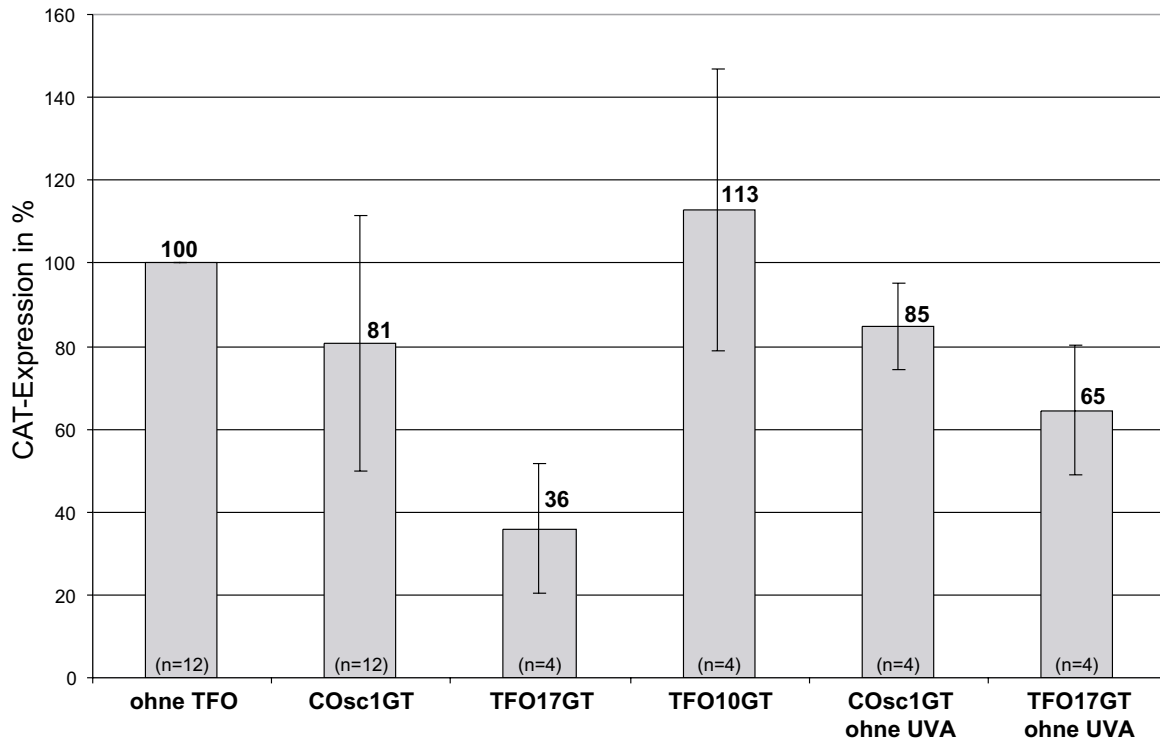
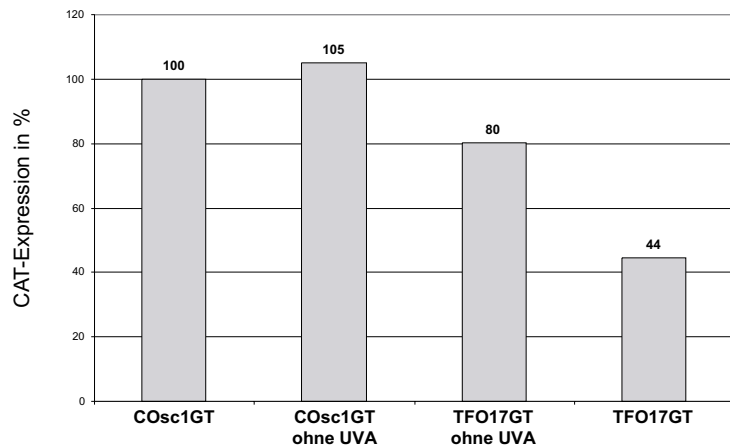


Abb. 54: Inhibition der CAT-Expression mit TFO17GT. 1,8 µg pCM52 wurden mit 1000fachen molarem Überschuß von TFO17GT in kaliumfreien Puffer inkubiert. Nach Bestrahlung mit 5 J/cm² wurde der gesamte Ansatz in A431-Zellen transfiziert. Die Transfektion erfolgte bei 70 % Konfluenz über 2 h unter Verwendung von 9 µl SuperFect. Nach 6 h wurde die CAT-Expression gemessen und die Werte auf die Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Ansätze normalisiert. Die CAT-Aktivität von Ansätzen, in denen das Plasmid ohne Triplehelix-Oligonukleotid transfiziert wurde, wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert der CAT-Aktivität mit durchschnittlichen absoluten Abweichung der mehrfach durchgeführten Experimente.

Wurde das Plasmid mit Kontroll-Oligonukleotiden inkubiert, änderte sich die CAT-Expression nicht wesentlich. Auch durch Bestrahlung mit UVA wurde die Expression kaum beeinflusst (COsc1GT). Beim Einsatz von TFO17GT war dagegen die CAT-Expression im Durchschnitt auf 65 % reduziert. Durch Bestrahlung mit UVA wurde die Inhibition nochmal deutlich verstärkt, Zellen dieser Ansätze zeigten nur 36 % Aktivität.

Abbildung 55 (nächste Seite) zeigt die Daten in einer anderen Darstellung. Hier wurde die CAT-Expression der Ansätze mit Kontroll-Oligonukleotid (COsc1GT) auf 100 % gesetzt.

Abb. 55: Aktivität von Triplehelix-Oligonukleotiden und Kontroll-Oligonukleotiden abhängig von UVA-Strahlung. Der Mittelwert ist dargestellt, wobei die Ansätze mit Kontroll-Oligonukleotid auf 100 % gesetzt wurden. Die Werte entstammen den Versuchen, die in Abbildung 54 dargestellt sind.



Hier verdeutlicht sich, daß die Bestrahlung mit UVA keinen signifikanten Einfluß auf das Kontroll-Oligonukleotid hatte. Bei den Ansätzen mit Triplehelix-Oligonukleotid wurde dagegen die Hemmung durch UVA-Strahlung verstärkt: Während ohne Bestrahlung eine leichte Reduktion der CAT-Aktivität auf etwa 80 % gegenüber dem Kontroll-Oligonukleotid feststellbar war, betrug die Aktivität nach Bestrahlung nur noch 44 %. Damit verstärkte die Bestrahlung den hemmenden Effekt des Triplehelix-Oligonukleotides um etwa 50 %.

4.2.3 Zusätzliche Untersuchungen zum Nachweis der triplehelixvermittelten Geninhibition

Die optimale Kontrolle zum Nachweis, daß die beobachtete Genhemmung tatsächlich über die Bildung einer Triplehelix stattgefunden hat, ist der Einsatz des inhibierenden Triplehelix-Oligonukleotides in Zusammenhang mit unpassenden Zielsequenzen. So können unspezifische Effekte des Triplehelix-Oligonukleotides auf das zu messende Gen ausgeschlossen werden. Daher wurden verschiedene Plasmide mit dem Triplehelix-Oligonukleotid TFO17GT inkubiert, die sich nur hinsichtlich der Triplehelixbindestelle unterschieden: Neben dem Plasmid mit *passender* Zielsequenz (pCM52) wurden Kontrollplasmide eingesetzt, die entweder *keine* (pCM51), eine *unpassende* Sequenz (pCM54), oder aber die Zielsequenz 17 mit einer *Mismatch*-Base (pCM52m), enthielten. Nach Transfektion wurde die CAT-Expression der einzelnen Ansätze gemessen (Abbildung 56, nächste Seite).

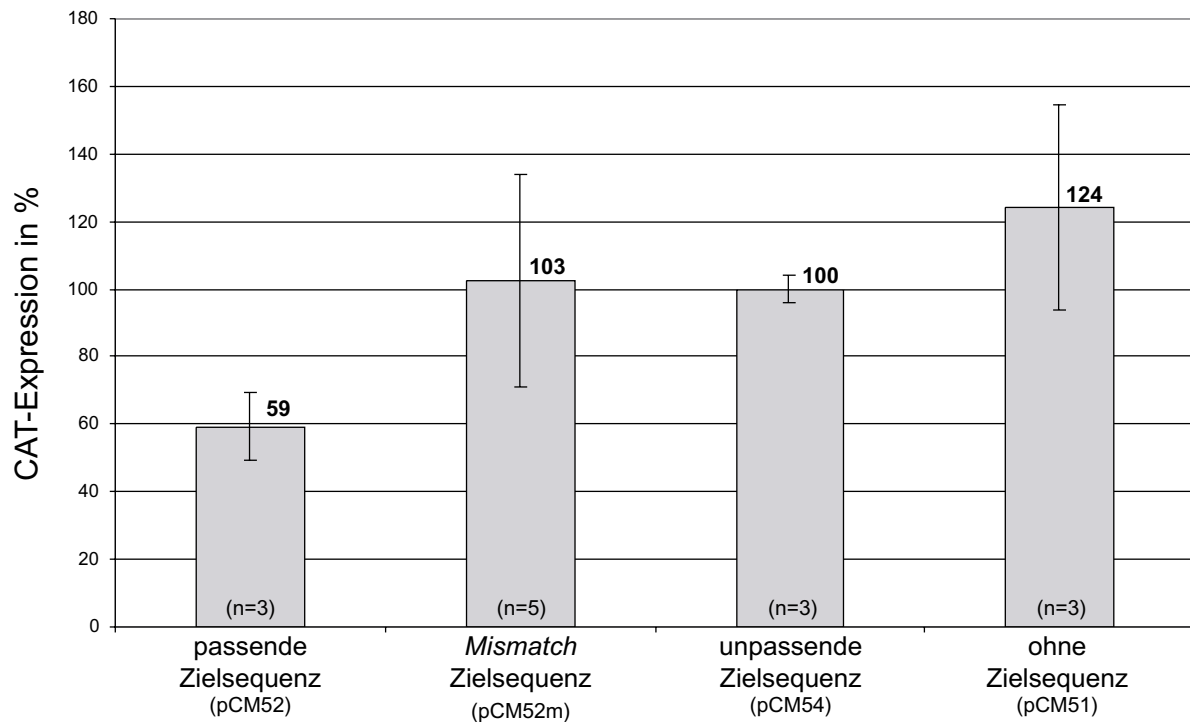


Abb. 56: Aktivität von TFO17GT an Plasmiden mit unterschiedlichen Zielsequenzen. Die jeweiligen Vektoren wurden analog zu den vorherigen Experimenten mit TFO17GT oder COsc1GT inkubiert und nach Bestrahlung (2 J/cm^2) in A431-Zellen transfiziert. Die CAT-Aktivität der Ansätze, in denen die Vektoren mit COsc1GT inkubiert wurden, wurden auf 100 % gesetzt und sind nicht dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte mehrfach durchgeführter Experimente mit deren durchschnittlichen absoluten Abweichung. Ansätze mit pCM52m wurden 5fach ($n=5$), die restlichen Ansätze 3fach ($n=3$) durchgeführt. Die Plasmide waren pCM52 (Zielsequenz 17), pCM52m (*Mismatch*-Zielsequenz), pCM54 (unpassende Zielsequenz mit der gleichen Länge, nicht dargestellt) und pCM51 (ohne Zielsequenz).

Alle Plasmide mit unpassender Zielsequenz zeigten eine unverminderte CAT-Expression. Der hemmende Effekt beruhte daher ausschließlich auf dem Zusammenspiel zwischen Oligonukleotid und Zielsequenz und ist somit eindeutig auf eine Triplehelixbildung zurückzuführen. Die unverminderte CAT-Aktivität der *Mismatch*-Ansätze zeigt, daß schon eine einzelne falsche Base in einer ansonsten passenden Zielsequenz ausreicht, den inhibierenden Effekt des Triplehelix-Oligonukleotids auszuschalten.

Diskussion

1. Bindungsfähigkeit von Triplehelix-Oligonukleotiden

In Studien zur Bindungsfähigkeit wurden die wichtigsten Eigenschaften der entworfenen Triplehelix-Oligonukleotide ermittelt. Dies waren die Fähigkeit zur Triplehelixbildung und die Fähigkeit zur UVA-vermittelten Quervernetzung nach Triplehelixbildung, sowie die Affinität, Spezifität und Selektivität zur Zielsequenz innerhalb eines zunehmend komplexeren DNA-Umfelds.

1.1 Studien an zielsequenzhaltigen Oligonukleotiden

Einen detaillierten Einblick in die Triplehelixbildung ermöglicht die Analyse in Gelretardationsexperimenten (Methodenteil, Abschnitt 2.5.1, Seite 51). Während einer Gelelektrophorese wird doppelsträngige DNA durch ein daran gebundenes Triplehelix-Oligonukleotid retardiert. Vorteil dieser Methode ist der *direkte* Nachweis einer Triplehelixbildung durch Retardation der Zielsequenz. Durch den Vergleich mit einem Kontroll-Oligonukleotid kann gezeigt werden, daß die Triplehelixbildung sequenzspezifisch ist. Nachteil dieser Methode ist, daß kein Aufschluß bezüglich der Selektivität der Triplehelix-Oligonukleotide gibt, weil nur kurze Zielsequenzen durch Oligonukleotide hinreichend retardiert werden. Nur in einem größeren DNA-Kontext kann überprüft werden, ob das Triplehelix-Oligonukleotid auch in unspezifischer Weise an anderen Stellen bindet.

Werden Gelretardationsexperimente unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, werden Triplehelices zerstört. Erst eine dauerhafte, kovalente Vernetzung von psoralen-konjugierten Triplehelix-Oligonukleotiden mit der Zielsequenz (Photoaddukte) durch UVA führt zur Retardation. Verschiedene Arbeitsgruppen (Takasugi et al. 1991, Gasparro et al. 1994, Yeung et al. 1988) haben gezeigt, daß bei dieser Vernetzung zuerst der Furanring des Psoralens mit dem Purinstrang der Zielsequenz reagiert (*Monoaddukt*), und danach - abhängig von der UVA-Dosis - der Pyronring des Psoralens mit dem Pyrimidinstrang und so zur Bildung von *Bisaddukten* führt. Dabei erfolgt die Zweitreaktion des Pyronrings nur nach erfolgter Erstreaktion des Furanrings. Eine Erstreaktion des Pyronrings ist auch möglich, aber selten (Takasugi et al. 1991), eine nachfolgende Reaktion des Furanrings ist in diesem Fall nicht möglich, es bleibt beim Monoaddukt (Einleitungsteil, Abschnitt 6.3, Seite 11).

Alle in dieser Arbeit vorgestellten Triplehelix-Oligonukleotide wurden auf ihre Fähigkeit zur Bildung von Photoaddukten getestet. Die Experimente zeigten die Entstehung von retardierten Photoaddukten abhängig von der TFO-Konzentration und der UVA-Dosis.

Da Ansätze mit Kontroll-Oligonukleotiden zu keiner Retardation führten, kann davon ausgegangen werden, daß erst die (sequenzspezifische) Triplehelixbildung die Entstehung von Photoaddukten ermöglichte, während freies Psoralen (Kontroll-Oligonukleotid) zu keinem Addukt führte (Abbildung 27, Seite 64).

Ein Vergleich der Retardationen unter nicht denaturierenden Bedingungen mit den Retardationen unter denaturierenden Bedingungen gibt Aufschluß über das Verhältnis Triplehelixmenge zu Photoaddukten: Experimente unter nicht denaturierenden Bedingungen zeigten ab einer TFO-Konzentration von 1 μM eine vollständige Retardation der Zielsequenz, eine Triplehelixbildung hat also mit allen Zielsequenzen stattgefunden. Andere Gruppen, die ähnliche Oligonukleotide einsetzen berichteten ebenfalls von einer vollständigen Retardation bei dieser TFO-Konzentration (Catapano et al. 2000, Durland et al. 1991). Unter denaturierenden Bedingungen und Bestrahlung mit hohen UVA-Dosen wurden dagegen bei dieser TFO-Konzentration nur geringe Mengen an Photoaddukten festgestellt. Offensichtlich wurde aus einer großen Zahl von Triplehelices nur ein kleiner Teil in Photoaddukte überführt. Erst bei hoher TFO-Konzentration (10 μM) und hoher UVA-Dosis (5 J/cm^2) war die Adduktbildung nahezu vollständig (Abbildung 40, Seite 78).

Ferner wurde überprüft, ob die entwickelten Oligonukleotide auch bei intrazellulären Kaliumkonzentrationen eine Triplehelix bilden können, da ein hemmender Effekt monovalenter Kationen vielfach beschrieben worden ist (Cheng et al. 1993, Faruqi et al. 1997, Olivas et al. 1995, Rougee et al. 1992). Voraussetzung für einen biologischen Effekt ist eine Triplehelixbildung unter diesen Bedingungen. Die Experimente zeigten, daß Kalium die Entstehung von Triplehelices reduziert, nicht aber verhindert. Ähnliches wurde auch von anderen Gruppen berichtet (Faruqi et al. 1997).

Insgesamt läßt sich aus den Ergebnissen ableiten, daß die Triplehelixbildung von der TFO-Konzentration und von dem Ionenmilieu abhängt. Die Bildung von Photoaddukten ist dabei nur nach vorheriger Triplehelixbildung möglich, da selbst hohe UVA-Dosen zu keinen unspezifischen Quervernetzungen führten (Kontroll-Oligonukleotid). Abhängig von UVA-Dosis und TFO-Konzentration wird dabei ein Teil der Triplehelices in Photoaddukte überführt.

Somit sind die psoralenkonjugierte Triplehelix-Oligonukleotide prinzipiell geeignet für eine molekularbiologisch modifizierte Phototherapie (PUVA-Therapie). Während bei der konventionellen PUVA-Therapie zufällige, nicht sequenzspezifische Quervernetzungen durch freie Psoralenmoleküle eine Hemmung der Replikation und somit der Zellproliferation bewirken, können Psoralenmoleküle durch Triplehelix-Oligonukleotide zielgerichtet an bestimmte Stellen hingeführt werden.

1.2 Studien an zielesequenzhaltigen Plasmiden

Einen indirekten Nachweis einer Triplehelix liefert die Hemmung eines Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenz mit der Zielsequenz überlappt (Methodenteil, Abschnitt 2.5.2, Seite 52). Vorteil der Methode ist, daß im Vergleich zu den Gelretardationen längere DNA-Fragmente eingesetzt werden können. Zum einen kann dadurch die Detektion direkt, ohne Markierung der DNA erfolgen und zum anderen läßt sich ein bestimmtes molares Verhältnis zwischen Oligonukleotid und Zielsequenz einsetzen, und so die Bindungsstärke (Affinität) des Oligonukleotides abschätzen.

Die Wahl des Restriktionsenzym hängt in erster Linie von der Zielsequenz ab. Nicht alle Zielsequenzen sind geeignet, da die Zielsequenz mit der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym überlappen muß. Der genomische Bereich um die Zielsequenz 17 bietet beispielsweise keine geeignete Restriktionsstelle. Der Bereich um die Zielsequenz 13 dagegen hat zwar eine überlappende Restriktionsstelle (*Bfa* I), Versuche eine Triplehelix an genomischen DNA-Präparationen durch Hemmung dieses Enzym nachzuweisen scheiterten aber, da *Bfa* I häufig schneidet und so zu kurzen, schwer nachzuweisbaren Fragmenten führt. Aus diesen Gründen wurden Plasmide kloniert, in denen der Bereich um die Zielsequenz so modifiziert wurde, daß ein Triplehelixnachweis über die Hemmung eines seltener schneidenden Restriktionsenzym (*Eco*N I) möglich wurde.

Eine 50%ige Hemmung von *Eco*N I wurde bei einem etwa 8fachen Überschuß von TFO13GT erreicht (Abbildung 30, Seite 67). Barre et al. (2000) berichteten von einer etwa 50%igen Hemmung bei einem etwa 100fachen TFO-Überschuß. Zudem wurde das Plasmid in dieser Studie länger und bei niedrigeren Temperaturen mit dem Oligonukleotid inkubiert, Bedingungen, die für die Triplehelixbildung förderlich sind, nicht aber der Situation einer zukünftigen, therapeutischen Anwendung entsprechen. TFO13GT scheint also stärker an seine Zielsequenz zu binden als die Oligonukleotide der erwähnten Studie. Analog zu den Gelretardationsexperimenten wurde die Triplehelixbildung durch Kalium verschlechtert, eine 50%ige Hemmung wurde erst bei einem 65fachen Überschuß beobachtet. Eine geringere Affinität zeigte in diesen Experimenten das parallel bindende bTFO13CU, hier wurde eine 50%ige Hemmung erst bei einem etwa 30fachen Überschuß festgestellt. Offensichtlich sind die sterischen Verhältnisse der Zielsequenz 13 für die parallele Bindung dieses Oligonukleotides nicht optimal.

Das Triplehelix-Oligonukleotid wurde mit dem Plasmid durch UVA-Bestrahlung quervernetzt und anschließend wurde das Plasmid aufgereinigt, weil Triplehelixinkubationspuffer und Restriktionspuffer für *Eco*N I nicht kompatibel waren. Da bei der Aufreinigung nicht quervernetzte Triplehelices zerstört werden, kann die *Eco*N I-Hemmung nur durch Photoaddukte verursacht worden sein. Gelretardationsexperimente mit dem Oligonukleotid TFO17GT zeigten, daß von einer großen Triplehelixmenge nur ein kleiner Teil

quervernetzt wird (Ergebnisteil, Abschnitt 3.2.1, Seite 76). Ohne die notwendige Aufreinigung könnte die Hemmung des Restriktionsenzym stärker sein, da dann die Hemmung durch die (größere Menge) Triplehelices verursacht werden würde. Allerdings könnte die Kinetik der Triplehelixbildung (Maher et al. 1990) auch zu einem anderen Ergebnis führen: Ein Triplehelix-Oligonukleotid lagert sich entsprechend seiner Affinität an die Zielsequenz an und löst sich wieder ab, wobei sich ein Fließgleichgewicht zwischen freier Zielsequenz und Triplehelix einstellt. Ein Restriktionsenzym kann aber nur durch angelegertes Oligonukleotid behindert werden. Während der Verdauung besteht daher aufgrund des Fließgleichgewichts immer wieder die Möglichkeit für das Restriktionsenzym zu schneiden. Je länger die Verdauung vorgenommen wird, desto mehr Plasmide können verdaut werden. Dies könnte zu falschen Rückschlüssen zur Affinität des Oligonukleotides führen und könnte die relativ geringe Restriktionshemmung von Barre et al. (2000) erklären. Wird dagegen nach der Triplehelixinkubation bestrahlt und aufgereinigt, entspricht die Situation einer Art Momentaufnahme der Triplehelixmenge zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Ein Teil der Triplehelices wird fixiert, und die durch diese fixierten Triplehelices verursachte Restriktionshemmung gemessen.

Insgesamt gibt die Tatsache, daß schon drei Triplehelix-Oligonukleotide pro Zielsequenz ausreichen eine selektive Hemmung von *Eco*N I, innerhalb einer 4500 bp langen DNA-Sequenz auszulösen, während bis zu 1000 Kontroll-Oligonukleotide pro Zielsequenz keinerlei hemmenden Effekt hatten, einen Hinweis auf die hohe Selektivität von Triplehelix-Oligonukleotiden und damit auf das große Potential dieser Technologie.

1.3 Studien an genomischer DNA

Voraussetzung für einen biologischen Effekt von Triplehelix-Oligonukleotiden ist die Bildung einer Triplehelix mit der Zielsequenz innerhalb genomischer DNA. Das in dieser Arbeit ausgewählte Zielgen ICAM-1 kommt nur zweimal im Genom vor. Entsprechend kommen auch die ICAM-1-Zielsequenzen in einer Zelle nur zweimal vor. Das Oligonukleotid muß deshalb innerhalb des genomischen Kontexts von etwa 3 Milliarden Basenpaaren an seine Zielsequenz binden. Aufgrund der Seltenheit der Zielsequenz birgt der Versuch eine Triplehelixbildung in genomischer DNA nachzuweisen erhebliche Schwierigkeiten, denn es muß ein geeignetes Nachweisverfahren zur spezifischen Detektion der extrem geringen Triplehelixmengen entwickelt werden. Aufgrund dieser Problematik sind trotz der Wichtigkeit der Fragestellung bisher nur drei Nachweisverfahren beschrieben worden, von denen keines eine breitere Anwendung fand. Zum einen wurde die Hemmung eines Restriktionsenzym in genomischer DNA durch ein Triplehelix-Oligonukleotid gezeigt und die entstehenden Fragmente durch Hybridisierung mit einer Sonde (Giovannangeli et al. 1997) oder mittels Primerextension und PCR (Belousov et al. 1998)

nachgewiesen. Zum anderen wurde die Inhibition einer semiquantitativen PCR-Reaktion durch ein Triplehelix-Oligonukleotid beschrieben (Giovannangeli et al. 1997). Das dritte Nachweisverfahren bestand aus der Kombination einer Primerextension, die durch das Triplehelix-Oligonukleotid an einer bestimmten Stelle abgebrochen wird und einer nachfolgenden, modifizierten PCR-Reaktion (Oh et al. 1999). Nachteile dieser Verfahren ist die Voraussetzung einer geeigneten Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym und der hohe Aufwand bei der Durchführung der Experimente.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Versuche unternommen eine Triplehelix in genomischer DNA nachzuweisen. Versuche mittels Inhibition einer PCR-Reaktion durch ein quervernetztes Triplehelix-Oligonukleotid nachzuweisen scheiterten an der für genomische DNA nötigen hohen Amplifikationsrate. Versuche eine Triplehelixbildung an der Zielsequenz 13 mittels Restriktionsenzymhemmung nachzuweisen, scheiterten daran, daß das einzige geeignete Restriktionsenzym (*Bfa* I) kurze, schwer nachweisbare Fragmente erzeugt, da es relativ häufig schneidet (Ergebnisteil, Abschnitt 3.1.3.1, Seite 69). Andere selbstentwickelte Versuche, zum Beispiel die Verdauung von DNA mit Exonuklease III durch die Bildung einer Triplehelix an der Zielsequenz zu blockieren, führten ebenfalls nicht zum Ziel.

Eine neue Nachweismethode konnte entwickelt werden, die erfolgreich war: Dabei werden bifunktionale Oligonukleotide eingesetzt, deren Enden mit Biotin und Psoralen modifiziert sind. Hat eine Triplehelixbildung stattgefunden, kann das Triplehelix-Oligonukleotid mittels Psoralen und UVA mit der DNA quervernetzt werden. Genomische DNA-Fragmente werden dadurch biotinyliert und können mit Hilfe von Streptavidinbeads magnetisch separiert werden. Das separierte Fragment wird dann mittels PCR-Amplifikation identifiziert (Methodenteil, Abschnitt 2.5.4, Seite 53). Hauptvorteile dieser Methode sind, daß keine Restriktionsschnittstelle an der Zielsequenz benötigt wird und daß die Triplehelix direkt durch Biotinylierung der DNA nachgewiesen wird. Dadurch ist der Nachweis im Prinzip auf beliebige weitere Zielsequenzen im Genom anwendbar und daher in Zukunft auch zur Validierung anderer biologisch oder medizinisch interessanter Triplehelixstrukturen geeignet. Zudem ist der experimentelle Aufwand um ein Vielfaches geringer als der der anderen beschriebenen Methoden. Voraussetzung ist allerdings eine 5'-TpA-Stelle an der Zielsequenz um eine Quervernetzung mit Psoralen und UVA zu ermöglichen.

Diese Methode wurde an der Zielsequenz 13 angewandt, da mit Oligonukleotiden für diese Zielsequenz die ICAM-1-Expression erfolgreich gehemmt werden konnte. Versuche, bei denen genomische DNA mit biotinylierten Triplehelix-Oligonukleotiden inkubiert wurde, zeigten nach Separation mit Streptavidinbeads ein PCR-Produkt. Nicht kovalent vernetzte Triplehelices wurden während des Experimentes zerstört, da Versuche ohne

Bestrahlung kein Produkt ergaben. Das PCR-Produkt entstand also ausschließlich durch kovalente Vernetzung der DNA mit dem Oligonukleotid die zu Biotinylierung und damit zur Separation des ICAM-1-Fragmentes führte. Mit psoralen- und biotinmodifizierten Kontroll-Oligonukleotiden, bei denen kein PCR-Produkt festgestellt wurde, wurde gezeigt, daß eine Separation nur bei passender Sequenz des Oligonukleotides möglich ist. Das PCR-Produkt beruhte also neben dem Psoralen- und Biotinmechanismus auf der sequenzspezifischen Triplehelixbildung. Damit konnte eine Triplehelixbildung in genomischer DNA an der Zielsequenz 13 nachgewiesen werden. Der Nachweis war sowohl mit dem antiparallel bindenden Triplehelix-Oligonukleotid bTFO13GT als auch mit dem parallel bindenden Triplehelix-Oligonukleotid bTFO13CU erfolgreich.

In der Zelle ist DNA im Zellkern lokalisiert und dort in den Strukturen des Chromatingerüsts (Nukleosomen) organisiert. Solcherart organisierte DNA könnte für Triplehelix-Oligonukleotide unzugänglich sein. An kurzen DNA-Stücken die an Histone assoziiert waren, wurde gezeigt, daß die Triplehelixbildung an bestimmten Positionen verhindert wurde (Brown et al. 1996). Aus diesem Grund wurden isolierte Zellkerne mit Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert, um zu testen ob die Zielsequenz 13 auch im Zellkern zugänglich für Triplehelix-Oligonukleotide ist. Der Einsatz isolierter Zellkerne hat den Vorteil, daß eine Transfektion umgangen wird und die Inkubation unter (kaliumfreien) Idealbedingungen erfolgen kann.

Als Annäherung an die in vivo-Situation wurde auch in Zellkernen die Bildung einer Triplehelix im Ansätzen mit Triplehelix-Oligonukleotiden festgestellt (Abbildung 35, Seite 72). Im Gegensatz zu genomischer DNA wurde allerdings in Ansätzen mit Kontroll-Oligonukleotiden ebenfalls eine (geringere) PCR-Produktmenge festgestellt. Da Versuche ohne Bestrahlung kein Produkt ergaben, muß dieses PCR-Produkt auf unspezifischen Quervernetzungen durch UVA beruhen, die unabhängig von der Oligonukleotidsequenz sind. Diese müssen im ICAM-1-Fragment stattgefunden haben, da die PCR-Reaktion spezifisch für dieses Fragment ist. Mit der Kontrollamplifikation eines anderen Fragmentes wurde dieser Verdacht bestätigt: Ein Fragment, das keine Zielsequenz 13 enthielt wurde ebenso in geringem Ausmaß amplifiziert (Abbildung 37, Seite 74). Offensichtlich fand unter den Bedingungen dieser Experimente an TpA-Abschnitten eine Interkalation des Psoralens unabhängig von der Oligonukleotidsequenz statt. Das Auftreten unspezifischer Quervernetzungen im Genom gibt erstmals einen Hinweis auf die Selektivität von Triplehelix-Oligonukleotiden im genomischen Kontext. Dies wurde bisher noch nicht untersucht, obwohl dies entscheidend für das Nebenwirkungsprofil einer zukünftigen therapeutischen Anwendung sein kann. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß die Zielsequenz 13 auch in Zellkernen zugänglich für Triplehelix-Oligonukleotide ist. Die deutlich höhere PCR-Produktmenge in den Ansätzen mit Triplehelix-Oligonukleotid zeigt

eine sequenzspezifische Triplehelixbildung. Die Voraussetzung für eine Hemmung der ICAM-1-Expression *in vivo* ist also gegeben.

Es wurden auch Versuche unternommen, die Bildung einer Triplehelix in der intakten Zelle nachzuweisen. Dazu wurden A431-Zellen mit Triplehelix-Oligonukleotid transfiziert, bestrahlt, genomische DNA präpariert und einer Separation unterzogen. Im Gegensatz zu isolierter DNA und zu Zellkernen konnte hier aber keine Triplehelixbildung nachgewiesen werden. Verschiedene Ursachen kommen hierfür in Betracht: Die Separationsmethode ermöglicht nur die Detektion triplehelixvermittelter Psoralenquervernetzungen. Wie Gelretardationen und auch Tests an genomischer DNA zeigten, hängen diese stark von der UVA-Dosis ab. Um zytotoxische Effekte zu umgehen wurden eine Bestrahlung der Zellen mit hohen UVA-Dosen vermieden. Ein weiterer Grund könnte eine geringere Triplehelixmenge in Zellen sein, die zu entsprechend geringeren Psoralenquervernetzungen führte. Ursachen dafür könnten eine, durch eine nicht optimale Transfektion, niedrige TFO-Konzentration sein, oder eine geringere Triplehelixbildung sein, da sie unter intrazellulären Bedingungen (Kalium) stattfinden muß. Weiterführende Versuche mit sensitiveren Nachweisverfahren wie zum Beispiel mit Echtzeit-PCR-Systemen sollten daher in Zukunft unternommen werden.

2. Die Hemmung von ICAM-1

Die Hemmung eines zellulären, eukaryoten Gens mit Triplehelix-Oligonukleotiden ist bisher selten publiziert worden (Aggarwal et al. 1996, McGuffie et al. 2000, Catapano et al. 2000).

Wurden A431-Zellen mit Triplehelix-Oligonukleotid transfiziert und anschließend die ICAM-1 Expression durch Zugabe von IFN γ induziert, war eine deutlich reduzierte ICAM-1-Menge an der Zelloberfläche zu messen (Abbildung 43, Seite 82). Diese Reduktion wurde durch höhere TFO-Konzentration verstärkt und nur bei Triplehelix-Oligonukleotiden, nicht aber bei den entsprechenden Kontroll-Oligonukleotiden beobachtet, was auf einen sequenzabhängigen Effekt hinweist. Die Messung von ICAM-1 wurde durchflußzytometrisch bestimmt, was die Bestimmung der ICAM-1-Menge *pro Zelle* ermöglichte. Die ICAM-Expression nahezu aller Zellen einer A431-Population wurde durch IFN γ -Zugabe induziert. Waren die Zellen zuvor mit Triplehelix-Oligonukleotid transfiziert worden, zeigte ein Teil der Population eine hohe ICAM-1-Expression, während der andere Teil eine niedrige ICAM-1-Expression, die in etwa der Basalexpression un behandelter Zellen entsprach.

Interessanterweise traten bei diesen Experimenten kaum Zellen mit *leicht* reduzierter Expression auf. Nur inhibierte Zellen (die ICAM-1-Expression entsprach der basalen

Expression) oder nicht inhibierte Zellen (Expression entsprach induzierten Zellen) wurden festgestellt, deren Anteil sich abhängig von der TFO-Konzentration verschob (Abbildung 44, Seite 83). Als Erklärung können folgende Überlegungen diskutiert werden: Bei einem Gen, das in zwei Kopien pro Zelle vorkommt gibt es prinzipiell drei Möglichkeiten der Triplehelixbildung in einer Zelle: Entweder haben zwei Oligonukleotide an beide Allele gebunden (kein Allel frei), oder nur ein Oligonukleotid an ein Allel (das andere Allel ist frei), oder es hat gar kein Oligonukleotid gebunden (beide Allele frei). Hat die Triplehelixbildung an beiden Allelen stattgefunden, sollte die ICAM-1-Synthese komplett blockiert sein. In den Experimenten zeigten inhibierte Zellen eine niedrige ICAM-1-Menge, die der Basalexpression unbehandelter Zellen entsprach. Dies könnte auch der ICAM-1-Menge entsprechen, die bereits vor Transfektion auf der Zelloberfläche war. Sie kann von Triplehelix-Oligonukleotiden nicht verändert werden, da eine Triplehelix nur die Neusynthese von ICAM-1 blockiert. Für diese These sprechen auch Versuche, in denen nicht IFN γ -behandelte Zellen mit Triplehelix-Oligonukleotid transfiziert wurden. Diese Zellen zeigten keine meßbare Reduktion der (basalen) ICAM-1-Expression (Daten nicht dargestellt). Hat dagegen überhaupt keine Triplehelix stattgefunden, dann stehen beide Allele dem Transkriptionsapparat zur Verfügung und ICAM-1 wird unbeeinflusst exprimiert. Daß Oligonukleotide keine unspezifisch hemmende Effekte auf die ICAM-1-Expression haben, zeigten Ansätze mit Kontroll-Oligonukleotiden in denen die Zellen die gleiche ICAM-1-Menge exprimierten wie nicht transfizierte Zellen. Hat eine Triplehelix mit nur einem Allel stattgefunden, steht das andere Allel dem Transkriptionsapparat zur Verfügung. Da kaum intermediäre Expressionsstufen vorkamen, kann vermutet werden, daß die die ICAM-1-Expression durch das freie Allel kompensiert wird.

ICAM-1 wurde nur mit Triplehelix-Oligonukleotiden, die an die Zielsequenz 13 binden, gehemmt. Andere Zielsequenzen scheinen für eine Hemmung ungeeignet zu sein. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Catapano et al. (2000) gemacht. Für die Zielsequenz 13 wurden zwei Triplehelix-Oligonukleotide entwickelt von denen sowohl das antiparallel bindende TFO13GT als auch das parallel bindende bTFO13CU einen hemmenden Effekt hatten. Die Hemmung war bei beiden Oligonukleotiden ab einer Konzentration von etwa 1,5 μM feststellbar, eine 50%ige Hemmung wurde mit TFO13GT bei etwa 2 μM festgestellt. Diese Konzentrationen sind im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen niedrig: Catapano et al. (2000) stellten eine 50%ige Reduktion von *c-myc*-mRNA mit 20 μM eines 3'-modifizierten Phosphodiester-Oligonukleotides fest. Mit einem Thioat-Oligonukleotid beobachtete diese Arbeitsgruppe eine Hemmung bereits bei 10 μM (McGuffie et al. 2000). Mit Oligonukleotiden, deren Rückgrat aus Phosphoramidatbindungen bestand, wurde eine Genhemmung festgestellt, in denen streptolysin-permeabilisierte Zellen 100 μM Oligonukleotid ausgesetzt wurden (Faria et al. 2000).

Der Vergleich mit einem Kontroll-Oligonukleotid zeigt, daß die beobachtete Genhemmung von der Sequenz des Oligonukleotides abhängt. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, daß die Hemmung auch spezifisch für das Zielgen ist und andere Gene nicht beeinflußt werden. Bei der Hemmung eines endogenen Gens ist daher die beste Kontrolle neben dem Einsatz von Kontroll-Oligonukleotiden der Vergleich mit einem anderen Gen. Hierfür wurde ein Gen mit ähnlicher Regulation ausgewählt: HLA-DR, ein Gen aus dem MHC-II-Komplex wird ebenfalls durch IFN γ induziert. Durch die Wahl des gleichen Induktors kann ein unspezifischer Einfluß des Oligonukleotides auf die Induktion ausgeschlossen werden. Dies ist umso wichtiger, da von unspezifischen Effekten G/T-haltiger Oligonukleotide an IFN γ -Rezeptoren berichtet wurde (Ramanathan et al. 1994). Da HLA-DR genauso wie ICAM-1 auf der Zelloberfläche exprimiert wird, ist es ebenfalls durchflußzytometrisch bestimmbar. Experimente, in denen die Expression einer Zellpopulation von HLA-DR und von ICAM-1 gemessen wurde, ergaben eine unbeeinflusste HLA-DR-Expression, wohingegen ICAM-1 inhibiert wurde. Dies ist -neben Kontroll-Oligonukleotiden- ein weiteres Indiz dafür, daß die Genhemmung mit den Triplehelix-Oligonukleotiden spezifisch für das ICAM-1-Gen ist, und nicht auf Hemmung der Induktion beruht.

Wenn psoralenkonjugierte Triplehelix-Oligonukleotide nach Triplehelixbildung bestrahlt werden, dann können sie über Psoralen/UVA-Wechselwirkungen dauerhaft mit ihrer Zielsequenz verbunden werden. Die Genhemmung könnte dadurch verstärkt werden. Allerdings zeigten Experimente in denen Zellen transfiziert, aber nicht bestrahlt wurden, eine gleich stark gehemmte ICAM-1-Expression. Offenbar reichte die Triplehelixbildung an sich für die Genhemmung aus. Diese Ergebnisse decken sich auch mit anderen Arbeitsgruppen, die von biologischen Effekten mit Triplehelix-Oligonukleotiden berichteten, die nicht kovalent quervernetzt wurden: An Mäusen wurden genomische Mutationen an der Zielsequenz durch Triplehelix-Oligonukleotide, die nicht psoralenkonjugiert waren, nachgewiesen (Vasquez et al. 2000). Auch McGuffie et al. (2000) berichten von einer Genhemmung in Leukämie-Zelllinien mit Triplehelix-Oligonukleotiden, die nicht psoralengekoppelt waren.

Insgesamt sprechen folgende Ergebnisse dafür, daß die Genhemmung durch Triplehelixbildung verursacht wurde: Zwei strukturell unterschiedliche Triplehelix-Oligonukleotide mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften hemmten ICAM-1: Ein in antiparalleler Orientierung bindendes Triplehelix-Oligonukleotid vom Purin-Typ (TFO13GT) und ein parallel bindendes Triplehelix-Oligonukleotid vom Pyrimidin-Typ (bTFO13CU). Ein unspezifischer Effekt ist deshalb sehr unwahrscheinlich. Entsprechende Kontroll-Oligonukleotide mit der gleichen Basenzusammensetzung hemmten die ICAM-1-Expression dagegen nicht. Die Hemmung betraf ICAM-1, nicht aber die Expression eines anderen IFN γ induzierbaren Kontrollgens. Weiterhin war der Hemmeffekt abhängig von der TFO-Konzentration.

3. Die Aktivität von Triplehelix-Oligonukleotiden im Modellsystem

Wird ein Gen durch ein Triplehelix-Oligonukleotid gehemmt, dann ist es wichtig nachzuweisen, daß diese Hemmung auf Triplehelixbildung und nicht auf anderen, unspezifischen Effekten zurückzuführen ist. Der Einsatz eines sequenzdurchmischten Kontroll-Oligonukleotides an der Zielsequenz gibt einen Hinweis auf einen sequenzspezifischen Effekt. Eine weitere Kontrolle ist der Einsatz des einer sequenzdurchmischten Zielsequenz. Wird diese mit dem Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert sollte dieses keinen hemmenden Effekt haben. Mit diesen beiden Ansätzen kann gezeigt werden, daß die beobachtete Hemmung sowohl von der Oligonukleotid- als auch von der Zielsequenz abhängt und so eindeutig auf der Triplehelixbildung beruht. Diese zusätzliche Kontrolle ist allerdings nicht bei der Hemmung eines endogenen Gens möglich, da die Zielsequenz natürlicherweise vorhanden ist und nicht modifiziert werden kann. Solche Kontrollen können nur modellhaft an künstlichen Systemen durchgeführt werden, in denen die Zielsequenz modifiziert wurde.

In dieser Arbeit wurde ein solches System konstruiert. Es bestand aus Expressionsplasmiden, in denen verschiedene Triplehelixbindestellen zwischen Promotor und Reportergen (Chloramphenicol-Acetyltransferase, CAT) inkloniert wurden. Die Triplehelixbindestellen enthielten entweder die ICAM-1-Zielsequenz 17 oder verschiedene Kontrollsequenzen. Als Kontrollsequenzen wurde eine durchmischte Sequenz gleicher Länge, keine Sequenz, oder eine Sequenz, bei der eine einzelne Base ausgetauscht war (*Mismatch-Base*), eingesetzt. Die Versuche wurden mit dem Triplehelix-Oligonukleotid TFO17GT durchgeführt (Ergebnisteil, Abschnitt 4.2.3, Seite 94).

Wurde das zielsequenzhaltige Plasmid mit TFO17GT inkubiert, bestrahlt und in A431-Zellen transfiziert, war die CAT-Expression um 40 % reduziert. Wurden die Kontrollplasmide mit veränderter Zielsequenz mit Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert war die CAT-Expression dagegen unbeeinflusst. Die Hemmung hing also sowohl von der Oligonukleotidsequenz auch von der Zielsequenz im Plasmid ab. Da erst das passende Zusammenspiel von Oligonukleotid- und Zielsequenz eine genhemmende Wirkung hatte, konnte gezeigt werden, daß die Hemmung tatsächlich auf eine Triplehelixbildung an der Zielsequenz zurückzuführen ist. Wurde ein Plasmid, dessen Zielsequenz von nur einer Base unterbrochen war, mit Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert, wurde eine unverminderte CAT-Expression festgestellt. Offensichtlich reichte bereits *eine* falsche Base in der Zielsequenz aus um die Triplehelixbildung und damit eine Genhemmung vollständig zu verhindern. Dies gibt einen Hinweis auf die hohe Spezifität der Triplehelixbildung und ist wichtig im Hinblick auf eine möglichst selektive Bindung des Oligonukleotides an seine Zielsequenz.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine Genhemmung an Reporterplasmiden zeigten. Allerdings erlauben die Ergebnisse keinen direkten quantitativen Vergleich mit den eigenen Daten, da unterschiedliche Oligonukleotide oder verschiedene Inkubations- oder Transfektionsbedingungen gewählt wurden: Parallel bindende, psoralenkonjugierte Oligonukleotide in Verbindung mit UVA zeigten eine Hemmung an Reporterplasmiden (Grigoriev et al. 1993, Macaulay et al. 1995). Faria et al. (2000) stellten eine 50%ige Hemmung mit Phosphoamidat-Oligonukleotiden fest. Diese Oligonukleotide zeigten keine Hemmung an einem Kontrollplasmid mit mutierter Zielsequenz, das zwei Mismatch-Basen enthielt. Mit einem Reporterkonstrukt, das die Zielsequenz im Promotor enthielt wurde von Ritchie et al. (2000) eine 50%ige Hemmung berichtet. Dieser relativ starke Effekt wurde mit unmodifizierten, antiparallel bindenden Oligonukleotiden beobachtet, die mit SuperFect transfiziert wurde. Das Ergebnis steht im Widerspruch zu Daten, die zeigen, daß solche Oligonukleotide intrazellulär rasch degradiert werden (Zengedui et al. 1992).

4. Einfluß von UVA-Strahlung auf die Genhemmung mit Triplehelix-Oligonukleotiden

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß mit Triplehelix-Oligonukleotiden Psoralene positionsgenau an der Doppelhelix plaziert werden können. In Anknüpfung an die dermatologische PUVA-Therapie ließe sich so eine selektive Genhemmung mit psoralengekoppelten Triplehelix-Oligonukleotiden erzielen, wenn sich der inhibierende Effekt mit UVA verstärken läßt.

Der Einfluß von UVA-Strahlung auf die biologische Aktivität von psoralengekoppelten Triplehelix-Oligonukleotiden wurde mit dem Reporterplasmid untersucht. Dazu wurde das zielsequenzhaltige Plasmid mit Oligonukleotiden inkubiert, bestrahlt (oder nicht bestrahlt), in A431-Zellen transfiziert und deren CAT-Expression gemessen. In unbestrahlten Ansätzen mit Triplehelix-Oligonukleotid war die CAT-Expression im Vergleich zum Kontroll-Oligonukleotid um etwa 20 % reduziert, wobei diese Reduktion aufgrund der experimentellen Schankungen nicht als signifikant anzusehen ist. In bestrahlten Ansätze war die CAT-Expression dagegen um 50 % reduziert. Dieser Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Ansätzen zeigt, daß die Genhemmung primär durch Quervernetzungen verursacht worden ist.

Musso et al (1996) untersuchten ebenfalls die Hemmung eines Reportergens mit einem psoralenkonjugierten Triplehelix-Oligonukleotid. Im Vergleich zu unbestrahlten Ansätzen wurde die Genexpression um 80 % reduziert. In diesen Versuchen wurde das Plasmid nach Inkubation mit dem Triplehelix-Oligonukleotid bestrahlt (oder nicht bestrahlt) und der Ansatz in HeLa-Zellen elektroporiert. Möglicherweise wurde die Triplehelix durch die Elektroporation zerstört. Wenn sie zerstört ist, dann ist die Expression in unbestrahlten Ansätzen höher. Ein Vergleich mit diesen Ansätzen führt dann zu einem größeren Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Ansätzen. In diesem Fall ist eine Aussage, ob eine Triplehelixbildung ohne Quervernetzung in der Lage ist ein Gen zu hemmen, nicht möglich. Dies könnte unter Umständen eine Erklärung die hohen Hemmung dieses Oligonukleotides sein.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen, daß in Ansätzen mit Kontroll-Oligonukleotid die Genexpression durch Bestrahlung nicht beeinflußt wurde. Unter diesen Bedingungen haben keine unspezifischen, sequenzunabhängigen Quervernetzungen stattgefunden, die zu einer Hemmung geführt hätten. Die Bestrahlung mit UVA verbesserte den Hemmeffekt des Triplehelix-Oligonukleotides erheblich, während sie beim Kontroll-Oligonukleotid keinen signifikanten Effekt hatte.

Die Ergebnisse lassen zwei alternative Erklärungen bezüglich der CAT-Inhibition nach UVA-Strahlung zu: 1. Triplehelices sind *nicht* oder nur schwach in der Lage das Gen zu hemmen. Erst nach Quervernetzung durch UVA-Strahlung wird ein genhemmender Effekt entwickelt. Eine Aktivierung der Triplehelix-Oligonukleotide durch Bestrahlung wäre denkbar. 2. Triplehelices *sind* zwar in der Lage das Reportergen zu hemmen, aber sie wurden (zum Beispiel bei der Transfektion) zerstört, während Quervernetzungen erhalten blieben. Gegen die Zerstörung während der Transfektion sprechen Untersuchungen von Sedelnikova et al. (1999) die zeigten, daß Triplehelices nach Komplexierung in Liposomen stabil bleiben. Allerdings wurde in dieser Arbeit nicht mit liposomalen Zubereitungen, sondern mit einem Dendrimer transfiziert. Gegen die Zerstörung sprechen auch Ergebnisse von Nakanishi et al. (1998), die nicht psoralenkonjugierte Triplehelix-Oligonukleotide einsetzen. In dieser Studie wurde abhängig von der TFO-Konzentration die Expression bis zu 50 % gehemmt, wobei Oligonukleotide mit Thioatrückgrat eingesetzt wurden. Somit erscheint die 1. Erklärung wahrscheinlicher, und eine Aktivierung von psoralenkonjugierten Triplehelix-Oligonukleotiden durch UVA-Strahlung wäre denkbar.

5. Ausblick

Mit der Methode mittels magnetischer Separation eine Triplehelix von biotinkonjugierten Triplehelix-Oligonukleotiden nachzuweisen, wurde eine neue Technik zum Nachweis genomischer Triplehelices geschaffen. Eine Verbesserung der PCR-Analyse durch die Anwendung sensitiverer Detektionstechniken wie quantitative Echtzeit-PCR könnte den Nachweis einer Triplehelixbildung in intakten Zellen erbringen. Dies könnte dann an Zellen durchgeführt werden, die mit Triplehelix-Oligonukleotid transfiziert wurden.

Die Nachweis der Triplehelixbildung in isolierten Zellkernen zeigte, daß neben triplehelix-vermittelten Quervernetzungen auch unspezifische Quervernetzungen stattfinden. Die Nachweismethode mittels magnetischer Separation und PCR-Analyse eröffnet erstmals die Möglichkeit an genomischer DNA spezifische und unspezifische TFO-Wechselwirkungen zu differenzieren. Damit können neu entwickelte Oligonukleotide oder Oligonukleotidanaloga hinsichtlich ihrer Selektivität im Genom überprüft werden. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung ist ein selektiver, auf hoher Affinität des Triplehelix-Oligonukleotides basierender biologischer Effekt entscheidend für ein zukünftiges Nebenwirkungsprofil.

Die Spezifität der Genhemmung für ICAM-1 wurde neben dem Vergleich der Triplehelix-Oligonukleotide mit Kontroll-Oligonukleotiden auch durch den Vergleich mit einem ähnlichen Gen (HLA-DR) herausgearbeitet. Der Vergleich mit nur *einem* Kontrollgen hat eher modellhaften Charakter, da er die intrazelluläre Situation stark vereinfacht. Die Untersuchung möglichst vieler anderer Gene gäbe weiteren Aufschluß auf die Gen-spezifität. Hierfür wäre zum Beispiel der Einsatz von Microarrays interessant, da mit dieser Methode viele Gene gleichzeitig untersucht werden können. Die Erkenntnis, daß neben triplehelixbedingten Quervernetzungen auch unspezifische TFO-Quervernetzungen stattfinden, unterstreicht die Wichtigkeit solcher Untersuchungen.

Mit der Zielsequenz 13 wurde eine DNA-Sequenz entdeckt, die das Potential zur Hemmung der ICAM-1-Expression hat. Daher bietet es sich an weitere Oligonukleotid-modifikationen zu testen, die an diese Sequenz binden. Insbesondere die hochaffin und selektiv bindenden PNAs (Peptide nucleic acids) eröffnen unter Umständen verbesserte Möglichkeiten zur Hemmung von ICAM-1 (Faruqi et al. 1998, Wang et al. 1999). Auch Triplehelix-Oligonukleotide, deren Rückgrat statt einer Phosphodiesterbindung eine Phosphoamidatbindung enthält, sollten eine höhere Affinität besitzen (Barre et al. 2000, Giovannangeli et al. 1997). Oligonukleotide mit höherer Affinität zur Zielsequenz könnten in niedrigerer Konzentration eingesetzt werden und damit das Auftreten zytotoxischer Effekte minimiert werden. Weitere Möglichkeiten zur Steigerung der biologischen Effektivität ist die Kopplung von reaktiven Substanzen an Triplehelix-Oligonukleotide. Dies

sind zum Beispiel DNA spaltende Substanzen wie FeBleomycin (Kane et al. 1995) oder Substanzen wie BePI , die eine Triplehelix stabilisieren können (Pilch et al. 1993).

Alle Versuche wurden an der Zelllinie A431 durchgeführt. Weitere Versuche zur ICAM-1-Hemmung können an zunehmend komplexeren biologischen Systemen erfolgen. Versuche sollten dabei zuerst an anderen Zelllinien, dann an primären Zellen, insbesondere Keratinozyten und schließlich an Geweben erfolgen. Geeignete Systeme zur Einbringung von Triplehelix-Oligonukleotiden in Gewebe müssen entwickelt werden. Insbesondere die topische Anwendung von Triplehelix-Oligonukleotiden an der Haut zum Beispiel mit Hilfe von liposomalen Zubereitungen bietet sich zur Untersuchung an.

Letztendlich kann die Triplehelix-Technologie zur Hemmung anderer medizinisch relevanter Gene eingesetzt werden.

Zusammenfassung

Oligonukleotide können sich an bestimmte Abschnitte der Doppelhelix als dritter DNA-Strang anlagern. Die resultierende DNA-*Triplehelix* kann mit der Transkription von Genen interferieren. Zur Charakterisierung dieser potentiell therapeutisch nutzbaren Eigenschaft von Triplehelix-Oligonukleotiden wurde in der vorliegenden Arbeit modellhaft die triplehelixvermittelte Hemmung des Adhäsionsmoleküls *Intercellular-adhesion molecule-1* (ICAM-1) angestrebt. ICAM-1 hat eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und im Ablauf zahlreicher immunologischer und entzündlicher Prozesse inne und ist deshalb ein attraktives Ziel für eine genspezifische therapeutische Hemmstrategie.

Die Anlagerung von Triplehelix-Oligonukleotiden erfolgt bevorzugt an Stellen, an denen einer der beiden Doppelhelix-Stränge eine Folge von Purinbasen und der komplementäre Strang somit Pyrimidinbasen aufweist (*Homopurinabschnitt*). Nach solchen Sequenzen wurde das ICAM-1-Gen durchsucht. Im dritten Intron wurde eine geeignete 16 bp lange Homopurin-Homopyrimidin-Zielsequenz identifiziert. Für diese Sequenz wurde ein aus Guanosin- und Thymidin-Nukleotiden zusammengesetztes Triplehelix-Oligonukleotid (TFO13GT) derart konstruiert, daß es antiparallel an den Purinstrang der Zielsequenz bindet. Als Kontrolle dienten Oligonukleotide mit gleichem Aufbau, aber durchmischter Sequenz (COsc1GT und COsc2GT).

In Bindungsstudien wurde überprüft, ob das Triplehelix-Oligonukleotid TFO13GT tatsächlich an seine ICAM-1-Zielsequenz binden kann. Eine Bindung ließ sich nachweisen a) in Gelretardationsexperimenten (Retardation der Zielsequenz durch gebundenes TFO13GT in der Gelelektrophorese) und b) durch Hemmung von Restriktionsenzymen (die Bindungsstelle von TFO13GT überlappt mit der Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym; gebundenes TFO13GT verhindert dadurch die Verdauung mit diesem Enzym). In beiden Ansätzen waren die Effekte nur mit dem Triplehelix-Oligonukleotid, nicht aber mit Kontroll-Oligonukleotiden zu beobachten.

Diese Bindungsstudien wurden unter optimierten Bedingungen an kurzen DNA-Zielabschnitten im zellfreien Milieu durchgeführt, womit eine grundsätzliche Bindungsfähigkeit *in vitro* gezeigt werden konnte. Anschließend sollte überprüft werden, ob das Triplehelix-Oligonukleotid auch *genomischer DNA* und *im Chromatin/Nukleosomen-Umfeld* der Zelle den Weg zu seiner Zielsequenz findet und dort spezifisch an die Zielsequenz bindet. Hierfür konnte als neues sensitives Nachweissystem entwickelt werden, das auf mehreren methodischen Schritten beruht: Nach Triplehelixbildung werden psoralengekoppelte Triplehelix-Oligonukleotide mittels UVA-Bestrahlung kovalent mit der Doppelhelix verbunden. Anschließend wird die genomische DNA mit einem Restriktionsenzym in geeignete Fragmente gespalten. Das andere Ende des Triplehelix-Oligonukleotides ist biotinyliert und bindet somit an streptavidinbeschichtete magnetische

Partikel. Dadurch können mit einem Magneten triplehelixtragende DNA-Fragmente von der übrigen DNA separiert (Magnetische Separation) und mittels PCR-Amplifikation nachgewiesen werden. Der neu entwickelte Nachweis ist im Prinzip auf beliebige weitere Zielsequenzen im Genom anwendbar und ist daher in Zukunft auch zur Validierung anderer biologisch oder medizinisch interessanter Triplehelixstrukturen geeignet.

Durch Einsatz dieser Methode gelang der Nachweis der durch sequenzspezifische Bindung von TFO13GT an seine ICAM-1-Zielsequenz erzeugten Triplehelixstrukturen in gereinigter genomischer DNA, aber auch an frisch isolierten Zellkernen (Chromatin/Nukleosomen-Umfeld) von A431-Zellen, einer von einem spinözellulären Karzinom abgeleiteten permanenten Zelllinie.

Nach dem Bindungsnachweis wurde experimentell überprüft, ob das Triplehelix-Oligonukleotid auch den angestrebten funktionellen Effekt, die Hemmung der ICAM-1-Expression, aufweist. Hierzu wurde TFO13GT in A431-Zellen transfiziert und der Einfluß von TFO13GT auf die ICAM-1-Oberflächenexpression durchflußzytometrisch untersucht. Die Transfektionseffizienz wurde mit aktiviertem Dendrimer oder einer kationischen Liposomenzubereitung optimiert und die erfolgreiche Einbringung in Zellkerne experimentell mit FITC-markierten Oligonukleotiden überprüft. Da ICAM-1 in A431-Zellen eine niedrige Basalexpression aufweist, wurde ICAM-1 durch Zugabe von Interferon- γ (IFN γ) induziert. Die vorherige Transfektion von TFO13GT antagonisierte die IFN γ -induzierte ICAM-1-Expression. Wurde die Konzentration des Oligonukleotides erhöht, war auch die ICAM-1-Hemmung stärker. Kontroll-Oligonukleotide beeinflussten hingegen die ICAM-1-Expression nicht, was die Sequenzspezifität des Hemmeffektes belegt. Um weiter abzusichern, daß sich der hemmende Effekt auf das ICAM-1-Gen beschränkt, wurde als Kontrolle die Expression des HLA-DR-Gens untersucht, da HLA-DR ebenfalls durch IFN γ induziert wird und gleichzeitig mit ICAM-1 durchflußzytometrisch gemessen werden kann. Die Experimente zeigten, daß TFO13GT zwar ICAM-1 hemmte, aber die Expression von HLA-DR unbeeinflusst ließ.

Als Bestätigung dieser Befunde wurde eine Triplehelixstruktur auch mit einem anderen Triplehelix-Oligonukleotid (bTFO13CU) erzeugt, das für dieselbe ICAM-1-Zielsequenz konstruiert wurde, aber im Gegensatz zu TFO13GT in *paralleler* Orientierung an den Purinstrang bindet. Es war aus den modifizierten Nucleotiden 5-Methylcytosin und 5-Propynyluracil aufgebaut. Mit diesem Oligonukleotid wurde ebenso die Bindung in isolierten Zellkernen nachgewiesen und es hatte auch einen hemmenden Effekt auf die ICAM-1-, nicht aber auf die HLA-DR-Expression.

Der gezeigte kombinierte Nachweis einer chromosomalen Triplehelix (im ICAM-1-Gen) *und* eines biologischen Hemmeffektes (auf die ICAM-1-Expression) mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden ist neuartig und wurde bisher für kein endogenes zelluläres Gen

geführt. Hierdurch erhöht sich die Plausibilität des Konzeptes, Triplehelix-Oligonukleotide auch therapeutisch zur spezifischen Genhemmung einzusetzen.

Ein weitere Fragestellung der vorliegenden Arbeit betraf die Interaktion von *psoralen*-gekoppelten Oligonukleotiden mit der Doppelhelix. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Triplehelix-Oligonukleotid und Doppelhelix sind reversibel, durch chemische Modifikationen kann aber eine dauerhafte Anbindung des Oligonukleotide ermöglicht werden. Beispielsweise können psoralengekoppelte Triplehelix-Oligonukleotide durch UVA-Bestrahlung kovalent an ihre Zielsequenzen gebunden werden (PUVA-Methode). Dieser Umstand kann einerseits methodisch zur Analyse von Triplehelix-Oligonukleotiden dienlich sein, wie bei der oben erwähnten magnetischen Separation, er bietet aber andererseits auch Anknüpfungspunkte an in der Dermatologie etablierte Behandlungskonzepte: Die Anwendung von Psoralen in Verbindung mit UVA-Strahlung ist in der Therapie von entzündlichen (Psoriasis) und malignen Hauterkrankungen (T-Zell-Lymphome) etabliert (PUVA-Therapie).

Um den Einfluß von Psoralenkoppelung und UVA-Aktivierung auf die biologische Aktivität der Triplehelix-Oligonukleotide zu untersuchen, wurde eine aus dem siebten ICAM-1-Exon stammende Triplehelix-Zielsequenz zwischen den SV40-Promotor und Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Reportergen eines Expressionsplasmids inkloniert. Nach Transfektion des Plasmids in A431-Zellen wurde das CAT-Gen unter Kontrolle des SV-40-Promotors deutlich exprimiert (gemessen im CAT-ELISA). Wenn das Plasmid jedoch vor Transfektion mit Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert wurde, dann sank die CAT-Expression als Folge der an der inklonierten Zielsequenz entstandenen Triplehelix um etwa 30 % ab. Die Repression der CAT-Expression war aber nochmals deutlich stärker (etwa 60 %), wenn das Plasmid mit einem psoralengekoppelten Triplehelix-Oligonukleotid inkubiert und UVA-bestrahlt wurde. Diese Verstärkung des hemmenden Effekts kann auf die PUVA-vermittelte kovalente Verbindung des Triplehelix-Oligonukleotids mit seiner Zielsequenz zurückgeführt werden, die zu einer Zunahme von Plasmiden führte, deren Transkription blockiert ist.

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß mit Triplehelix-Oligonukleotiden Psoralene positionsgenau an der Doppelhelix plaziert werden können. In Anknüpfung an die dermatologische PUVA-Therapie ließe sich eine *selektive Genhemmung durch psoralengekoppelte Triplehelix-Oligonukleotide* erzielen. Die Transkription von proinflammatorischen Genen oder von Onkogenen könnte spezifisch ausgeschaltet werden. Psoralenkonjugierte Triplehelix-Oligonukleotide könnten so Ausgangspunkt für eine molekularbiologisch modifizierte PUVA-Therapie von Hautkrankheiten sein.

Literaturverzeichnis

Aggarwal, B. B., Schwarz, L., Hogan, M. E. und Rando, R. F.

Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells.

Cancer Res. 1996; 56: 5156-5164.

Amagai, M., Klaus Kovtun, V. und Stanley, J. R.

Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion.

Cell 1991; 67: 869-877.

Bailey, C. und Weeks, D. L.

Understanding oligonucleotide-mediated inhibition of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes.

Nucleic Acids Res. 2000; 28: 1154-1161.

Barker, J. N. W. N., Mitra, R. S., Griffiths, C. E. M., Dixit, V. M. und Nickoloff, B. J.

Keratinocytes as initiators of inflammation.

Lancet 1991; 337: 211-214.

Barre, F. X., Ait Si Ali, S., Giovannangeli, C., Luis, R., Robin, P., Pritchard, L. L., Helene, C. und Harel-Bellan, A.

Unambiguous demonstration of triple-helix-directed gene modification.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000; 97: 3084-3088.

Barre, F. X., Asseline, U. und Harel Bellan, A.

Asymmetric recognition of psoralen interstrand crosslinks by the nucleotide excision repair and the error-prone repair pathways.

J. Mol. Biol. 1999; 286: 1379-1387.

Barre, F. X., Giovannangeli, C., Helene, C. und Harel Bellan, A.

Covalent crosslinks introduced via a triple helix-forming oligonucleotide coupled to psoralen are inefficiently repaired.

Nucleic Acids Res. 1999; 27: 743-749.

Bates, P. J., Laughton, C. A., Jenkins, T. C., Capaldi, D. C., Roselt, P. D., Reese, C. B. und Neidle, S.

Efficient triple helix formation by oligodeoxyribonucleotides containing alpha- or beta-2-amino-5-(2-deoxy-D-ribofuranosyl) pyridine residues.

Nucleic Acids Res. 1996; 24: 4176-4184.

Beal, P. A. und Dervan, P. B.

The influence of single base triplet changes on the stability of a pur.pur.pyr triple helix determined by affinity cleaving.

Nucleic Acids Res. 1992; 20: 2773-2776

- Belousov, E. S., Afonina, I. A., Kutuyavin, I. V., Gall, A. A., Reed, M. W., Gamper, H. B., Wydro, R. M. und Meyer, R. B.**
 Triplex targeting of a native gene in permeabilized intact cells: covalent modification of the gene for the chemokine receptor CCR5.
 Nucleic Acids Res. 1998; 26: 1324-1328.
- Bennett, C. F., Kornbrust, D., Henry, S., Stecker, K., Howard, R., Cooper, S., Dutson, S., Hall, W. und Jacoby, H. I.**
 An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.
 J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997; 280: 988-1000.
- Bianchi, E., Bender, J. R., Blasi, F. und Pardi, R.**
 Through and beyond the wall: late steps in leukocyte transendothelial migration.
 Immunol. Today 1997; 18: 586-591.
- Boyd, A. W., Wawryk, S. O., Burns, G. F. und Fecondo, J. V.**
 Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) has a central role in cell-cell contact-mediated immune mechanisms.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988; 85: 3095-3099.
- Bricio, T., Rivera, M., Molina, A., Martin, A., Burgos, J. und Mampaso, F.**
 Soluble adhesion molecules in renal transplantation.
 Ren. Fail. 1996; 18: 75-83.
- Brown, P. M. und Fox, K. R.**
 Nucleosome core particles inhibit DNA triple helix formation.
 Biochem. J. 1996; 319: 607-611.
- Brown, P. M., Madden, C. A. und Fox, K. R.**
 Triple-helix formation at different positions on nucleosomal DNA.
 Biochemistry 1998; 37: 16139-16151.
- Catapano, C. V., McGuffie, E. M., Pacheco, D. und Carbone, G. M. R.**
 Inhibition of gene expression and cell proliferation by triple helix-forming oligonucleotides directed to the c-myc gene.
 Biochemistry 2000; 39: 5126-5138.
- Cheng, A. J. und Van Dyke, M. W.**
 Monovalent cation effects on intermolecular purine-purine-pyrimidine triple-helix formation.
 Nucleic Acids Res. 1993; 21: 5630-5635.
- Cogoi, S., Suraci, C., Del Terra, E., Diviacco, S., Van der Marel, G., Van Boom, J., Quadrifoglio, F. und Xodo, L.**
 Downregulation of c-Ki-ras promoter activity by triplex-forming oligonucleotides endogenously generated in human 293 cells.
 Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2000; 10: 283-295.

- De Bizemont, T., Duval Valentin, G., Sun, J. S., Bisagni, E., Garestier, T. und Helene, C.**
 Alternate strand recognition of double-helical DNA by (T,G)-containing oligonucleotides in the presence of a triple helix-specific ligand.
 Nucleic Acids Res. 1996; 24: 1136-1143.
- Degitz, K., Li, L. J. und Caughman, S. W.**
 Cloning and characterization of the 5'-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene.
 J. Biol. Chem. 1991; 266: 14024-14030.
- Demidov, V. V., Yavnilovich, M. V., Belotserkovskii, B. P., Frank Kamenetskii, M. D. und Nielsen, P. E.**
 Kinetics and mechanism of polyamide („peptide“) nucleic acid binding to duplex DNA.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995; 92: 2637-2641.
- Durland, R. H., Kessler, D. J., Gunnell, S., Duvic, M., Pettitt, B. M. und Hogan, M. E.**
 Binding of triple helix forming oligonucleotides to sites in gene promoters.
 Biochemistry 1991; 30: 9246-9255.
- Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A. und Springer, T. A.**
 Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1).
 J. Immunol. 1986; 137: 245-254.
- Dustin, M. L., Singer, K. H., Tuck, D. T. und Springer, T. A.**
 Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1).
 J. Exp. Med. 1988; 167: 1323-1340.
- Dustin, M. L. und Springer, T. A.**
 Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells.
 J. Cell. Biol. 1988; 107: 321-331.
- Elangbam, C. S., Qualls, C. W. und Dahlgren, R. R.**
 Cell adhesion molecules—update.
 Vet. Pathol. 1997; 34: 61-73.
- Escude, C., Francois, J. C., Sun, J. S., Ott, G., Sprinzl, M., Garestier, T. und Helene, C.**
 Stability of triple helices containing RNA and DNA strands: experimental and molecular modeling studies.
 Nucleic Acids Res. 1993; 21: 5547-5553.
- Escude, C., Giovannangeli, C., Sun, J. S., Lloyd, D. H., Chen, J. K., Gryaznov, S. M., Garestier, T. und Helene, C.**
 Stable triple helices formed by oligonucleotide N3'—>P5' phosphoramidates inhibit transcription elongation.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996; 93: 4365-4369.

Faria, M., Wood, C. D., Perrouault, L., Nelson, J. S., Winter, A., White, M. R., Helene, C. und Giovannangeli, C.

Targeted inhibition of transcription elongation in cells mediated by triplex-forming oligonucleotides.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000; 97: 3862-3867.

Faria, M., Wood, C. D., White, M. R., Helene, C. und Giovannangeli, C.

Transcription inhibition induced by modified triple helix-forming oligonucleotides: a quantitative assay for evaluation in cells.

J. Mol. Biol. 2001; 306: 15-24.

Faruqi, A. F., Egholm, M. und Glazer, P. M.

Peptide nucleic acid-targeted mutagenesis of a chromosomal gene in mouse cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998; 95: 1398-1403.

Faruqi, A. F., Krawczyk, S. H., Matteucci, M. D. und Glazer, P. M.

Potassium-resistant triple helix formation and improved intracellular gene targeting by oligodeoxyribonucleotides containing 7-deazaxanthine.

Nucleic Acids Res. 1997; 25: 633-640.

Felsenfeld, G., Davies, D. und Rich, A.

Formation of a three-stranded polynucleotide molecule.

J. Am. chem. Soc. 1957; 79: 2023-2024.

Fox, K. R.

Targeting DNA with triplexes.

Curr. Med. Chem. 2000; 7: 17-37.

Gasparro, F. P., Havre, P. A., Olack, G. A., Gunther, E. J. und Glazer, P. M.

Site-specific targeting of psoralen photoadducts with a triple helix-forming oligonucleotide: characterization of psoralen monoadduct and crosslink formation.

Nucleic Acids Res. 1994; 22: 2845-2852.

Gee, J. E., Revankar, G. R., Rao, T. S. und Hogan, M. E.

Triplex formation at the rat neu gene utilizing imidazole and 2'-deoxy-6-thioguanosine base substitutions.

Biochemistry 1995; 34: 2042-2048.

Giovannangeli, C., Diviacco, S., Labrousse, V., Gryaznov, S., Charneau, P. und Helene, C.

Accessibility of nuclear DNA to triplex-forming oligonucleotides: the integrated HIV-1 provirus as a target.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997; 94: 79-84.

Godard, G., Boutorine, A. S., Saison Behmoaras, E. und Helene, C.

Antisense effects of cholesterol-oligodeoxynucleotide conjugates associated with poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles.

Eur. J. Biochem. 1995; 232: 404-410.

Gondeau, C., Maurizot, J. C. und Durand, M.

Circular dichroism and UV melting studies on formation of an intramolecular triplex containing parallel T*A:T and G*G:C triplets: netropsin complexation with the triplex.
Nucleic Acids Res. 1998; 26: 4996-5003.

Griffiths, C. E., Esmann, J., Fisher, G. J., Voorhees, J. J. und Nickoloff, B. J.

Differential modulation of keratinocyte intercellular adhesion molecule-I expression by gamma interferon and phorbol ester: evidence for involvement of protein kinase C signal transduction.
Br. J. Dermatol. 1990; 122: 333-342.

Griffiths, C. E., Voorhees, J. J. und Nickoloff, B. J.

Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor.
J. Am. Acad. Dermatol. 1989; 20: 617-629.

Grigoriev, M., Praseuth, D., Guieysse, A. L., Robin, P., Thuong, N. T., Helene, C. und Harel-Bellan, A.

Inhibition of gene expression by triple helix-directed DNA cross-linking at specific sites.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1993; 90: 3501-3505.

Guieysse, A. L., Praseuth, D., Giovannangeli, C., Asseline, U. und Helene, C.

Psoralen adducts induced by triplex-forming oligonucleotides are refractory to repair in HeLa cells.
J. Mol. Biol. 2000; 296: 373-383.

Gumbiner, B. M.

Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.
Cell 1996; 84: 345-357.

Helene, C., Montenay Garestier, T., Saison-Behmoaras, T., Takasugi, M., Toulme, J. J. und Asseline, U.

Oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating agents: a new class of gene regulatory substances.
Biochimie 1985; 67: 777-783.

Hoenigsmann, H., Szeimies, R. M., Knobler, R., Fitzpatrick, T. B., Pathak, M. A. und Wolff, K. (1999).

Photochemotherapy and photodynamic therapy. In: Freedberg, I. M., Eisen, A. Z., Wolff, K., Austen, K. F., Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Fitzpatrick, T. B. (eds), *Dermatology in general medicine*. 5. Ausgabe.
McGraw-Hill, New York, 2880-2900.

Hoogsteen, K.

The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine.
Acta Crystallogr. 1959; 12: 822-823.

Htun, H. und Dahlberg, J. E.

Topology and formation of triple-stranded H-DNA.
Science 1989; 243: 1571-1576.

- Kane, S. A., Hecht, S. M., Sun, J. S., Garestier, T. und Helene, C.**
 Specific cleavage of a DNA triple helix by FeII.bleomycin.
 Biochemistry 1995; 34: 16715-16724.
- Kavanaugh, A. F., Davis, L. S., Nichols, L. A., Norris, S. H., Rothlein, R., Scharschmidt, L. A. und Lipsky, P. E.**
 Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1.
 Arthritis Rheum. 1994; 37: 992-999.
- Klein, C. E.**
 Adhäsionsrezeptoren.
 Hautarzt 1994; 45: 263-284.
- Kochetkova, M., Iversen, P. O., Lopez, A. F. und Shannon, M. F.**
 Deoxyribonucleic acid triplex formation inhibits granulocyte macrophage colony-stimulating factor gene expression and suppresses growth in juvenile myelomonocytic leukemic cells.
 J. Clin. Invest. 1997; 99: 3000-3008.
- Krawczyk, S. H., Milligan, J. F., Wadwani, S., Moulds, C., Froehler, B. C. und Matteucci, M. D.**
 Oligonucleotide-mediated triple helix formation using an N3-protonated deoxycytidine analog exhibiting pH-independent binding within the physiological range.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992; 89: 3761-3764.
- Krutmann, J., Kock, A., Schauer, E., Parlow, F., Moller, A., Kapp, A., Forster, E., Schopf, E. und Luger, T. A.**
 Tumor necrosis factor beta and ultraviolet radiation are potent regulators of human keratinocyte ICAM-1 expression.
 J. Invest. Dermatol. 1990; 95: 127-131.
- Kukreti, S., Sun, J. S., Garestier, T. und Helene, C.**
 Extension of the range of DNA sequences available for triple helix formation: stabilization of mismatched triplexes by acridine-containing oligonucleotides.
 Nucleic Acids Res. 1997; 25: 4264-4270.
- Kukreti, S., Sun, J. S., Loakes, D., Brown, D. M., Nguyen, C. H., Bisagni, E., Garestier, T. und Helene, C.**
 Triple helices formed at oligopyrimidine*oligopurine sequences with base pair inversions: effect of a triplex-specific ligand on stability and selectivity.
 Nucleic Acids Res. 1998; 26: 2179-2183.
- Kumaresan, K. R., Ramaswamy, M. und Yeung, A. T.**
 Structure of the DNA interstrand cross-link of 4,5',8-trimethylpsoralen.
 Biochemistry 1992; 31: 6774-6783.

- Kumasaka, T., Quinlan, W. M., Doyle, N. A., Condon, T. P., Sligh, J., Takei, F., Beaudet, A. I., Bennett, C. F. und Doerschuk, C. M.**
 Role of the intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) in endotoxin-induced pneumonia evaluated using ICAM-1 antisense oligonucleotides, anti-ICAM-1 monoclonal antibodies, and ICAM-1 mutant mice.
 J. Clin. Invest. 1996; 97: 2362-2369.
- Lacoste, J., Francois, J. C. und Helene, C.**
 Triple helix formation with purine-rich phosphorothioate-containing oligonucleotides covalently linked to an acridine derivative.
 Nucleic Acids Res. 1997; 25: 1991-1998.
- Lacroix, L., Lacoste, J., Reddoch, J. F., Mergny, J. L., Levy, D. D., Seidman, M. M., Matteucci, M. D. und Glazer, P. M.**
 Triplex formation by oligonucleotides containing 5-(1-propynyl)-2'-deoxyuridine: Decreased magnesium dependence and improved intracellular gene targeting.
 Biochemistry 1999; 38: 1893-1901.
- Le Doan, T., Perrouault, L., Praseuth, D., Habhoub, N., Decout, J. L., Thuong, N. T., Lhomme, J. und Helene, C.**
 Sequence-specific recognition, photocrosslinking and cleavage of the DNA double helix by an oligo-[alpha]-thymidylate covalently linked to an azidoproflavine derivative.
 Nucleic Acids Res. 1987; 15: 7749-7760.
- Lebedeva, I. und Stein, C. A.**
 Antisense oligonucleotides: Promise and reality.
 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2001; 41: 403-419.
- Luo, Z., Macris, M. A., Faruqi, A. F. und Glazer, P. M.**
 High-frequency intrachromosomal gene conversion induced by triplex-forming oligonucleotides microinjected into mouse cells.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000; 97: 9003-9008.
- Macaulay, V. M., Bates, P. J., McLean, M. J., Rowlands, M. G., Jenkins, T. C., Ashworth, A. und Neidle, S.**
 Inhibition of aromatase expression by a psoralen-linked triplex-forming oligonucleotide targeted to a coding sequence.
 FEBS Lett. 1995; 372: 222-228.
- Mackay, C. M. und Imhof, B.**
 Cell adhesion in the immune system.
 Immunol. Today 1993; 14: 99-102.
- Makgoba, M. W., Sanders, M. E., Luce, G. E., Dustin, M. L., Springer, T. A., Clark, E. A., Mannoni, P. und Shaw, S.**
 ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells.
 Nature 1988; 331: 86-88.

Maher, L. J. d., Dervan, P. B. und Wold, B. J.

Kinetic analysis of oligodeoxyribonucleotide-directed triple-helix formation on DNA.
Biochemistry 1990; 29: 8820-8826.

Marchand, C., Sun, J. S., Bailly, C., Waring, M. J., Garestier, T. und Helene, C.

Optimization of alternate-strand triple helix formation at the 5'CpG3' and 5'GpC3' junction steps.
Biochemistry 1998; 37: 13322-13329.

Mazerolles, F., Barbat, C., Meloche, S., Gratton, S., Soula, M., Fagard, R., Fischer, S., Hivroz, C., Bernier, J., Sekaly, R. P. et al.

LFA-1-mediated antigen-independent T cell adhesion is regulated by CD4 and p56lck tyrosine kinase.

J. Immunol. 1994; 152: 5670-5679.

McGuffie, E. M., Pacheco, D., Carbone, G. M. und Catapano, C. V.

Antigene and antiproliferative effects of a c-myc-targeting phosphorothioate triple helix-forming oligonucleotide in human leukemia cells.

Cancer Res. 2000; 60: 3790-3799.

Mehta, R. C., Stecker, K. K., Cooper, S. R., Templin, M. V., Tsai, Y. J., Condon, T. P., Bennett, C. F. und Hardee, G. E.

Intercellular adhesion molecule-1 suppression in skin by topical delivery of anti-sense oligonucleotides.

J. Invest. Dermatol. 2000; 115: 805-812.

Mergny, J. L., Sun, J. S., Rougee, M., Montenay Garestier, T., Barcelo, F., Chomilier, J. und Helene, C.

Sequence specificity in triple-helix formation: experimental and theoretical studies of the effect of mismatches on triplex stability.

Biochemistry 1991; 30: 9791-9798.

Milligan, J. F., Krawczyk, S. H., Wadwani, S. und Matteucci, M. D.

An anti-parallel triple helix motif with oligodeoxynucleotides containing 2'-deoxyguanosine and 7-deaza-2'-deoxy-xanthosine.

Nucleic Acids Res. 1993; 21: 327-333.

Mills, M., Arimondo, P. B., Lacroix, L., Garestier, T., Helene, C., Klump, H. und Mergny, J. L.

Energetics of strand-displacement reactions in triple helices: a spectroscopic study.

J. Mol. Biol. 1999; 291: 1035-1054.

Miwa, S., Isobe, M., Suzuki, J., Makuuchi, M., Miyasaka, M., Yamazaki, S. und Kawasaki, S.

Effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 and anti-leukocyte function associated antigen-1 monoclonal antibodies on rat-to-mouse cardiac xenograft rejection.

Surgery 1997; 121: 681-689.

Moser, H. E. und Dervan, P. B.

Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation.

Science 1987; 238: 645-650.

Musso, M., Wang, J. C. und Van Dyke, M. W.

In vivo persistence of DNA triple helices containing psoralen-conjugated oligodeoxyribonucleotides.

Nucleic Acids Res. 1996; 24: 4924-4932.

Nakanishi, M., Weber, K. T. und Guntaka, R. V.

Triple helix formation with the promoter of human alpha1(I) procollagen gene by an antiparallel triplex-forming oligodeoxyribonucleotide.

Nucleic Acids Res. 1998; 26: 5218-5222.

Nesbit, M. und Herlyn, M.

Adhesion receptors in human melanoma progression.

Invasion Metastasis 1994; 14: 131-146.

Nickoloff, B. J. und Mitra, R. S.

Phorbol ester treatment enhances binding of mononuclear leukocytes to autologous and allogeneic gamma-interferon-treated keratinocytes, which are blocked by anti-LFA-1 monoclonal antibody.

J. Invest. Dermatol. 1988; 90: 684-689.

Noonberg, S. B., Francois, J. C., Garestier, T. und Helene, C.

Effect of competing self-structure on triplex formation with purine-rich oligodeoxynucleotides containing GA repeats.

Nucleic Acids Res. 1995a; 23: 1956-1963.

Noonberg, S. B., Francois, J. C., Praseuth, D., Guieysse Peugeot, A. L., Lacoste, J., Garestier, T. und Helene, C.

Triplex formation with alpha anomers of purine-rich and pyrimidine-rich oligodeoxynucleotides.

Nucleic Acids Res. 1995b; 23: 4042-4049.

Oh, D. H. und Hanawalt, P. C.

Triple helix-forming oligonucleotides target psoralen adducts to specific chromosomal sequences in human cells.

Nucleic Acids Res. 1999; 27: 4734-4742.

Olivas, W. M. und Maher, L. J. r.

DNA recognition by alternate strand triple helix formation: affinities of oligonucleotides for a site in the human p53 gene.

Biochemistry 1994; 33: 983-991.

Olivas, W. M. und Maher, L. J. r.

Overcoming potassium-mediated triplex inhibition.

Nucleic Acids Res. 1995; 23: 1936-1941.

Pilch, D. S., Waring, M. J., Sun, J. S., Rougee, M., Nguyen, C. H., Bisagni, E., Garestier, T. und Helene, C.

Characterization of a triple helix-specific ligand. BePI (3-methoxy-7H-8-methyl-11- [(3'-amino)propylamino]-benzo[e]pyrido[4,3-b]indole) intercalates into both double-helical and triple-helical DNA.

J. Mol. Biol. 1993; 232: 926-946.

- Praseuth, D., Perrouault, L., Le Doan, T., Chassignol, M., Thuong, N. und Helene, C.**
Sequence-specific binding and photocrosslinking of alpha and beta oligodeoxynucleotides to the major groove of DNA via triple-helix formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988; 85: 1349-1353.
- Ramanathan, M., Lantz, M., MacGregor, R. D., Garovoy, M. R. und Hunt, C. A.**
Characterization of the oligodeoxynucleotide-mediated inhibition of interferon- γ -induced major histocompatibility complex class I and intercellular adhesion molecule-1.
J. Biol. Chem. 1994; 269: 24564-24574.
- Rando, R. F., DePaolis, L., Durland, R. H., Jayaraman, K., Kessler, D. J. und Hogan, M. E.**
Inhibition of T7 and T3 RNA polymerase directed transcription elongation in vitro.
Nucleic Acids Res. 1994; 22: 678-685.
- Rao, T. S., Durland, R. H., Seth, D. M., Myrick, M. A., Bodepudi, V. und Revankar, G. R.**
Incorporation of 2'-deoxy-6-thioguanosine into G-rich oligodeoxyribonucleotides inhibits G-tetrad formation and facilitates triplex formation.
Biochemistry 1995; 34: 765-772.
- Ritchie, S., Boyd, F. M., Wong, J. und Bonham, K.**
Transcription of the human c-*Src* promoter is dependent on Sp1, a novel pyrimidine binding factor SPy, and can be inhibited by triplex-forming oligonucleotides.
Nucleic Acids Res. 2000; 275: 847-854.
- Rosen, S. D. und Bertozzi, C. R.**
The selectins and their ligands.
Curr. Opin. Cell. Biol. 1994; 6: 663-673.
- Rothlein, R., Czajkowski, M., O'Neill, M. M., Marlin, S. D., Mainolfi, E. und Merluzzi, V. J.**
Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies.
J. Immunol. 1988; 141: 1665-1669.
- Rougee, M., Faucon, B., Mergny, J. L., Barcelo, F., Giovannangeli, C., Garestier, T. und Helene, C.**
Kinetics and thermodynamics of triple-helix formation: effects of ionic strength and mismatches.
Biochemistry 1992; 31: 9269-9278.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.**
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 1988; 239: 487-491.
- Salmela, K., Wramner, L., Ekberg, H., Hauser, I., Bentdal, O., Lins, L. E., Isoniemi, H., Backman, L., Persson, N., Neumayer, H. H., Jorgensen, P. F., Spieker, C., Hendry, B., Nicholls, A., Kirste, G. und Hasche, G.**
A randomized multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation: a report of the European Anti-ICAM-1 Renal Transplant Study Group.
Transplantation 1999; 67: 729-736.

Schlingensiepen, R. und Schlingensiepen, K.-H. (1997).

Antisense Oligodeoxynucleotides-Highly specific tools for basic research and pharmacotherapy. In: Schlingensiepen, R., Brysch, W. und Schlingensiepen, K.-H. (eds), Antisense - from technology to therapy.

Blackwell Wissenschaft Berlin, Wien: Seite 5 (Figure 2).

Sedelnikova, O. A., Panyutin, I. G., Luu, A. N. und Neumann, R. D.

The stability of DNA triplexes inside cells as studied by iodine-125 radioprinting.

Nucleic Acids Res. 1999; 27: 3844-3850.

Singer, K. H., Tuck, D. T., Sampson, H. A. und Hall, R. P.

Epidermal keratinocytes express the adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 in inflammatory dermatoses.

J. Invest. Dermatol. 1989; 92: 746-750.

Springer, T. A.

Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.

Cell 1994; 76: 301-314.

Staunton, D. E., Marlin, S. D., Stratowa, C., Dustin, M. L. und Springer, T. A.

Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families.

Cell 1988; 52: 925-933.

Stepkowski, S. M., Tu, Y., Condon, T. P. und Bennett, C. F.

Blocking of heart allograft rejection by intercellular adhesion molecule-1 antisense oligonucleotides alone or in combination with other immunosuppressive modalities.

J. Immunol. 1994; 153: 5336-5346.

Stepkowski, S. M., Wang, M. E., Amante, A., Kalinin, D., Qu, X., Blasdel, T., Condon, T., Kahan, B. D. und Bennett, F. C.

Antisense ICAM-1 oligonucleotides block allograft rejection in rats.

Transplant. Proc. 1997; 29: 1285.

Stepkowski, S. M., Wang, M. E., Condon, T. P., Cheng Flournoy, S., Stecker, K. und Graham, M.

Protection against allograft rejection with intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotides.

Transplantation 1998; 66: 699-707.

Stern, R. S. und Laird, N.

The carcinogenic risk of treatments for severe psoriasis.

Cancer 1994; 73: 2759-2764.

Sun, J. S., De Bizemont, T., Duval Valentin, G., Montenay Garestier, T. und Helene, C.

Extension of the range of recognition sequences for triple helix formation by oligonucleotides containing guanines and thymines.

C. R. Acad. Sci. III 1991; 313: 585-590.

Sun, J. S., Francois, J. C., Montenay Garestier, T., Saison Behmoaras, T., Roig, V., Thoung, N. T. und Helene, C.

Sequence-specific intercalating agents: intercalation at specific sequences on duplex DNA via major groove recognition by oligonucleotide-intercalator conjugates.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1989; 86: 9198-9202.

Takasugi, M., Guendouz, A., Chassignol, M., Decout, J. L., Lhomme, J., Thuong, N. T. und Helene, C.

Sequence-specific photo-induced cross-linking of the two strands of double-helical DNA by psoralen covalently linked to a triple helix-forming oligonucleotide.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991; 88: 5602-5606.

Thoung, N. T. und Hélène, C.

Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides.

Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1993; 32: 666-690.

Van de Stolpe, A. und Van der Saag, P. T.

Intercellular adhesion molecule-1.

J. Mol. Med. 1996; 74: 13-33.

Vasquez, K. M., Narayanan, L. und Glazer, P. M.

Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice.

Science 2000; 290: 530-533.

Voraberger, G., Schafer, R. und Stratowa, C.

Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region.

J. Immunol. 1991; 147: 2777-2786.

Wagner, R. W., Matteucci, M. D., Lewis, J. G., Gutierrez, A. J., Moulds, C. und Froehler, B. C.

Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines.

Science 1993; 260: 1510-1513.

Wang, G., Xu, X., Pace, B., Dean, D. A., Glazer, P. M., Chan, P., Goodman, S. R. und Shokolenko, I.

Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated induction of human gamma-globin gene expression.

Nucleic Acids Res. 1999; 27: 2806-2813.

Wang, Z. und Rana, T. M.

DNA damage-dependent transcriptional arrest and termination of RNA polymerase II elongation complexes in DNA template containing HIV-1 promoter.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997; 94: 6688-6693.

Watson, J. D. und Crick, F. H. C.

Molecular structure of nucleic acids.

Nature 1953; 171: 737-738.

Wawryk, S. O., Cockerill, P. N., Wicks I. P. und Boyd A. W.

Isolation and characterization of the promoter region of the human intercellular adhesion molecule-1 gene.

Int. Immunol. 1991; 3: 83-93.

Xodo, L. E., Alunni Fabbroni, M., Manzini, G. und Quadrifoglio, F.

Sequence-specific DNA-triplex formation at imperfect homopurine-homopyrimidine sequences within a DNA plasmid.

Eur. J. Biochem. 1993; 212: 395-401.

Xodo, L. E., Manzini, G., Quadrifoglio, F., van der Marel, G. A. und van Boom, J. H.

Effect of 5-methylcytosine on the stability of triple-stranded DNA—a thermodynamic study.

Nucleic Acids Res. 1991; 19: 5625-5631.

Yacyshyn, B. R., Bowen Yacyshyn, M. B., Jewell, L., Tami, J. A., Bennett, C. F., Kisner, D. L. und Shanahan, W. R., Jr.

A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease.

Gastroenterology 1998; 114: 1133-1142.

Yeung, A. T., Jones, B. K. und Chu, C. T.

Photoreactivities and thermal properties of psoralen cross-links.

Biochemistry 1988; 27: 3204-3210.

Zendegui, J. G., Vasquez, K. M., Tinsley, J. H., Kessler, D. J. und Hogan, M. E.

In vivo stability and kinetics of absorption and disposition of 3' phosphopropyl amine oligonucleotides.

Nucleic Acids Res. 1992; 20: 307-314.

Zimmermann, G. A., Prescott, S. M. und McIntyre, T. M.

Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules.

Immunol. Today 1992; 13: 93-99.

Abkürzungen

A	Adenin
APS	Ammoniumperoxosulfat
BSA	Rinderserumalbumin
bCO	Biotinylated Control Oligonucleotide
bp	Basenpaar
bTFO	Biotinylated triplex-forming oligonucleotide
C	Cytosin
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	Cluster of differentiation
CO	Control oligonucleotide
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy Spiro {1,2 dioxetane-2,2'-(5'-Chloro) Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl) Phenylphosphat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Double stranded (doppelsträngig)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
FITC	Fluor-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
GpA	Guanin/Adenin-Abschnitte in DNA
HEPES	2,4(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl-Ethansulfonsäure
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton

LB	Luria Broth
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LFA	Lymphocyte-function associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
mC	5-Methylcytosin
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
MHC	Major histokompatibilität complex
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	R-Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
Pso	Psoralen
pU	5-Propynyluracil
PUVA	Psoralen in Verbindung mit UVA-Strahlung
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
ss	Single stranded (einzelstängig)
SSC	Standard saline citrate buffer
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TFO	Triplex-forming oligonucleotide
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	Volume (Volumen)
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	Very late antigen
w	weight (Gewicht)

Danksagung

Ich möchte mich bei Professor Dr. med. Dr. h.c. Gerd Plewig für die Bereitstellung des schönen Arbeitsplatzes mit Erker-Ausblick auf den Südfriedhof in München bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Professor Dr. med. Klaus Degitz für die interessante Themenstellung und die unermüdliche Förderung und Betreuung meiner Arbeit bedanken. Die zahlreichen Anregungen und die vielen gemeinschaftlichen Diskussion haben mein Interesse an der Forschung gefördert, sowie Motivation und Ausdauer für die gesteckten Ziele bewirkt.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Christoph Marschall, der mich in die molekularbiologischen Arbeitstechniken einführte. Durch seine kritische Denkweise hat er mir die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens vermittelt und seine humorvolle Art sowie sein unverwüchtlicher Optimismus half mir sehr in der schwierigen Anfangsphase meiner Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Evelyn Braungart, die mich in verschiedenste molekularbiologische Techniken einführte.

Bei Claudia Kammerbauer, Sigi Vollmer und Dr. rer. nat. Paul Trommler bedanke ich mich für die anregenden wissenschaftlichen und labortechnischen Gespräche.

Frau Dr. Carine Giovannangeli möchte ich sehr herzlich danken für das Interesse, das sie meinen Ergebnissen entgegenbrachte und für die spannenden und motivierenden Diskussion in Paris.

Großer Dank gilt auch meinen Eltern und meiner Frau, die mich in nahezu jeder Hinsicht unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Robert Frank Gerald Patrick Besch

Adresse: Lechfeldstr. 7, 80689 München, Tel.: 089/58090078, Fax: 089/5469077

Geburtsdatum: 12.02.1967

Eltern: Franz Besch, Apotheker, Dr. Ulrike Besch, Kunsthistorikerin

Ausbildung

- 1973 - 1977 Grundschule an der Camerloherstraße, München
- 1977 - 1986 Karlsgymnasium München-Pasing
- 27.06.1986 Abitur, Leistungsfächer Physik und Biologie
- 1986 - 1988 Musikausbildung im Freien Musikzentrum München
- 1988 - 1993 Pharmaziestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1993 Pharmazeutisches Praktikum: Gentechnologische Arbeiten am
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der LMU München (Leiter:
Prof. Dr. M. H. Zenk)
- 1994 Pharmazeutisches Praktikum: Ausbildung in der öffentlichen
Apotheke (St. Anna-Apotheke, München)
- 01.07.1994 III. Staatsexamen
- 28.07.1994 Approbation als Apotheker

Beruflicher Werdegang

- 1994 - 1997 Teilzeitarbeit in einer öffentlichen Apotheke (Greifen Apotheke,
München) Arbeiten für Konzerte, Film und Theater (Komposition,
Arrangement, Produktion)
- ab 02.02.1998 Laborarbeiten zum Zwecke der Promotion bei Prof. Dr. K. Degitz an
der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie (Leiter
Prof. Dr. G. Plewig). Thema: Hemmung der ICAM-Genexpression
durch Triplehelix-Oligonukleotide

Auszeichnungen

- 1999 Posterpreis, 26. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische
Forschung, Bonn, 18.-20.02.1999