Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Sczakiel

Entwurf von Antisense-Oligonukleotiden hoher Effektivität am Beispiel der humanen Matrix-Metalloproteinase-2

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Tobias Sabelhaus
aus Bremen

LÜBECK 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. G. Sczakiel
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.07.2012
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VI

1. EINLEITUNG 1

1.1 AUFBAU DER DESOXYRIBONUKLEINSÄURE 1
1.1.1 GRUNDLAGEN DER ANTISENSE-NUKLEINSÄUREN 1
1.1.2 VERSCHIEDENE FORMEN VON ANTISENSE-METHODEN 2
1.1.3 BEDEUTUNG DER PRÄDIKTION EFFEKTIVER ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE 3
1.1.3.1 Thermodynamik und Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden 4
1.1.3.2 Bedeutung von RNA-Sekundärstruktur und akzessiblen einzelsträngigen Bereichen für die Wirksamkeit 4
1.1.3.3 Sequenz-Motive von hoher Bedeutung für die Effektivität der Antisense-Oligonukleotide 5
1.1.4 CHEMISCHE MODIFIKATIONEN VON ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDEN 6
1.1.5 VERGLEICH VON ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDEN UND RNAI 7
1.1.6 AKTUELLE THERAPEUTISCHE ANWENDUNGEN VON ASODN 8
1.2 AUFBAU DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX 8
1.2.1 BEDEUTENDE ENZYME ZUR MODULATION DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX 8
1.3 ZIELSETZUNG 10

2. MATERIAL UND METHODEN 11

2.0 MATERIALIEN 11
2.0.1 VERWENDETE GERÄTE 11
2.0.2 CHEMIKALIEN UND KULTURMEDIEN 12
2.0.3 PUFFER UND LÖSUNGEN 13
2.1 METHODEN 13
2.1.1 COMPUTERASSISTIERTE PRÄDIKTION VON ASODN HOHER EFFEKTIVITÄT 13
2.1.1.1 Identifikation von Sekundärstrukturen der MMP-2 mRNA 13
2.1.2 AUSWAHL DER ASODN PRO MOTIV 15
2.1.3 BERECHNUNGEN DER SCHMELZTEMPERATUREN 15
2.1.4 SEQUENZ-MOTIVE VON HOHER BEDEUTUNG 15
2.1.5 INTRA- UND INTERMOLEKULARE INTERAKTIONEN DER ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE 16
2.2 EINLEITUNG METHODEN UND VERSUCHSABFOLGE 16
2.2.1 ZELLKULTUR VON HT-1080 17
2.3 PRIMERDESIGN FÜR DIE POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) 17
2.3.1 AUFARBEITUNG UND KLONIERUNG EINES STANDARDS FÜR DIE QUANTITATIVE POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) 19
2.3.1.1 RNA-Gewinnung mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientzentrifugation 19
2.3.1.2 RNA-abhängige DNA-Polymerisation / Reverse Transkription 20
2.3.1.3 Gelelektrophorese mit Agarose 21
2.3.1.4 DNA-Elution aus einem Agarosegel 21

2.3.1.5 DNA-Klonierung in chemisch kompetente *E. coli*-Kulturen 22
2.3.1.6 DNA-Isolierung 23
2.4 EINLEITUNG ZU DEN ZELLKULTUREXPERIMENTEN MIT DARSTELLUNG DER VERARBEITUNGSSCHRITTE 24
2.4.1 CHEMISCHE TRANSFEKTION DER ASODN MIT LIPOFECTAMIN2000 24
2.4.2 VITALITÄTSTEST IN DER ZELLKULTUR MIT TRYPANBLAU 24
2.4.3 UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON REGENERATIONSZEIT UND KONZENTRATION DER ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE AUF DIE VITALITÄT DER ZELLEN 25
2.4.4 ZELLLYSE UND RNA-EXTRAKTION 25
2.4.5 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN VON NUKLEINSÄUREN 26
2.4.6 REVERSE TRANSKRIPTION 26
2.4.7 QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION (QRT-PCR) 27
2.5 QUALITÄTSKONTROLLE DER ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE 28
2.5.1 Denaturierendes Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) 28
2.6 KLONIERUNG UND ISOLATION DER INTERNEN STANDARDS 29
2.7 AUSWAHLKRITERIEN DER ASODN UND SCRAMBLEKONTROLLEN 32
2.8 ERLÄUTERUNG DER KONTROLLMECHANISMEN WIE SCRAMBLE- UND NEGATIV-KONTROLLE 33
2.8.1 Scramble-Kontrolle 33
2.8.2 Negativ Kontrolle 34
2.9 SCHWELLENWERT (CT-WERT) UND BERECHNUNG VON RELATIVEN AMPLIKONMENGEN 34

3. ERGEBNISSE 36

3.1 STRUKTURANALYSE DER ZIEL-MRNA 36
3.1.1 DETAILDARSTELLUNG DER EINZELNEN MOTIVE 38
3.1.1.1.0 Zielmotiv 1 (1284): Position 1284-1293 38
3.1.1.1.1 Anpassung der asODN im Zielmotiv 1284 39
3.1.1.2.0 Zielmotiv 2 (1689): Position 1689-1699 40
3.1.1.2.1 Anpassung der asODN im Zielmotiv 1689 42
3.1.1.3.0 Zielmotiv 3 (2313): Position 2313-2322 43
3.1.1.3.1 Anpassung der asODN im Zielmotiv 2313 45
3.1.1.4.0 Zielmotiv 4 (2715): Position 2715-2724 45
3.1.1.4.1 Anpassung der asODN im Zielmotiv 2715 47
3.1.1.5.0 Zielmotiv 5 (AUG): 47
3.2 OPTIMIERUNG DER ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN 47
3.2.1 ERGEBNISSE DER KONZENTRATIONS- UND ZEITABHÄNGIGKEITEN 48
3.3 ANTEILIGES AUFTRETEN DER SEKUNDÄRSTRUKTUREN IN DER ANALYSE DIFFERIERENDER FENSTERBREITEN 49
3.3.1 UNTERSCHIEDE IM AUFTRETEN DER ZIELMOTIVE IN DEN EINZELNEN FENSTERBREITEN 52
3.3.1.1 Quantitatives Auftreten der Sekundärstruktur 1284 53
3.3.1.2 Quantitatives Auftreten der Sekundärstruktur 1689 53
3.3.1.3 Quantitatives Auftreten der Sekundärstruktur 2313 53
3.3.1.4 Quantitatives Auftreten der Sekundärstruktur 2715 54
3.4 WIRKSAMKEITSANALYSE UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER MOTIVZUGEHÖRIGKEIT 54
3.4.1 WIRKSAMKEIT DER ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE DES 1284ER MOTIVS 55
3.4.2 WIRKSAMKEIT DER ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE DES 1689ER MOTIVS 56
3.4.3 WIRKSAMKEIT DER ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE DES 2313ER MOTIVS 57

3.4.4 WIRKSAMKEIT DER ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE DES 2715ER MOTIVS 58
3.4.5 WIRKSAMKEIT DER ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE DES AUG-MOTIVS 59
3.5 WIRKSAMKEITSANALYSE UNTER SPEZIELLER BERÜCKSICHTIGUNG DES GC-GEHALTS 59
3.6 WIRKSAMKEITSANALYSE UNTER SPEZIELLER BERÜCKSICHTIGUNG DER SCHMELZTEMPERATUR 60
3.7 WIRKSAMKEITSANALYSE UNTER BERÜCKSICHTIGUNG SPEZIELLER SEQUENZMOTIVE 61

4. DISKUSSION 63

5. ZUSAMMENFASSUNG 71

6. ANHÄNGE 72

6.1: TABELLARISCHE ERGEBNISSE 72
6.2: SEQUENZEN DER VERWENDETEN ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE 76
6.3: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER VERWENDETEN ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE 77
6.4: FIRMENVERZEICHNIS 79

7. REFERENZEN 81

8. LEBENSLAUF 86

9. DANKSAGUNGEN 87

10. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG 88

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cm	Zentimeter
dATP	Desoxyriboadenosidtriphosphat
dCTP	Desoxyribocytosidtriphosphat
dGTP	Desoxyriboguanidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
E.coli	Bakterium Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (~9,81 ms²)
G	Guanin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H_20	Wasser
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleinsäure
PBS	Phosphat-buffered saline

PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
ss	Einzelstrang
Std.	Stunden
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
XCB	Xylencyanol

1. Einleitung

1.1 Aufbau der Desoxyribonukleinsäure

In den späten 40iger Jahren des letzten Jahrhunderts zeigten experimentelle Forschungen, dass den „Nucleinsäuren vom Desoxyribosetyp“ ein entscheidender Anteil an der Vererbung zukommt (Avery *et al.*, 1944). Zwei Wissenschaftler bildeten aus den ihnen 1953 bekannten Variablen ein bis heute gültiges Modell, welches als Ehrung bis heute ihre Namen („Watson-Crick-Modell“) trägt (Watson und Crick, 1953). Zwei Stränge der Desoxyribonukleinsäure (DNA), als sense- und non-sense-Strang bezeichnet, bilden zusammen eine gegenläufige Doppelhelix. Ihre Stabilität erhalten die Stränge durch ein starres Zucker-Phosphat-Gerüst an der Außenseite. Die Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin sind dem inneren Kern der Doppelhelix zugewandt. Bedingt durch ihre chemischen Eigenschaften bilden je eine Purinbase und eine Pyrimidinbase ein Basenpaar mit entweder zwei (Adenin-Thymin) oder drei (Guanidin-Cytosin) schwachen, nicht kovalenten Wasserstoffbrückenbindungen.

Die DNA kodiert die Erbinformation in Form einer Aminosäureabfolge für die Proteine, die eine Zelle und damit den ganzen Organismus ausmachen. Der Fluss der Erbinformation zum Genprodukt startet mit der sogenannten „Transkription“. In diesem Schritt wird eine Messanger-RNA („Boten“-RNA, kurz mRNA) synthetisiert. Dabei dient der non-sense Strang als Vorlage. Die synthetisierte mRNA ist zu diesem komplementär und somit gleichzeitig nahezu identisch zum sense-Strang der DNA. Die mRNA verlässt anschließend den Zellkern, an den Ribosomen im Zytoplasma wird in einem als „Translation“ bezeichneten Schritt, aus ihr eine Polypeptidkette synthetisiert.

1.1.1 Grundlagen der Antisense-Nukleinsäuren

Das Prinzip der Antisense-Nukleinsäuren basiert auf dem Einbringen kurzer Nukleinsäureketten mit einer Basenlänge von 15-25 Nukleotiden (nt), in das Zytoplasma einer Zielzelle. Diese Antisense-Oligodesoxynukleotide (asODN) werden komplementär zu einer Sequenz auf der mRNA konstruiert. In diesem Zielbereich kommt es über Basenwechselwirkungen zur Bildung eines sogenannten „semistabilen Heteroduplex“. Dieser Komplex aus RNA und asODN wird durch einen zelleigenen Schutzmechanismus mit Hilfe des Enzyms RNase H, welches als zelleigener Schutzmechanismus gilt, durch hydrolytische Spaltung der RNA abgebaut. Die RNase H spaltet ausschließlich die RNA in diesem Heteroduplex. Hierbei reicht ein Heteroduplex aus fünf Nukleotiden aus, um von der RNase H erkannt zu werden und

diese zu aktivieren (Monia *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1999). Die Antisense-Oligonukleotide selbst werden von der RNase H nicht gespalten und stehen somit für eine erneute Bindung einer komplementären mRNA zur Verfügung.

Die gezielte Reduktion eines Genproduktes (z.B. Protein oder Enzym) in einem gegebenen Organismus stellt ein therapeutisch häufig angestrebtes Ziel dar. Antisense-Oligonukleotide hemmen über einen zelleigenen Mechanismus die Produktion eines Zielproteins. Erste Beachtung erhielt die Antisense-Theorie nach der Arbeit der Wissenschaftler Zamecnik und Stephenson (Stephenson und Zamecnik, 1978). Sie schlugen einen neuen Therapieansatz vor, welcher sich von der klassischen Gentherapie dadurch unterscheidet, dass nicht zusätzliche Gene in die Zelle eingebracht werden, sondern durch Einbringen komplementärer Sequenzen vorhandene Gene gehemmt werden (Zamecnik, 1997). Gut zehn Jahre später zeigten Arbeitsgruppen, dass die Genregulation nach dem Antisense-Prinzip auch physiologisch vorkommt. Der Überlegung folgend, dass eine frühzeitige Hemmung der Genexpression auf RNA-Ebene die Energiebilanz der Zelle im Vergleich zu einer späteren Hemmung auf Proteinebene deutlich positiver gestaltet, sind diese Erkenntnisse nicht verwunderlich. Es muss im „Interesse“ der Zelle liegen, eine fehlerhafte Genexpression so früh wie möglich zu unterbinden, um die „Kosten“ für den Fehler so gering wie möglich zu halten (Simons, 1988; Simons und Kleckner, 1988).

1.1.2 Verschiedene Formen von Antisense-Methoden

Eine weitere Form der antisense-vermittelten Reduktion der Expression eines Proteins auf sequenzspezifische Weise ist die RNA interference (RNAi). Hierbei handelt es sich um eine weitere posttranskriptionale Modifikation der Expression der Gene (Fire *et al.*, 1998; Elbashir *et al.*, 2001). Die Aktivierung der RNAi erfolgt über ein kurzes doppelsträngiges RNA-Molekül (dsRNA, siRNA), welches mit einem seiner beiden Stränge (antisense oder „guide“ Strang) komplementär zur Zielsequenz auf der mRNA ist. Diese ebenfalls ca. 20 nt langen dsRNA-Moleküle werden im Zytoplasma in einen Enzym-Komplex (RISC, „RNA-induced silencing complex“) integriert. Die beiden Stränge werden von einander gelöst und der antisense Strang in einer Weise exponiert, dass eine Ziel-mRNA mit ihrem komplementären Abschnitt binden kann. Anschließend erfolgt die Spaltung der Ziel-RNA durch ein katalytisches Zentrum des RISC (Hammond *et al.*, 2001). Hieraus resultiert, ähnlich dem oben beschriebenem Antisense Effekt, die sequenzspezifische Hemmung eines Genprodukts auf

posttranskriptionaler Ebene. Für die Entdeckung von RNAi in dem Nematodenwurm *C. elegans* erfolgte im Jahr 2006 die Verleihung des Nobelpreises für Medizin und Physiologie an C. Mello und A. Fire.

Der Nachweis, dass die Aktivierung der RNAi durch artifizielle siRNA-Moleküle nur einen physiologischen Prozess imitiert, wurde in den letzten Jahren erbracht. Als Regulator der Proteinaktivität ist es der Zelle möglich, durch miRNA („Mikro-RNA“) gezielt Proteine nach erfolgter Transkription zu hemmen. Diese endogenen miRNA-Moleküle sind meist in den Intronregionen des Genoms kodiert und entstehen aus Vorläufermolekülen („small hairpin RNA“, shRNA) durch gezielte Spaltung (Han *et al.,* 2004). Durch diesen Mechanismus erfolgt eine feine Justierung der Genexpression, wie sie z.B. bei der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen wichtig ist (Chen *et al.*, 2004).

1.1.3 Bedeutung der Prädiktion effektiver Antisense-Oligonukleotide

Die Wirksamkeit eines Antisense-Oligonukleotids wird gemessen an der Reduktion des Zielproteins oder an der Reduktion der Ziel-mRNA. Nicht jedes asODN zeigt in der experimentellen Analyse einen signifikanten Effekt; vielmehr variiert die Wirksamkeit zwischen nahezu kompletter Reduktion der mRNA („knock-down“) bis zum Ausbleiben eines signifikanten Effekts. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass nur wenige asODN, im Bereich von 10-20%, effektiv sind. Neben thermodynamischen Eigenschaften zwischen Antisense-ODN und Ziel-mRNA gibt es Hinweise, dass besonders der Verfügbarkeit der Zielsequenz auf der mRNA eine hohe Bedeutung hinsichtlich einer gesteigerten Effektivität zukommt. Verfügbare Sequenzen auf der mRNA können mittels verschiedener Techniken identifiziert werden. Reihenuntersuchungen mit einer großen Anzahl an randomisierten asODN und RNase-H Spaltungsanalysen, sowie Untersuchungen mit sogenannten „scanning arrays“ sind nur einige der experimentellen Analysemethoden (Lima *et al.*, 1997; Milner *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003).

Die experimentelle Vorhersage von verfügbaren Zielsequenzen ist jedoch sehr zeit- und kostenintensiv. Somit kommt der theoretischen Prädiktion verfügbarer Zielsequenzen mit computerbasierten Methoden eine besondere Bedeutung zu. Durch sie bieten sich Möglichkeiten, ohne die Kosten molekularer Versuche, eine Vorauswahl an effektiven Antisense-Oligonukleotiden zu treffen.

1.1.3.1 Thermodynamik und Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden

Nach dem oben beschriebenen „Watson-Crick-Modell“ der DNA, bildet sich eine unterschiedliche Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotidbasen in einem Doppelstrang aus. Zwischen den Basen Adenin (A) und Thymin (T), resp. Uracil (U), bilden sich zwei, zwischen den Basen Guanin (G) und Cytosin (C) drei, nicht-kovalente Bindungen aus. Diese Bindungen können sich in langen einzelsträngigen Bereichen von Nukleinsäuren intramolekular ausbilden. Ein Bereich mit einer hohen Anzahl an Guanin- und Cytosinbasen besitzt somit unter anderem aufgrund der höheren Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen eine höhere Stabilität. Nach neueren Untersuchungen macht die Anzahl an Wasserstoffbrückebindungen nur einen kleinen Anteil an der nachweislich höheren Stabilität GC-reicher Regionen aus. Die sogenannten Stapelwechselwirkungen zwischen benachbarten Basenpaaren besitzt einen höheren stabilisierenden Einfluss (Yakovchuk *et al.,* 2006) auf den Doppelstrang. Hierbei ist der stabilisierende Effekt von CG-GC-Basen höher als TA-AT-Basen.

Einzelsträngige Antisense-Oligonukleotide mit hoher Stabilität des Heteroduplex zeigen experimentell eine verbesserte Wirksamkeit. Im Gegensatz hierzu zeigen effektive siRNA-Moleküle (doppelsträngig) eine im Durchschnitt niedrigere Stabilität (Lu und Mathews, 2008). Dieser Unterschied wird durch die Notwendigkeit der Bindungslösung als initialer Schritt im Falle der doppelsträngigen siRNA-Moleküle verstanden. Bei einzelsträngigen asODN wird dieser Schritt nicht benötigt, hier zeigt sich eine höhere Effektivität stabiler, intramolekularer Bindungen.

Die Unterscheidung zwischen effektiven und nicht effektiven asODN hängt aus thermodynamischen Gesichtspunkten von der Affinität der asODN zur mRNA ab. Als weitere zu berücksichtigende Parameter sind die Tendenz zur Ausbildung intramolekularer und intermolekularer Strukturen wie Dimere und Eigenbindungen zu nennen.

1.1.3.2 Bedeutung von RNA-Sekundärstruktur und akzessiblen einzelsträngigen Bereichen für die Wirksamkeit

Unter physiologischen Bedingungen liegen RNA und DNA, ebenso wie Proteine, nicht in linearer Form vor, sondern bilden, über intramolekulare Bindungen, Sekundärstrukturen aus. Hierzu zählen vor allem Schlaufen („loop“) und Ausbuchtungen („bulge“), die in einer langstreckigen Nukleinsäure durch

Basenpaarungen und Stapelwechselwirkungen weit auseinanderliegender Basen entstehen können. Hierbei können unterschiedliche Abschnitte z.B. eines RNA-Moleküls mit sich selbst eine semistabile, sequenzabhängige Bindung eingehen. Diese Beobachtung ist für die Wahl effektiver asODN entscheidend. Denn nicht jedes komplementäre Oligonukleotid zeigt einen guten, hemmenden Einfluss auf die Proteinproduktion. Exponierte Basensequenzen der einzelsträngigen RNA, welche unter physiologischen Bedingungen keine intramolekularen Bindungen eingehen und somit für eine Heteroduplexbindung zur Verfügung stehen, scheinen für den Einsatz von asODN optimal geeignet (Scherr *et al.*, 2000). Durch die computerunterstützte Vorhersage von zugängigen Abschnitten der mRNA ist die Ausbeute von wirksamen asODN in der experimentellen Analyse gestiegen. Für die korrekte Vorhersage dieser verfügbaren Ziele ist die Bestimmung der wahrscheinlichsten Sekundärstruktur der mRNA unter physiologischen Bedingungen entscheidend.

Eine etablierte Methode zur Vorhersage der Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren wird durch die Computer-Suite mFOLD unterstützt (Patzel *et al.*, 1999; Kretschmer-Kazemi Far *et al.*, 2005). Diese Sammlung von Algorithmen zur Berechnung von Stabilitäten von Doppelsträngen und thermodynamischen Wechselwirkungen, wie freien Energie- und Entropieänderungen zwischen RNA und Oligonukleotiden, basiert auf den Arbeiten von M. Zuker und ist im Internet (http://mfold.bioinfo.rpi.edu/) in stetig aktualisierter Form zugängig (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003).

1.1.3.3 Sequenz-Motive von hoher Bedeutung für die Effektivität der Antisense-Oligonukleotide

Ein weiterer Ansatz, effektive Antisense-Oligonukleotide von ineffektiven zu unterscheiden, ist aus Metaanalysen und statistischen Untersuchungen entstanden. Kurze Basenfolgen der Antisense-Oligonukleotide, als Sequenz-Motive bezeichnet, korrelieren statistisch mit höherer oder niedrigerer Effektivität. So konnten große statistische Metaanalysen eine Vielzahl an Sequenz-Motiven mit erhöhter und erniedrigter Effektivität nachweisen (Tu *et al.*, 1998; Matveeva *et al.*, 2000). Diese Sequenzmotive werden in sogenannte „good“ und „bad motifs“ unterteilt. Es zeigten sich in verschiedenen Analysen allerdings Unterschiede bezüglich der Erhöhung bzw. Erniedrigung der Effektivität einzelner Sequenzmotive (McQuisten und Peek, 2007).

Eine weitere Sonderstellung in der antisense-vermittelten Reduktion eines Genprodukts nehmen die Antisense-Oligonukleotide gerichtet gegen das Startcodon AUG sowie gegen die 5'Cap-Struktur und den Poly-A-Schwanz der mRNA ein. Diese besonderen Strukturen der mRNA zählen zu den nicht translatierten Bereichen. Das Startcodon AUG bildet den Initiationspunkt, an dem die Translation beginnt. Der Bereich unmittelbar vor dem Startcodon wird nicht translatiert und dient vordringlich der Stabilität der mRNA (5'-UTR, „untranslated region"). Gleiches gilt für den Poly-A-Schwanz als Bestandteil der 3'-UTR. Zudem befinden sich in beiden untranslatierten Bereichen Bindungsstellen für regulatorische Proteine. Die Reduktion der Ziel-mRNA durch Antisense-Oligonukleotide gerichtet gegen das Startcodon, wird vor allem auf die sterische Behinderung bei der Initiation der Translation zurückgeführt (Cowsert *et al.*, 1993).

1.1.4 Chemische Modifikationen von Antisense-Oligonukleotiden

Oligonukleotide mit einem Phosphodiestergrundgerüst sind in der molekularbiologischen Forschung als Werkzeuge weit verbreitet. Sie sind für Versuche zur antisense-vermittelten therapeutischen Nutzung jedoch aufgrund ihrer geringen Halbwertzeit *in vivo* ungeeignet. Binnen Minuten werden sie im Serum des menschlichen Organismus durch ubiquitär vorkommende Exo- und Endonukleasen degradiert. Eine Verbesserung der Halbwertzeit konnte durch die Einführung einer Phosphorothioategruppe an den Internukleotidstellen erreicht werden. Die intrazelluläre Halbwertzeit der Oligonukleotide konnte so von 8-10 Minuten (Phosphodiester) auf 10 – 24 Stunden erhöht werden (Agrawal und Iyer, 1997; Buddecke, 2002). Der Vorteil der erhöhten Resistenz vor enzymatischem Abbau wird durch eine verminderte Stabilität der Heteroduplexbildung mit der Ziel-mRNA in seiner Bedeutung gemindert. Die Fähigkeit der RNase H, den gebildeten Heteroduplex zu spalten, wird durch diese chemische Veränderung jedoch nicht beeinflusst. Allerdings zeigten Versuche eine erhöhte Affinität der Thioateoligonukleotide zu bestimmten Proteinen. Die hierfür verantwortliche Polyanionbindung resultiert aus dem stärker negativ geladenen Grundgerüst. Obwohl dieses Phänomen noch nicht ganz verstanden ist, werden diese Proteininteraktionen unter anderem für die Zytotoxizität der Phosphothioate verantwortlich gemacht (Yakubov *et al.*, 1993; Guvakova *et al.*, 1995; Rockwell *et al.*, 1997). Bei der Synthese entsteht am internukleotiden Phosphat ein chirales Zentrum, mit der daraus resultierenden Bildung eines Diasteriomeres. Die zwei Isoformen jedes modifizierten Nukleotids haben zwar keine erwiesenen Unterschiede in der

Thermostabilität oder der Wirksamkeit, allerdings stellen sie eine Unsicherheit in der Synthese dar, die nur durch aufwändige Reinigungsverfahren gelöst werden kann.

Um dem theoretischen Ideal eines Oligonukleotids, bestehend aus hoher Stabilität, guter Aktivierungsaktivität der RNase H, geringer Bindungsaktivität anderer Proteine sowie hoher Stabilität des zu bildenden Heteroduplexes, nahe zu kommen, können Kombinationen unterschiedlicher chemischer Modifikationen in einem Molekül angewendet werden. So können z.B. nur die endständigen Nukleotide in der nukleasestabileren Phosphorothioatechemie hergestellt („end-capping“), dazwischen liegende Nukleotide können z.B. durch natürliche Phosphodiesterbindungen verbunden werden. Diese Teilphosphothioate (PPS, „partiel phosphothioate oligonucleotides“) zeigen deutlich geringere unspezifische Effekte als Oligonukleotide mit reiner Phosphothioatechemie (Peyman und Uhlmann, 1996; Galderisi *et al.*, 1999).

1.1.5 Vergleich von Antisense-Oligonukleotiden und RNAi

Die beiden bedeutendsten Vertreter der Antisense Methodik sind hinsichtlich ihrer Effektivität bereits mehrfach miteinander verglichen worden. Vergleichende Studien versuchen Unterschiede sowie gemeinsame Eigenschaften hinsichtlich z.B. Stabilität und Nebenwirkungen im klinischen Gebrauch der asODN und RNAi aufzuzeigen. Schon in den Jahren um die Jahrtausendwende lagen erste Vergleiche vor, die eine verbesserte Effektivität der siRNA-Moleküle in der RNAi gegenüber der asODN aufzeigen konnten (Zamore *et al.*, 2000; Caplen *et al.*, 2001). Diesen Vergleichen bleibt einschränkend die Tatsache anzumerken, dass es sich bei den asODN in dieser Untersuchung um unmodifizierte Oligonukleotide handelte, die eine weitaus geringere Stabilität aufweisen. Zusammen mit einer Fülle von Daten konnten in einer großen vergleichenden Arbeit (Vickers *et al.*, 2003) deutliche Zusammenhänge beider Wirkungsweisen aufgezeigt werden. In der Arbeit wurde die Wirkung der asODN (mit einer wie in dieser Arbeit verwendeten Phosphorothioatemodifikation), im Vergleich zu RNAi mit demselben Ziel auf der mRNA, als gleich gut oder besser beschrieben. Angemerkt wurde allerdings, dass die Zielstrukturen für die asODN und damit nicht zwangsläufig auch für RNAi optimiert wurden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass in der Mehrzahl der Fälle Zielstrukturen ohne asODN Effekt ebenfalls keinen RNAi Effekt aufwiesen. Die Arbeit bescheinigt beiden Wirkungsweisen einen vergleichbaren maximalen Effekt und Spezifität, ebenso wie eine vergleichbare Dauer der erzielten Wirkung.

1.1.6 Aktuelle therapeutische Anwendungen von asODN

Das amerikanische Unternehmen ISIS Pharmaceuticals produzierte und vertrieb das erste Medikament basierend auf der Antisense Theorie, mit dem Handelsnamen Vitravene© (Wirkstoff: Fomivirsen). Aufgrund geringer ökonomischer Relevanz wurde das Medikament vom Markt entfernt. Die Indikation des Medikaments zur Behandlung der CMV-Retinitis bei HIV-Patienten bestand für die intravitrale, d.h. in den Glaskörperraum des Auges, Applikation (Henry *et al.*, 2001; VitraveneStudyGroup, 2002). Das Problem der ausschließlich lokalen Wirksamkeit des Medikamentes, sowie die Reduktion systemischer Nebenwirkungen löst diese besondere Applikationsform. Weitere Therapeutika befinden sich auch bei anderen Firmen in der Entwicklung oder der klinischen Erprobung. Zu beachten ist eine jüngst erfolgreich getestete orale Applikationsform, welche in den weiteren Entwicklungen eine zunehmende Bedeutung erreichen könnte (Tillman *et al.*, 2008).

1.2 Aufbau der extrazellulären Matrix

Im menschlichen Organismus, wie in weiteren multizellulären Organismen, sind die Zellzwischenräume mit extrazellulärer Matrix ausgefüllt. Diese Matrix besteht im wesentlichen aus Strukturproteinen, Polysacchariden und interstitieller Flüssigkeit. Die eingelagerten Proteine setzten sich aus den Kollagenen, Proteoglykanen und Strukturglykoproteinen zusammen. Vor allem die faserbildenden Proteine, zu denen die Kollagene gehören, verleihen der Matrix Stabilität und bieten den Zellen Möglichkeiten zur Adhäsion und Interaktion. Lange Zeit hielt sich die Annahme, die extrazelluläre Matrix sei unveränderlich und starr. Heute weiß man, dass diese Aussage nicht den Tatsachen entspricht. Ständiges Auf- und Abbauen der Matrix garantieren physiologische Prozesse wie Wachstum, Heilung und Entwicklung. Aus Störungen des empfindlichen Fließgleichgewichts zwischen Matrixauf- und -abbau resultieren Erkrankungen z.B. aus dem rheumatologischen Formenkreis (Rheumatoide Arthritis, Takayasu-Arteriitis), aber auch der klassische Tumorinvasion und Metastasierung (Okada *et al.*, 1990; Docherty *et al.*, 1992; Bar-Or *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 2001).

1.2.1 Bedeutende Enzyme zur Modulation der extrazellulären Matrix

Die Matrix Metalloproteinasen, auch Matrixine genannt (Matrisian, 1990), bilden eine heterogen Gruppe von zinkabhängigen Endopeptidasen, welche

zusammengenommen in der Lage sind, fast alle Bestandteile der extrazellulären Matrix abzubauen. Zu den Gelatinasen, einer Untergruppe der Matrixine, werden heute zwei Vertreter der Matrix Metalloproteinasen gezählt (MMP-2 und MMP-9). Gegenstand der experimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit ist die mRNA der Matrixmetalloproteinase-2. Die Entdeckung dieser auch Gelatinase A genannten Proteinase gelang im Jahre 1972 (Harris und Krane, 1972). Das latente Enzym besteht aus 631 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 72.000 Dalton. Matrix Metalloproteinasen sind induzierbare Enzyme. Hormonelle Reize (z.B. Wachstumsfaktoren) sowie lokale chemische Besonderheiten führen zu einer vermehrten Produktion von MMP. Alle MMP werden zudem als inaktive Vorstufen (pro-Enzyme) gebildet und sezerniert. Erst durch Abspaltung des N-terminalen Pro-Peptids, meist durch andere MMP, erfolgt die Aktivierung der Matrix Metalloproteinasen.

Die Aktivität der MMP wird durch die Bindung von TIMP („tissue inhibitors of metalloproteinases“) an das C-terminale Ende, der Hämopexinähnlichen Domäne, der meisten MMP geregelt. Durch diesen Kreislauf der geregelten Aktivierung und Inaktivierung erfolgt eine bedarfsgerechte Steuerung des Abbaus extrazellulärer Matrix.

Aufgrund der Fähigkeit, die entscheidenden Strukturproteine der Basalmembran zu degradieren, wird den Gelatinasen die wichtigste Rolle in der physiologischen Durchwanderung der Basalmembran von z.B. T-Lymphozyten, ebenso wie in der malignen Tumorinvasion zugeschrieben. So zeigen MMP-2 defiziente Mäuse eine reduzierte Angiogenese und vermindertes Tumorwachstum. Für zahlreiche maligne Tumore konnte eine erhöhte Aktivität der MMP nachgewiesen werden. So korreliert die Größe von Brustkrebs gut mit der Menge an peripher gemessenem MMP-2 welches möglicherweise als Prognosefaktor in Frage kommt (Liu *et al.*, 2006). Ähnliche Korrelationen konnten für Magen-, Pankreas und Prostatakarzinome nachgewiesen werden (Agnantis *et al.*, 2004). Resultierend aus diesen Erkenntnissen erfolgte eine klinische Testung eines Inhibitors (Marimastat, British Biotech Pharm.) der Matrix Metalloproteinase-2 (Millar *et al.*, 1998) Erste klinische Studien zu dem systemischen MMP-Inhibitor verliefen jedoch enttäuschend (Sparano *et al.*, 2004)

1.3 Zielsetzung

Antisense-Oligonukleotide können als therapeutische Agenzien erfolgreich eingesetzt werden. Notwendig hierfür ist die Identifikation eines spezifischen Proteins als maßgebliche Ursache einer Erkrankung. Durch selektive Suppression der Genexpression auf mRNA-Ebene, also vor Beginn der Translation, kann dieses spezifische Protein herunterreguliert werden. Ziel dieser Arbeit ist es durch Antisense-Oligonukleotide eine effektive Reduktion der Matrix Metalloproteinase 2 *in vitro* auf mRNA-Ebene zu erreichen. Zudem soll die Identifikation effektiver Antisense-Oligonukleotide durch Optimierung der Prädiktion von Sekundärstrukturen verbessert werden. Der Fokus liegt hierbei auf dem Vergleich unterschiedlicher Abschnittsbreiten der mRNA.

2. Material und Methoden

2.0 Materialien

2.0.1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller, Ort
Autoklav 3870 ELV	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Brutschrank	Heraeus, Hannover
Elektroporationsgerät	Biorad Laboratories, München
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
GeneAMP 5700	Eurogentec
Horizontalelektrophoresekammer	Biorad Laboratories, München
Inkubationsschüttler	INFORS AG, Bottmingen
Kamera	PHASE, Lübeck
Kühlzentrifuge Roxica 120R	Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer	Ikamag, Genf, Schweiz
Mikrowelle	Bosch, Wernau
PAA-Gelkammer	Biometra, Hamburg
PCR-Cycler Uno II	Biometra, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer DU-600	Beckmann, München
Pipetten	Eppendorf
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hannover
Tischzentrifuge Microfuge Lite R	Beckmann, München
UV-Transluminator	Sigma, Heidelberg
Vortexer	Ikamag, Genf, Schweiz
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH, Medlingen

2.0.2 Chemikalien und Kulturmedien

Chemikalie / Kulturmedien	**Hersteller**
1 kb plus DNA ladder	Gibco BRL / Invitrogen
Agarose	Biozym
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (10% APS)	Merck
β-Mercaptoethanol	Fluka Buchs / Sigma-Aldrich
Borsäure	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Cäsiumchlorid (CsCl)	Roth
Chloroform	Merck
DMEM	Gibco BRL / Invitrogen
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Formamid	Merck
Glycerin	Sigma-Aldrich
Guanidiniumthiocyanat	Gerbu
Hefeextrakt	Gibco BRL / Invitrogen
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natrium-Acetat	Merck
OPTIMEM	Gibco BRL / Invitrogen
Pepton 140	Gibco BRL / Invitrogen
Rinderserum Albumin (FCS)	Roth
Stains-all Stocklösung	Sigma-Aldrich

Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris-Base (Trihydroxymethylaminomethan)	Gerbu
Tris-HCl	Roth
Harnstoff / Urea	Roth
Xylencyanol	Sigma-Aldrich

2.0.3 Puffer und Lösungen

Name	**Rezeptur**
6xDNA-Probenpuffer	Glycerin 30% (v/v), 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, in 1x TAE, pH 8,5
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$, 1,8 mM KH_2PO_4, (pH 7,4)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base, 1 M Natrium-Acetat, 0,1 M EDTA, (pH 8,3)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, (pH 7,0)
Stains-all	10 ml Stains-all Stocklösung, 10 ml Formamid, 50 ml Isopropanol, 1 ml 3M Tris-HCl (pH 8,8), 129 ml H_2O
LB-(Luria-Bertani-)Amp.	10 g/l Pepton 140, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5 (mit NaOH), Ampicillin 10µg/ml
TBE (10x):	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 25 mM EDTA

2.1 Methoden

2.1.1 Computerassistierte Prädiktion von asODN hoher Effektivität

2.1.1.1 Identifikation von Sekundärstrukturen der MMP-2 mRNA

Die Prädiktion der Sekundärstrukturen von mRNA spielt für die Genregulation nach der Antisense Theorie eine entscheidende Rolle. Die computerassistierte Prädiktion solcher Sekundärstrukturen ist eine kostengünstige Alternative zu aufwendigen experimentellen Reihenuntersuchungen. Die Analyse erfolgt nach dem Prinzip der Energieminimierung. Basierend auf den Grundlagen der Thermodynamik, nimmt jedes Molekül einen Zustand minimaler freier Energie ein. Eine lineare Basenabfolge, wie z.B. die mRNA, nimmt den energetisch günstigsten Zustand u.a. durch intramolekulare Basenpaarungen ein. Aus diesen Bindungen resultieren z.B. die zuvor erwähnten Sekundärstrukturen der mRNA, „loop“ und „bulge“. Mit Hilfe der Faltungsalgorithmen der mFOLD-Suite werden die Sekundärstrukturen in den zehn niedrigsten Energiestufen berechnet und dargestellt. Berücksichtigt wird hierbei die Basensequenz eines definierten Ausschnitts der mRNA, genannt Fenster.

Die Sequenz der mRNA der humanen Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) ist aus der Gendatenbankdatei NM_004530 entnommen. Die Sequenz misst 3069 Basen und ist auf dem Chromosom 16 des menschlichen Genoms kodiert. Die Berechnungen der Sekundärstrukturen wurden im Oktober 2004 im Rechnerzentrum des HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) (Senger *et al.*, 1995) durchgeführt. Das Programm *mFOLD* kam, implementiert in die Programmsammlung *Oligo* V 3.1, in der Versionsnummer 2.0 zum Einsatz (Rychlik und Rhoads, 1989). Analysiert wurde die 3069 nt lange Sequenz in drei verschiedenen Fensterbreiten: 600 nt, 1000 nt und 1400 nt (s. Abbildung 4). Die Fensterbreiten geben dabei die Größe des Rasters an, welche in 100 nt großen Schritten über die gesamte RNA-Sequenz bewegt wird und diese auf ihre zehn niedrigsten Energieniveaus hin analysiert. Das erste Fenster der Untersuchungsreihe mit einer Fensterbreite von 600 nt reicht also von der Position 1 bis zur Position 600, das zweite Fenster von Position 101 bis 700 auf der RNA. In einer Analyse mit einer Fensterbreite reicht die erst Analyse von Position 1 bis Position 1000. Hieraus resultieren bei einer RNA-Sequenz von 3069 nt 26 respektive 22 (1000er Fenster) und 18 (1400er Fenster) zu analysierende Fenster. In diesen Fenstern kommen einzelsträngige Bereiche, auch Motive genannt, in unterschiedlicher Häufigkeit vor. Ein Motiv wird dann näher untersucht, wenn es eine Länge von mindestens 10 nt umfasst, sowie in einem Fenster mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 80 % vorkommt. Ferner werden einzelsträngige Bereiche untersucht, die in den niedrigsten fünf der zehn untersuchten Energiestrukturen konserviert sind. Die drei Datenmengen wurde zunächst für sich alleine nach Strukturen abgesucht, die möglichst viele der Anforderungen erfüllten. Anschließend wurden in einer Metaanalyse alle drei Datenmengen der unterschiedlichen Fensterbreiten verbunden.

Die Zielbereiche auf der RNA der Gelatinase-A werden so festgelegt. Die grafische Darstellung der Zielbereiche wurde anschließend untersucht, um besonders interne Schleifen (internal loop), endständige Schleifen (terminal loop) und Ausbuchtungen (bulge) zu identifizieren. Diese Sekundärstrukturen wurden in vorangegangenen Arbeiten als besonders vorteilhaft beschrieben (Kretschmer-Kazemi Far *et al.*, 2001). Als Ergebnisse der oben beschriebenen Auswahlverfahren wurden in diesem Fall die Zielstrukturen 1284-1293, 1689-1699, 2313-2322, sowie die Zielstruktur 2715-2724 (Namensgebung unterstrichen) zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

2.1.2 Auswahl der asODN pro Motiv

Aufgrund statistischer Berechnungen konnte gezeigt werden, dass Basenfolgen von einer Länge von 15-17 Nukleotiden eine singuläre Homologie im Genom erreicht (Lebedeva und Stein, 2001). Analog dieser Berechnung, werden alle Oligonukleotide mit einer Mindestlänge von 18 Basen an den Zielbereich angepasst. Nachdem die Zielmotive identifiziert wurden, erfolgt die systematische Analyse der dazugehörigen Basensequenzen sowie die Bestimmung der komplementären Sequenzen der asODN. Hierbei werden die asODN eines Motivs so ausgewählt, dass entweder das 3'- oder das 5'-Ende des asODN im ungepaarten Zielbereich liegt. Die detaillierte Darstellung der manuellen Auswahl der einzelnen Antisense-Oligonukleotide erfolgt im Kapitel 2.7.

2.1.3 Berechnungen der Schmelztemperaturen

Die T_m (Schmelztemperatur) eines DNA-Doppelstranges ist als Temperatur definiert, bei der 50 % des Doppelstrangs in einzelsträngiger Form vorliegen, also die beiden Stränge voneinander gelöst sind. Einfluss auf die Schmelztemperatur nehmen vor allem Zusammensetzung der Nukleinsäuren (Basenverteilung), Länge und Konzentration des Oligonukleotid. Ein Antisense-Oligonukleotid bildet mit der mRNA einen Heteroduplex. Diese Doppelstrangbildung geschieht nach gleichen Regeln wie in einem DNA-Doppelstrang. Die Höhe der Schmelztemperatur bildet somit eine Kenngröße für die Festigkeit einer Bindung, bestehend aus zwei Abschnitten von Nukleinsäuren.

Eine einfache Methode zur Abschätzung von Schmelztemperaturen ist die sogenannte Wallace-Methode (Wallace *et al.*, 1979). Sie findet ihre Verwendung hauptsächlich bei der Untersuchung von kleinen Oligonukleotiden, idealerweise bis zu einer Größe von zirka 15 Basen. Sie berücksichtigt ausschließlich die Basenverteilung. Die Schmelztemperatur berechnet sich hiernach aus der Summe der Basenpaare. Für jedes Adenin (A) und Thymin (T) Basenpaar werden 2 °C, für jedes Guanin (G) und Cytosin (C) Basenpaar 4°C zur Schmelztemperatur addiert.

$$T_m = (A+T)*2 + (G+C)*4 \text{ [°C]}$$

2.1.4 Sequenz-Motive von hoher Bedeutung

Es ist zu vermuten, dass die Effektivität eines Antisense-Oligonukleotids nicht von einer einzigen chemischen Eigenschaft, wie z.B. der Schmelztemperatur, allein

abhängig ist. Vielmehr ist von einer multifaktoriellen Beeinflussung der Effektivität von asODN auszugehen. Einen weiteren viel untersuchten Aspekt bilden die Sequenzmotive. Wie eine Forschergruppe an der Universität von Utha (Matveeva *et al.*, 2000) zeigen konnte, gibt es kurze Nukleotidsequenzen mit einem signifikant höheren Vorkommen in effektiven asODN. Statistischen Analyse mehrerer Experimente sowie Registerdaten flossen in diese Untersuchungen ein. Es wird postuliert, dass es Sequenzmotive gibt, welche die Effektivität der asODN steigern können. In der oben beschriebenen Arbeit wurde für die Basensequenzen CCAC, TCCC, ACTC, GCCA und CTCT eine Korrelation mit einer verbesserten Wirksamkeit nachgewiesen. Ebenso wurde für die Sequenzen GGGG, ACT, AAA und TAA eine geringere Wirksamkeit nachgewiesen. Einige dieser als „good motif“ oder „bad motif“ beschriebenen Sequenzmotive sollen hier in die Untersuchung einfließen.

2.1.5 Intra- und intermolekulare Interaktionen der Antisense-Oligonukleotide

Kurze Oligonukleotide können Bindungen miteinander aufbauen. Hierbei sind vor allem Bindungen zweier gleicher Antisense-Oligonukleotide in diesen Versuchen von Bedeutung. Die Bindung über Basenpaare zweier verschiedener Molekülen gleicher Basensequenz, Dimerbildung, kann temperaturabhängig die Untersuchungsergebnisse verändern, da die asODN nicht für die Bindung an die Zielsequenz zur Verfügung stehen. Zudem ist mit zunehmender Länge von Oligonukleotiden eine intramolekulare Bindung durch Basenpaarbindungen möglich indem sich die Enden der asODN aneinander legen. Die Berechnung der Dimerbildung sowie der Selbstbindung erfolgte mittels des Computerprogramms Oligo (Version 3.4). Eine Auswertung der Versuchsergebnisse unter besonderer Berücksichtigung von Dimer- und selbstkomplemtären Bindungen erfolgt im Ergebnisteil.

2.2 Einleitung Methoden und Versuchsabfolge

Die in Zellkultur gewachsenen Zellen werden einzeln mit einem Antisense-Oligonukleotid, welches spezifisch gegen einen bestimmten Teil der mRNA der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) gerichtet ist, transfiziert. Durch eine Carrier-vermittelte Endozytose mittels Lipofectamin2000 (siehe Kapitel 2.4.1) werden die Oligonukleotide in die Zellen eingebracht. In den Zellen erfolgt die Bildung eines Heteroduplexes, bestehend aus mRNA und asODN, welcher von der zelleigenen RNase H erkannt wird.

Es resultiert die hydrolytische Spaltung der mRNA und somit die Reduktion der Menge an intakter MMP-2-mRNA. Zur anschließenden Analyse werden die Zellen lysiert und die enthaltene Gesamt-RNA isoliert. Es folgt die quantitative Bestimmung der MMP-2 mRNA im Vergleich zu einer konstant vorhandenen mRNA („housekeeping Gen", GAPDH). Anschließend erfolgt die Bestimmung der Relativen Reduktion jedes einzelnen asODN im Vergleich zu Kontroll-Oligonukleotiden („Scramble-Kontrollen").

2.2.1 Zellkultur von HT-1080

Die Untersuchungen wurden an menschlichen Fibrosarkomzellen aus der Zelllinie HT-1080 durchgeführt. Die Erstbeschreibung und Analyse dieser Zellen erfolgte durch Rasheed et al. (Rasheed *et al.*, 1974). HT-1080 Zellen produzieren eine große Menge MMP-2 und gelten als Referenzzelllinie zur Analyse der Gelatinase A (MMP-2). Es handelt sich hierbei um adhärent wachsende Zellen, welche einschichtig wachsen. Die Ziellinie wurde freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe Müller aus dem Institut für Molekulare Biologie, Universität zu Lübeck, zur Verfügung gestellt. Die Zucht der Zellen erfolgte in DMEM Medium (Gibco BRL) supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS, Wachstumsmedium).

Jeweils eine Millionen Zellen werden in eine 80 cm² große Kulturflasche mit 15 ml Wachstumsmedium ausgesät. Die Zellen wachsen im Brutschrank bei 37°C und 10% CO_2-Atmosphäre. Beim Erreichen einer 80%igen Konfluenz auf dem Boden der Kulturflasche erfolgt die sogenannte Passage. Hierbei wird zunächst das Medium von den Zellen abgenommen, anschließend werden die Zellen mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Nach dem Abnehmen des PBS werden die Zellen mit 2,0 ml Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst (37°C, 10% CO_2 Atmosphäre, 5 Minuten). Die Inhibition des Trypsins erfolgt mit 10 ml Wachstumsmedium. Die Zellsuspension wird für drei Minuten mit 1000g Rotationskraft pelletiert. Danach wird der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert. In einer Neubauer Zählkammer werden die resuspendierten Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Zum Aussäen auf eine neue 80 cm² Zellkulturflaschen werden erneut 10^6 Zellen in 15 ml Wachstumsmedium suspendiert und in die Kulturflasche ausgebracht.

2.3 Primerdesign für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Grundlage der quantitativen Analyse einer Nukleinsäure ist die Polymerasekettenreaktion. In dieser enzymatischen Reaktion werden Teile einer Nukleotidkette durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase exponentiell vervielfältigt

(vergl 2.4.7). Hierzu sind kurze Oligonukleotide als Initiationsmoleküle (Primer) nötig. Als Grundlage der Sequenz der menschlichen Gelatinase A (MMP-2) wurde die Sequenz NM_004530 herangezogen (Collier et al., 1988). Die 3069 Basen umfassende mRNA-Sequenz ist bereits um die nichtkodierenden Zwischensequenzen (Introns) reduziert. Auf dieser Grundlage werden Primerpaare für ein Amplikon von einer Größe von 200 bp bei einer Schmelztemperatur (T_M) von über 60°C gesucht. Ein Amplikon bezeichnet den Bereich zwischen zwei zusammengehörigen Primern. Diesem Amplikon wird in der Polymerasekettenreaktion exponentiell vervielfältigt. Die Schmelztemperatur wird so gewählt, um den experimentellen Verfahren der quantitativen Polymerasekettenreaktion optimal angepasst zu sein (Rychlik, 1995). Das verwendete Programm zum Primer-Design (PrimerEXPRESS) liegt in der Version 1.5 vor (Breslauer *et al.*, 1986; Dieffenbach *et al.*, 1993). Folgende Spezifikationen gelten für dieses Amplikon, die Namensgebung basiert auf der relativen Position des Amplikons auf der mRNA:

3'-Amplikon:
Länge: 185 Basen + Primerlängen (2739-2975)

Forward-Primer (3'-Fwd)
Länge: 26 Basen GC-Gehalt: 50% T_M: 65°C
Sequenz: 5'-CTG CTG GCT GCC TTA GAA CCT TTC TT-3'

Reverse-Primer (3'-Rev)
Länge: 25 Basen GC-Gehalt: 52% T_M: 65°C
Sequenz: 5'-CTT GGT TTT CCT CCA TCC AGT GGA G-3'
(Tm: Schmelztemperatur, GC-Gehalt: prozentualer Anteil Guanin+Cytosin an den Nukleotiden)

Um in den Versuchen dieser Arbeit eine Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Probenansätzen zu erreichen, wird ein so genannter interner Standard verwendet. Proteine, welche in der Zelle auf einem konstanten Niveau gehalten werden, da sie für entscheidende Stoffwechselprozesse in der Zelle verantwortlich sind, bezeichnet man als „housekeeping" Gene. Zu den klassischen Vertretern dieser Gruppe gehört das Enzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), welches für einen Schritt der Glykolyse, nämlich die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG), verantwortlich ist. Die in dieser Arbeit verwendeten GAPDH-Primer wurden aus dem Institut für Urologie (Arbeitsgruppe

Kausch/Sellmann, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Primerspezifikationen des GAPDH-Amplikon sehen wie folgt aus:

GAPDH-Amplikon:
Länge: 257 Basen incl. Primerlängen (NM_002046: 934-1191)

Forward-Primer (GAPDH-Fwd)
Länge: 20 Basen GC-Gehalt: 60%
Sequenz: 5'-AAC AGC GAC ACC CAC TCC TC-3'

Reverse-Primer (GAPDH-Rev)
Länge: 21 Basen GC-Gehalt: 57%
Sequenz: 5'-GGA GGG GAG ATT CAG TGT GGT-3'
(GC-Gehalt: prozentualer Anteil Guanin+Cytosin an den Nukleotiden)

2.3.1 Aufarbeitung und Klonierung eines Standards für die quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die folgende Abfolge von Versuchen (2.3.1.1 bis 2.3.1.7) hat das Ziel, eine Standardreihe der Amplikone 3'-MMP-2 und GAPDH zu erzeugen. In einer quantitativen PCR wird mit Hilfe der Standardreihen überprüft, ob die gewünschte Vervielfältigung in den Reaktionsansätzen stattgefunden hat. Die Standards sind hierbei Proben, in denen das Amplikon in ansteigenden Konzentrationen direkt vorgelegt wird. Die Standards werden anschließend in der quantitativen PCR, ebenso wie die zu untersuchenden Proben, analysiert. Da in ihnen eine definierte Menge des Amplikons vorhanden ist, zeigt die Vervielfältigung in die PCR den korrekten Ablauf der Reaktion an.

Zur Gewinnung dieser Standards wurden zunächst die Zellen, mit denen in dieser Arbeit gearbeitet wurde, angezüchtet und ihre RNA extrahiert. Anschließend wurde die RNA mittels einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben, die cDNA in einer PCR amplifiziert und beide Amplikone getrennt in *Eschericha coli*-Stämme kloniert. Zuletzt wurden die Bakterien angezüchtet und die DNA der Bakterien isoliert.

2.3.1.1 RNA-Gewinnung mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientzentrifugation

HT-1080 Zellen werden in einer 150cm^2 Zellkulturflasche ausgesät und in DMEM-Medium mit 10% FCS sowie 1x Penicillin/Streptomycin bis zur Konfluenz

wachsen gelassen. Nach einem Waschschritt erfolgt die Lyse mit 12ml Guanidinum-isothiocyanat (in Phenol mit 0,1 M DTT). Das Lysat wird anschließend in ein steriles PNP-Röhrchen überführt. Die Viskosität der Lösung wird anschließend durch mehrmaliges Aspirieren verringert. Weiter wird je 1 ml Caesiumchlorid mit dem Lysat überschichtet. Hiernach folgt ein 20-stündiger Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge (Beckmann L-70, Rotor SW 50:1, 36.000rpm, 20°C). Der Überstand wird abgenommen und das lokalisierte Pellet in dem Röhrchen getrocknet und nach Entfernung von etwaigen Verschmutzungsresten mittels Chloroform in 100 µl DEPC-H_2O (pH 6,5) vorsichtig resuspendiert. Die erhaltene Suspension wird nun im Verhältnis 1:1 mit Chloroform überschichtet und erneut 2 Minuten zentrifugiert (Beckmann MICROFUGE R, 15.3000g, 25°C). Die obere Phase, welche die Nukleinsäuren aufgrund der hydrophilen Eigenschaft enthält, wird abgenommen. Hinzu werden 1/10 des Volumens Na-Acetat (3 M, pH 5,3) und das 3-fache des Volumens an Ethanol (100%) gegeben. Die Mixtur wird für 1 Stunde auf 80°C abgekühlt und anschließend für 1 Stunde erneut zentrifugiert (Beckmann MICROFUGE R, 15.3000g, 4°C). Hiernach wird der entstandene Überstand verworfen und das Pellet mit 750µl Ethanol (70%) gewaschen und erneut pelletiert (Beckmann MICROFUGE R,15.300g, 25°C, 20 Minuten). Der Überstand wird verworfen und das Pellet getrocknet. Die abschließende Resuspension erfolgte in 100 µl DEPC-H_2O. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit einer 1:100 Verdünnung in TE-Puffer (pH 8,0) in dem Photometer (DU-640, 250-320 nm).

2.3.1.2 RNA-abhängige DNA-Polymerisation / Reverse Transkription

Die isolierte RNA wird anschließend mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wird durch das RT-Kit der Firma GIBCO (SUPERSCRIPT II, Gibco BRL) mit 5µg der isolierten Gesamt-RNA als Ausgangsmenge und dem random Primer (Invitrogen) durchgeführt. Zu den 5µl Probe/RNA kommen 5µl H_2O, sowie 1µl dNTP-Mix (10 mM each) und 1 µl randomPrimer (250 ng/µl). Nach einer Erwärmung auf 65°C und anschließender Abkühlung im Eisbad werden hierzu 4µl 5xFirstStrandBuffer sowie 2µl 0,1M DTT und 1µl RNase-out gegeben. Nach einem Annealingschritt bei 25°C für 10 Minuten erfolgt die Erwärmung der Probe auf die Inkubationstemperatur von 42°C, zunächst für 2 Minuten. Anschließend wird die Reverse Transkriptase (SUPERSCRIPT II, 200 Unit) hinzugegeben und für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Abschließend wird das Enzym

durch eine 10-minütige Erhitzung auf 70°C inaktiviert. Direkt im Anschluss an die Reverse Transkription folgt eine PCR zum Amplifizieren der cDNA. In dem 50µl PCR-Ansatz werden 5µl des RT-Produktes eingesetzt.

2.3.1.3 Gelelektrophorese mit Agarose

Amplifizierte Nukleinsäuren lassen sich in einem heterogenen Gemisch verschiedener Nukleinsäuren anhand ihrer Größe auftrennen und visualisieren. Die Auftrennung von Nukleinsäuren wird effizient und effektiv mit Hilfe eines Agarosegels erreicht. Die gewünschte Menge an Agarose (entsprechend 1-2%) wird in 100ml 1x TAE-Puffer (siehe 2.0.3) gelöst. Hierzu wird der Puffer mit der Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Ist die Agarose vollständig gelöst, wird die Lösung nach kurzer Abkühlung mit 4 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzt und anschließend in einen horizontalen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach einem kurzen Vorlauf in 1x TAE-Puffer mit angelegter Spannung (ca. 100 mA) werden die Proben zusammen mit einem 6x DNA-Probenpuffer aufgetragen, eine elektrische Spannung wird angelegt (max. 150 mA). Nach Separation der Nukleinsäuren erfolgt die Dokumentation unter einer UV-Lichtquelle (70% Intensität, 230-350 nm Wellenlänge, UV-Transluminator, SIGMA). Die orientierende Abschätzung der Länge getrennter Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe eines Längenstandards (1 kb plus DNA ladder).

2.3.1.4 DNA-Elution aus einem Agarosegel

Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgt nach dem Standardprotokoll des Geneclean II-Kits (Bio101, MP Biomedicals). Dazu wird ein Gelstück unter UV-Durchleuchtung aus dem Agarosegel herausgetrennt und in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit dem 3-fachen Volumen an NaI überschichtet und in einem Wasserbad für 20 Minuten auf 50°C erhitzt, bis das Gel sich gelöst ist. Die Glasmilch (10 µl) wird nach vorsichtigem Durchmischen dem Ansatz zugegeben. Um die DNA an die Glasmilch zu binden und das Ausfallen der Glasmilch zu verhindern, wird das Gemisch bei Raumtemperatur einige Mal aufgeschüttelt. Ein Zentrifugationsschritt (15.300g, 25°C) pelletiert die gewünschte Glasmilch-DNA-Verbindung. Anschließend wird die vom Überstand entfernte Verbindung dreimalig mit dem Puffer NewWash gewaschen. Abschließend erfolgt die Elution der DNA in 25 µl H_2O.

2.3.1.5 DNA-Klonierung in chemisch kompetente *E. coli*-Kulturen

Die Amplikone der HT-1080 DNA werden in den nächsten Schritten in ein Plasmid kloniert und anschließend in chemisch-kompetente Bakterien (Eschericha coli) transfiziert. In den Bakterienkulturen ist eine schnelle Vermehrung der Plasmid-DNA möglich, sodass anschließend mittels einer DNA-Extraktion (Midi-Prep) und Restriktion eine große Menge des Amplikons isoliert werden kann. Die Aufzucht der Bakterien erfolgte hierbei in Luria-Bertani-Medium. Vor Verwendung der Medien erfolgte eine Sterilisation bei 121 °C, 20 Minuten und 1 bar Überdruck im Autoklaven.

DNA-Abschnitte können mit Hilfe eines als Vektor bezeichneten Transportmittels in das Genom von Bakterien integriert werden. Hierzu wird das DNA-Fragment zunächst in ein zirkuläres DNA-Molekül (Plasmid) integriert und anschließend in Bakterien überführt. Als Vektor wird hier pCR2.1 aus dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Der Vektor mit dem DNA-Fragment wird in chemisch-kompetente *E. coli* Bakterien (DH5α) (Shuman, 1991) überführt. Diese sind mit der Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin und Kanamycin auf dem Genom ausgestattet.

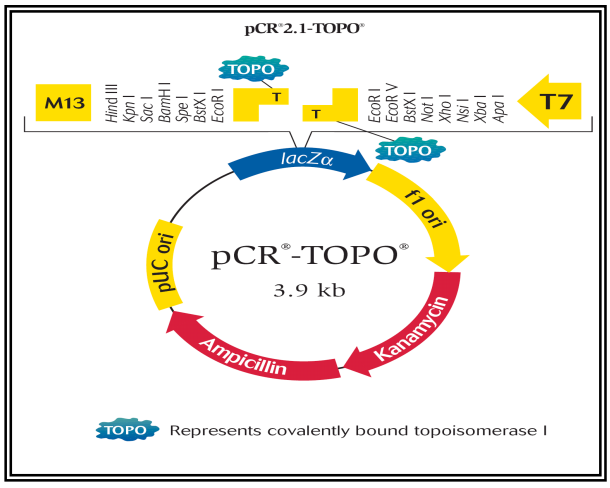

Abbildung 1: Darstellung des Vektors des TOPO TA Cloning Kits pCR2.1 (Invitrogen)

Das Eluat aus der Glasmilch (3 µl. siehe Kapitel 2.3.1.4) wird zu 1 µl Saltsolution und 1 µl H_2O laut Standardprotokoll gegeben. Dazu wurden 1 µl TOPO Vector (pCR2.1, siehe Abbildung 1) gegeben und je 2 µl des Gemisches zu 50 µl *E. coli* Zellsuspension pipetiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis werden die Zellen einem Hitzeschock (42°C, Wasserbad) ausgesetzt und anschließend wieder auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wird mit 250 µl LB-Medium verdünnt und für eine Stunde bei 37°C im Rüttler (Inkubationsschüttler, 37°C, 10% CO_2) bewegt, anschließend auf

vorbereiteten LB-Amp-Platten (siehe 2.0.3) in einer weiteren Verdünnung (10 µl Suspension + 40 µl LB-Medium) ausgesetzt.

Nach einer Übernachtkultur im Brutschrank (37°C, 10% CO_2) werden die Kolonien in Glasröhrchen mit 4 ml LB-Medium (+ 4 µl 100x Ampicillin) überführt und über Nacht auf dem Rüttler (Inkubationsschüttler, 37°C, 10% CO_2) inkubiert.

2.3.1.6 DNA-Isolierung

Die DNA-Extraktion dient der Isolation von bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus Bakterien. Es wird das Midi-Prep-System der Firma Qiagen nach Standardprotokoll verwendet. Eine gewünschte Kolonie auf einer LB-Amp.-Platte wird aufgenommen und in 4 ml LB-Amp.-Medium bei 37°C für zunächst 6-8 Std. und anschließend über Nacht inkubiert. Die Bakterien werden anschließend abzentrifugiert (Hettich Rotixa, 15 Minuten, 6.000g, 4°C). Der Überstand wird abgenommen und die pelletierten Bakterien in 4,0 ml Puffer P1 (inklusive RNase) resuspendiert. Im nächsten Schritt werden 4,0 ml Puffer P2 zugegeben und durch mehrmaliges invertieren vermischt. Nach einer kurzen Ruhephase bei Raumtemperatur erfolgt ein Inkubationsschritt mit 4 ml Puffer P3 auf dem Eisbad für 30 Minuten. Die Suspension wird in Polypropylen-Röhrchen überführt und zentrifugiert (20.000g, 30 Minuten, 4°C). Währenddessen werden die QIAGEN-Tips mit QBT-Puffer äquilibriert und anschließend mit dem Überstand aus dem zweiten Zentrifugationsschritt beladen. Durch Gravitationskraft erfolgt der Durchlauf der Suspension. Es folgt ein zweimaliger Waschschritt. Um die DNA aus dem Säulensystem zu eluieren, werden 5,0 ml Puffer QF auf die Säulen gegeben und der Durchlauf gesondert aufgefangen. Die DNA-Präzipitation wird eingeleitet indem 3,5 ml Isopropanol (Raumtemperatur) hinzugegeben, sorgfältig durchmischt und zentrifugiert (15.000g, 30 Minuten, 4°C) werden. Der Überstand wird unter Schonung des Pellets abgenommen und anschließend wird das Pellet in 2,0 ml Ethanol (70%) resuspendiert und in sterile Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Es folgt ein letzter Präzipitationsschritt (4°C, 15.300g, 30 Minuten). Der Überstand wird erneut abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die abschließende Resuspension der isolierten Plasmid-DNA erfolgt in 50 ml H_2O. Mit einer Verdünnung (1:100 in H_2O) erfolgt eine Konzentrationsbestimmung nach photometrischen Methoden (Beckmann DU-600) (vergleiche Kapitel 2.4.3).

2.4 Einleitung zu den Zellkulturexperimenten mit Darstellung der Verarbeitungsschritte

Um die Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden zu testen wird der hier vorlegten Arbeit eine Untersuchung in Zellkultur (*in vitro*) durchgeführt. HT-1080 Zellen werden mittels eines chemischen Transfektionsagenz (Lipfectamin2000, Invitrogen) mit den Antisense-Oligonukleotiden inkubiert (Felgner *et al.*, 1987). Nach Ablauf einer Inkubationszeit werden die Zellen lysiert und die RNA aus ihnen isoliert. Mit einer quantitativen PCR wird das Verhältnis der mRNA für MMP-2 und GAPDH (interner Standard) bestimmt. Über die Änderung des Verhältnisses wird auf die relative Menge an MMP-2 geschlossen und die Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide bewertet.

2.4.1 Chemische Transfektion der asODN mit Lipofectamin2000

In einer 12-well Schale werden 200.000 Zellen mit 1 ml DMEM-Medium pro well ausgebracht und für 15 Stunden bis zu einer Konfluenz von ca. 90% inkubiert (10% CO_2-Athmosphäre, 37°C). Nachdem das Medium vorsichtig von den Zellen abgenommen wird, folgt ein Waschschritt mit 1 ml OPTIMEM-Medium.

20 Minuten vor dem Aufbringen der Antisense-Oligonukleotide (asODN) auf die Zellen wird eine Lipofectamin2000-Verdünnung mit den Oligonukleotiden in OPTIMEM-Medium zusammengegeben. Pro Well werden 400 µl Final-Mix (Endkonzentration: 200 nM asODN, 10 µg/ml Lipofectamin2000 in OPTIMEM) auf die Zellen gegeben und für 4 Stunden inkubiert (37°C, 10% CO_2). Als Kontrolle wird eine Charge mit Lipofectamin2000 ohne Oligonukleotid eingesetzt (LIPO ohne). Hiernach werden die Zellen einmal vorsichtig mit je 1 ml Wachstumsmedium (siehe Kapitel 2.2.1) überschichtet. Nach dem schnellen Absaugen desselben wird erneut jeweils 1 ml Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben. Es beginnt die Regenerationsphase, in der die Zellen im Brutschrank für 20 Stunden bleiben. Nach Abschluss der Regeneration erfolgt die Isolation und Weiterverarbeitung der RNA.

2.4.2 Vitalitätstest in der Zellkultur mit Trypanblau

Eine in der Mikrobiologie weit verbreitete Methode des Vitalitätsnachweises ist die Anfärbbarkeit von Zellen mittels der Trypanblau-Methode. Der Farbstoff Trypanblau lagert sich an zytoplasmatische Proteine an und färbt die Zellen dadurch dunkelblau an. Zur Anwendung werden 8,0 µl der Lösung mit den suspendierten Zellen

auf einer Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm^2) ausgebracht. Die Zugabe des Farbstoffs erfolgt nach Maßgabe des Herstellers nach Standardprotokoll. Die Zählung der vitalen und avitalen Zellen erfolgt durch Durchmustern des definierten Volumens auf der Neubauer Zählkammer. Alle Ergebnisse werden durch Mehrfachbestimmungen und Mittelwertbildung statistisch verbessert.

2.4.3 Untersuchung des Einflusses von Regenerationszeit und Konzentration der Antisense-Oligonukleotide auf die Vitalität der Zellen

Zur Optimierung der Reaktionsfolge unter besonderer Berücksichtigung zweier elementarer Einflüsse auf die Zytotoxizität (asODN-Konzentration, Regenerationszeit) erfolgt zunächst eine Voruntersuchung. 200.000 Zellen werden pro Vertiefung in einer 12-well-Schale, entsprechend einer Fläche von 3,8 cm^2, ausgesät und mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der Antisense-Oligonukleotide transfiziert (Endkonzentration der asODN: 200 und 400 nM). In diesen Untersuchungen dient Lipofectin als chemisches Transfektionsagenz. Nach den verschiedenen Regenerationszeiten (8h, 20h und 32h) werden die Zellen anhand des Standardprotokolls weiter verarbeitet (siehe Kapitel 2.4.4 bis 2.4.7). Nach Ablösen der Zellen vom Untergrund der Zellkulturschalen mit Trypsin, erfolgt die Pelletierung der Zellen. Anschließend folgt ein Resuspensionsschritt in DMEM-Medium. Aus dieser Suspension werden 16 µl für den Trypanblautest entnommen.

2.4.4 Zelllyse und RNA-Extraktion

Die Isolierung von RNA erfolgt mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) (Kenzelmann und Muhlemann, 1997) nach Standardprotokoll incl. DNase-Verdau. Konfluent gewachsene HT1080-Zellen in der Zellkulturflasche werden mit PBS gewaschen und danach aus der Schale abgelöst (1x Trypsin, 0,5 ml, 37°C, 5% CO_2, Einwirkzeit 5 Minuten). Nach Zugabe des Wachstumspuffers (siehe Kapitel 2.2.1) zur Inaktivierung des Trypsin werden anschließend die abgelösten Zellen pelletiert (Hettich/Rotixa Zentrifuge, 1000 rpm, 3 Minuten) und der Überstand verworfen. Die Lyse der Zellen erfolgt mit 700 µl Lysis-Puffer (RLT-Puffer plus 10 µl β-Mercaptoethanol/ml). Das flüssige Lysat wird auf die QIAshredder-Säule gegeben und 2 Minuten bei 15.300 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Mit dem Durchlauf wird fortgefahren. Ein weiterer, 3-minütiger Zentrifugationsschritt pelletiert etwaige Reste. Zu dem Zelllysat wird 1 vol% 70%iger Ethanol gegeben. Im weiteren Verlauf werden die Nukleinsäuren durch

Zentrifugation an die RNeasy-Säulen gebunden. Etwaige Kontaminationen mit DNA, welche mit den weiteren Versuchen interferieren könnten, werden durch einen DNase-Verdau (DNaseI-Kit, Qiagen) vorgebeugt. Nach Abschluss mehrerer Waschvorgänge wird abschließend die RNA in DEPC- H_2O eluiert und in einem sterilen Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt.

2.4.5 Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Messungen werden am Beckmann DU-600 Photometer in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1,0 cm durchgeführt, gelöst sind die Proben in gepuffertem HEPES (10 mM, pH 7,0) in einer 1:20 Verdünnung. Der Nullabgleich erfolgt gegen eine Probe HEPES ohne Nukleinsäure. Die Berechnung der Konzentration erfolgt anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes ($E= \varepsilon \bullet c \bullet d$, E = Extinktion in O.D., ε = molarer Extinktionskoeffizient (Stoffkonstante), c = Konzentration des untersuchten Stoffes, d = Schichtdicke der Küvette) durch Extinktionsbestimmung. Dabei entspricht einer gemessenen Absorptionseinheit (O.D.) bei 260 nm Wellenlänge einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Warburg und Christian, 1941). Mit der gemessenen Menge an Gesamt-RNA kann im folgenden Schritt, der Reversen Transkription, ein Abgleich aller Proben auf eine einheitliche Menge an RNA pro Probe erfolgen. Die Reinheit einer DNA-Lösung kann durch weitere Messung der OD bei 280 nm abgeschätzt werden. Ein Quotient $O.D._{260}/O.D._{280} < 2$ zeigt eine Verunreinigung durch Proteine an (Wilfinger *et al.*, 1997).

2.4.6 Reverse Transkription

Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung erfolgt eine Reverse Transkription der RNA in cDNA. Die einzelnen Schritte dieser Versuche sind unter Kapitel 2.3.1.2 zusammengefasst. Jeweils 1,2 µg RNA werden in einem Gesamtansatz von 50 µl transkribiert. Als Polymerisationsstarter werden randomPrimer (250 ng/µl, Invitrogen) verwendet, das Enzym ist Superscript II (500 U/ Ansatz) der Firma Gibco BRL.

2.4.7 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Um eine gegebene Menge von DNA analysieren zu können, wird DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) amplifiziert. Durch die Verwendung eines fluoreszierenden Interkalators sowie eines Fluoreszenzdetektors ist eine quantitative Messung in Echtzeit möglich (Lee et al., 1993). Der Interkalator SYBR Green I (Sigma-Aldrich) fluoresziert in einem DNA-Doppelstrang. Hierbei nimmt die Fluoreszenz linear proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA zu. Der Detektor des GeneAMP 5700 zeichnet die Messwerte im zeitlichen Verlauf auf. Die Anregung des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green erfolgt bei einer Wellenlänge von 485 nm. Mit dieser Wellenlänge wird der interkalierte Farbstoff angeregt und emittiert ein Licht mit einer Wellenlänge von ca. 520 nm.

Der Reaktionszyklus der Real-Time-q-PCR gliedert sich in 3 Abschnitte:

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung und „hot start“	95°C	10 Minuten
2. Annealing und Polymerisation	60°C	60 Sekunden
3. Denaturierung	95°C	15 Sekunden

Hierbei werden die Schritte zwei und drei in den hier durchgeführten Untersuchungen 40 mal wiederholt. Durch die zyklischen Temperaturänderungen kommt es bei einer Temperatur von 60° C zur Bindung der Primermoleküle an die Nukleinsäuren sowie zu Verlängerung der selben. Bei 95°C werden die Bindungen wieder voneinander gelöst.
Die Reaktionsansätze sehen wie folgt aus:

Komponente	µl	Endkonzentration in 50 µl
Probe	10	
10x Reaktionspuffer	5	1x
50 mM $MgCl_2$ Lösung	3,5	3,5 mM
5,0 mM dNTP (each)	2	200 µM each
Forward Primer 10 µM	1,5	300 nM
Reverse Primer 10 µM	1,5	300 nM
SYBRGreen Färbelösung 1:2000	1,5	1:66.000
Hot GOLDSTAR Enzym	0,25	0,025 U/µl
H_2O	ad 50	

In jedem Ansatz der quantitativen PCR werden 10 µl der cDNA-Probe aus dem Reverse Transkriptionsansatz eingesetzt. Nach Zugabe der weiteren Komponenten erfolgt eine Auffüllung auf das Reaktionsvolumen von 50 µl mit Aqua bidest.

2.5 Qualitätskontrolle der Antisense-Oligonukleotide

In den Untersuchungen, die in dieser Arbeit dargestellt werden, kommen eine Vielzahl von kurzen Oligonukleotiden als Reaktionsbestandteil zum Einsatz. Dies sind zum Einen die Antisense-Oligonukleotide der verschiedenen Motive sowie zum Anderen die Primer für die quantitative PCR. Alle Nukleinsäuren wurden in Speziallaboratorien bestellt (Metabion, TIB Molbiol). Die Reinheit der Proben und die Länge der Nukleotide wurden jeweils in einem Polyacrylamid-Gel untersucht.

2.5.1 Denaturierendes Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel)

Ein Polyacrylamidgel bildet durch eine radikalische Polymerisation eine Gelmatrix aus. Hierbei kann die Menge der entstehenden Verzweigungen und resultierend die Porengröße durch Änderungen im Konzentrationsverhältnis der enthaltenden Acrylamide variiert werden.

Volumen		Stoff
10	ml	Polyacrylamid 40% (19:1)
10	g	UREA / Harnstoff
4	ml	5x TBE-Puffer

In einem Becherglas werden die Reagenzien mit einem Magnet-Rührfisch bei zirka 50°C bis zur vollständigen Lösung der Stoffe durchmischt. Um die Verunreinigungen des Harnstoffs zu entfernen, wird die Lösung anschließend filtriert. Die Polymerisation wird nach der Vorbereitung der folgenden Schritte durch die Zugabe von

Volumen		Stoff
200	µl	10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)
20	µl	TEMED

gestartet. Ammoniumperoxodisulfat dient hier als Initiator der Polymerisation und TEMED als Fänger der dabei frei werdenden Radikale.

Jeweils zwei Gele werden in einer Horizontalkammer in 1x TBE äquibrilliert. Nach dem einem Vorlauf (1 Stunde, 200 V, const.) werden jeweils 6 µl der Proben mit 4 µl Formamid versetzt und zusammen mit eine Laufkontrolle (1,0 µl Bromphenolblau, 3 µl H_2O, 4 µl Formamid) aufgetragen. Als interne Kontrolle wird eine Probe von vorbeschriebener Größe aufgetragen. Die Separation erfolgt bei einer Spannung von 200 – 220 Volt für zirka 2 Stunden aufrechterhalten.

Zur Darstellung der Proben nach Abschluss der Elektrophorese erfolgt eine Anfärbung. STAINS-ALL (SIGMA-ALDRICH) ist eine Methode um RNA, DNA oder Proteine anzufärben (Green *et al.*, 1973; Andrews, 1988). Es eignet sich unter anderem zum Anfärben von Substanzen in einem Polyacrylamidgel. Dazu wird das Gel nach der Auftrennung angefärbt und anschließend der Hintergrund unter normalem Tageslicht entfärbt, bis nur noch die Banden gefärbt sind.

Das fertige Gel färbt über Nacht mit verschlossenem Deckel zur Eliminierung von Licht in der Flüssigkeit.

Am nächsten Tag wird das Gel mehrfach mit H_2O gespült. Zur Kontrastverstärkung wird das Gel für zirka 10 Minuten einer Lichtquelle (Tageslicht) ausgesetzt. Die sich nun deutlich abzeichnenden Banden können mit einem Scanner oder Fototechnik archiviert werden.

2.6 Klonierung und Isolation der internen Standards

In einer quantitativen PCR, wie sie in den hier durchgeführten Untersuchungen durchgeführt wurde, spielen Standards eine bedeutende Rolle. Sie dienen der Kontrolle des korrekten Ablaufs der Polymerasekettenreaktion. Ein interner Standard kann z.B. das zuvor klonierte Zielamplikon sein. Werden die internen Standards als Kontrollproben in der quantitativen PCR eingesetzt. Erfolgt eine nachweisbare Amplifikation der klonierten Amplikone kann auf einen korrekten Ablauf der Versuche geschlossen werden. Erfolgt andersherum in den internen Standardproben keine Amplifikation kann auf einen Fehler im Versuchsablauf geschlossen werden. So erfolgt eine Validierung der Untersuchungsergebnisse.

Die Klonierung des Amplikons erfolgt hier über eine TA-Klonierung (Vergl. 2.3.1.6). Um zu verifizieren, dass die richtigen DNA-Fragmente (Amplikone) in die Plasmid-DNA des Bakteriums inseriert wurden, erfolgt eine Restriktionsanalyse mit anschließender Gelelektrophorese. Die Restriktionsanalyse erfolgt mit dem Enzym EcoR1 und dem dazugehörigen Puffer (Gibco BRL). 1 µg der DNA wurden mit 1x

Puffer und H_2O auf die gewünschte Menge gebracht und mit 1 µl des Enzyms versetzt. Das Gemisch inkubiert drei Stunden bei 37°C und wird anschließend in 1%igem Agarosegel unter UV-Licht dokumentiert.

Um zu überprüfen, ob die spezifischen Längenstandards für die qPCR nutzbar sind, müssen sie zuerst in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt werden. In dem 50 µl PCR-Ansatz (200 µM dNTP (each), 1,5 µM $MgCl_2$, 100 µM 3'-FWD-Primer, 100 µM 3'-REV-Primer, Taq-Polymerase (GIBCO BRL)) werden 2 µl der Resuspension der Plasmid-DNA eingesetzt. Es folgte ein PCR-Programm im Thermocycler mit 35 Zyklen nach folgendem Schema:

Reaktionsschritt		Dauer	Temperatur
Initiation		2 Minuten	95 °C
Denaturierung	**35 Zyklen**	15 Sekunden	95 °C
Annealing		45 Sekunden	60 °C
Elongation		60 Sekunden	72 °C
		2 Minuten	72 °C

Nach der Polymerasekettenreaktion erfolgte die Auftragung von 5 µl der Probe auf einem Gel (Agarose 1%, 4 µl Ethidiumbromid/100 ml mit 1 Kb DNA-ladder plus) zur Kontrolle der Länge des amplifizierten Bereiches und der Reinheit der Probe. Als Kontrolle wurde der 1 Kb Plus DNA Ladder eingesetzt (Gibco BRL). Die in dem Längenstandard enthaltenden Banden repräsentatieren folgende Längen: 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000 und weitere (jeweils Basenpaare).

Weiter erfolgt eine Konzentrationsbestimmung der PCR-Ergebnisse und eine Umrechnung auf Kopienanzahl. Ausgehend von einer Molmasse für Doppelstrang-DNA von 660 g/mol ds-DNA-Nukleotid und der Plasmidgröße inklusive der jeweilige Amplikone von 4200 bp für GAPDH und 4187 bp für 3'MMP-2 wird eine Verdünnungsreihe (in H_2O) von 50 bis 500000 Kopien pro Mikroliter für GAPDH und 3'-MMP-2 erzeugt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt anhand einer photometrischen Bestimmung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (vergleiche 2.4.3) . Die Konzentrationsbestimmung erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm, die Reinheit der Probe wird anhand der Ration 260 nm/ 280 nm abgeschätzt. Für das GAPDH-Amplikon incl. Plasmid-DNA folgt bei einer Länge von 4200 nt analog 2,722 µg Plasmid entsprechen einer Kopienanzahl von $6{,}023 \times 10^{11}$. Die photometrisch

bestimmte Konzentration der GAPDH-Probe wird anschließend zu der gewünschten Kopienzahl in Relation gesetzt und in mehreren Verdünnungsreihen in H_2O aliquotiert. Gleichsam erfolgte die Verdünnung der Plasmid-DNA des 3'-MMP-2 Amplikon.

Die erzeugten Verdünnungsreihen können in der quantitativen PCR eingesetzt werden. Sie dienen als interne Kontrolle. Die Plasmid-DNA mit dem inserierten Amplikon, welches aus einer PCR mit gleichen Primern gewonnen wurde, ermöglicht in einer erneuten, quantitativen PCR ein Annealing der Primer an jeder Kopie und somit eine lineare Amplifikation des Amplikons in Abhängigkeit von der eingesetzten Anzahl der Kopien. Als weitere Anwendung kann hieraus eine indirekte Quantifikation der

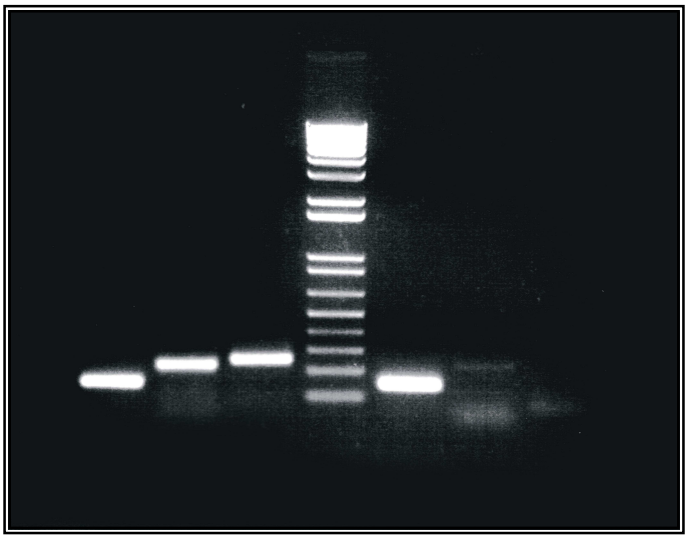

Abbildung 2: Agarosegel (1%), Reihe 1: Kontrollamplikon 186 bp, Reihe 2: 3'-MMP-2 Amplikon, Reihe 3 GAPDH Amplikon, Reihe 4: 1 Kb Plus DNA Ladder, Reihe 5: Kontrollamplikon 150 bp, Reihe 6: Primerkontrolle, Reihe 7: negativ Kontrolle (H_2O).

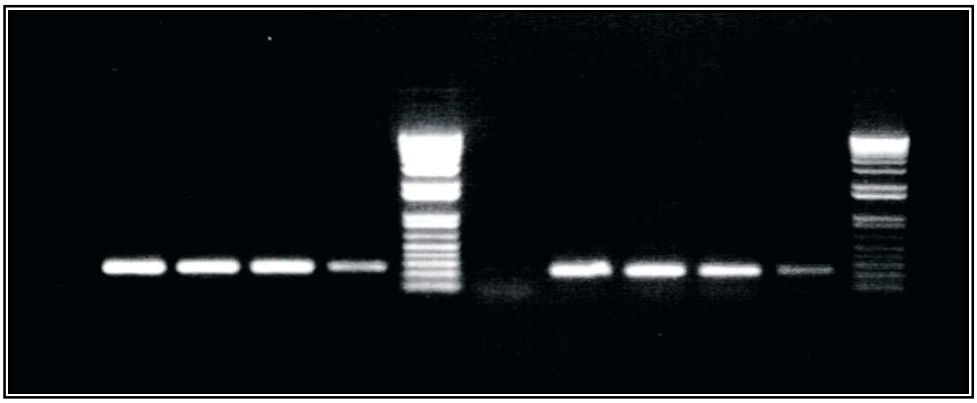

Abbildung 3: Agarosegel (1%), von links Reihen 2-5 GAPDH Amplikon und Reihen 8-11 3'MMP-2 Amplikon in absteigenden Konzentrationen ($5x10^{10}$ bis $5x10^{4}$ Kopien), Reihen 6 und 12 1-Kb plus DNA-ladder (Gibco), Reihen 1 und 7 H_2O Negativkontrolle

untersuchten cDNA aus den Antisense Versuchen abgeleitet werden. Aus Gründen der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften zwischen cDNA und Plasmid-DNA wurde in den hier dargestellten Versuchen von dieser Möglichkeit kein Gebrauch gemacht.

Abschließend erfolgte eine Darstellung der Verdünnungsreihen von $5 \bullet 10^{10}$ bis $5 \bullet 10^{5}$ der beiden Amplikone in einem Agarosegel (Abbildungen 2 und 3).

2.7 Auswahlkriterien der asODN und Scramblekontrollen

Die Prädiktion von Sekundärstrukturen ist für die Identifikatin von Zielbereichen (Motiven) ein wichtiger Schritt. Sind die Bereiche, in denen voraussaglich keine intramolekularen Bindungen vorhanden sind, identifiziert und als Zielmotive festgelegt, erfolgt die Auswahl der Antisense-Oligonukleotide, welche an die Zielsequenz angepasst werden. Anhand der bekannten Basensequenz des Zielbereichs kann die Basensequenz von Antisense-Oligonukleotiden an den Motiven abgeleitet werden.

In allen 4 Zielbereichen erfolgt die Auswahl der Antisense-Oligonukleotide nach dem gleichen theoretischen Schema. Jeweils vom 5'- und vom 3'-Ende werden mehrere Antisense-Oligonukleotide an den Zielbereich nach dem Prinzip der Basenpaarung angepasst. Anschließend werden die asODN und auf ihre Länge, etwaige höhergradige Selbstbindungen, sogenannte Dimerbildung, GC-Gehalt und errechneten Tm-Werte hin überprüft. Besondere Motive, aus Erfahrungswerten als negativ angesehen, werden vermerkt oder ausgeschlossen (siehe Motiv 2715). Aus dieser ersten Sammlung an Sequenzen wird eine weitere, engere Auswahl getroffen.

Für jedes Strukturmotiv wird eine Scramblekontrolle, mit identischer Basenverteilung und zufällig variierter Sequenz eines Oligonukleotids dieses Motivs, erzeugt. Ist bei den jeweils erzeugten Scrambleoligonukleotiden einerseits das Verhältnis der Basen zum zugrundeliegenden asODN gleich, gibt es andererseits für sie keine komplementäre Sequenz auf der Ziel-RNA. Daher ist mit keiner wirksamen Reduktion durch den RNase H vermittelten Mechanismus zu rechnen. Die Scramble-Oligonukleotide dienen in diesen Untersuchungen als eine interne Kontrolle (Negativkontrolle). Sie weisen die gleichen chemischen Eigenschaften wie die asODN auf, sollten aber keine Wirksamkeit im Sinne des Antisense Mechanismus aufweisen. So wird sichergestellt, dass etwaige beobachtete Effekte der Antisense-Oligonukleotide nicht solitär auf dem Effekt der chemischen Transfektion durch das Lipofectamin2000 Agens beruhen. Mit einem sogenannten Alignment wird sichergestellt, dass die

Scramble-Oligonukleotide keine Bindung zum Zielgenom aufweisen. Hierzu werden die Basensequenzen der Scamblekontrollen mit dem Zielgenom auf eine Sequenzhomologie verglichen.

Die Antisense-Oligonukleotide wurden bei der Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) als Phosphorothioate (PTO) bezogen. Jedes Oligonukleotid wurde als Ethanolpräzipitat in einer Menge von knapp über 100 nmol geliefert. Nach Lieferung erfolgte in einem ersten Schritt die Herstellung einer 1 mM Stammlösung in TE-Puffer (pH 8,0). In einer 1:10 Verdünnung wurden anschließend alle Oligonukleotide in mehreren Chargen aliquotiert, so dass für jedes Experiment nur eines der identisch großen Aliquots benutzt und verbraucht werden musste. Dadurch wurde versucht Schädigungen der Oligonukleotide, z.B. durch häufiges Auftauen und Einfrieren, zu minimieren.

Jedes asODN wird zur Reinheits- und Längenüberprüfung in einem denaturierenden PAA-Gel (Harnstoff, 20 % Polyacrylamid 19:1) dargestellt. Als Längenstandard und Kontrolle diente ein Oligonukleotid gleicher Chemie der Arbeitsgruppe Kretschmer-Kazemi Far (Institut für Molekulare Medizin, Universität Lübeck). Zur Darstellung des Nukleotidmaterials erfolgte ein Anfärbung nach der STAINSALL-Methode (Abbildungen nicht dargestellt).

2.8 Erläuterung der Kontrollmechanismen wie Scramble- und Negativ-Kontrolle

2.8.1 Scramble-Kontrolle

In der hier vorliegenden Arbeit wird die Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden auf die Expression des Proteins MMP-2 untersucht. Dabei wird die Expression anhand der Menge an mRNA im Zellsystem beurteilt. Die isolierte Gesamt-RNA einer Probe wird in standardisierter Menge untersucht. Beurteilt wird der Quotient aus dem gesuchten Gen (MMP-2) und einem sogenannten „house keeping“ Gen (GAPDH). Alle Untersuchungen der Antisense-Oligonukleotide werden in jedem Versuch in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Aus diesen drei Proben eines untersuchten Oligonukleotids wird der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Anschließend wird der Mittelwert aller Scramble-Kontrollen einer Versuchreihe auf 100 % normiert. Die Reduktion des Verhältnisses MMP-2 zu GAPDH wird also zusätzlich an den Werten der Scramble-Kontrollen abgeglichen, von denen keine Veränderung der Expression zu erwarten ist. Ihnen geht die gleiche Transfektion

eines Oligonukleotids voraus. Im Gegensatz hierzu bilden die zusätzlichen Kontrollen, in denen nur die Transfektion ohne Oligonukleotid durchgeführt wird (LIPO ohne), eine vergleichbarere Kontrolle. Normiert werden die Versuchsergebnisse ausschließlich an den gemittelten Scramble-Kontrollen. Alle Oligonukleotide wurden auf insgesamt 4 PCR-Platten verteilt. Der Abgleich der Proben erfolgte stets nur mit den Scramble-Kontrollen der gleichen Platte. Alle Proben wurden zeitnah untersucht. Jeweils zwei Platten sind am gleichen Tag und nacheinander untersucht worden.

2.8.2 Negativ Kontrolle

Als zusätzliche Kontrolle in der quantitativen PCR werden für jedes Primerpaar so genannte „none template controls“ (NTC) eingesetzt. In diesen Proben werden keine nutzbaren Matrizen für die Polymerase zugeführt, sondern stattdessen Wasser. Es sollte aufgrund der fehlenden Matrize zu keiner Amplifikation von Nukleinsäuren kommen, man spricht von einer „Negativ-Kontrolle“. Spezifische oder unspezifische Nukleinsäurenverunreinigungen der Materialien können zu einer nachweisbaren Amplifikation führen.

Für das 3’MMP-2 Primerpaar konnte in allen erfolgten Versuchen in 40 Amplifikationszyklen kein Material nachgewiesen werden, bzw. der Schwellenwert nicht erreicht werden. Dies ist das erwartete Ergebnis einer Negativ-Kontrolle. In allen GAPDH Untersuchungen waren die Schwellenwerte in den NTC bei einem CT-Wert um 35 erreicht. Bei der hier beobachteten Amplifikation handelt es sich am ehesten um unspezifische Ergebnisse, wie sie zum Beispiel aus einer Dimerbildung der Primer entstehen können. Von einer Verunreinigung der Proben ist, ob der Konsistenz der unspezifischen Werte, nicht auszugehen. Gemessen an den Probenwerten von einem Durchschnittswert von zirka 17 kann hier von einer unspezifischen Amplifikation ausgegangen werden. Alle Negativ-Kontrollen wurden in den Versuchen als negativ bewertet. Dieses Ergebnis deutet auf eine saubere Arbeit mit den Probenmaterialien hin.

2.9 Schwellenwert (CT-Wert) und Berechnung von relativen Amplikonmengen

Eine quantitative PCR nach dem hier verwendeten SYBR Green Protokoll weist eine zunehmende Amplifikation der DNA durch eine ansteigende Fluoreszenz nach. Gleichzeitig zeichnen die Steuerungsprogramme die gemessene Menge an Fluoreszenz in ihrem zeitlichen Verlauf auf. Nach dem Abschluss des letzten Zyklus werden die

gesammelten Ergebnisse der Untersuchungsreihe dargestellt. Ein Schwellenwert (CT-Wert, „cycle threshold“), welcher in der Phase des linearen Anstiegs der gemessenen Fluoreszenz liegt, wird definiert. Der Punkt, an dem der lineare Anstieg der Fluoreszenz der Proben diesen Schwellenwert erreicht, wird als CT-Wert der Probe gemessen. Diese CT-Werte können für die Analyse in weiterführende Programme exportiert werden. Die CT-Werte zeigen zusammengefasst den Amplifikationszyklus, zu dem der Schwellenwert erreicht wird, an. Liegt in der Probe eine hohe Menge an zu amplifzierendem Material vor, kommt es zu einer schnellen Amplifikation und einem schnellen Erreichen des Schwellenwertes. Es ergibt sich ein niedriger CT-Wert. In diesem Fall erfolgte die weiterführende Analyse mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft). Anhand der CT-Werte erfolgte die Berechnung der theoretischen Ausbeute an gesuchtem Material nach folgender Formel:

$$2^{(40-CT)}$$

Bei einer Verdopplung des gesuchten DNA-Abschnitts mit jedem Zyklus einer PCR ergibt sich so die ideelle Menge. Da der Schwellenwert im Bereich des exponentiellen Wachstums festgelegt ist, kann diese Formel näherungsweise benutzt werden. Der untersuchte MMP/GAPDH Quotient aus den vom CT-Wert abgeleiteten Mengen wird hinterher noch mit dem gleichen Quotient der Scramble-Kontrollen abgeglichen. Da es hier zu einer doppelten Quotientenbildung kommt, kommt rechnerisch eine Teilung der gemessenen CT-Werte zur Bestimmung der relativen Expression zum tragen.

3. Ergebnisse

Die Identifikation von Strukturmotiven auf der mRNA der Matrixmetalloproteinase-2 (im Folgenden als Zielmotive bezeichnet), sowie die Anpassung der Antisense-Oligonukleotide an diese, wie in dieser Arbeit durchgeführt, wird im ersten Teil der Ergebnisse dargestellt. Ferner kommt der Einfluss verschiedener Sequenzanalysemethoden auf das Auftreten der Zielmotive zur Darstellung. Im Weiteren werden die Versuchsergebnisse, in Form der Relativen Reduktion auf mRNA-Ebene gemessen, dargestellt, bevor die Wirksamkeit der asODN unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren dargestellt wird.

3.1 Strukturanalyse der Ziel-mRNA

Wie in vorangegangenen Arbeiten aufgezeigt werden konnte, wird die Effektivität von Antisense-Oligonukleotiden durch die Verfügbarkeit des Zielbereichs signifikant verbessert (Scherr *et al.*, 2000). Durch die Verfügbarkeit bildet sich ein Heteroduplex durch Anlagerung der Antisense-Oligonukleotide an die mRNA.

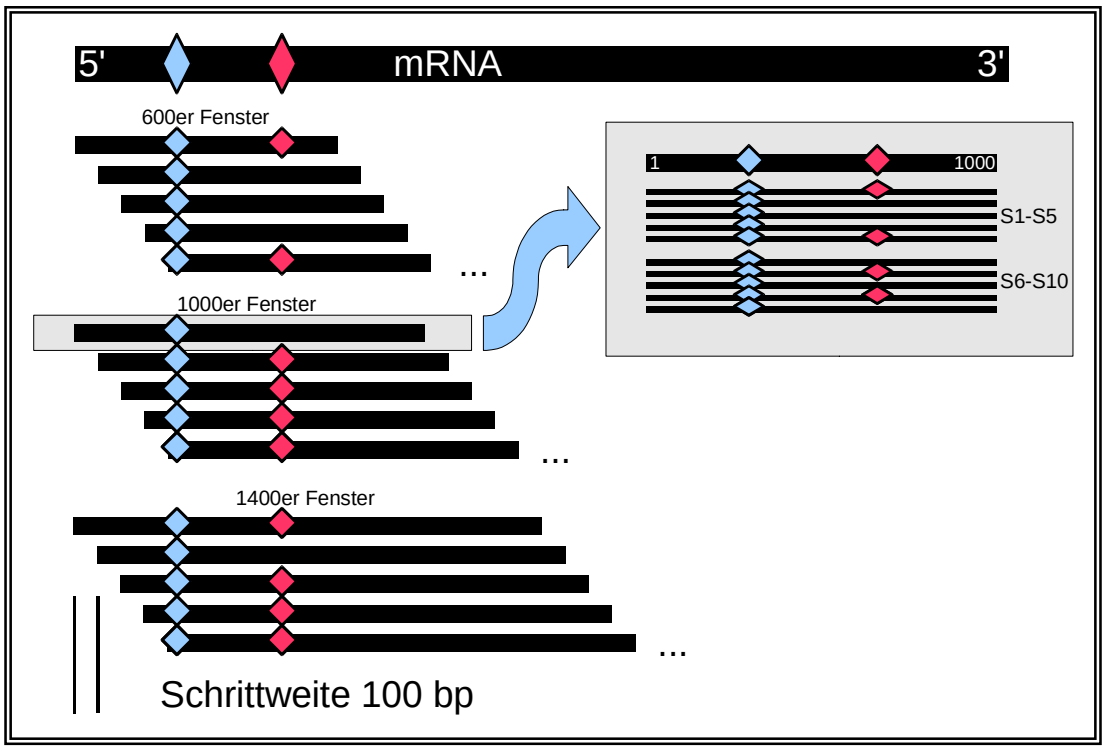

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Leserasters. Die Prädiktion der Sekundärstrukturen erfolgt in Abschnitten, sequentielle Abschnitte in einem konstanten Abstand von 100 bp schließen die gesamte Sequenz ein. In jedem Abschnitt erfolgt die Berechnung der Sekundärstrukturen in den 10 niedrigsten Energieniveaus (S1 – S10). Konsistenz einer Sekundärstruktur (blau), Inkonsistenz (rot).

Wechselwirkungen der beiden Moleküle, unter anderem Basenbindungen, sind für die Stabilisierung des Heteroduplex verantwortlich.

Lange Nukleinsäureketten bilden aufgrund chemischer Eigenschaften und thermodynamischen Grundregeln folgend intramolekulare Bindungen und Sekundärstrukturen aus. Die wichtigsten intramolekularen Bindungen zur Ausbildung dieser Sekundärstrukturen sind Basenpaarbindungen nach dem Watson-Crick-Modell. Kurze Basensequenzen an einer Stelle der Nukleinsäure binden mit komplementären Basensequenzen an anderer Stelle der gleichen Nukleinsäure. So entsteht eine kurze doppelhelikale Struktur.

Das Fehlen einer intramolekularen Bindung ergibt die Möglichkeit, dieser Basensequenz als Zielsequenz für ein Antisense-Oligonukleotid zur Verfügung zu stehen. Somit besteht durch Vorhersage der aus thermodynamischer Sicht wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen der mRNA die Möglichkeit, diese ungepaarten Bereiche zu identifizieren und als Zielbereiche hoher Güte zu definieren. Nicht berücksichtigt werden hierbei Bindungen mit anderen Ribonukleinsäuren oder Proteinen (z.B. Tertiärstrukturen).

In der hier durchgeführten Berechnung wird mit dem Programm MFOLD eine Vorhersage der zehn wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen der Ziel-mRNA durchgeführt. Dies erfolgt durch Bestimmung der Sekundärstrukturen in den zehn niedrigsten Energiestufen. Zeigt sich eine Sequenz, mit einer Mindestlänge von zehn Basen, in acht der zehn niedrigsten Energiestufen (80%) als nicht beteiligt an einer intramolekularen Bindung, ist diese Sequenz als Zielmotiv in die engere Auswahl aufgenommen. Die Analyse der Sekundärstrukturen erfolgt in drei verschiedenen Fensterbreiten. Hiermit ist die Länge des Abschnitts der mRNA bezeichnet, welcher für die Berechnung der Sekundärstrukturen verwendet wurde. Die Fensterbreiten in den Untersuchungen dieser Arbeit betragen 600 nt, 1000 nt und 1400 nt (siehe Abbildung 4).

Nachdem ein Zielmotiv identifiziert ist, erfolgt anhand der Basensequenz des Zielbereichs die Anpassung von homologen Antisense-Oligonukleotiden (siehe Abbildung 5). Hierbei werden die asODN so angepasst, dass jeweils ein Ende der Nukleotidkette im Zielbereich liegt. Aus der Menge an asODN wird eine Auswahl getroffen welche der Untersuchungsreihen zugeführt werden.

3.1.1 Detaildarstellung der einzelnen Motive

In dieser Untersuchung werden vier Zielmotive der mRNA der Matrix Metalloproteinase-2 detailliert untersucht. Kriterien, die ein Zielmotiv erfüllen muss, sind eine Länge von wenigstens 10 Basen sowie das Vorhandensein in wenigstens 8 der 10 niedrigsten Energiestufen. Die Bezeichnung der asODN bildet sich aus der Motivposition und einem Buchstaben.

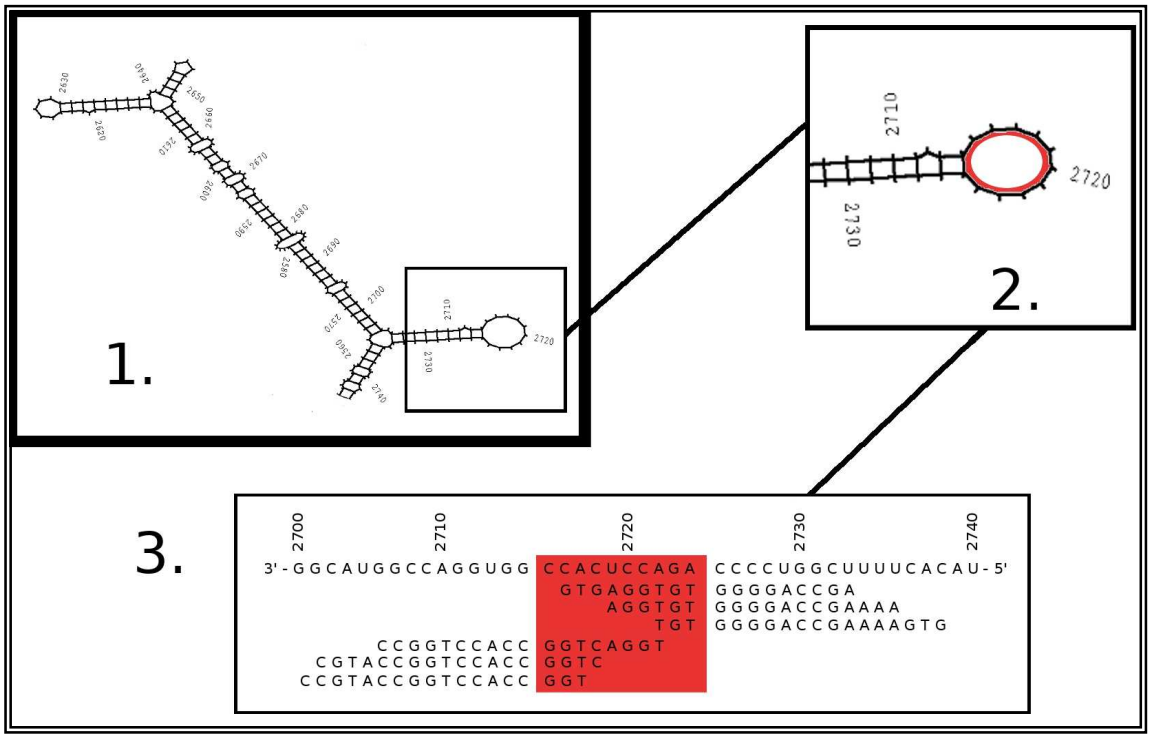

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Anpassung effektiver Antisense-Oligonukleotide am Beispiel des Zielmotivs 2715: Im Ersten Schritt (1.) werden aus den grafischen Darstellungen der Sekundärstruktur die konsistent ungepaarten Bereiche identifiziert. Diese (2.) werden hinsichtlich ihrer Sequenz analysiert und mehrere Antisense-Oligonukleotide vom 3'- und 5'-Ende an den Zielbereich (rot) angepasst.

3.1.1.1.0 Zielmotiv 1 (1284): Position 1284-1293

Das erste Zielmotiv, benannt nach der ersten ungepaarten Base 1284, ist zehn Basen lang und morphologisch einem sogenannten „bulge"-Motiv, also einer Ausbuchtung, zuzuordnen (Abbildung 6a-c). Als Einziges der untersuchten Zielmotive ist das 1284er Motiv in allen untersuchten Fensterbreiten, in denen es vorkommt, gleich konfiguriert. Es handelt sich also um ein zu 100 % konserviertes Motiv. Ein langer helikaler Bereich des Motivs, aus dem die Ausbuchtung hervortritt, wird aus einem 6 Basen langen Abschnitt in 5'-Richtung, nur unterbrochen von einer kurzen ungepaarten Region, gebildet. Weiter in derselben Richtung und ebenso in 3'-Richtung bilden sich einige

kurze Ausbuchtungen, welche von Doppelstrangbindungen mit hoher Stabilität unterbrochen sind.

Das 1284er Motiv selbst ist zu 70 % aus Guanin- und Cytosinbasen aufgebaut, insbesondere die 5'-Region des Zielmotivs besteht aus vier aufeinander folgenden Guanin- oder Cytosinbasen. Die 3'-Region ist im Gegensatz hierzu mit einem 50%igen GC-Gehalt als weniger stabil einzustufen.

Zwei Bereiche sind so nah an der eigentlichen Zielregion, dass sie von einigen Oligonukleotiden mitbetroffen werden. In der 5'-Region der mRNA befindet sich eine konserviert ungepaarte Region. Diese umfasst eine Länge von drei Basen (Position 1275-77). Ferner finden sich im 3'-Bereich ebenfalls Regionen (3 nt und 4 nt lang an Position 1297-1299 bzw. 1304-1307), welche ungepaart in den Energieberechnungen sind. Die Antisense-Oligonukleotide können mit diesen Regionen Heteroduplexbindungen außerhalb der eigentlichen Zielregion ausbilden und so zur Stabilität der Bindung zwischen asODN und mRNA beitragen. Es erhöht sich so die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen, als indirekter Parameter der Bindungsstabilität, zwischen asODN und mRNA.

3.1.1.1.1 Anpassung der asODN im Zielmotiv 1284

Die komplementäre Basensequenz zur mRNA-Sequenz der Matrixmetalloproteinase-2 wird bestimmt. Die Anpassung der asODN erfolgt so, dass jeweils ein Ende des Antisense-Oligonukleotids im Zielbereich zu liegen kommt.

Zusätzlich sollen im Zielmotiv 1284 die in 3'- und 5'-Richtung flankierenden Regionen von einem weiteren asODN mit abgedeckt werden. Das asODN 1284m überspannt die flankierende Region bei Position 1297-1299 sowie die ungepaarte Region bei Position 1304-1307. Da dieses Oligonukleotid die eigentliche Zielsequenz zusätzlich mit abdecken soll, wird es um drei Basen verlängert; es kommt nur durch diese Maßnahme weiterhin mit einem seiner Enden im Zielbereich zum Liegen.

Erste Berechnungen der möglichen Oligonukleotide ergeben für 1284i bei einem GC-Gehalt von 50 % eine Schmelztemperatur von 46,1 °C. Um die Schmelztemperaturen und damit die Versuchsbedingungen aller Antisense-Oligonukleotide in diesem Zielmotiv möglichst homogen zu halten, wird dieses Oligonukleotid um eine Base in seiner 5'-Richtung verlängert. Aufgrund des höheren GC-Gehaltes besitzen die ersten drei asODN dieses Motivs eine höhere Schmelztemperatur. Zudem zeigen sie aufgrund ihrer Sequenz eine geringere Tendenz

zur Ausbildung von Dimerbindungen (Bindung zwischen zwei gleichen asODN) sowie Selbstkomplementbindungen (Bindung innerhalb des asODN mit Ausbildung einer Sekundärstruktur).

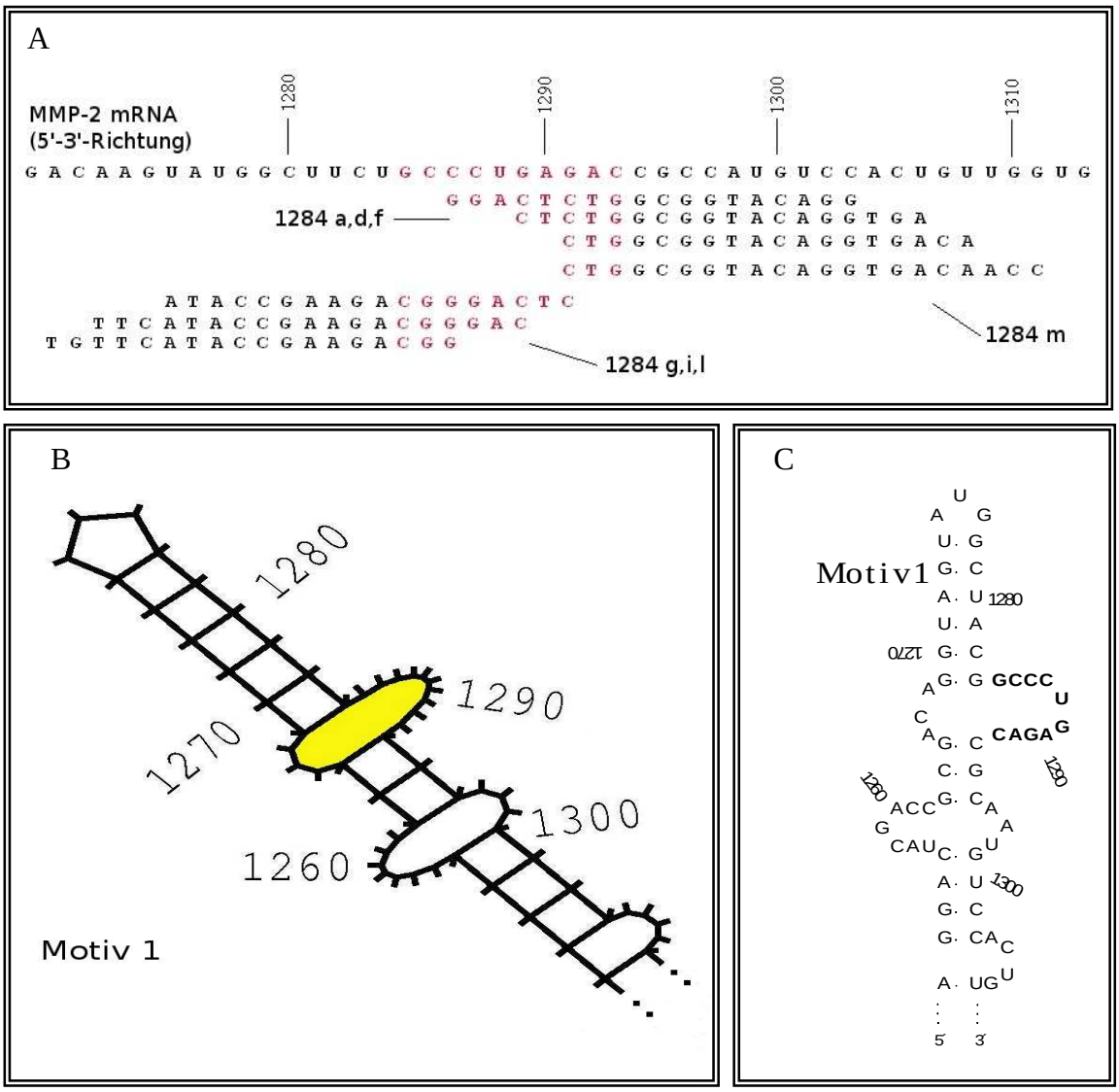

Abbildung 6A: Basensequenzdarstellung des 1284er Motivs sowie der zugehörigen Antisense-Oligonukleotide. mRNA in 5'-3'-Richtung, asODN in 3'-5'-Richtung, ungepaarter Zielbereich ist in rot abgebildet. Bezeichnung der asODN wie in den Ergebnissen in alphabetischer Reihenfolge.
Abbildung 6B-C: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur (B). Farbliche Markierung des ungepaarten Zielbereichs. Basensequenz des Zielmotivs einschließlich des gepaarten Umgebungsbereichs (C, Zielsequenz **fett**)

3.1.1.2.0 Zielmotiv 2 (1689): Position 1689-1699

Das Zielmotiv 1689 ist mit 11 Basen das Längste der untersuchten Motive. Die Sekundärstruktur bildet eine endständige Schleife („terminal loop"). Die Ausbildung dieser Sekundärstruktur wird durch fünf Basen im angrenzenden Bereich in 5'- und 3'-

Richtung gefestigt. Die Basen bilden durch ihre Sequenzhomologie eine feste Bindung und formen so diesen „Hals“ mit dem dazwischen liegenden, ungepaarten Zielmotiv.

Insgesamt kommen in dem 1689iger Zielmotiv zwei verschiedene

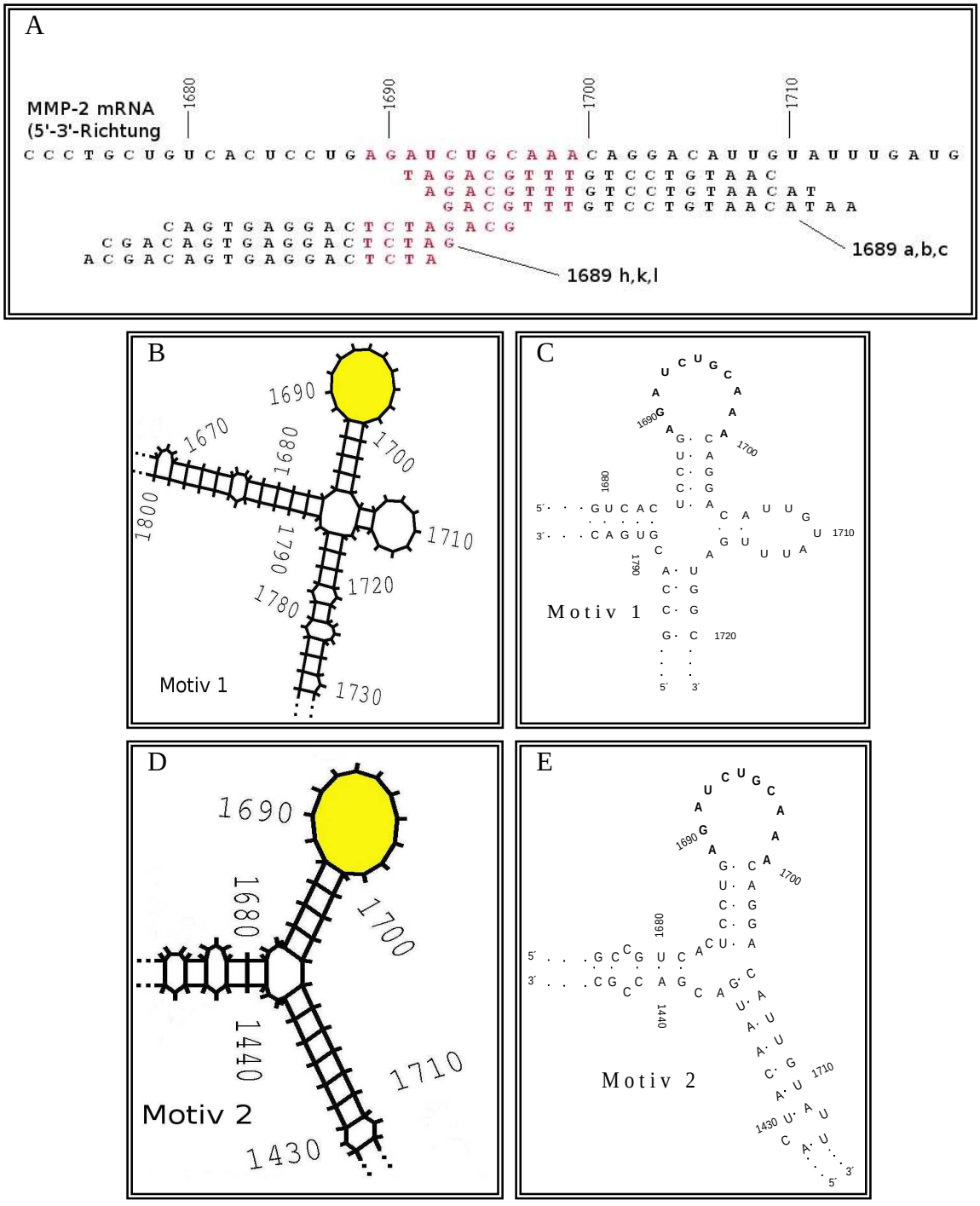

Abbildung 7A: Basensequenzdarstellung des 1689er Motivs sowie der zugehörigen Antisense Oligonukleotide. mRNA in 5’-3’-Richtung, asODN in 3’-5’-Richtung, ungepaarter Zielbereich ist in rot abgebildet. Bezeichnung der asODN wie in den Ergebnissen in alphabetischer Reihenfolge.
Abbildung 7B-E: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur (B,D). Farbliche Markierung des ungepaarten Zielbereichs. Basensequenz des Zielmotivs einschließlich des gepaarten Umgebungsbereichs (C,E, Zielsequenz **fett**)

Sekundärstrukturen vor (siehe Abbildungen 7A-E). Motiv 1 wird dabei aus den Basen 1670-1800 auf einer Gesamtlänge von 130 bp gebildet. Weiter in 3’-Richtung dieser Sekundärstruktur befindet sich eine ungepaarte Region, in welche einige der asODN reichen. Wie im Motiv 1284 kann es hier zu einer Verstärkung der Bindungsfestigkeit kommen.

Motiv 2 ist ungleich komplexer aufgebaut, da die Nukleotide in direkter Nachbarschaft zur Zielsequenz mit der Region um die Position 1440 eine Doppelbindung eingehen. Weitere ungepaarte Sequenzen sind in 5’-Richtung an den Positionen 1682-83 und 1676-78 sowie 1672-1673 festzustellen, in 3’-Richtung werden keine benachbarten ungepaarten Sequenzen in diesem Motiv dargestellt.

Die beiden Motive sind unterschiedlich häufig in den verschiedenen Untersuchungen nach Fensterbreiten verteilt. Im 600er Fenster ist lediglich das Motiv 1 vorhanden. In den Untersuchungen mit 1000er und 1400er Fenster beträgt der Anteil des Motivs 1 94,3% bzw. 96,1%.

Das gesamte Motiv 1689 zeichnet sich, besonders im Vergleich zu den anderen Zielmotiven, durch einen relativ geringen Gehalt an Guanin und Cytosin aus. Lediglich 4 von 11 Basen können 3 Basenpaarbindungen ausbilden. Dies entspricht einem Anteil von 36%.

3.1.1.2.1 Anpassung der asODN im Zielmotiv 1689

Aus dem geringen GC-Gehalt der Zielsequenz im 1689er Motiv resultiert für die Antisense-Oligonukleotide eine geringe Schmelztemperatur. Um diese zu erhöhen und so eine bessere Homogenität der asODN zu erreichen, werden einige asODN um eine bzw. mehre Basen verlängert. Diese Maßnahme ist nur bei den Oligonukleotiden, welche mit ihrem 3’-Ende im Zielbereich liegen nötig (1689a-c). Der Grund ist der angrenzende Bereich in 5’-Richtung, der durch seinen hohen GC-Gehalt zu einer erhöhten Schmelztemperatur führt. Es verbleibt nach Verlängerung der Oligonukleotide eine signifikante Differenz in den Schmelztemperaturen der verschiedenen Motive. So besitzt das Oligonukleotid 1689k die niedrigste Schmelztemperatur aller asODN von 40,6°C bei einer Länge von 19 Basen. Auf die weitere Anpassung wurde bewusst verzichtet.

Die Tendenz einer Selbstbindung der Oligonukleotide ist vergleichbar mit den asODN des 1284er Motivs und innerhalb des 1689er Motivs ausgeglichen verteilt.

Sogenannte Dimerformationen variieren zwischen einer Basenbindung über vier Nukleotide bis über sechs Nukleotide.

3.1.1.3.0 Zielmotiv 3 (2313): Position 2313-2322

Die Zielstruktur 2313 umfasst eine Basenlänge von 10 Basen. Es handelt sich, ebenfalls wie das Motiv 1689, um eine endständige Schleife (siehe Abbildung 8A-E).

Das Zielmotiv 2313 bildet in der Analyse insgesamt drei unterschiedliche Sekundärstrukturen. Hierbei ist das Motiv 3 (Motivstruktur nicht dargestellt) ausschließlich in der Analyse des letzten Fensters (Position 2301-2900) der 600er Analyse vorkommend. Diese dritte Motivstruktur ist als Konsequenz aus der Position nahe dem Ende der Untersuchung als systemische Besonderheit eingestuft worden. Eine genauere Analyse unterbleibt.

Des Weiteren wurden in den Untersuchungen mit den Fensterbreiten von 600, 1000 und 1400 nt zwei Motive gefunden. Die endständige Schleife des Motivs 1 wird gefestigt durch eine intramolekulare Doppelbindung über insgesamt 10 Basenpaare, welche nur durch eine kurze ungepaarte Region (2307-08, 2327) unterbrochen ist. Der Effekt der nur sehr kurzen, zusätzlichen ungepaarten Basen wird von einigen Antisense-Oligonukleotiden dieses Zielmotivs erreicht. Aufgrund der Kürze von nur einer, respektive zwei Basen, ist von einem nur geringen Effekt auszugehen. Erst nach diesen 10 Basenpaaren tritt eine längerstreckige Ausbuchtung in diesem Motiv auf.

Die Basensequenz des 2313er Motivs ist im zweiten Motiv in einer größeren Region ohne intramolekulare Bindungen enthalten. Über insgesamt 25 Basen bildet sich eine große endständige Schleife aus. Durch die Komplementarität der angrenzenden Basen in 5’- und 3’-Richtung entsteht der Hals der Schleife aus sieben Basenpaaren. An den kurzen Bereich von drei ungepaarten Basen weiter in 5’-Richtung ragt keines der untersuchten Antisense-Oligonukleotide heran. Eine mögliche Beeinflussung der Stabilität in der Heteroduplexbildung unterbleibt daher in dieser Analyse.

Die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Sekundärstrukturen des 2313er Zielmotivs ist in den Analysen mit den höheren Fensterbreiten homogen: In allen Analysen des 1000er und 1400er Fensters ist einzig Strukturmotiv 1 nachzuweisen. In der Analyse des 600er Fensters tritt Motiv 2 mit einem Anteil von 3,4% auf. Zudem ist das hier aus oben genannten Gründen nicht gesondert dargestellte Motiv 3 in dieser Fensteranalyse in 15,5% der Darstellungen vertreten.

Der Anteil von Guanin und Cytosinbasen im Zielmotiv beträgt 50%. Die den Zielbereich begrenzenden Regionen in 5’- sowie 3’-Richtung sind GC-reich.

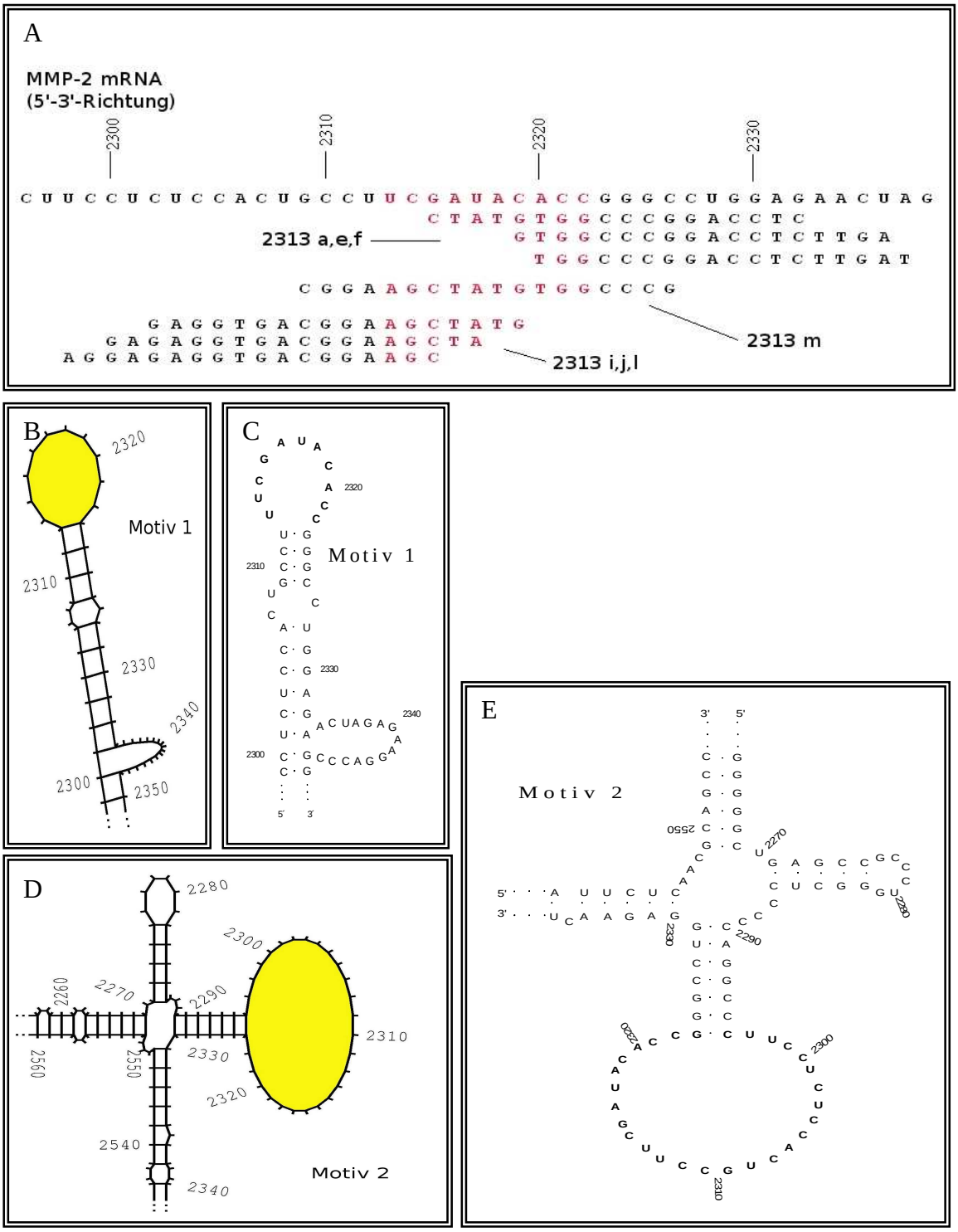

Abbildung 8A: Basensequenzdarstellung des 2313er Motivs sowie der zugehörigen Antisense Oligonukleotide. mRNA in 5'-3'-Richtung, asODN in 3'-5'-Richtung, ungepaarter Zielbereich ist in rot abgebildet. Bezeichnung der asODN wie in den Ergebnissen in alphabetischer Reihenfolge.
Abbildung 8B-E: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur (B,D). Farbliche Markierung des ungepaarten Zielbereichs. Basensequenz des Zielmotivs einschließlich des gepaarten Umgebungsbereichs (C,E, Zielsequenz **fett**)

3.1.1.3.1 Anpassung der asODN im Zielmotiv 2313

In diesem Zielmotiv werden analog zu dem oben beschriebenen Prozedere jeweils drei asODN, von jeder Seite in die Zielsequenz reichend, angepasst. Die Schmelztemperaturen der asODN des Zielmotivs 2313 sind im Vergleich zu den übrigen Zielmotiven überdurchschnittlich hoch. Zudem bilden die asODN sehr geringe Dimer Formationen, dem asODN 2313l fehlt sogar diese geringe Tendenz zur Bildung eines Dimers. Eine Selbstkomplementalität ist in keinem der asODN nachzuweisen. Zusätzlich zu einer Auswahl von je drei Oligonukleotiden, deren Enden jeweils vom 3'- und 5'-Ende in die Zielsequenz reichen, wurde an dieses Motiv ein Oligonukleotid zentrisch an der Zielsequenz angelegt (2313m). Beide Enden des Oligonukleotids liegen in Bereichen, für die eine Doppelstrangbildung vorausgesagt wurde. Mit diesem asODN soll ein möglicher positiver Effekt unter Berücksichtigung der größeren Schleife wie im Motiv 2 speziell untersucht werden.

3.1.1.4.0 Zielmotiv 4 (2715): Position 2715-2724

Das letzte hier untersuchte Zielmotiv besteht aus einer Schleife mit einer Länge von 10 Basen. Die unmittelbare Nachbarschaft des Zielmotivs in 5'- und 3'-Richtung bildet einen Hals aus neun Basenpaaren mit einer einzelnen ungepaarten Base in 5'-Richtung (siehe Abb. 9; Position 2712). Dieser Hals kommt in allen beobachteten Motiven vor, der weitere Verlauf ist allerdings überaus unterschiedlich. Insgesamt fünf unterschiedliche Sekundärstrukturen sind an diesem Zielmotiv darstellbar. Allen Sekundärstrukturen ist ein, sich dem Hals anschließender Bereich mit ungepaarten Basen gemein. Die Anzahl der ungepaarten Basen differiert deutlich.

Da sich im 3'-Bereich der MMP-2-mRNA eine Folge von fünf Pyrimidinbasen befindet und es korrespondierend im Antisense-Oligonukleotid zu fünf aufeinanderfolgenden Purinbasen (5'-AGGGG-3') kommen würde, erfolgte hier ein Ausschluss der entsprechenden Oligonukleotide. Eine Abfolge von vier und mehr Purinen, sogenannte Tetraplexe, wurden in vorangegangenen Untersuchungen stets von der Untersuchung ausgenommen, da unspezifische Effekte durch Proteininteraktionen beobachtet werden (Benimetskaya et al., 1997). Somit stellt eine solche Formation eine Unsicherheit im Verhalten der asODN dar. Aus diesem Grund erfolgte an diesem Zielmotiv nur das Einpassen der asODN vom 5'-Ende der mRNA.

Das letzte der untersuchten Motive bildet noch in einer weiteren Hinsicht eine Ausnahme. Die Analyse des 1400er Fenster konnte kein signifikantes Vorkommen des

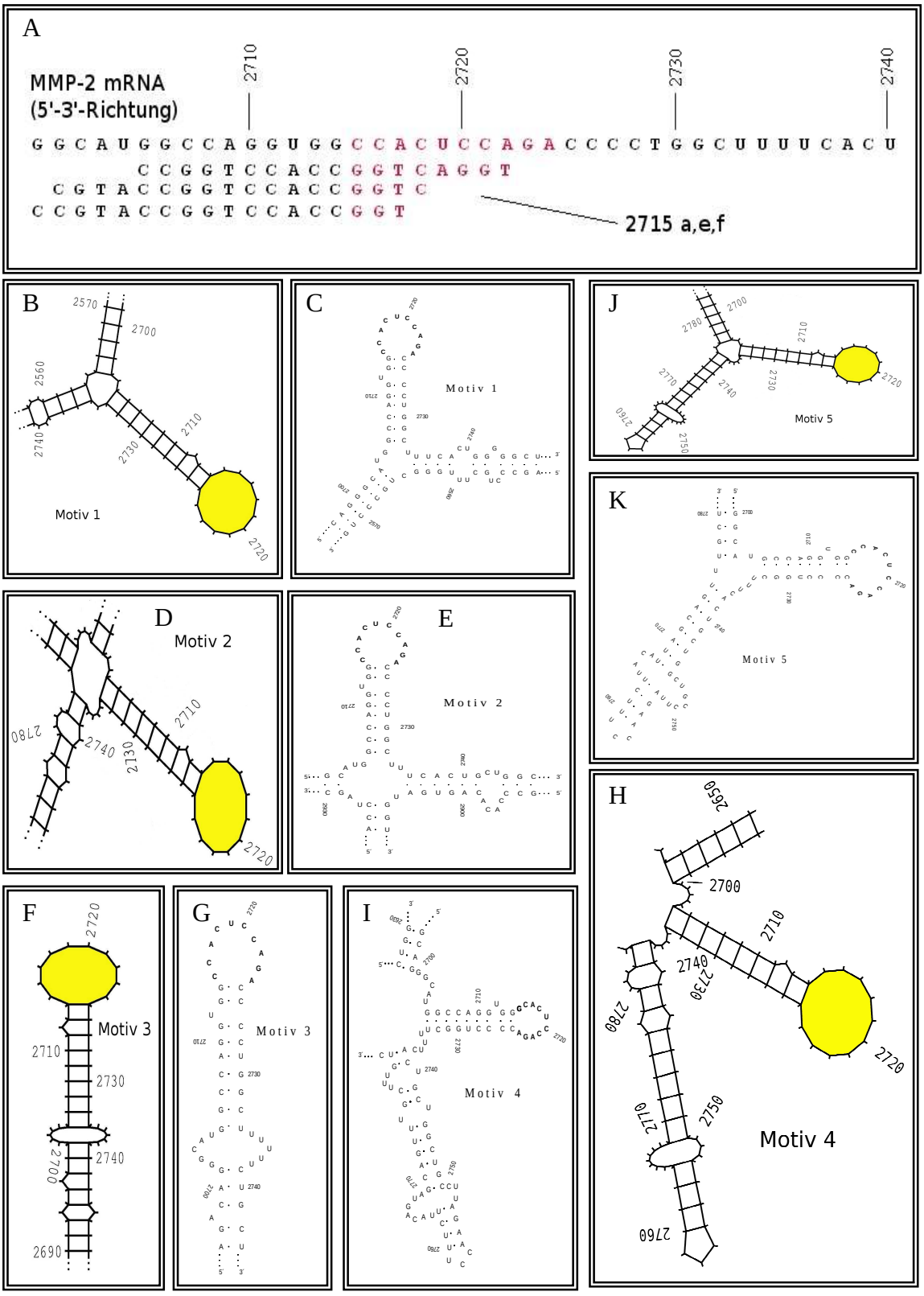

Abbildung 9A: Basensequenzdarstellung des 2715er Motivs sowie der zugehörigen Antisense Oligonukleotide. mRNA in 5'-3'-Richtung, asODN in 3'-5'-Richtung, ungepaarter Zielbereich ist in rot abgebildet. Bezeichnung der asODN wie in den Ergebnissen in alphabetischer Reihenfolge.
Abbildung 9B-K: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur (B,D,F,H,J). Farbliche Markierung des ungepaarten Zielbereichs. Basensequenz des Zielmotivs einschließlich des gepaarten Umgebungsbereichs (C,E,G,I,K, Zielsequenz **fett**)

Motivs nachweisen. Lediglich in insgesamt 12 von 40 möglichen Energieebenen konnte in dieser Untersuchung ein ungepaarter Bereich, wie in den anderen Untersuchungen, gefunden werden. Auch in der Untersuchung der 1000er Fensterbreite konnte im Fenster 1900-2900 kein Treffer im Sinne der Auswahlkriterien gefunden werden. Trotz der Ergebnisse wurde dieses Motiv experimentell getestet, insbesondere aufgrund der Tatsache einer sehr hohen Konsistenz in der Untersuchung mit einer Fensterbreite von 600 bp. Eine weitere Besonderheit stellt der hohe GC-Gehalt im 5'-Bereich der Zielsequenz dar.

3.1.1.4.1 Anpassung der asODN im Zielmotiv 2715

Die Anzahl der untersuchten Antisense-Oligonukleotide des Zielmotivs 2715 ist aufgrund der oben dargestellten strukturellen Besonderheit (Tetraplexe) auf drei reduziert. Alle asODN sind so an die Zielsequenz angepasst, dass sie mit ihrem 5'-Ende im Zielbereich enden. Hierbei ist das asODN 2715a mit 8 Nukleotiden im voraussaglich ungepaarten Zielbereich, 2715f mit 3 Nukleotiden. Zugleich sind sie, im Vergleich mit den asODN der übrigen Zielmotive, die asODN mit dem höchsten GC-Gehalt und der höchsten Schmelztemperatur. Hieraus leitet sich die konstante Länge der asODN ab, alle Antisense-Oligonukleotide dieses Motivs sind 18 bp lang. Die Oligonukleotide dieses Motivs zeichnen sich zudem durch eine hohe Tendenz zur Dimer- sowie Selbstkomplementbindung aus.

3.1.1.5.0 Zielmotiv 5 (AUG):

Das AUG-Motiv bildet eine Ausnahme von der Regel mit der in dieser Arbeit die Optimierung der Vorhersage effektiver asODN erfolgen sollte (s. Kapitel I.1.3.3). Die drei Antisense-Oligonukleotide, welche gegen das Startcodon gerichtet sind, sollen über einen sekundärstrukturunabhängigen Mechanismus eine Reduktion der Menge an MMP-2-mRNA erreichen. Eine besondere Anpassung der asODN war nicht nötig. Besonderheiten in den Sekundärstrukturen der verschiedenen Fensterbreiten entfallen in dieser Analyse.

3.2 Optimierung der Zellkulturuntersuchungen

Die antisensevermittelte relative Reduktion einer mRNA ist von vielen Faktoren abhängig. Neben dem Einfluss der Sekundärstruktur der mRNA auf die Wirksamkeit der asODN beeinflussen chemische Besonderheiten der Transfektion die Ergebnisse.

Zum Einen kann die Konzentration des asODN-Lipofectamingemisches in der Zellkultur toxische Effekte auslösen und zum ungerichteten Zelluntergang führen. Die Regenerationszeit, als Zeitraum nach Abnahme der asODN-Lösung von der Zellkultur bis zur Zelllyse, bestimmt zum Anderen die Einwirkzeit der asODN, als auch den zeitlichen Rahmen von zelluläreren Kompensationsmechanismen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit sind an Zellen in Zellkultur durchgeführt worden (*in vitro*). Ein Teil der Effekte werden in Untersuchungen *in vivo* nicht in gleichem Ausmaß festzustellen sein.

In einem Vorversuch wurden zur Optimierung der beiden Faktoren Regenerationszeit und Konzentration der asODN eine Scramble-Kontrolle (sc2313) sowie zwei Antisense-Oligonukleotide (1284D, 2313E) und eine Lipofectin-Kontolle ohne Oligonukleotid (LIPO ohne) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (Endkonzentration: 200 nM, 400 nM) sowie drei unterschiedlichen Regenerationszeiten (8h, 20h, 32h) untersucht. Bewertet wurden lichtmikroskopische Eindrücke der Zellen inklusive eines Vitalitätstests mit Trypanblau (Vergleiche 2.4.1 bis 2.4.3). Die Ergebnisse dieses Vorversuches wurden zur Optimierung der Hauptuntersuchungen verwandt. Die Reduktion der toxischen Effekte sowie die Optimierung der Expositionszeit sind die Ziele dieser Untersuchungen.

3.2.1 Ergebnisse der Konzentrations- und Zeitabhängigkeiten

Nach einer Regenerationszeit von 8 Stunden ist eine Zellkonfluenz in den 12-well Schalen von ca. 80 % erreicht. Weniger als 1 % der Zellen sind abgerundet oder vom Untergrund abgelöst. Auch eine Anfärbbarkeit mit Trypanblau konnte ebenso nur bei unter 1 % der Zellen beobachtet werden. Die Färbung des Mediums ist gleichbleibend in allen Proben.

Nach 20 Stunden Regeneration erreichen alle Proben eine nahezu 100 %-ige Konfluenz. Weniger als 10 % der Zellen zeigen Abrundungen der äußeren Membran oder sind vom Untergrund der Kulturflasche abgelöst. Die gleichen Ergebnisse liefert die Trypanblaufärbung. Wie auch in den Proben, mit einer Regenerationszeit von 8 Stunden, ist eine signifikante Verfärbung des Mediums nicht zu beobachten.

Nach 32 Stunden Regenerationszeit zeigt sich das Wachstumsmedium (DMEM, 10 % FKS) deutlich verfärbt. Die deutlichste Verfärbung ist in den Proben ohne Antisense-Oligonukleotid (LIPO ohne) nachweisbar. Der Indikator Phenolrot, welcher in dem Medium enthalten ist, verfärbt sich von einem blass roten Ausgangston zu einem blass gelben Farbton. Dies ist der Nachweis einer Erniedrigung des pH-Wertes. Die Azidose entsteht vor allem durch Stoffwechselprodukte, welche im Rahmen einer

langen Wachstumsphase anfallen. Die Konfluenz der Zellen ist, im Vergleich zu den Untersuchungen mit geringeren Regenerationszeiten, deutlich auf das Niveau der 8 Stunden-Werte rückläufig. Mikroskopisch sind vermehrt abgelöste, abgerundete Zellen in den Proben nachweisbar. Die Anzahl abgestorbener Zellen, ermittelt mit der Trypanblaufärbung, ist gegenüber den Untersuchungen mit geringeren Regenerationszeiten erhöht.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse sowie unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Agrawal *et al.*, 1991; Dean *et al.*, 1994) wurde für die anstehenden Hauptuntersuchungen eine Regenerationszeit von 20 Stunden sowie eine Endkonzentration der Antisense-Oligonukleotide von 200 nM gewählt. Die Expositionszeit in der die Antisense-Oligonukleotide auf die Zellen gebracht wird, ist auf 4 Stunden festgelegt. In den genannten Arbeiten konnte eine mittlere Wirksamkeit von phosphothioat-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden (PTO-asODN) *in vitro* und *in vivo* (im Organismus Maus) von 24 bis 48 Stunden ermittelt werden.

3.3 Anteiliges Auftreten der Sekundärstrukturen in der Analyse differierender Fensterbreiten

Die Analyse der thermodynamischen Eigenschaften von linearen Nukleinsäuren wird unter anderem von intramolekularen Bindungen bestimmt. Durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Purin- und Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren entsteht eine sequenzabhängige Stabilität. In einer linearen Nukleotidkette kann die Ausbildung einer intramolekularen Bindung zwischen entfernten Bereichen mit komplementärer Sequenz zu erhöhter Stabilität führen. Hierbei bilden sich durch die intramolekularen Bindungen komplexe Strukturen, sogenannte Sekundärstrukturen aus. Die Stabilität der Sekundärstrukturen ist unter anderem von der Anzahl der intramolekularen Bindungen abhängig. Zudem lässt sich die Stabilität berechnen. Diese Berechnung, welche auf dem Prinzip „nearest neighbor“ basieren, erlauben den Vergleich der Stabilität unterschiedlicher Sekundärstrukturen. Eine Reihenfolge der, aus thermodynamischer Sicht, wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen lässt sich erstellen.

In diesen Berechnungen wird die Struktur mit der festesten intramolekularen Bindung als, aus thermodynamischer Sicht, am wahrscheinlichsten angesehen. Dies basiert auf den Grundsätzen der Thermodynamik, nach denen alle Stoffe ein Minimum an freier Energie erreichen wollen.

600er Fenster, Rastergröße 100 bp										
			1284		1689		2313		2715	
Position			S1-S10	S1-S5	S1-S10	S1-S5	S1-S10	S1-S5	S1-S10	S1-S5
701	bis	1300	0%	0%						
801	bis	1400	40%	60%						
901	bis	1500	80%	100%						
1001	bis	1600	90%	100%						
1101	bis	1700	90%	100%	0%	0%				
1201	bis	1800	90%	80%	60%	100%				
1301	bis	1900			100%	100%				
1401	bis	2000			80%	100%				
1501	bis	2100			100%	100%				
1601	bis	2200			100%	100%				
1701	bis	2300								
1801	bis	2400					100%	100%		
1901	bis	2500					100%	100%		
2001	bis	2600					100%	100%		
2101	bis	2700					80%	100%		
2201	bis	2800					100%	100%	90%	100%
2301	bis	2900					90%	100%	100%	100%
2401	bis	3000							100%	100%
2501	bis	3069							100%	100%
Mittelwert:			**65%**	**73%**	**73%**	**83%**	**95%**	**100%**	**98%**	**100%**

Tabelle 1: Übersicht der Verfügbarkeit der vier Motive (1284, 1689, 2313 und 2715) im 600er Fenster. Darstellung der Gesamtwahrscheinlichkeiten in den fünf (S1-S5) bzw. zehn (S1-S10) niedrigsten Energieebenen. Wahrscheinlichkeit nicht an einer intramolekularen Bindung beteiligt zu sein dargestellt (ungepaart).

In einer komplexgeformten Nukleinsäure können die Bereiche, die nicht an einer intramolekularen Bindung beteiligt sind, abgeleitet werden. Umfassen diese Bereiche eine gewisse Größe, zeigen sie sich als Zielmotive für eine antisense-vermittelte Therapie prädestiniert. Das Fehlen einer intramolekularen Bindung macht es wahrscheinlich, dass der Bereich zur Heteroduplexbindung zwischen Nukleinsäure und asODN zur Verfügung steht. Liegt keine intramolekulare Bindung im Zielbereich vor, ist das Zielmotiv „verfügbar“.

Lineare, einzelsträngige Nukleinsäuren, wie z.B. messenger-RNA, sind meist viele tausend Basen lang. Da die intramolekularen Bindungsmöglichkeiten mit der Länge der Nukleinsäuren ansteigen, sind die Berechnung der wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen mit zunehmender Länge der untersuchten Nukleinsäure aufwendig. Aus diesem Grund wird bei der Analyse von Nukleotidketten ein Abschnitt nach dem anderen analysiert. Typischerweise werden, einem Raster ähnlich, unterschiedlicher

1000er Fenster, Rastergröße 100 bp											
			1284		**1689**		**2313**		**2715**	
Position			S1-S10	S1-S5	S1-S10	S1-S5	S1-S10	S1-S5	S1-S10	S1-S5
301	bis	1300	0%	0%						
401	bis	1400	80%	80%						
501	bis	1500	90%	100%						
601	bis	1600	60%	40%						
701	bis	1700	40%	20%	0%	0%				
801	bis	1800	60%	80%	100%	100%				
901	bis	1900	70%	80%	100%	100%				
1001	bis	2000	90%	80%	90%	100%				
1101	bis	2100	80%	80%	100%	100%				
1201	bis	2200	60%	60%	100%	100%				
1301	bis	2300			100%	100%				
1401	bis	2400			90%	100%	100%	100%		
1501	bis	2500			100%	100%	100%	100%		
1601	bis	2600			100%	100%	100%	100%		
1701	bis	2700					100%	100%		
1801	bis	2800					100%	100%	70%	100%
1901	bis	2900					90%	100%	90%	100%
2001	bis	3000					90%	100%	80%	100%
2101	bis	3069					100%	100%	100%	100%
Mittelwert:			**63%**	**62%**	**88%**	**90%**	**98%**	**100%**	**85%**	**100%**

Tabelle 2: Übersicht der Verfügbarkeit der vier Motive (1284, 1689, 2313 und 2715) im 1000er Fenster. Darstellung der Gesamtwahrscheinlichkeiten in den fünf (S1-S5) bzw. zehn (S1-S10) niedrigsten Energieebenen. Wahrscheinlichkeit nicht an einer intramolekularen Bindung beteiligt zu sein dargestellt (ungepaart).

Größe im Abstand von jeweils 100 Basen über die Gesamtlänge der Nukleinsäure verschoben und analysiert. In jedem dieser Fenster werden die Sekundärstrukturen in den zehn niedrigsten Energiestufen berechnet. Erst in einer Metaanalyse der gewonnenen Daten erfolgt die Vorhersage der wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen (Vergleiche Abbildung 4).

Die Analyse der Sekundärstrukturen umfasst ausschließlich den Einfluss intramolekularer Bindungen. Einflüsse zwischen unterschiedlichen Nukleinsäuren führten zur Ausbildung von Tertiärstrukturen, welche in ihrer Analyse von der Zusammensetzung des jeweiligen biologischen Systems abhängen. Daher ist einer Bestimmung im Sinne der hier durchgeführten Untersuchungen nicht möglich.

1400er Fenster, Rastergröße 100 bp										
			1284		**1689**		**2313**		**2715**	
Position			S1-S10	S1-S5	S1-S10	S1-S5	S1-S10	S1-S5	S1-S10	S1-S5
1	bis	1400	30%	40%						
101	bis	1500	90%	100%						
201	bis	1600	80%	100%						
301	bis	1700	90%	100%	0%	0%				
401	bis	1800	70%	100%	90%	100%				
501	bis	1900	70%	80%	100%	100%				
601	bis	2000	20%	0%	100%	100%				
701	bis	2100	40%	20%	100%	100%				
801	bis	2200	60%	20%	100%	100%				
901	bis	2300	90%	100%	90%	100%				
1001	bis	2400	90%	100%	100%	100%	100%	100%		
1101	bis	2500	60%	80%	100%	100%	100%	100%		
1201	bis	2600	90%	80%	90%	100%	100%	100%		
1301	bis	2700			100%	100%	100%	100%		
1401	bis	2800					90%	80%	0%	10%
1501	bis	2900					90%	100%	50%	40%
1601	bis	3000					90%	100%	40%	40%
1701	bis	3069					90%	100%	0%	20%
Mittelwert:			**68%**	**71%**	**88%**	**91%**	**95%**	**98%**	**23%**	**28%**

Tabelle 3: Übersicht der Verfügbarkeit der vier Motive (1284, 1689, 2313 und 2715) im 1400er Fenster. Darstellung der Gesamtwahrscheinlichkeiten in den fünf (S1-S5) bzw. zehn (S1-S10) niedrigsten Energieebenen. Wahrscheinlichkeit nicht an einer intramolekularen Bindung beteiligt zu sein dargestellt (ungepaart).

3.3.1 Unterschiede im Auftreten der Zielmotive in den einzelnen Fensterbreiten

Die Prädiktion der Sekundärstruktur einer Nukleinsäure ist für die optimierte Auswahl wirksamer Antisense-Oligonukleotide bedeutend. Die sichere Bestimmung der Sekundärstruktur *in vivo* ist zur Zeit mit vertretbarem Aufwand nicht möglich. Durch oben beschriebene Algorithmen kann die Prädiktion der Sekundärstruktur optimiert werden, um so eine Näherung der *in vivo*-Struktur zu erreichen. Es werden in diesen

Berechnungen einzelne Abschnitte der Nukleinsäure getrennt und nacheinander analysiert. Durch eine überlappende, rasterartige Untersuchung entsteht eine Prädiktion der Sekundärstrukturen der gesamten Nukleinsäure. Zudem erfolgte die Untersuchung in drei unterschiedlichen Rasterbreiten (600, 1000 und 1400 bp).

3.3.1.1 Quantitatives Auftreten der Sekundärstruktur 1284

Die Sekundärstruktur des Zielmotivs 1284 tritt in allen drei Analysen mit unterschiedlicher Fensterbreite konstant häufig auf. In den niedrigsten fünf Energieebenen (S1-S5) zeigt sich ein prozentuales Auftreten zwischen 62% und 73%. In der Betrachtung der zehn niedrigsten Energiestufen tritt das Strukturmotiv 1284 in 63% bis 68% der Fälle auf.

3.3.1.2 Quantitatives Auftreten der Sekundärstruktur 1689

Das Auftreten des 1689er Motivs ist mit ansteigender Fensterbreite erhöht. Zeigte sich in der Analyse der Sekundärstruktur in den fünf niedrigsten Energieebenen im 600er Fenster ein Auftreten von 83%, ist dies in der Analyse des 1400er Fensters 91%. Gleichartig sind die Ergebnisse unter Betrachtung der zehn niedrigsten Energieebenen (S1-S10). Auffallend in der Analyse dieses Strukturmotivs ist der Unterschied in den ersten Abschnitten der Rasteranalyse zu den übrigen Abschnitten eines jeden Fensters. So zeigt sich in der Analyse mit einer Fensterbreite von 1000 bp im ersten Raster (betrachtet werden die Basenposition 701 bis 1700) kein Auftreten der Sekundärstruktur 1689. In allen weiteren Analysen dieser Untersuchung tritt das Strukturmotiv mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% auf (Analyse in den niedrigsten fünf Energieebenen S1-S5). Ursächlich hierfür könnte die Tatsache sein, dass der Zielbereich (Position 1689-1699) zu nah an der Positionsgrenze liegt. Es erscheint somit nicht sinnvoll die Analyse dieser Sekundärstrukturposition im Raster 701-1700 durchzuführen. (Weitere Ausführungen siehe Kapitel IV.8)

3.3.1.3 Quantitatives Auftreten der Sekundärstruktur 2313

Das 2313er Strukturmotiv zeichnet sich durch ein hohes Auftreten in allen untersuchten Fensterbreiten aus. Bei Betrachtung der niedrigsten fünf Energielebenen (S1-S5) ist das Motiv in der Analyse im 600er und 1000er Fenster in allen möglichen Einzelanalysen vorhanden (100%). In der Analyse mit einer Fensterbreite von 1400 Basen ist in der Analyse der Position 1401-2800 das Motiv nur zu 80% vorhanden.

Hieraus resultiert in der Analyse des 1400er Fensters ein Gesamtvorkommen der 2313 Motivs zu 98%.

In den Analysen der zehn niedrigsten Energieebenen (S1-S10) kann eine hohe Wahrscheinlichkeit in allen drei Untersuchungen nachgewiesen werden. Die Gesamtwahrscheinlichkeit des Motivs 2313 beträgt in der Analyse des 600er Fensters sowie des 1400er Fensters 95%, in der Analyse des 1000er Fensters 98%.

3.3.1.4 Quantitatives Auftreten der Sekundärstruktur 2715

Das Motiv 2715 nimmt in der Analyse, durch seine Nähe zum Ende der mRNA, stets eine Sonderstellung ein. Die mRNA der MMP-2 besteht aus 3069 Basen, das Motiv 2715 ist somit weniger als 400 Basen von dem 5'-Ende der mRNA entfernt. Hieraus resultiert in allen Fenstern eine geringere Analysezahl als in den Analysen der anderen Motive. In allen hier untersuchten Fensterbreiten (600, 1000, 1400) ergeben sich vier Analysen mit Sekundärstrukturen der jeweils zehn niedrigsten Energiestufen.

In der Analyse mit einer Fensterbreite von 600 bp tritt das Zielmotiv 2715 im Vergleich mit den weiteren drei Zielmotiven am Häufigsten auf. In allen Analysen unter Berücksichtigung der fünf niedrigsten Energiestufen (S1-S5) sowie in 98% der Analysen unter Berücksichtigung der zehn niedrigsten Energiestufen (S1-S10), ist der Zielbereich 2715 ungepaart. Mit ansteigender Fensterbreite wird die Ausprägung dieses Zielmotivs geringer. Zunächst zeigt sich nur eine Reduktion in der Betrachtung der zehn niedrigsten Energiestufen (S1-S10, 1000er Fenster), in der Analyse im 1400er Fenster ist das Zielmotiv nur noch in 28% (S1-S5), respektive 25% (S1-S10) der Analysen vorhanden.

3.4 Wirksamkeitsanalyse unter Berücksichtigung der Motivzugehörigkeit

Als direktes Maß der Effektivität eines Antisense-Oligonukleotids gilt die Relative Reduktion, gemessen auf Transkriptionsebene. Die Relation besteht hierbei im direkten Vergleich zur mRNA eines konstant synthetisierten Proteins. Ab welchem Wert ein Oligonukleotid als wirksam oder nicht wirksam bezeichnet werden kann, ist nicht genau zu definieren. In den hier dargestellten Untersuchungen soll bei einer relativen Reduktion von über 50% eine Wirksamkeit angenommen werden.

3.4.1 Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide des 1284er Motivs

Die in diesem Motiv untersuchten asODN zeigen insgesamt nur eine mäßige Wirksamkeit. Unter Einbeziehung der Standardabweichungen zeigt einzig das

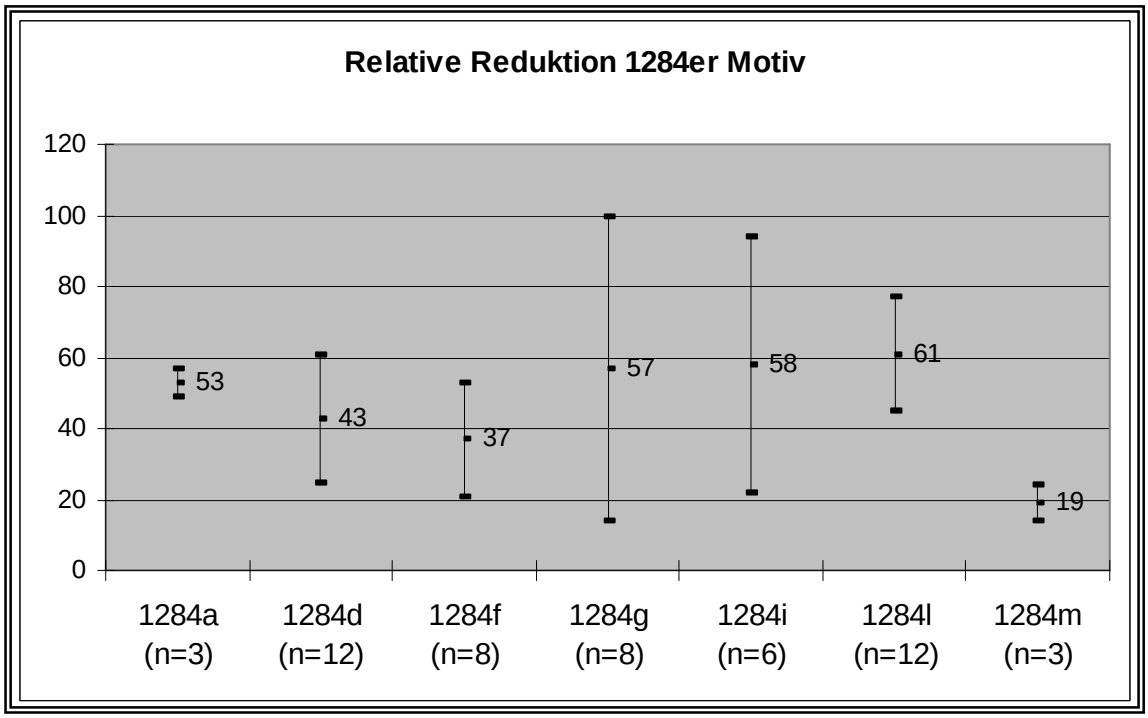

Abbildung 10: Relative Reduktion der MMP-2 mRNA durch die Antisense-Oligonukleotide des 1284er Motivs. Dargestellt sind die Mittelwerte der Versuchsergebnisse des jeweiligen asODN (numerische Darstellung) sowie die Standardabweichung

Oligonukleotid 1284m eine signifikante relative Reduktion. Dieses Antisense-Oligonukleotide war am 5'-Ende verlängert worden um sicher zwei benachbarte Regionen zu erreichen. Diese beiden sehr kurzen Abschnitte mit ebenfalls ungepaarter Struktur befinden sich an den Positionen 1297-1299 und 1304-1307 der MMP-2-mRNA. Da als besondere Eigenschaft dieses Motivs nur eine Sekundärstruktur in den computer-assistierten Voraussagen vorkommt, konnte hier der Versuch unternommen werden, mit dem asODN 1284m ein um drei Nukleotide verlängertes Oligonukleotid auf seine Wirksamkeit hin zu überprüfen. Dieses Antisense-Oligonukleotid nimmt aufgrund der Länge und erhöhten Schmelztemperatur eine Sonderstellung ein. Durch die verlängerte Sequenz ist eine höhere Festigkeit der Duplexbindung zu erwarten. Dies zeigt sich in den Δ-G Werten, welches die Energieunterschiede zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand beschreibt. Gleichzeitig bleibt die Tendenz zur Dimerformation aufgrund der Nukleotidsequenz, im Vergleich zu anderen asODN in diesem Motiv, konstant.

Die asODN 1284d und 1284f sind formal ebenfalls als wirksam einzustufen. Eine relative Reduktion auf Transkriptionsebene wird erreicht, allerdings sind beide Standardabweichungen zu hoch um unter die geforderten 50%-Marke zu kommen. Diese durch unterschiedliche Versuchsergebnisse hervorgerufenen Werte bilden ein Abbild der Streuung (siehe Diskussion Kapitel IV).

3.4.2 Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide des 1689er Motivs

Das zweite hier dargestellte Motiv hat als Besonderheit nicht nur den im Durchschnitt geringsten prozentualen GC-Gehalt, sondern stellt sich ebenfalls durch eine sehr konstant hohe Wirksamkeit dar. Fast alle Oligonukleotide dieses Motivs erreichen die geforderten 50% Relative Reduktion. Lediglich das Oligonukleotid 1689l erreicht diese Signifikanz nicht. Ein Zusammenhang zwischen dem GC-Gehalt kann in

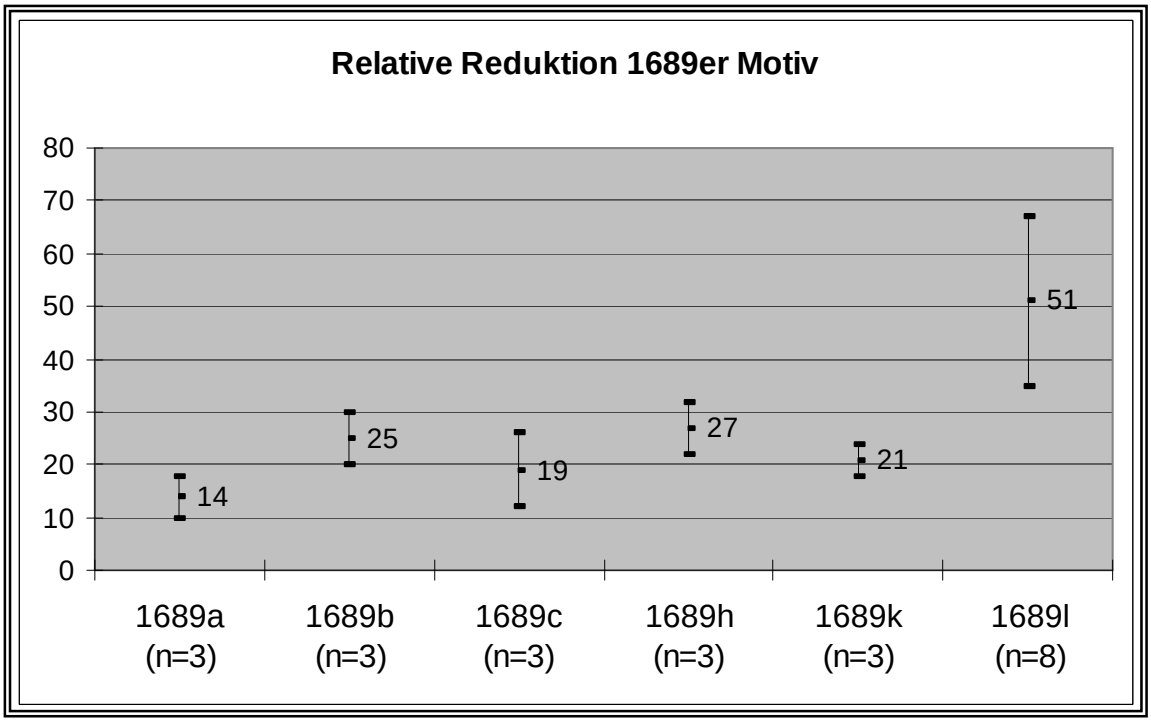

Abbildung 11: Relative Reduktion der MMP-2 mRNA durch die Antisense-Oligonukleotide des 1689er Motivs. Dargestellt sind die Mittelwerte der Versuchsergebnisse des jeweiligen asODN (numerische Darstellung) sowie die Standardabweichung

dieser Versuchsreihe nicht deutlich abgelesen werden. Sowohl die Oligonukleotide mit dem höchsten GC-Gehalt (1689h und 1689k, beide 55%), als auch das Oligonukleotid mit dem geringsten GC-Gehalt (1689c), zeigen eine ausreichende Wirksamkeit. Die Antisense-Oligonukleotide dieses Motivs bilden in den durchgeführten

Untersuchungen, im Vergleich zu den übrigen Motiven, die asODN mit den niedrigsten Schmelztemperaturen. Das verwundert nicht besonders ob der Tatsache, dass ein relativ niedriger Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen diesen Oligonukleotiden gemein ist. Somit lässt sich für die motivinterne Betrachtung kein Unterschied zwischen ausreichender und nicht ausreichender Wirksamkeit in Beziehung mit der Schmelztemperatur ausdrücken.

3.4.3 Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide des 2313er Motivs

Mit einer Wirksamkeit von vier aus sieben der in diesem Motiv getesteten Oligonukleotiden fällt dieses Motiv nicht sonderlich erfolgreich in der Betrachtung auf. Dabei fällt unter Berücksichtigung der Standardabweichung ein weiteres der

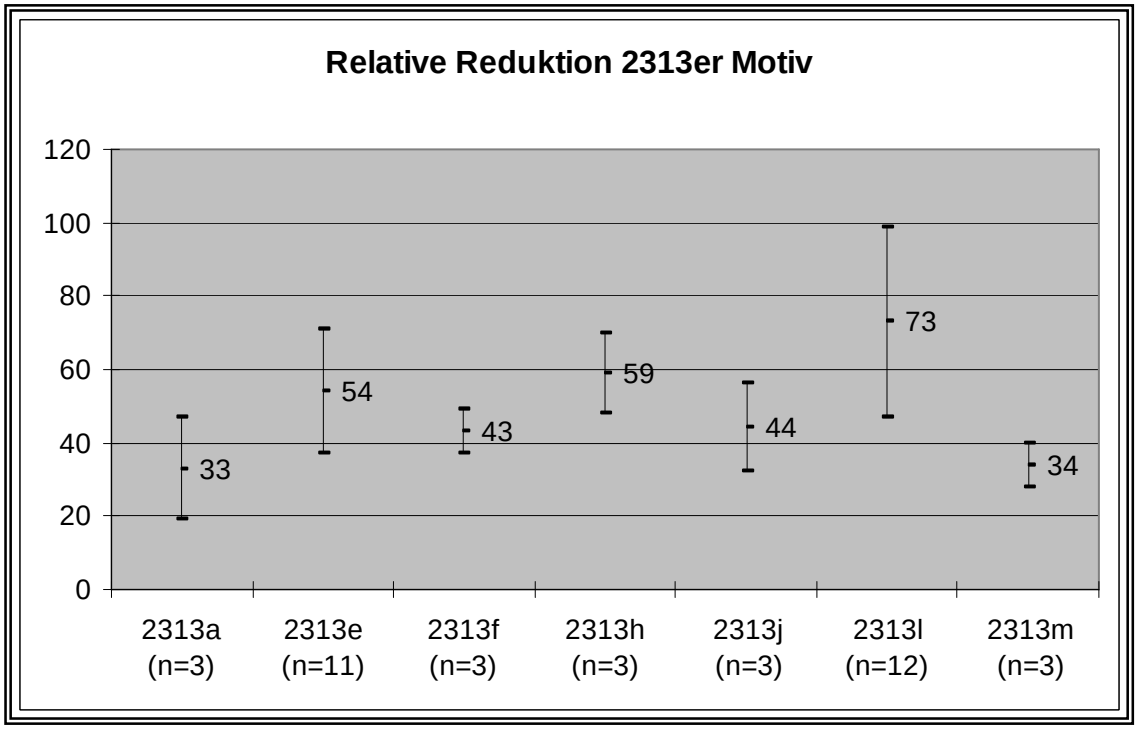

Abbildung 12: Relative Reduktion der MMP-2 mRNA durch die Antisense-Oligonukleotide des 2313er Motivs. Dargestellt sind die Mittelwerte der Versuchsergebnisse des jeweiligen asODN (numerische Darstellung) sowie die Standardabweichung

untersuchten Nukleotide unter die geforderten 50% Relative Reduktion des Genprodukts. Lediglich die Antisense-Oligonukleotide 2313a, 2313f und 2313m zeigen in den Untersuchungen bei genauerer Betrachtung eine ausreichende Wirkung. Hierbei ist auffällig, dass alle diese Motive einen GC-Gehalt von über 60 % haben. Ebenso sind auch unter den nicht wirksamen asODN zwei mit einem gleich hohen GC-Gehalt. Deutlich ist allerdings die Tatsache, dass unter den nichtwirksamen Oligonukleotiden

auch jene mit dem niedrigsten GC-Gehalt liegen (2313h, 2313j). Wie schon in dem 1284iger Motiv ist hier wieder eine deutliche Wirksamkeit eines verlängerten Oligonukleotids mit einer Umspannung des favorisierten Bereichs festzustellen (2313m). Dieses Oligonukleotid zeichnet sich ebenso durch einen hohen GC-Gehalt von über 65 % aus.

Ein klarer linearer Zusammenhang zwischen der errechneten Schmelztemperatur und der Wirksamkeit der in diesem Motiv untersuchten Antisense-Oligonukleotide ist nicht abzuleiten. Während das schon erwähnte 2313m Motiv mit der besten Reduktion der MMP-2 RNA die höchste Schmelztemperatur hat, ist das asODN 2313e mit der zweithöchsten Schmelztemperatur nicht in der Lage, die geforderten 50% Relative Reduktion zu erreichen. Die drei weiteren nicht signifikant wirksamen Oligonukleotide zeigen allesamt die geringsten Schmelztemperaturen dieses Motivs (44,7°C bis 50,6°C).

3.4.4 Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide des 2715er Motivs

Aufgrund der oben erwähnten strukturellen Besonderheit (Kapitel 3.1.1.4.0), konnten Antisense-Oligonukleotide nur von einer Seite an die Zielsequenz dieses Zielmotivs angepasst werden. So reduzierte sich die Anzahl der untersuchen Oligonukleotide auf die Hälfte. Besonders an diesen drei Oligonukleotiden ist der

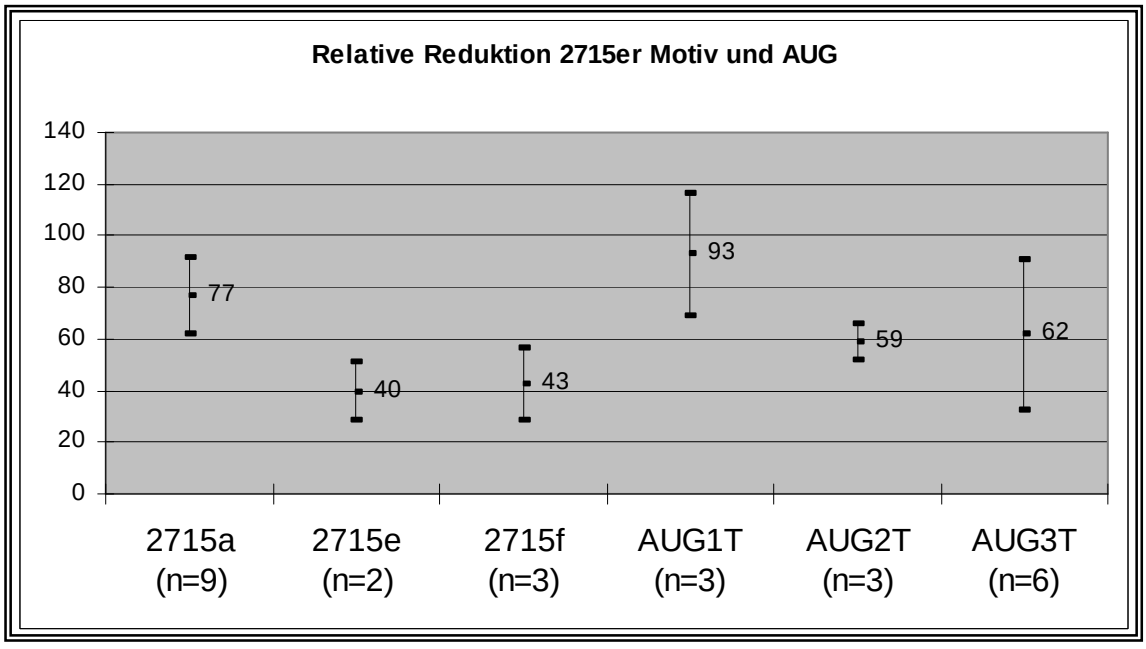

Abbildung 13: Relative Reduktion der MMP-2 mRNA durch die Antisense-Oligonukleotide des 2715er Motivs sowie der gegen die Initiationssequenz AUG gerichteten asODN. Dargestellt sind die Mittelwerte der Versuchsergebnisse des jeweiligen asODN (numerische Darstellung) sowie die Standardabweichung

höchste Anteil von Guanin-Cytosin-Basen in allen untersuchten Oligonukleotiden (72%). Die Relative Reduktion stellt sich hier, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, als nicht ausreichend dar. Die asODN 2715e und 2715f zeigen eine Relative Reduktion, welche unter Berücksichtigung der Standardabweichung, die signifikante Hemmung nur um wenige Punkte verpassen.

Besonderheiten ergeben sich im Hinblick auf die untersuchte Schmelztemperatur in diesem Motiv. Alle drei Oligonukleotide zeigen eine hohe Schmelztemperatur von 58,8°C bis 62,1°C. Die Schmelztemperaturen dieses Motivs sind, im Vergleich mit denen der anderen Motive, die höchsten.

3.4.5 Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide des AUG-Motivs

Die drei untersuchten Oligonukleotide des AUG-Motivs (AUG1T, AUG2T, AUG3T) haben, wie oben dargestellt, in der hier durchgeführten Untersuchungsreihe eine Sonderstellung. Nach der theoretischen Überlegung eines alternativen Weges der Minderung des Genproduktes durch sterische Behinderung der Translation am Ribosom, wird auf mRNA-Ebene keine Reduktion des Genproduktes erwartet. Allerdings ist ein mRNA-Oligonukleotidheteroduplex, wie er auch in diesem Fall gebildet wird, Substrat für die RNase H. Somit kann aufgrund dieses Mechanismus mit einer Reduktion des Genproduktes, auf mRNA-Ebene gemessen, gerechnet werden. Demgegenüber kann eine beabsichtigte Reduktion des Genproduktes durch sterische Behinderung am Ort der Translation nur auf einer höheren Ebene (Proteinebene) gemessen werden. Die Untersuchung der Proteinebene erfolgte in den hier vorliegenden Versuchen nicht.

Eine signifikante Reduktion des Genproduktes ist in den hier vorliegenden Ergebnissen auf mRNA-Ebene nicht festzustellen. Unter Einschluss der Standardabweichung kommt eine Reduktion unter die geforderten 50 % nicht vor. Das Oligonukleotid AUG-3T verfehlt diese Marke allerdings nur um wenige Prozentpunkte.

3.5 Wirksamkeitsanalyse unter spezieller Berücksichtigung des GC-Gehalts

Der GC-Gehalt einer Nukleinsäurenkette ist ein direktes Maß für ihre Stabilität. In einer Doppelhelix bilden besonders benachbarte GC-Basenpaare durch Wechselwirkungen stabilisierende Wirkungen auf den Nukleinsäuredoppelstrang aus. Diese Effekte basieren nur zu einem Teil auf der Anzahl der

Wasserstoffbrückenbindungen, welche sich zwischen den gegenüberliegenden Basen bilden. Der, aus thermodynamischer Sicht, größere Anteil wird durch Stapelwechselwirkungen beigetragen (Yakovchuk et al., 2006).

Die Effektivität eines asODN ist nicht allein in der Stabilität ihrer Bindung zum Zielstrang begründet. Allerdings kann die Stabilität, und somit der GC-Gehalt, eines asODN für einen Teil der Effektivität verantwortlich gemacht werden. In den hier untersuchten asODN zeigten sich vor allem asODN mit einem niedrigen GC-Gehalt als besonders effektiv. Dieser Effekt resultiert vordringlich aus der guten Wirksamkeit der asODN aus dem 1689 Motiv. Die drei asODN mit dem geringsten GC-Gehalt aller hier untersuchten Oligonukleotide (1689b, 1689c, 1689a), zeigen eine sehr gute Wirksamkeit. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine gleichmäßige Verteilung der asODN unter Berücksichtigung von GC-Gehalt und Effektivität zu verzeichnen ist. Zwei asODN mit einem GC-Gehalt von 66 % sowie zwei asODN mit einem GC-Gehalt von 55 % gehören zu den effektivsten Antisense-Oligonukleotiden (2313a und 2313m, 1689h und 1689k).

3.6 Wirksamkeitsanalyse unter spezieller Berücksichtigung der Schmelztemperatur

Die Untersuchungsergebnisse unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur sind den Ergebnissen unter Berücksichtigung des GC-Gehalts vergleichbar. Die Berechnung der Schmelztemperatur nach Wallace basiert auf der Verteilung der unterschiedlichen Basen (Wallace *et al.*, 1979). Hierbei resultiert aus einem hohen Anteil an Guanin und Cytosin eine hohe Schmelztemperatur. Eine direkte Abhängigkeit besteht somit zwischen diesen beiden Eigenschaften der asODN. Große Unterschiede in der Effektivitätsanalyse GC-Gehalt/Schmelztemperatur bleiben aus.

Es ergibt sich bei der Betrachtung der Effektivitäten, unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur, ebenfalls eine hohe Wirksamkeit der asODN mit der niedrigsten Schmelztemperatur. Die asODN 1689 a-c sind von den untersuchten asODN die Oligonukleotide mit der geringsten Schmelztemperatur (50 bzw. 52 °C) und zeigen zeitgleich einen hohen Effekt. Außerdem zeigen einige effektive asODN, wie 2313a und 2313m, hohe Schmelztemperaturen, weitere asODN, wie 1689h und 1689k, haben bei relativ geringer Schmelztemperatur eine hohe Effektivität. Das längste Antisense-Oligonukleotid 1284m zeigt bei hoher Schmelztemperatur und niedrigem GC-Gehalt eine hohe Effektivität.

Die Antisense-Oligonukleotide des 2715er Motivs sind mit den höchsten Schmelztemperaturen verbunden. Sie zeigen eine mäßige Wirksamkeit, welche z.T. im Bereich der signifikanten Hemmung liegen (2715e, 2715f)

3.7 Wirksamkeitsanalyse unter Berücksichtigung spezieller Sequenzmotive

Wie in der Einleitung beschrieben, besteht ein Zusammenhang zwischen kurzen Sequenzmotiven und einer besseren bzw. schlechteren Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden („good“ und „bad motifs“). Metaanalysen sowie Registerauswertungen konnten eine statistisch signifikante Korrelation bestimmter Sequenzmotive nachweisen (Matveeva et al., 2000). Hierbei handelt es sich um nachträgliche Analysen großer experimenteller Daten, welche mit phosphorothioat-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden erhoben wurden. In den hier vorgenommenen Untersuchungen sind Antisense-Oligonukleotide derselben chemischen Modifikation wie in der Metaanalyse verwendet worden.

Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Wirksamkeit der asODN sowie dem Auftreten u.a. der Sequenzen CCAC, TCCC, ACTC, CCA und CTCT (jeweils in 5’-3’-Richtung). Zudem zeigte sich eine inverse Korrelation der Sequenzmotive GGGG, ACTG, TAA, CCGG und AAA. Der signifikante Effekt der jeweiligen Sequenzmotive auf die Wirksamkeit ist ursächlich nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden Effektivitätsänderungen der RNase H, sequenzabhängige Änderungen in der Kinetik der Aufnahme der Antisense-Oligonukleotide sowie Beeinflussung der Stabilität der Heteroduplexbindung (asODN-mRNA).

In den Oligonukleotiden 2313a, 2313e, 2313f und 2313m des 2313er Motivs befindet sich das Sequenzmotiv CCGG. Dieses wurde zuvor als signifikant mit einer inversen Korrelation hinsichtlich der Wirksamkeit identifiziert. Insbesondere der Effekt dieses Sequenzmotivs ließ sich allerdings zuvor nicht immer reproduzieren.

Ein negativer Effekt auf die Wirksamkeit kann hier nicht nachgewiesen werden. Die genannten asODN zeigten eine durchschnittliche Wirksamkeit von 41 %, im Gegensatz zu einer durchschnittlichen Wirksamkeit der übrigen asODN dieses Motivs von 58 %. Dieser Vergleich basiert allerdings nur auf den speziellen Sequenzmotiven ohne Berücksichtigung der übrigen Eigenschaften der Antisense-Oligonukleotide.

Die asODN des Motivs 2715 zeigten alle das Sequenzmotiv CCAC, welches in oben genannter Metaanalyse mit einer erhöhten Wirksamkeit korreliert wurde.

Aufgrund des konsistenten Auftretens in allen asODN dieses Motivs kann ein Vergleich innerhalb des gleichen Motivs nicht erfolgen. Es zeigt sich bei der Betrachtung aller getesteten asODN eine relativ geringe Wirksamkeit der asODN des 2715er Motivs.

Das asODN 2715a beinhaltet zudem die Sequenz ACTG, welche als „bad motif“ identifiziert wurde. Es zeigte sich eine reduzierte Wirksamkeit dieses asODN (Relative Reduktion 77±15%) im Vergleich zu den beiden weiteren Antisense-Oligonukleotiden dieses Motivs Relative Reduktion 40±11% bzw. 44±13%).

4. Diskussion

Antisense-Oligonukleotide sind eine effiziente Möglichkeit der sequenzspezifischen Hemmung eines Genproduktes. In den hier durchgeführten Untersuchungen sind für das Genprodukt Matrix-Metalloproteinase-2 Antisense-Oligonukleotide entworfen und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit experimentell getestet worden. Es ergeben sich aus den Ergebnissen Optimierungsmöglichkeiten hinsichtlich der Prädiktion effektiver asODN für zukünftige Experimente. Diese sollten im Folgenden dargestellt werden.

Die Versuche dieser Untersuchungen umfassen insgesamt 23 asODN, gerichtet gegen vier verschiedenen Abschnitte der MMP-2 mRNA . Diese sind über die gesamte Länge der mRNA der MMP-2 verteilt und entsprechend ihrer Position bezeichnet (1284, 1689, 2313 und 2715). Eine effektive Relative Reduktion *in vitro*, bezogen auf das „house-keeping-Gen“ GAPDH, wurde bei 39% der asODN nachgewiesen. Eine grenzwertig effektive Relative Reduktion (Reduktion auf unter 50%, STABW nicht berücksichtigt) wurde in weiteren 22 % der asODN erreicht, 39% der asODN zeigten keine Effektivität. Die Versuchsergebnisse zeigen somit eine erfolgreiche Relative Reduktion.

Durch die computer-assistierte Identifikation lokaler Sekundärstrukturen und der Ableitung von Motiven von hoher Güte besteht die Möglichkeit die Trefferquote effektiver asODN zu verbessern. Das hier benutzte System der vorexperimentellen Analyse zur Verbesserung der Trefferquote und somit Reduktion des Zeit- und Kostenaufwands ist stabil und erfolgreich. Hierbei zeigen sich jedoch Unterschiede im Vergleich der einzelnen Motive. Die asODN des 1689er Motivs sind in 83 % der Fälle effektiv, im Motiv 2313 sind 43 % (bzw. 67 % bei Missachtung der Standardabweichung) der asODN effektiv. Antisense-Oligonukleotide dieser beiden Motive sind im Durchschnitt effektiver als asODN, die gegen die Motive 1284 und 2715 gerichtet sind. Ziel einer präexperimentellen Analyse sollte die Identifikation dieser beiden Motive als zu favorisierende Ziele sein. Die aus diesen Ergebnissen abzuleitenden Optimierungen werden nachfolgend vorgestellt. Zunächst werden mögliche Einflüsse der Effektivität im einzelnen diskutiert.

Bezüglich der Wirksamkeit von Antisense-Nukleinsäuren gibt es im Hinblick auf die Stabilität der Bindung zwischen asODN und mRNA, abgeleitet z.B. durch den GC-Gehalt und die Schmelztemperatur, wichtige Unterschiede zwischen doppelsträngigen und einzelsträngigen Antisense Molekülen (siRNA, asODN). So

zeigten Lu und Mathews (Lu und Mathews, 2008) eine verbesserte Wirksamkeit von asODN mit hoher Stabilität. Für doppelsträngige Antisense Agenzien (siRNA) konnte eine verbesserte Wirksamkeit in Bereichen geringer Stabilität nachgewiesen werden. Begründet wird diese Beobachtung möglicherweise damit dass ein geringer GC-Gehalt und eine abzuleitende niedrige Stabilität bei siRNA-Molekülen den Energieaufwand für das Entwinden des Doppelstrangs senkt. Dies würde einer geringeren Bedeutung der Stabilität zwischen Antisense Agens und mRNA im Vergleich mit dem Energieaufwand bedeuten. Die Untersuchungsergebnisse der hier vorliegenden Versuche zeigen eine erhöhte Wirksamkeit von asODN mit niedrigem GC-Gehalt, respektive niedriger Duplexstabilität. Dieses Ergebnis kommt vor allem durch die gute Wirksamkeit der asODN des 1689er Motivs zustande. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen an asODN. Somit kann, aufgrund der hier beobachteten Ergebnisse, die Überlegenheit des Einflusses der Sekundärstruktur und Verfügbarkeit des Zielmotivs, gegenüber der Stabilität des Heteroduplexes, bezüglich der Effektivität angenommen werden.

Die vorhergesagten Sekundärstrukturen von zwei der vier Zielmotive ließen die Möglichkeit jeweils eines einzelnen, verlängerten Antisense-Oligonukleotids erfolgversprechend erscheinen. Hierbei bleiben unspezifische Effekte infolge der Länge der Oligonukleotidkette wie z.B. erhöhte Schmelztemperaturen unberücksichtigt.

Das Antisense-Oligonukleotid 1284m des Motivs 1284 wurde im Vergleich zu den regulären asODN um drei Basen, auf eine Gesamtlänge von 21 Basen, verlängert. Die war als erfolgversprechend angesehen worden, da in 3’-Richtung der mRNA ab Position 1304 eine weitere, voraussaglich ungepaarte Region von vier Basen vorliegt. Zudem basiert diese Überlegung auf der Annahme einer singulären Sekundärstruktur als Besonderheit dieses Motivs (siehe Kapitel 3.1.1.1.0). Durch die Verlängerung des asODN 1284m wird diese Region mitbetroffen. Die Anzahl und Position der Basen im Zielbereich ist gleich dem des asODN 1284f.

Das asODN 2313m aus dem 2313er Motiv ist mit 18 Basen in der Länge nicht different zu den übrigen asODN. Abweichend von den übrigen asODN erfolgt die Anpassung an den Zielbereich allerdings in der Mitte des asODN. Die Enden der Nukleotidkette sind nicht im Zielbereich. Dies erfolgt aufgrund der Motivstruktur 2 dieses Motivs, in der eine größere endständige Schleife angenommen wird. Zudem konnte in vorangegangenen Arbeiten einer Steigerung der Wirksamkeit in Motiven mit mehreren Motivstrukturen dargestellt werden (Kretschmer-Kazemi Far *et al.*, 2005).

Beide asODN zeigen eine gute Wirksamkeit (Relative Reduktion: 1284m 19±5, 2313m 34±6). Somit kann formal die jeweilige Überlegung, die zum Einschluss dieser ungewöhnlichen asODN führte, als zielführend angenommen werden. Über die Bedeutung der Ursache ist in dieser numerisch kleinen Analyse keine sichere Einordnung möglich. Beide asODN zeichnen sich durch eine feste Bindung respektive hohen GC-Gehalt aus. Zudem ist die Verlängerung des Antisense-Oligonukleotids 1284m ebenfalls mit einer höheren Anzahl der Basenpaarbindungen vergesellschaftet.

Statistische Untersuchungen einiger Arbeitsgruppen konnten in der Vergangenheit zeigen, dass bestimmte kurze Nukleotidsequenzen in den Antisense-Oligonukleotiden mit einer veränderten Wirksamkeit korrelieren. So konnte eine Arbeitsgruppe um Matveeva (Matveeva *et al.*, 2000) anhand von Datenbanken mit Untersuchungsergebnissen aus über 1000 Experimenten eine signifikante Korrelation zwischen verschiedenen Sequenzen mit einer Länge bis zu 4 Basen und einer erhöhten bzw. verringerten Effektivität nachweisen. Die Ursache der zuvor beobachteten Korrelation zwischen einzelnen Sequenzmotiven und der Wirksamkeit ihrer asODN ist unklar. Diskutiert werden sequenzspezifische Effekte auf die Wirksamkeit der RNase H als Enzym, welches für die Degradation der mRNA im Heteroduplex verantwortlich ist. Zudem wird ein Effekt auf die Aufnahme der asODN in die Zelle anhand sequenzspezifischer Eigenheiten diskutiert. Ferner wird eine höhere Stabilität GC-reicher Sequenzmotive als Ursache der verbesserten Antisense Wirksamkeit angenommen.

In den hier durchgeführten Untersuchungen an der mRNA der Matrix-Metallo-proteinase-2 konnten die beschriebenen Korrelationen nur zum Teil nachgewiesen werden. Das Sequenzmotiv CCGG ist in den hier untersuchten asODN mehrfach vorhanden. In der oben beschriebenen Registerauswertung zeigte sich eine negative Korrelation dieses Sequenzmotivs. Diese Korrelation ließ sich allerdings nur in zwei von drei Datenmengen nachweisen und ist insgesamt schwach signifikant und von geringer Potenz. Im 2313er Motiv bildet sich in insgesamt vier Antisense-Oligonukleotiden (2313a, 2313e, 2313f und 2313m) diese Sequenz ab. Eine negative Korrelation lässt sich hier nicht nachweisen. In der Motiv-Internen Analyse lässt sich eher eine geringe Tendenz zu einer besseren Wirksamkeit dieser asODN ableiten.

Das Sequenzmotiv CCAC korreliert mit einer verbesserten Wirksamkeit hoch signifikant. Dieses Sequenzmotiv tritt in den hier untersuchten asODN ausschließlich im Motiv 2715 auf. Die Sequenz CCAC ist in allen drei asODN dieses Motivs

vorhanden. Es kann somit bei möglicher gleichsinniger Veränderung der Wirksamkeit kein Rückschluss auf einen isolierten Effekt des Sequenzmotivs gezogen werden. Außerdem ist anzumerken, dass im Motiv 2715 gewisse Limitationen hinsichtlich Effektivität und Prädiktion der Sekundärstrukturen existieren. Diese resultieren vordringlich aus der unmittelbaren Nähe zum Ende der mRNA (Vergleiche Kapitel 3.1.1.4.0). Es verbleibt somit eine Unsicherheit hinsichtlich der Ergebnisse der in diesem Motiv getesteten asODN. Die Wertigkeit der Ergebnisse insgesamt sowie die Wertigkeit des Sequenzmotivs CCAC speziell kann somit nicht sicher eingestuft werden.

Im Sequenzmotiv ACTG findet sich ein hoch potenter Prädiktor reduzierter, Antisense-vermittelter Wirksamkeit. Einzig das asODN 2715a weist dieses Sequenzmotiv auf, der negative Effekt hinsichtlich der Antisense-Wirksamkeit kann im Vergleich mit den übrigen asODN dieses Motivs nachgewiesen werden.

Der Umfang der Untersuchung von Matveeva (Matveeva *et al.*, 2000) ist im Vergleich zu den wenigen Antisense-Oligonukleotiden der hier durchgeführten Experimente überlegen. So kann hier theoretisch nur eine Bestätigung oder der fehlenden Nachweis der Ergebnisse geliefert werden. Zudem ist zu bemerken, dass in dieser Untersuchung die Verfügbarkeit der Zielmotive anhand von Untersuchungen zur Sekundärstruktur den Schwerpunkt bildete. Der Vergleich dieser beiden Wege zur Verbesserung der Prädiktion effektiver Antisense-Oligonukleotide kann hier nicht erfolgen. Solche vergleichende Untersuchungen fehlen und würden aufgrund der zum Teil schwachen Effekte große, zeit- und kostenintensive Experimente erfordern. Es ist durchaus zu vermuten, dass beide Optimierungen zur Verbesserung der Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden, gemeinsam eingesetzt, eine weitere Verbesserung der Prädiktion effektiver asODN erreichen können.

Anhand der hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse können Verbesserungen für nachfolgende Untersuchungen mit asODN postuliert werden. Die hier untersuchte Nukleinsäure (mRNA der humanen MMP-2) besitzt eine Länge von ca. 3100 Basen. In der retrospektiven Analyse zeigt sich, von den hier untersuchten Motiven, dass das Motiv 1689 die besten Ergebnisse, gemessen als Relative Reduktion, erzielt. Die Prädiktion dieses Motivs ist in der Untersuchung mittels der mFOLD-Suite mit einer Fensterbreite von 1000 Basen und in den zehn niedrigsten Energiestufen am höchsten. Diese Fensterbreite ist in dieser Untersuchung als zu favorisierende zu bezeichnen.

Nachfolgend bleiben die Fensterbreite 1400er als gut und die 600er Breite als mäßig gut zu bezeichnen.

Die Ergebnisse in den fünf niedrigsten Energiestufen (S1-S5) machen eine Wirksamkeitsprognose schwierig. Sowohl in der Analyse im 600er und 1000er Fenster sind die Motive 1689 und 2313 zu 100% vorhanden. Es ergibt sich ausschließlich im 1400er Fenster ein geringeres Vorhandensein des ineffektiveren 2313er Motivs in der Analyse.

In der Arbeit von Kretschmer-Kazemi Far (Kretschmer-Kazemi Far *et al.*, 2005) konnte eine Überlegenheit der 1000er Fensterbreite ebenfalls nachgewiesen werden. Mit der Annahme der 50%igen Prädiktion war die Analyse in dieser Fensterbreite allen anderen überlegen. Als Einschränkung wurde dort jedoch das Motiv mit der besten Relativen Reduktion isoliert im 600er Fenster nachgewiesen.

Weitere theoretische Optimierungsmöglichkeiten bestehen in der Reduktion der Schrittweite, mit der das Raster über die zu untersuchende mRNA verschoben wird. Dadurch ergäbe sich eine größere Datenmenge und so eine möglicherweise bessere Näherung an die *in vivo* Verhältnisse. Der Einfluss einer geringeren Schrittweite wurde von der Arbeitsgruppe Kretschmer-Kazemi Far in oben genannter Publikation nicht nachgewiesen.

Nukleinsäuren bilden durch intramolekulare Wechselwirkungen Sekundärstrukturen aus. Hieraus resultieren kurze Abschnitte, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an einer intramolekularen Bindung beteiligt sind, also ungepaart sind. Diese Abschnitte (Motive) bilden favorisierte Ziele für eine sequenzspezifische Degradation durch einen Antisense-vermittelten Mechanismus, möglicherweise aufgrund der leichteren Ausbildung eines Heteroduplexes zwischen mRNA und asODN.

Die Prädiktion der Sekundärstrukturen und somit der Ziel-Motive kann schnell computergestützt durch Algorithmen durchgeführt werden. In der hier verwendeten Methode, werden nach dem Prinzip der Energieminimierung alle theoretisch möglichen Sekundärstrukturen einer Nukleinsäure berechnet. In einem zweiten Schritt wird anhand dieser eine Reihenfolge der Sekundärstrukturen nach absteigender Wahrscheinlichkeit erstellt. Hierbei werden ausschließlich intramolekulare Bindungen berücksichtigt. Wechselwirkungen mit anderen Ribonukleinsäuren oder Proteinen in der Zelle unterbleiben. Die Analyse der Nukleinsäuren erfolgt zudem in als Fenster definierten Ausschnitten. Hieraus ergibt sich eine reduzierte Validität der Prädiktion. Die Analyse

kann nur ein Modell zur Bestimmung der Sekundärstrukturen anbieten, die zellulären Zustände können hiervon deutlich abweichen.

Jede Analyse berechnet die zehn wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen im definierten Fenster. Je größer das Fenster definiert ist, desto größer ist der Anteil an berücksichtigten Basen. Im Fall der Berücksichtigung der gesamten Nukleinsäure ergäbe sich somit lediglich zehn zu analysierende Sekundärstrukturen. Handelte es sich um eine Analyse mit höchster Genauigkeit, wäre dies als einfachste und beste Analysemethode zu postulieren. Da es einen nicht näher bekannten Unterschied zwischen Prädiktion von Sekundärstrukturen und tatsächlicher Konformation gibt, erfolgt die Analyse von Teilen der Nukleinsäuren, den Fenstern. Werden diese Fenster sequentiell über die gesamte Nukleinsäure verschoben ergibt sich hieraus eine Datenmenge, welche die gesamte Nukleinsäure berücksichtigt.

Die Analyse in großen Fenstern berücksichtigt einen prozentual größeren Anteil der Basen. Hieraus resultiert eine höhere Wahrscheinlichkeit in der Prädiktion von Sekundärstrukturen. Solche Sekundärstrukturen, welche aus intramolekularen Bindungen mit entfernten Anteilen der mRNA entstehen, werden mit zunehmender Fenstergröße berücksichtigt. Die Anzahl an prädiktierten Sekundärstrukturen nimmt mit der Fenstergröße allerdings ab. Die Datenmenge aus der die Analyse erfolgt, reduziert sich. Hieraus kann eine geringere Qualität der Analyse resultieren. Dieser Effekt tritt bei Betrachtung längerer Nukleinsäuren in den Hintergrund, da er auf einer Reduktion der Analysen am Ende der Nukleinsäure beruht.

Die Analyse mit kleineren Fenstern ist in der Prädiktion von Sekundärstrukturen auf einen kleineren Teil der Nukleinsäure beschränkt. Mögliche feste Bindungen mit weiter entfernten Nukleinsäuren können so nicht erkannt werden. Es ist jedoch möglich, dass diese Analyse den *in vivo* Verhältnissen näher kommt, da sich Sekundärstrukturen mit nahen Nukleinsäureabschnitten möglicherweise mit höherer Wahrscheinlichkeit ausbilden. So wird davon ausgegangen, dass sich während der Transkription schon stabile Faltungseinheiten bilden, welche verbleiben und sich nicht erneut lösen.

Systematische Analysen einer Nukleinsäure hinsichtlich geeigneter Motive für eine Antisense-vermittelte Reduktion eines Genproduktes umfassen die gesamte Länge der Nukleinsäure. Favorisierte Motive können sich in unterschiedlichen Bereichen der Nukleinsäure befinden. Bezüglich der Position der Zielmotive können systemische Analysefehler in der Wahrscheinlichkeitsbestimmung von Sekundärstrukturen entstehen. Zielmotive nahe einem der beiden Enden der mRNA ergeben in der

fensterbasierten Analyse, wie sie hier angewendet wird, eine reduzierte Datenmenge, aus der die Wahrscheinlichkeiten der unterschiedlichen Sekundärstrukturen berechnet werden kann. Aufgrund des Umfangs an Analysedaten ergibt sich für Motive im Zentrum der mRNA ein Vorteil gegenüber Motiven am Ende der mRNA. Dieser Effekt kann in der systemischen Analyse nicht umgangen werden.

Bei der sequentiellen, fensterbasierten Analyse zeigt sich zudem eine Ungenauigkeit im ersten und letzten Fenster der jeweiligen Analyse. Da es sich lediglich um einen Teil einer Datenmenge handelt, kann dieser Fehler klein ausfallen, hinsichtlich eines möglichst optimalen Ergebnisses aber bedeutsam sein. Bei einer Schrittweite von 100 bp wird in der hier durchgeführten Analyse, insbesondere in der Analyse des 1689er Motivs, eine deutliche Diskrepanz zwischen den Sekundärstrukturen im ersten Analysefenster zu den Übrigen deutlich. Das erste Analysefenster in den Untersuchungen unterschiedlicher Fensterbreiten ergibt jeweils einen Abstand von lediglich 11 Basen zum Ziel. Zudem wird die unmittelbare Sekundärstruktur des 1689er Motivs auch aus Basen oberhalb von Position 1700 gebildet (siehe graphische Darstellung Abb.6, Kapitel 3.1.1.2.0). Hieraus resultiert eine reduzierte Wahrscheinlichkeit des Auftretens der untersuchten Sekundärstruktur. Dieser Effekt ist im Motiv 1284 ebenfalls nachweisbar. Aufgrund des größeren Abstands des Motivs zum Fensterrand in den Motiven 2313 und 2715 jedoch nicht. In den beiden letztgenannten Motiven sollte der gleiche Effekt am anderen Ende der untersuchten Fenster auftreten. Da die Motive allerdings außer im 600er Fenster in allen Untersuchungen nicht in den Randbereich einer Fensterbetrachtung kommen, bleibt dieser Effekt aus.

Es ergibt sich somit für das Zielmotiv 1689 eine Verbesserung der mittleren Wahrscheinlichkeit im 600er Fenster von 73%/83% auf 88%/100% in den Betrachtungen der niedrigsten 10 bzw.5 Energieebenen. Im 1000er Fenster ist die Wahrscheinlichkeit von 88%/90% auf 98%/100% gesteigert, im 1400er Fenster von 88%/91% auf 97%/100 %.

Unter Berücksichtigung dieses Effektes zeigte sich die Überlegenheit des 1400er Fensters in der Identifikation des effektivsten Motivs (1689). In der Betrachtung des 1000er Fensters kann diesbezüglich eine Überlegenheit nicht nachgewiesen werden, beide Motive (1689, 2313) treten mit einer Wahrscheinlichkeit von 98 % auf. Als Einschränkung bleibt festzuhalten, dass die Analyse im 1000er Fenster die beiden

effektivsten Motive ebenso wie die Analyse im 1400er Fenster identifizieren kann. Große Unterschiede diesbezüglich bestehen zwischen beiden Analysen nicht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Bestimmung der relativen Reduktion der MMP-2-mRNA durch spezifische Antisense-Oligonukleotide werden jeweils in 3-fach Bestimmungen durchgeführt. Eine anschließende Mittelung der Werte erfolgt rechnerisch. Die Abweichung der einzelnen Ergebnisse vom Mittelwert (STABW, Standardabweichung) ist jeweils angegeben. Es zeigt sich in der Mehrzahl der Fälle eine relativ große Streuung, auffällig durch eine hohe Standardabweichung. Gründe für eine Streuung diesen Ausmaßes finden sich auf jeder Ebene der Einzelversuche bzw. in der Summe der Folgeversuche. Durch das beständige Normieren von Zwischenergebnissen in den Versuchen ist versucht worden, den systematischen Fehler so gering wie möglich zu halten. Die Normierung wurde z.B. durch folgende Maßnahmen erreicht: Jede Probe startete mit der gleichen Zellzahl, entnommen aus einer Stammlösung. Durch regelmäßiges, vorsichtiges suspendieren ist die optimale Verteilung der Zellen auf alle Proben sichergestellt. Die Menge an der Gesamt-RNA, welche in der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben wurde, ist auf 1,2 µg normiert. Die Normierung der mRNA (MMP-2) auf die mRNA des „house keeping“ Gens GAPDH stellt eine weitere Kontrolle dar. Erst durch diese letzte Normierung kann von einer relativen Reduktion, nämlich relativ zu GAPDH, gesprochen werden. Eine Einflussnahme der gegen die mRNA der Matrixmetalloproteinase-2 gerichteten asODN auf die mRNA der GAPDH ist nicht zu erwarten. Erst die Scramble-Kontrollen und ihr Verhältnis von MMP-2 zu GAPDH ergeben die Richtwerte, an denen die Ergebnisse der Daten gemessen und beurteilt werden können. Abschließend wurden die Daten aller Proben eines Oligonukleotids erst nach Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung zur Auswertung benutzt. Alle oben aufgeführten Normierungen und Abgleichungen konnten die hier gesehene Streuung jedoch nicht verhindern. Man mag argumentieren, dass den Ergebnissen die Validität aufgrund der Streuung abzuerkennen sei. Durch Mittelwertbildung und Errechnung der Standardabweichung kann die Signifikanz in den dargestellten Ergebnissen abgeschätzt werden.

5. Zusammenfassung

In der hier vorgestellten Arbeit wurde am Beispiel der Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) die Wirkung einer sequenzspezifischen Regulation eines Proteins durch Antisense-Oligonukleotide dargestellt. Zudem ergeben sich aus den Untersuchungsergebnissen Optimierungen der präexperimentellen Auswahl geeigneter asODN.

Die Bedeutung von thermodynamischen Eigenschaften der Zielmotive und ihrer Antisense-Oligonukleotide steht hinter der Bedeutung der Sekundärstruktur und der daraus resultierenden Verfügbarkeit des Zielmotivs zurück.

Basierend auf den hier vorliegenden Ergebnissen kann die Prädiktion zu favorisierenden Zielmotive unter Berücksichtigung nachfolgend aufgeführter Regeln verbessert werden. Die Analyse der Sekundärstrukturen erfolgt mittels der mFOLD-Suite, die Fensterbreite der Untersuchung wird auf 1400 bp festgelegt. Jedes Motiv mit einer Mindestlänge von zehn Basen, welches in wenigstens 8 von 10 Sekundärstrukturen vorhanden ist gilt als zu favorisieren. Einschränkend ist die Bedeutung der ersten und letzten Fensteranalyse zu vernachlässigen. Zielmotive mit einem prozentual höheren Auftreten in den untersuchten Fenstern, sind mit einer höheren Wirksamkeit ihrer asODN korreliert.

Gegen jedes, so identifizierte, Zielmotiv sollte die Anpassung von sequenzhomologen Antisense-Oligonukleotiden erfolgen. Hierbei können bestimmte, kurze Sequenzmotive einen weiteren positiven Einfluss hinsichtlich Wirksamkeit haben.

6. Anhänge

6.1: Tabellarische Ergebnisse

Name	CT MMP-2	CT GAPDH	MMP / GAPDH	MEAN	STABW	rT	SD	rT-sc	SD-sc
Lipo ohne	22,01	15,97	0,015198	0,0181	0,0030	100,00	16,64	137,70	
Lipo ohne	22,05	16,24	0,017824						
Lipo ohne	22,15	16,59	0,021197						
sc1284	23,64	17,18	0,011359	0,0122	0,0032	67,46	17,74	92,90	
sc1284	24,07	17,35	0,009486						
sc1284	23,30	17,31	0,015734						
sc1689	23,31	17,48	0,017579	0,0164	0,0010	90,66	5,79	124,84	
sc1689	23,13	17,16	0,015953						
sc1689	22,94	16,94	0,015625						
sc2313	22,06	16,56	0,022097	0,0160	0,0053	88,79	29,24	122,25	
sc2313	22,40	16,21	0,013697						
sc2313	22,66	16,32	0,012344						
sc2715	23,44	17,00	0,011518	0,0101	0,0022	55,92	12,05	77,00	
sc2715	24,89	17,85	0,007599						
sc2715	23,64	17,16	0,011203						
scAUG1T	24,78	18,27	0,010972	0,0109	0,0029	60,29	16,25	83,01	
scAUG1T	24,98	18,00	0,007922						
scAUG1T	23,75	17,57	0,013792						
1284 A	25,07	17,89	0,006896	0,0070	0,0005	38,85	2,91	53,50	4,01
1284 A	25,07	18,03	0,007599						
1284 A	24,82	17,57	0,006570						
1284 D	24,45	17,39	0,007494	0,0043	0,0029	23,74	16,06	32,70	22,11
1284 D	25,91	17,77	0,003545						
1284 D	26,57	17,48	0,001835						
1284 F	26,33	18,34	0,003933	0,0034	0,0005	18,74	2,79	25,80	3,84
1284 F	26,47	18,06	0,002940						
1284 F	25,54	17,29	0,003285						
1284 G	25,24	17,29	0,004044	0,0036	0,0009	20,03	5,21	27,58	7,17
1284 G	25,98	17,36	0,002542						
1284 G	25,92	18,05	0,004275						
1284 J	26,44	17,98	0,002840	0,0047	0,0025	25,83	13,74	35,56	18,91
1284 J	26,23	18,14	0,003670						
1284 J	25,24	18,18	0,007494						
1284 L	24,08	17,02	0,007494	0,0090	0,0019	49,64	10,24	68,36	14,10
1284 L	24,66	17,76	0,008373						
1284 L	23,67	17,17	0,011049						

Tabelle 4: Ergebnisse 1 von 4. Dargestellt sind die CT-Werte (Roh-Daten), das Verhältnis der daraus errechneten RNA-Mengen sowie die rT (relative Transkription), STABW (Standardabweichung), SD (Standardabweichung der rT), rT-sc (relative Transkription auf die Scramblekontrollen normiert), SD-sc (Standardabweichung der rT-sc)

Name	CT MMP-2	CT GAPDH	MMP / GAPDH	MEAN	STABW	rT	SD	rT-sc	SD-sc
Lipo ohne	22,12	16,06	0,014989	0,0196	0,0040	100,00	20,30	110,75	
Lipo ohne	21,93	16,42	0,021944						
Lipo ohne	22,09	16,57	0,021793						
sc1284	23,23	17,17	0,014989	0,0169	0,0024	86,09	12,05	95,35	
sc1284	23,50	17,82	0,019505						
sc1284	23,29	17,33	0,016064						
sc1689	23,20	17,32	0,016980	0,0161	0,0009	82,15	4,55	90,98	
sc1689	23,12	17,08	0,015198						
sc1689	23,05	17,09	0,016064						
sc2313	21,85	16,49	0,024349	0,0201	0,0054	102,64	27,71	113,68	
sc2313	22,05	16,54	0,021944						
sc2313	22,43	16,27	0,013985						
1284 M	25,04	17,13	0,004158	0,0034	0,0009	17,24	4,50	19,09	4,98
1284 M	26,81	18,12	0,002421						
1284 M	25,78	17,64	0,003545						
1689 A	25,87	17,59	0,003217	0,0024	0,0007	12,46	3,45	13,80	3,82
1689 A	26,58	17,62	0,002008						
1689 A	26,39	17,49	0,002093						
1689 B	25,65	17,81	0,004364	0,0043	0,0010	22,21	4,91	24,59	5,44
1689 B	25,19	17,63	0,005299						
1689 B	25,77	17,56	0,003377						
1689 C	25,18	17,49	0,004843	0,0034	0,0013	17,28	6,50	19,14	7,20
1689 C	25,79	17,15	0,002507						
1689 C	26,05	17,57	0,002801						
1689 H	24,90	17,45	0,005719	0,0048	0,0009	24,33	4,84	26,95	5,36
1689 H	25,78	17,75	0,003826						
1689 H	25,25	17,53	0,004743						
1689 K	25,85	17,97	0,004245	0,0037	0,0005	19,08	2,57	21,13	2,85
1689 K	25,83	17,56	0,003240						
1689 K	26,36	18,29	0,003721						
1689 L	24,94	17,80	0,007090	0,0075	0,0019	38,33	9,92	42,45	10,99
1689 L	25,19	17,76	0,005799						
1689 L	25,09	18,39	0,009618						

Tabelle 5: Ergebnisse 2 von 4. Dargestellt sind die CT-Werte (Roh-Daten), das Verhältnis der daraus errechneten RNA-Mengen sowie die rT (relative Transkription), STABW (Standardabweichung), SD (Standardabweichung der rT), rT-sc (relative Transkription auf die Scramblekontrollen normiert), SD-sc (Standardabweichung der rT-sc)

Name	CT MMP-2	CT GAPDH	MMP / GAPDH	MEAN	STABW	rT	SD	rT-sc	SD-sc
Lipo ohne	25,21	18,87	0,012344	0,0112	0,0010	100,00	8,97	131,66	
Lipo ohne	24,92	18,33	0,010380						
Lipo ohne	25,24	18,73	0,010972						
sc1284	26,28	19,07	0,006754	0,0090	0,0020	79,81	17,38	105,07	
sc1284	25,15	18,46	0,009685						
sc1284	25,05	18,47	0,010453						
sc1689	26,06	19,06	0,007813	0,0089	0,0010	79,49	8,62	104,65	
sc1689	25,40	18,67	0,009420						
sc1689	25,63	18,92	0,009552						
sc2313	25,20	18,37	0,008790	0,0114	0,0042	101,28	37,05	133,34	
sc2313	25,08	18,31	0,009163						
sc2313	24,45	18,50	0,016176						
sc2715	26,29	19,26	0,007652	0,0064	0,0023	56,78	20,48	74,75	
sc2715	27,32	19,25	0,003721						
sc2715	25,78	18,77	0,007759						
scAUG1T	26,14	18,80	0,006172	0,0070	0,0011	62,42	9,43	82,18	
scAUG1T	25,58	18,35	0,006661						
scAUG1T	25,29	18,36	0,008201						
2313 A	27,47	18,97	0,002762	0,0028	0,0012	24,86	10,27	32,73	13,52
2313 A	28,30	19,06	0,001654						
2313 A	26,77	18,79	0,003961						
2313 E	26,43	18,64	0,004518	0,0050	0,0019	44,90	16,82	59,11	22,14
2313 E	26,67	18,50	0,003472						
2313 E	26,06	18,93	0,007139						
2313 F	27,63	19,63	0,003906	0,0036	0,0005	32,28	4,33	42,50	5,69
2313 F	27,51	19,16	0,003065						
2313 F	26,97	18,97	0,003906						
2313 H	26,94	19,05	0,004216	0,0051	0,0009	45,00	8,00	59,25	10,54
2313 H	26,38	18,72	0,004944						
2313 H	25,98	18,60	0,006003						
2313 J	27,08	19,11	0,003988	0,0037	0,0010	33,30	9,30	43,85	12,24
2313 J	27,76	19,17	0,002595						
2313 J	26,81	19,06	0,004639						
2313 L	26,94	19,10	0,004364	0,0050	0,0008	44,38	7,07	58,43	9,31
2313 L	26,75	19,02	0,004710						
2313 L	26,38	18,97	0,005880						

Tabelle 6: Ergebnisse 3 von 4. Dargestellt sind die CT-Werte (Roh-Daten), das Verhältnis der daraus errechneten RNA-Mengen sowie die rT (relative Transkription), STABW (Standardabweichung), SD (Standardabweichung der rT), rT-sc (relative Transkription auf die Scramblekontrollen normiert), SD-sc (Standardabweichung der rT-sc)

Name	CT MMP-2	CT GAPDH	MMP / GAPDH	MEAN	STABW	rT	SD	rT-sc	SD-sc
Lipo ohne				0,0079	0,0000	100,00	0,20	103,71	
Lipo ohne	25,62	18,64	0,007879						
Lipo ohne	25,75	18,77	0,007902						
sc1284	26,23	18,90	0,006229	0,0078	0,0014	98,84	17,44	102,51	
sc1284	25,48	18,65	0,008797						
sc1284	25,60	18,70	0,008370						
sc1689	25,96	18,71	0,006573	0,0071	0,0006	89,61	7,35	92,93	
sc1689	25,88	18,86	0,007707						
sc1689	26,34	19,16	0,006930						
sc2313	26,22	18,94	0,006436	0,0080	0,0025	100,81	31,78	104,55	
sc2313	26,23	18,98	0,006578						
sc2313	25,61	19,08	0,010848						
2313 M	27,68	19,27	0,002945	0,0026	0,0004	32,86	5,57	34,08	5,78
2313 M	27,98	19,08	0,002100						
2313 M	27,26	18,74	0,002733						
2715 A	26,49	18,78	0,004763	0,0049	0,0007	62,21	8,53	64,52	8,84
2715 A	26,51	18,66	0,004320						
2715 A	26,26	18,79	0,005642						
2715 E	26,83	18,74	0,003672	0,0031	0,0009	38,89	10,82	40,33	11,22
2715 E	28,22	19,55	0,002465						
2715 F	27,99	19,51	0,002802	0,0033	0,0010	41,90	13,12	43,46	13,61
2715 F	28,24	19,66	0,002619						
2715 F	27,62	19,82	0,004497						
AUG1T	26,25	19,49	0,009232	0,0071	0,0019	90,03	23,46	93,37	24,33
AUG1T	26,61	19,28	0,006206						
AUG1T	25,76	18,35	0,005872						
AUG2T	26,75	18,74	0,003898	0,0045	0,0005	56,93	6,75	59,04	7,00
AUG2T	26,76	19,02	0,004652						
AUG2T	26,35	18,69	0,004926						
AUG3T	27,16	19,16	0,003898	0,0031	0,0008	38,78	9,96	40,22	10,33
AUG3T	28,73	19,99	0,002339						
AUG3T	28,68	20,27	0,002942						

Tabelle 7: Ergebnisse 4 von 4. Dargestellt sind die CT-Werte (Roh-Daten), das Verhältnis der daraus errechneten RNA-Mengen sowie die rT (relative Transkription), STABW (Standardabweichung), SD (Standardabweichung der rT), rT-sc (relative Transkription auf die Scramblekontrollen normiert), SD-sc (Standardabweichung der rT-sc)

6.2: Sequenzen der verwendeten Antisense-Oligonukleotide

Abkürzung	Basensequenz in 5'→3' Richtung
1284a	GGA CAT GGC GGT CTC AGG
1284d	AGT GGA CAT GGC GGT CTC
1284f	ACA GTG GAC ATG GCG GTC
1284g	CTC AGG GCA GAA GCC ATA
1284j	CAG GGC AGA AGC CAT ACT T
1284l	GGC AGA AGC CAT ACT TGT
1284m	CCA ACA GTG GAC ATG GCG GTC
1689a	CAA TGT CCT GTT TGC AGA T
1689b	TAC AAT GTC CTG TTT GCA GA
1689c	AAT ACA ATG TCC TGT TTG CAG
1689h	GCA GAT CTC AGG AGT GAC
1689k	GAT CTC AGG AGT GAC AGC
1689l	ATC TCA GGA GTG ACA GCA
2313a	CTC CAG GCC CGG TGT ATC
2313e	AGT TCT CCA GGC CCG GTG
2313f	TAG TTC TCC AGG CCC GGT
2313h	GTA TCG AAG GCA GTG GAG
2313j	ATC GAA GGC AGT GGA GAG
2313l	CGA AGG CAG TGG AGA GGA
2313m	GCC CGG TGT ATC GAA GGC
2715a	TGG ACT GGC CAC CTG GCC
2715e	CTG GCC ACC TGG CCA TGC
2715f	TGG CCA CCT GGC CAT GCC
AUG-1T	GGC TCA GCG GCT CAT GGT
AUG-2T	GCT CAT GGT CCG GCC CCC
AUG-3T	CAG CGG CTC ATG GTC CGG
sc1284	CAG GTG GTC AGA TGG ACC
sc1689	TTA GTC ATG TCA GAC TGA CAT
sc2313	GGT CCA GAG GTC CTG GAC
sc2715	GGA CCC TGG TCC TGA CCC
scAUG-1T	GAC CTG GTC CAC TGG TGG

6.3: Tabellarische Darstellung der verwendeten Antisense-Oligonukleotide

	Länge	Tm WALLACE	Tm errechnet	GC-Gehalt	Dimer Formationen	Selbstkomplement	Delta-G-Bindungsenergie	Ende im Zielbereich	Anzahl der Basen im Zielbereich	H-Brückenbindungen im Zielbereich	**Relative Reduktion**		Standardabweichung
	[n]	[°C]	[°C]	[%]			[kcal / mol]		[n]				
1284a	18	60	53,3	66	1x4;2x1	3	-34,4	3'	8	21	54	±	4
1284d	18	58	50	61	1x4;2x1	3	-35,1	3'	5	13	43	±	18
1284f	18	58	50,8	61	1x4;2x1	3	-35,1	3'	3	8	37	±	16
1284g	18	56	48,2	55	2x3;2x1	3 4	-35,1	5'	8	25	57	±	42
1284i	19	56	47,3	55	2x3;2x1	3 4	-34,8	5'	6	17	58	±	36
1284l	18	54	44,5	50	2x3;2x1	3	-33,3	5'	3	9	61	±	16
1284m	21	68	59,7	61	1x4;2x1	3	-42	3'	3	8	19	±	5

Tabelle 8: Tabellarische Übersicht der verwendeten Antisense-Oligonukleotiden des Motivs 1284. Angabe von verschiedenen chemischen Eigenschaften sowie der Relativen Reduktion.

	Länge	Tm WALLACE	Tm errechnet	GC-Gehalt	Dimer Formationen	Selbstkomplement	Delta-G-Bindungsenergie	Ende im Zielbereich	Anzahl der Basen im Zielbereich	H-Brückenbindungen im Zielbereich	**Relative Reduktion**		Standardabweichung
	[n]	[°C]	[°C]	[%]			[kcal / mol]		[n]				
1689a	19	50	41,5	39	1x4;2x1	3	-31,5	3'	9	21	14	±	4
1689b	20	52	43,9	44	1x4;2x1	3	-31,9	3'	8	19	25	±	5
1689c	21	52	42,9	44	1x4	3	-31,6	3'	7	17	19	±	7
1689h	18	56	40,6	55	1x6	3	-30,4	5'	8	20	27	±	5
1689k	18	56	40,6	55	1x4	3 4	-30,4	5'	5	12	21	±	3
1689l	18	54	41,8	50	2x3;2x1	3 4	-30,7	5'	4	9	51	±	16

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der verwendeten Antisense-Oligonukleotiden des Motivs 1689. Angabe von verschiedenen chemischen Eigenschaften sowie der Relativen Reduktion.

	Länge	Tm WALLACE	Tm errechnet	GC-Gehalt	Dimer Formationen	Selbstkomplement	Delta-G-Bindungsenergie	Ende im Zielbereich	Anzahl der Basen im Zielbereich	H-Brückenbindungen im Zielbereich	**Relative Reduktion**		Standardabweichung
	[n]	[°C]	[°C]	[%]			[kcal / mol]		[n]				
2313a	18	60	52,4	66	1x4		-37,4	3'	8	20	33	±	14
2313e	18	60	54,6	66	1x4		-38,5	3'	4	11	54	±	17
2313f	18	58	51,8	51	1x4		-37,5	3'	3	8	43	±	6
2313h	18	56	44,7	55	1x4		-33,2	5'	7	18	59	±	11
2313j	18	56	46,9	55	1x4		-34,2	5'	5	12	44	±	12
2313l	18	60	50,6	66			-35,8	5'	3	8	73	±	26
2313m	18	60	55,1	66	1x4	3	-39,4		10	25	34	±	6

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der verwendeten Antisense-Oligonukleotiden des Motivs 2313. Angabe von verschiedenen chemischen Eigenschaften sowie der Relativen Reduktion.

	Länge	Tm WALLACE	Tm errechnet	GC-Gehalt	Dimer Formationen	Selbstkomplement	Delta-G-Bindungsenergie	Ende im Zielbereich	Anzahl der Basen im Zielbereich	H-Brückenbindungen im Zielbereich	**Relative Reduktion**		Standardabweichung
	[n]	[°C]	[°C]	[%]			[kcal / mol]		[n]				
2715a	18	62	58,8	72	1x6	4 5	-39,8	5'	8	21	77	±	15
2715e	18	62	59,4	72	1x6;2x1	5 6	-40,3	5'	4	11	40	±	11
2715f	18	62	62,1	72	1x6;2x1	5 6	-41,8	5'	3	8	44	±	13

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der verwendeten Antisense-Oligonukleotiden des Motivs 2715. Angabe von verschiedenen chemischen Eigenschaften sowie der Relativen Reduktion.

6.4: Firmenverzeichnis

Metabion GmbH

Lena-Christ-Straße 44

82152 Martinsried

Deutschland

TIB MOLBIOL

Tempelhofer Weg 11-12

10829 Berlin

Deutschland

Qiagen GmbH

QIAGEN Straße 1

40724 Hilden

Deutschland

Invitrogen GmbH
(vormals **GIBCO BRL**)
Technologiepark Karlsruhe
Emmy-Noether Straße 10
76131 Karlsruhe

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Riedstraße 2
89555 Steinheim

Carl Roth GmbH & Co KG
Schoemperlenstraße 3-5
76231 Karlsruhe

MERCK KGaA
Frankfurter Straße 250
64293 Darmstadt

GERBU Biochemicals GmbH
Am Kirchwald 6
69251 Gaiberg

Biozym Scientific GmbH
Steinbrinksweg 27
31840 Hessisch Oldendorf

7. Referenzen

Agnantis, N. J., A. C. Goussia, A. Batistatou und D. Stefanou (2004). "Tumor markers in cancer patients. an update of their prognostic significance. Part II." In Vivo **18**(4): 481-8.

Agrawal, S. und R. P. Iyer (1997). "Perspectives in antisense therapeutics." Pharmacol Ther **76**(1-3): 151-60.

Agrawal, S., J. Temsamani und J. Y. Tang (1991). "Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(17): 7595-9.

Andrews, A. T. (1988). Electrophoresis: Theory,Techniques and Biochemical and Clinical Applications. 2nd ed. New York**:** 38-42.

Avery, O. T., C. M. Macleod und M. McCarty (1944). "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii." J Exp Med **79**(2): 137-58.

Bar-Or, A., E. M. Oliveira, D. E. Anderson und D. A. Hafler (1999). "Molecular pathogenesis of multiple sclerosis." J Neuroimmunol **100**(1-2): 252-9.

Benimetskaya, L., M. Berton, A. Kolbanovsky, S. Benimetsky und C. A. Stein (1997). "Formation of a G-tetrad and higher order structures correlates with biological activity of the RelA (NF-kappaB p65) 'antisense' oligodeoxynucleotide." Nucleic Acids Res **25**(13): 2648-56.

Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker und L. A. Marky (1986). "Predicting DNA duplex stability from the base sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3746-50.

Buddecke, E. (2002). Molekulare Medizin - Eine systematische Einführung. Landberg/Lech, ecomed.

Caplen, N. J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire und R. A. Morgan (2001). "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9742-7.

Chen, C. Z., L. Li, H. F. Lodish und D. P. Bartel (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." Science **303**(5654): 83-6.

Collier, I. E., S. M. Wilhelm, A. Z. Eisen, B. L. Marmer, G. A. Grant, J. L. Seltzer, A. Kronberger, C. S. He, E. A. Bauer und G. I. Goldberg (1988). "H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen." J Biol Chem **263**(14): 6579-87.

Cowsert, L. M., M. C. Fox, G. Zon und C. K. Mirabelli (1993). "In vitro evaluation of phosphorothioate oligonucleotides targeted to the E2 mRNA of papillomavirus: potential treatment for genital warts." Antimicrob Agents Chemother **37**(2): 171-7.

Dean, N. M., R. McKay, T. P. Condon und C. F. Bennett (1994). "Inhibition of protein kinase C-alpha expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters." J Biol Chem **269**(23): 16416-24.

Dieffenbach, C. W., T. M. Lowe und G. S. Dveksler (1993). "General concepts for PCR primer design." PCR Methods Appl **3**(3): S30-7.

Docherty, A. J., J. O'Connell, T. Crabbe, S. Angal und G. Murphy (1992). "The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases." Trends Biotechnol **10**(6): 200-7.

Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber und T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.

Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold und M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver und C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." Nature **391**(6669): 806-11.

Galderisi, U., G. Di Bernardo, M. A. Melone, G. Galano, A. Cascino, A. Giordano und M. Cipollaro (1999). "Antisense inhibitory effect: a comparison between 3'-partial and full phosphorothioate antisense oligonucleotides." J Cell Biochem **74**(1): 31-7.

Green, M. R., J. V. Pastewka und A. C. Peacock (1973). "Differential staining of phosphoproteins on polyacrylamide gels with a cationic carbocyanine dye." Anal Biochem **56**(1): 43-51.

Guvakova, M. A., L. A. Yakubov, I. Vlodavsky, J. L. Tonkinson und C. A. Stein (1995). "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix." J Biol Chem **270**(6): 2620-7.

Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi und G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." Science **293**(5532): 1146-50.

Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin und V. N. Kim (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes Dev **18**(24): 3016-27.

Harris, E. D., Jr. und S. M. Krane (1972). "An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture." Biochim Biophys Acta **258**(2): 566-76.

Henry, S. P., R. C. Miner, W. L. Drew, J. Fitchett, C. York-Defalco, L. M. Rapp und A. A. Levin (2001). "Antiviral activity and ocular kinetics of antisense oligonucleotides designed to inhibit CMV replication." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(11): 2646-51.

Ho, S. P., Y. Bao, T. Lesher, R. Malhotra, L. Y. Ma, S. J. Fluharty und R. R. Sakai (1998). "Mapping of RNA accessible sites for antisense experiments with oligonucleotide libraries." Nat Biotechnol **16**(1): 59-63.

Itoh, Y., A. Takamura, N. Ito, Y. Maru, H. Sato, N. Suenaga, T. Aoki und M. Seiki (2001). "Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion." Embo J **20**(17): 4782-93.

Kenzelmann, M. und K. Muhlemann (1997). "Pitfalls of PCR: cross-reactivity with joyride E. coli nucleic acid." Biotechniques **23**(2): 204-6.

Kretschmer-Kazemi Far, R., J. Leppert, K. Frank und G. Sczakiel (2005). "Technical improvements in the computational target search for antisense oligonucleotides." Oligonucleotides **15**(3): 223-33.

Kretschmer-Kazemi Far, R., W. Nedbal und G. Sczakiel (2001). "Concepts to automate the theoretical design of effective antisense oligonucleotides." Bioinformatics **17**(11): 1058-61.

Lebedeva, I. und C. A. Stein (2001). "Antisense oligonucleotides: promise and reality." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 403-19.

Lee, L. G., C. R. Connell und W. Bloch (1993). "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes." Nucleic Acids Res **21**(16): 3761-6.

Lima, W. F., V. Brown-Driver, M. Fox, R. Hanecak und T. W. Bruice (1997). "Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity." J Biol Chem **272**(1): 626-38.

Liu, S. C., S. F. Yang, K. T. Yeh, C. M. Yeh, H. L. Chiou, C. Y. Lee, M. C. Chou und Y. S. Hsieh (2006). "Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer." Clin Chim Acta **371**(1-2): 92-6.

Lu, Z. J. und D. H. Mathews (2008). "Fundamental differences in the equilibrium considerations for siRNA and antisense oligodeoxynucleotide design." Nucleic Acids Res **36**(11): 3738-45.

Mathews, D. H., J. Sabina, M. Zuker und D. H. Turner (1999). "Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure." J Mol Biol **288**(5): 911-40.

Matrisian, L. M. (1990). "Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling." Trends Genet **6**(4): 121-5.

Matveeva, O. V., A. D. Tsodikov, M. Giddings, S. M. Freier, J. R. Wyatt, A. N. Spiridonov, S. A. Shabalina, R. F. Gesteland und J. F. Atkins (2000). "Identification of sequence motifs in oligonucleotides whose presence is correlated with antisense activity." Nucleic Acids Res **28**(15): 2862-5.

McQuisten, K. A. und A. S. Peek (2007). "Identification of sequence motifs significantly associated with antisense activity." BMC Bioinformatics **8**: 184.

Millar, A. W., P. D. Brown, J. Moore, W. A. Galloway, A. G. Cornish, T. J. Lenehan und K. P. Lynch (1998). "Results of single and repeat dose studies of the oral matrix metalloproteinase inhibitor marimastat in healthy male volunteers." Br J Clin Pharmacol **45**(1): 21-6.

Milner, N., K. U. Mir und E. M. Southern (1997). "Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays." Nat Biotechnol **15**(6): 537-41.

Monia, B. P., E. A. Lesnik, C. Gonzalez, W. F. Lima, D. McGee, C. J. Guinosso, A. M. Kawasaki, P. D. Cook und S. M. Freier (1993). "Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression." J Biol Chem **268**(19): 14514-22.

Okada, Y., Y. Gonoji, I. Nakanishi, H. Nagase und T. Hayakawa (1990). "Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **59**(5): 305-12.

Patzel, V., U. Steidl, R. Kronenwett, R. Haas und G. Sczakiel (1999). "A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability." Nucleic Acids Res **27**(22): 4328-34.

Peyman, A. und E. Uhlmann (1996). "Minimally modified oligonucleotides - combination of end-capping and pyrimidine-protection." Biol Chem Hoppe Seyler **377**(1): 67-70.

Rasheed, S., W. A. Nelson-Rees, E. M. Toth, P. Arnstein und M. B. Gardner (1974). "Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)." Cancer **33**(4): 1027-33.

Rockwell, P., W. J. O'Connor, K. King, N. I. Goldstein, L. M. Zhang und C. A. Stein (1997). "Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular

endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6523-8.

Rychlik, W. (1995). "Priming efficiency in PCR." Biotechniques **18**(1): 84-6, 88-90.

Rychlik, W. und R. E. Rhoads (1989). "A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA." Nucleic Acids Res **17**(21): 8543-51.

Scherr, M., J. J. Rossi, G. Sczakiel und V. Patzel (2000). "RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts." Nucleic Acids Res **28**(13): 2455-61.

Senger, M., K. H. Glatting, O. Ritter und S. Suhai (1995). "X-HUSAR, an X-based graphical interface for the analysis of genomic sequences." Comput Methods Programs Biomed **46**(2): 131-41.

Shuman, S. (1991). "Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10104-8.

Simons, R. W. (1988). "Naturally occurring antisense RNA control--a brief review." Gene **72**(1-2): 35-44.

Simons, R. W. und N. Kleckner (1988). "Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes." Annu Rev Genet **22**: 567-600.

Sparano, J. A., P. Bernardo, P. Stephenson, W. J. Gradishar, J. N. Ingle, S. Zucker und N. E. Davidson (2004). "Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196." J Clin Oncol **22**(23): 4683-90.

Stephenson, M. L. und P. C. Zamecnik (1978). "Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(1): 285-8.

Tillman, L. G., R. S. Geary und G. E. Hardee (2008). "Oral delivery of antisense oligonucleotides in man." J Pharm Sci **97**(1): 225-36.

Tu, G. C., Q. N. Cao, F. Zhou und Y. Israel (1998). "Tetranucleotide GGGA motif in primary RNA transcripts. Novel target site for antisense design." J Biol Chem **273**(39): 25125-31.

Vickers, T. A., S. Koo, C. F. Bennett, S. T. Crooke, N. M. Dean und B. F. Baker (2003). "Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis." J Biol Chem **278**(9): 7108-18.

VitraveneStudyGroup (2002). "A randomized controlled clinical trial of intravitreous fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS." Am J Ophthalmol **133**(4): 467-74.

Wallace, R. B., J. Shaffer, R. F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose und K. Itakura (1979). "Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch." Nucleic Acids Res **6**(11): 3543-57.

Warburg, O. und W. Christian (1941). "Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase." Biochem. Z. **310**: 384-421.

Watson, J. D. und F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." Nature **171**(4356): 737-8.

Wilfinger, W. W., K. Mackey und P. Chomczynski (1997). "Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity." Biotechniques **22**(3): 474-6, 478-81.

Wu, H., W. F. Lima und S. T. Crooke (1999). "Properties of cloned and expressed human RNase H1." J Biol Chem **274**(40): 28270-8.

Yakovchuk, P., E. Protozanova und M. D. Frank-Kamenetskii (2006). "Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix." Nucleic Acids Res **34**(2): 564-74.

Yakubov, L., Z. Khaled, L. M. Zhang, A. Truneh, V. Vlassov und C. A. Stein (1993). "Oligodeoxynucleotides interact with recombinant CD4 at multiple sites." J Biol Chem **268**(25): 18818-23.

Zamecnik, P. (1997). "Background of the antisense oligonucleotide approach to chemotherapy." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **7**(3): 199-202.

Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp und D. P. Bartel (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.

Zhang, H. Y., J. Mao, D. Zhou, Y. Xu, H. Thonberg, Z. Liang und C. Wahlestedt (2003). "mRNA accessible site tagging (MAST): a novel high throughput method for selecting effective antisense oligonucleotides." Nucleic Acids Res **31**(14): e72.

Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res **31**(13): 3406-15.

8. Lebenslauf

Name:	Sabelhaus
Vorname:	Tobias
Geburtsdatum:	04.06.1977
Geburtsort:	Bremen

1983 – 1993 Grundschule und gymnasiale Oberstufe,
St.-Johannis-Schule Bremen

1993 – 1997 Gymnasiale Oberstufe, Abschluss Abitur,
Altes Gymnasium an der kleinen Helle, Bremen

davon 1994 – 1995 Austauschjahr an der Westerville North High School,
Westerville, Ohio

1998 – 2005 Studium der Humanmedizin,
Medizinische Universität zu Lübeck, später Universität zu Lübeck

2005 – 2008 Assistenzarzt Innere Medizin,
St.-Vincenz-Krankenhaus, Paderborn

2008 Assistenzarzt Innere Medizin,
Krankenhaus Itzehoe, Itzehoe

Seit 2009 Assistenzarzt Innere Medizin,
Krankenhaus „Links der Weser“, Gesundheit Nord, Bremen

9. Danksagungen

Ich möchte mich im Folgenden bei Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far für die nette Betreuung sowie Anregung zur Diskussionen und Verbesserungen meiner Arbeitsweisen bedanken. Zudem gebührt ihr mein Dank für die erfahrende Unterstützung in meinem Arbeiten und Motivationshilfen.

Ich bedanke mich ferner bei Prof. G. Sczakiel für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens. Zudem bedanke ich mich bei ihm für die freundliche Aufnahme am Institut für Molekulare Medizin und die erteilten Ratschläge.

Für geduldige Anleitung der Grundlagen sowie Hilfe bei der Erlangung des handwerklichen Rüstzeugs in glühender Sommerhitze, bedanke ich mich besonders bei W. Wünsche.

Besonders bedanken möchte ich mich für eine freundliche Arbeitsatmosphäre, Ratschläge aller Art sowie Hilfestellungen bei M. Schütt, A. Hopert, M. Overhoff, K. Böttcher, P. Teich, Herr Hein-Langendorf und J. Warneke.

Ich danke meinen Eltern für ihre nicht abreißende Geduld und Unterstützungen in allen wichtigen Belangen.

10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich die hier vorliegende Dissertation

„Entwurf von Antisense-Oligonukleotiden hoher Effektivität am Beispiel der humanen Matrix-Metalloproteinase-2“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient zu haben.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch an keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum) (Unterschrift mit Vor- und Zuname)