

Antisense-Inhibition der bakteriellen RNase P

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich
Pharmazeutische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Heike Grügelsiepe
aus Nienburg a.d. Weser

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Pharmazeutische Chemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: _____ Prof. Dr. rer. nat. Roland K. Hartmann _____

Zweitgutachter: _____ Prof. Dr. rer. nat. Mario Mörl _____

Tag der mündlichen Prüfung am: 13.07.2005 _____

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Verzeichnis der Abkürzungen und Einheiten	6
1 Einleitung	9
1.1 Das Antisense-Prinzip	9
1.1.1 Modifikationen von AS-ON	11
1.1.1.1 Locked Nucleic Acids (LNA)	11
1.1.1.2 Peptide Nucleic Acids (PNA)	13
1.1.2 Antisense-Strategien bei Bakterien	14
1.1.3 Invasive Peptide	15
1.1.4 Antibiotika-Resistenzen	17
1.2 RNA als <i>drug target</i>	17
1.2.1 Struktur und Funktion der bakteriellen RNase P	18
1.2.2 Eukaryontische und archaeale RNase P	19
1.2.3 Strategien zur Inhibition bakterieller RNase P	20
1.2.4 Eignung der CCA-Bindungsstelle für eine Antisense-Strategie	21
2 Aufgabenstellung	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Bakterielle Zellkultur	23
3.1.1 Zellaufzucht	23
3.1.2 Inhibition von <i>E. coli</i> -Zellen	23
3.1.3 Herstellung kompetenter Zellen	24
3.1.4 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	25
3.2 Allgemeine Nukleinsäuretechniken	25
3.2.1 Gelelektrophoretische Methoden	25
3.2.1.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	25
3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese	27
3.2.2 Nachweis von Nukleinsäuren in Gelen	27
3.2.2.1 Ethidiumbromidfärbung	27
3.2.2.2 UV- <i>shadowing</i>	28
3.2.2.3 Radioluminographie	28
3.2.3 Gelelution von Nukleinsäuren	28
3.2.4 Phenol- und Chloroformextraktion	28
3.2.5 Ethanolfällung	29
3.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
3.3 DNA-Techniken	30

3.3.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
3.3.2	Restriktionsverdau von DNA	30
3.4	RNA-Techniken	31
3.4.1	T7-Transkription	31
3.4.1.1	Nicht radioaktive T7-Transkription	32
3.4.1.2	Guanosin-gestartete T7-Transkription	32
3.4.2	Entfernung von 2',3'-Cyclophosphaten.....	33
3.4.3	5'-Phosphorylierung von RNA.....	34
3.4.4	3'-Markierung von RNA mit [5'- ³² P]pCp.....	34
3.4.5	Nukleolytische Spaltungen von Ribonukleinsäuren	35
3.4.6	Partielle alkalische Hydrolyse.....	35
3.4.7	Bleiinduzierte Spaltung von RNA	36
3.5	Kinetische und thermodynamische Methoden.....	36
3.5.1	Inhibitionsassay <i>in vitro</i>	37
3.5.2	Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D).....	39
3.5.3	Bestimmung von Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsrate (k_{off})	40
3.5.4	β -Galaktosidase-Assay	41
4	Ergebnisse und Diskussion	43
4.1	Inhibitionsstrategie.....	43
4.1.1	Inhibierung der CCA-Bindungsstelle mit haarnadelförmigen RNA-AS-ON	43
4.1.2	Inhibitionsmechanismus der haarnadelförmigen AS-ON	47
4.1.3	Spezifität der haarnadelförmigen RNA-AS-ON	48
4.1.4	Optimierung der einzelsträngigen RNA-AS-ON	48
4.1.5	Vergleich mit anderen Antisense-Inhibitionsstrategien	50
4.2	Biochemische Charakterisierung der 14mer-Inhibitoren	51
4.2.1	Vergleich des Inhibitionspotentials	52
4.2.2	Spezifität.....	54
4.2.3	Strukturanalyse durch Bleispaltung.....	57
4.2.4	Assoziations- und Dissoziationsverhalten der Inhibitoren	60
4.2.4.1	K_D -Werte	60
4.2.4.2	Dissoziationskinetik.....	61
4.2.4.3	Assoziationskinetik.....	62
4.2.4.4	Vergleich der Assoziations- und Dissoziationsdaten	64
4.2.5	Fazit aus der biochemischen Charakterisierung der 14mer-Inhibitoren.....	66
4.3	PNA-Peptid-Konjugate	66
4.3.1	<i>in vitro</i> -Experimente mit PNA-Peptid-Konjugaten	67
4.3.2	<i>in vivo</i> -Inhibition der RNase P RNA von <i>E. coli</i>	68
4.3.3	Fazit aus den Experimenten mit PNA-Peptid-Konjugaten.....	71
4.4	Ausblick	72
5	Zusammenfassung	74

Inhaltsverzeichnis	3
6 Literaturverzeichnis	76
7 Anhang	89
A Geräte, Chemikalien, Enzyme und Puffer.....	89
B Lebenslauf	94
C Eigene Publikationen	95
D Danksagung.....	96
E Selbstständigkeitserklärung.....	97

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Struktur der RNA-, LNA- und PNA-Bausteine	12
Abb. 1.2: Wirkung invasiver Peptide auf eine bakterielle Membran.....	16
Abb. 1.3: Sekundärstrukturen der <i>E. coli</i> -RNase P RNA und <i>M. hyopneumoniae</i> -RNase P RNA	20
Abb. 3.1: Wachstumskurve für 3-ml LB-Kulturen des <i>E. coli</i> -Wildtyps K12 und des LPS-defekten Stamms AS19	24
Abb. 4.1: Schematische Darstellung des <i>kissing complex</i>	44
Abb. 4.2: Postulierte Invasion der haarnadelförmigen AS-ON in die RNA-Untereinheiten von <i>E. coli</i> - und <i>M. hyopneumoniae</i> -RNase P RNA	45
Abb. 4.3: Inhibition der RNA-Untereinheit von <i>E. coli</i> und <i>M. hyopneumoniae</i> durch haarnadelförmige AS-ON	46
Abb. 4.4: Charakterisierung des Inhibitionsmechanismus der haarnadelförmigen AS-ON....	47
Abb. 4.5: Längenoptimierung der einzelsträngigen RNA-AS-ON	49
Abb. 4.6: Inhibitionspotential der gegen verschiedene <i>E. coli</i> -P RNA-Regionen gerichteten DNA-AS-ON.....	51
Abb. 4.7: mögliche Triplexbildung zwischen einem <i>E. coli</i> -P RNA-Molekül und zwei PNA-14meren.....	54
Abb. 4.8: Postulierte Invasion des <i>E. coli</i> -spezifischen 14mers in die P15-Region verschiedener bakterieller P RNAs.....	55
Abb. 4.9: Darstellung der K_i -Werte über der freien Energie für die Inhibition der P RNAs von <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. vinosum</i> und <i>T. thermophilus</i> durch die verschiedenen RNA-14mere.....	56
Abb. 4.10: Nachweis des Antisense-Mechanismus für die 14mer-Inhibitoren mittels Bleispaltung	58
Abb. 4.11: Variation der Vorinkubationszeit der 14mer-Analoga	60
Abb. 4.12: Bestimmung der Dissoziationsrate von <i>E. coli</i> -P RNA und RNA-14mer bzw. DNA-14mer nach der Kompetitionsmethode.....	62
Abb. 4.13: Lineare Abhängigkeit des Substratumsatzes von der <i>E. coli</i> -P RNA-Konzentration	63
Abb. 4.14: Bestimmung der Assoziationsraten für das DNA-, RNA-, LNA- und PNA-14mer.	64
Abb. 4.15: PNA-Peptid-Konjugate zur Inhibition von <i>E. coli</i> -P RNA	67
Abb. 4.16: Effekte der PNA-Peptid-Konjugate auf das Wachstum des LPS-defekten <i>E. coli</i> -Stamms AS19 sowie des Wildtyps K12.....	68

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Auswahl zugelassener oder in klinischen Tests befindlicher AS-ON	10
Tab. 1.2: Vergleich der Eigenschaften von LNA und PNA	14
Tab. 3.1: Komigrationsverhalten einzelsträngiger Nukleinsäurefragmente (Länge in Nukleotiden) und der Farbstoffe BPB und XCB in denaturierenden Polyacrylamidgelen.	26
Tab. 3.2: Trennbereich von Agarosegelen	27
Tab. 4.1: K_i -Werte für die Interaktion der 14mer-Analoga mit den P RNAs von <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. vinosum</i> und <i>T. thermophilus</i>	52
Tab. 4.2: Kinetische Daten der 14mer-Analoga.....	61

Verzeichnis der Abkürzungen und Einheiten

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm	MBq	Megabequerel
A	Adenosin	min	Minute
Amp	Ampicillin	MW	Molekulargewicht
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Nt	Nukleotid(e)
AS-ON	Antisense-Oligonukleotid	N, dN	Nukleotid, Desoxynukleotid
BxHxD	Breite x Höhe x Dicke	NTP(s)	Ribonukleosidtriphosphat(e)
bidest.	bidestilliertes Wasser	OD	optische Dichte
bp	Basenpaar	P	Produkt
BPB	Bromphenolblau	p.a.	pro analysi
BSA	Rinderserumalbumin	PAA	Polyacrylamid
C	Cytidin	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
°C	Grad Celsius	PEG	Polyethylenglycol
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute	PNA	Peptide Nucleic Acid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
ds	doppelsträngig	RNase	Ribonuklease
DTT	Dithiothreitol	RNAi	RNA-Interferenz
E	Enzym	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	s	Sekunde
G	Guanosin	S	Substrat
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat
i.A.	im Allgemeinen	siRNA	small interfering RNA
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante	snRNA	small nuclear RNA
K _i	Inhibitionskonstante	sog.	sogenannte
kV	Kilovolt	ss	einzelsträngig
k	Reaktionsrate	T	Thymidin
k _{cat}	katalytische Geschwindigkeit	TBE	Tris-Borat-EDTA (Puffer)
k _{obs}	beobachtete Reaktionsrate	TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethylendiamin
k _{off}	Dissoziationsrate	T _m	Schmelztemperatur
k _{on}	Assoziationsrate	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
l	Liter	(p)tRNA	(pre)transfer-RNA
LB	Luria-Bertani	U	Uridin
LNA	Locked Nucleic Acid	U	Unit(s), Einheit der Enzymaktivität
LPS	Lipopolysaccharid		
M	mol/l, molar		
mA	Milliampere		

Upm	Umdrehungen pro Minute	XCB	Xylencyanolblau
UV	Licht im ultravioletten Bereich		

Präfixe für Einheiten: **f**, Femto (10^{-15}); **p**, Pico (10^{-12}); **n**, Nano (10^{-9}); **μ**, Mikro (10^{-6}); **m**, Milli (10^{-3}); **c**, Zenti (10^{-2}); **d**, Dezi (10^{-1}); **k**, Kilo (10^3); **M**, Mega (10^6); **G**, Giga (10^9).
Außerdem wurden allgemein übliche Abkürzungen verwendet.

1 Einleitung

1.1 Das Antisense-Prinzip

Das Antisense-Prinzip basiert auf der Watson-Crick-Basenpaarung von Nukleinsäuren mit einer komplementären Ziel-RNA. Schon 1978 entdeckten Zamecnik und Stephenson die Fähigkeit von DNA-Oligonukleotiden, die virale Replikation zu inhibieren (Zamecnik 1978). 1981 fanden Tomizawa et al. in *Escherichia coli* die erste natürliche Antisense-RNA, die die Replikation des Plasmids ColE1 kontrolliert (Tomizawa 1981). Heute sind unter den sogenannten kleinen RNAs (*small RNAs*) zahlreiche Antisense-RNAs, häufig mit regulatorischen Funktionen, in Bakterien bekannt. Sie spielen nicht nur eine Rolle bei der Replikation, sondern auch bei der Konjugation von Plasmiden. Darüber hinaus wird angenommen, dass sich Bakterien mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden (AS-ON) an sich verändernde Umweltbedingungen anpassen können (Brantl 2002, Massé 2003, Wagner 2002). Auch in Eukaryonten konnte eine Regulation nach dem Antisense-Prinzip beobachtet werden. Die sogenannte RNA-Interferenz (RNAi) wurde von Fire et al. 1998 das erste Mal beschrieben (Fire 1998).

Neben dem natürlichen Vorkommen bietet das Antisense-Prinzip interessante Therapiemöglichkeiten. So kann mit einzelsträngigen AS-ON generell mRNA blockiert werden, während die doppelsträngigen siRNAs (*small interfering RNAs*) nur im eukaryontischen System eingesetzt werden und dort für einen Abbau der mRNA sorgen. Mit Ribozymen und DNAsymen können mRNAs sowohl zerstört als auch repariert werden. Werden Antisense-Moleküle als Inhibitoren eingesetzt, so liegt ihr Vorteil gegenüber vielen konventionellen Inhibitoren darin, dass sie nicht das Protein hemmen, sondern bereits auf Translationsebene eingreifen und schon die Bildung des Proteins verhindern.

Im Weiteren soll nur auf Antisense-Oligonukleotide eingegangen werden. Als erstes und bis heute einziges Antisense-Medikament wurde Vitravene (Fomivirsen) 1998 zugelassen (Marwick 1998). Vitravene ist ein Phosphothioat-modifiziertes DNA-Oligonukleotid, das zur Behandlung von *Cytomegalovirus*-induzierter Retinitis bei AIDS-Patienten eingesetzt wird. Eine Reihe anderer Antisense-Medikamente sind zur Zeit in der klinischen Phase I bis III (Tab. 1.1). Die Beispiele zeigen, dass Antisense-Oligonukleotide potentiell in einem weiten Spektrum von Krankheiten, wie virale Infektionen, diverse Tumorerkrankungen und entzündliche Krankheiten eingesetzt werden können (Opalinska 2002, Kurreck 2003).

Tab. 1.1: Auswahl zugelassener oder in klinischen Tests befindlicher AS-ON

modifiziert nach Kurreck (2003) und Agrawal (2004)

Produkt	Firma	Target	Krankheit	Status
Vitravene (Formivirsen)	ISIS Pharmaceuticals	CMV IE2	CMV-Retinitis	zugelassen
Affinitac (ISIS 3521)	ISIS	PKC- α	Krebs	Phase III
Genasense	Genta	Bcl2	Krebs	Phase III
Alicaforsen (ISIS 2302)	ISIS	ICAM-1	Psoriasis, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa	Phase II/III
ISIS 14803	ISIS	Antiviral	Hepatitis C	Phase II
ISIS 2503	ISIS	H-ras	Krebs	Phase II
MG98	Methylgene	DNA Methyl- transferase	Krebs	Phase II
EPI-2010	EpiGenesis Pharmaceuticals	Adenosin A1- Rezeptor	Asthma	Phase II
GTI 2040	Lorus Therapeutics	Ribonukleotid- Reduktase (R2)	Krebs	Phase II
ISIS 104838	ISIS	TNF α	Rheumatoide Arthritis, Psoriasis	Phase II
ISIS 113715	ISIS	PTP-1B	Typ 2 Diabetes	Phase II
OGX-011	OncoGenex Technologies	Clusterin	Krebs	Phase I/II
Avi4126	AVI BioPharma	c-myc	Restenosis, Krebs, Polycystische Nieren- erkrankungen	Phase I/II
Gem231	Hybridon	PKA RI α	Krebs	Phase I/II
Gem92	Hybridon	HIV gag	AIDS	Phase I

Bcl2, B-cell CLL/lymphoma 2; CMV, Cytomegalovirus; HIV, human immunodeficiency virus; ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; TNF α , tumor necrosis factor α , PTP-1B, Protein Tyrosinphosphatase-1b

Die in Tab. 1.1 aufgelisteten klinischen Studien zeigen, dass mit AS-ON bisher vorwiegend virale oder eukaryontische und nicht bakterielle Systeme adressiert werden. Während bei der klassischen Anwendung von AS-ON das Zielmolekül mRNA ist, wurde in der vorliegenden Arbeit zudem das erste Mal eine stabile RNA als Zielmolekül ausgewählt, die RNA-Untereinheit der bakteriellen Ribonuklease P (RNase P, 1.2.1).

1.1.1 Modifikationen von AS-ON

Unmodifizierte Oligonukleotide haben eine sehr kurze Lebensdauer in biologischen Flüssigkeiten, da sie von den dort vorhandenen Nukleasen abgebaut werden. Für eine therapeutische Anwendung muß also die Stabilität der AS-ON durch Modifikationen verbessert werden. Es gibt zahlreiche Modifikationen, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen: Veränderungen am Rückgrat der Nukleotide (Zucker und Phosphatanteil) und an den Basen. Häufig verwendete Modifikationen der ersten Gruppe sind unter anderem Phosphothioat-DNA oder -RNA. In der Ribose wird speziell die 2'-OH-Gruppe modifiziert, so wie bei 2'-O-Methyl-RNA oder bei Locked Nucleic Acid (LNA). Bei Peptide Nucleic Acid (PNA) ist das gesamte Rückgrat gegen ein Peptidgerüst ausgetauscht. Ein Vertreter der zweiten Gruppe ist z.B. Inosin. Im Folgenden sollen nur die in dieser Arbeit verwendeten Modifikationen vorgestellt werden, die LNA- und PNA-Modifikationen.

1.1.1.1 Locked Nucleic Acids (LNA)

Locked Nucleic Acids (LNA, Abb. 1.1) wurden zuerst von Wengel und Imanishi 1998 synthetisiert (Koshkin 1998, Obika 1998). Das „*Locked*“ drückt aus, dass die 2' OH-Gruppe mit dem 4' C über eine Methylenbrücke verbunden, und so die Ribose in der 3'-endo Konformation fixiert ist. Dadurch entsteht ein starres Molekül, das mit RNA über Watson-Crick-Basenpaarung eine Duplex der A-Typ-Konformation bildet (Nielsen 2004). In LNA/DNA-Mixmeren, Oligonukleotiden, in denen sowohl DNA-, als auch LNA-Bausteine vorliegen, beeinflussen die LNA-Nukleotide, hauptsächlich in 3'-Richtung, benachbarte DNA-Nukleotide und zwingen diese in eine A-Typ-Konformation, wodurch die Duplexbildung mit RNA-Sequenzen erleichtert wird (Nielsen 2004, Petersen 2002). Die Affinität von LNA-Oligonukleotiden zu komplementären RNA- und DNA-Sequenzen ist verglichen mit den natürlichen Analoga deutlich höher (Singh 1998). So steigt die Schmelztemperatur (T_m -Wert) einer DNA:DNA-Helix bis zu 9,6 °C durch den Einbau eines einzigen zentralen LNA-Bausteins, wobei die Zunahme des T_m -Wertes mit jedem weiteren LNA-Nukleotid abnimmt (Braasch 2001). Ebenso wird der Effekt kleiner, wenn LNA-Bausteine in längere Oligonukleotide eingebaut werden, da diese von sich aus schon relativ hohe T_m -Werte aufweisen (Kurreck 2002). Bei RNA ist der Effekt nicht ganz so ausgeprägt. So wurde bei einer 9mer LNA/RNA-Hybridhelix eine Erhöhung des T_m -Wertes um 4 °C pro LNA-Nukleotid im Vergleich zu der entsprechenden RNA-Duplex gemessen (Singh 1998). Dagegen nimmt der T_m -Wert von 2'-O-methyl-Oligonukleotiden nur um weniger als 1°C pro Modifikation zu, während bei Phosphothioat-modifizierten AS-ON der T_m -Wert sogar noch unter dem des DNA-Oligonukleotids liegt (Kurreck 2002). Die Ursache für die außerordentlich hohe Thermostabilität von LNA-Hybridhelices konnte bis jetzt noch nicht eindeutig identifiziert werden. Es wird angenommen, dass sich Wasserbrücken zwischen dem 2' Brückensauerstoff des LNA-Nukleotides und dem 4' Sauerstoff des 3' benachbarten Zuckers ausbilden und damit die Hydratation in der kleinen Furche erhöhen. NMR-Daten

deuten auf ein sehr rigides Molekül mit einer geringen internen Beweglichkeit und einer insgesamt stärker geordneten Hydrathülle (Nielsen 2004).

Weitere Vorteile von LNAs sind ihre gute Wasserlöslichkeit und ihre einfache Kombinierbarkeit mit anderen oder modifizierten Nucleotiden, für die die gleiche Kopplungschemie verwendet wird (Petersen 2003). So können LNA/DNA-Mixmere so gestaltet werden, dass sie durch die Aktivierung von RNase H in eukaryontischen Systemen die Antisense-Wirkung verstärken (Kurreck 2002). Die Stabilität von LNA/DNA-Mixmeren ist im Serum deutlich höher als die unmodifizierter Oligonucleotide. Ein Vergleich mit Phosphothioat-modifizierten Oligonucleotiden zeigte, dass der Abbau der LNA/DNA-Mixmere geringer war als der der Phosphothioat-Oligonucleotide (Wahlestedt 2000). In Versuchen mit SVPD (*3'-exonuclease snake venom phosphodiesterase*) und S1 Endonuclease waren allLNAs (Oligonucleotide, die nur aus LNA-Bausteinen bestehen) noch stabiler als LNA/DNA-Mixmere (Vester 2004). Zur Untersuchung der Toxizität wurden allLNAs und fünf Phosphothioatbasen enthaltende Oligonucleotide direkt in das Gehirn von Ratten injiziert. Es konnte keine Toxizität der LNA-Moleküle festgestellt werden, während die Phosphothioat-modifizierten Oligonucleotide deutliche Gewebeschäden verursachten (Wahlestedt 2000).

Die hohe Affinität der LNA-Oligonucleotide zu Nucleinsäuren geht einher mit einer erhöhten Toleranz gegenüber Fehlpaarungen und somit einer geringeren Spezifität. Dem kann durch den Einsatz von LNA/DNA-Mixmeren mit geschickt positionierten LNA-Bausteinen entgegen gewirkt werden (Braasch 2001). Ebenso kann dies durch ein Verkürzen der LNA-Bausteine erreicht werden (Kurreck 2003).

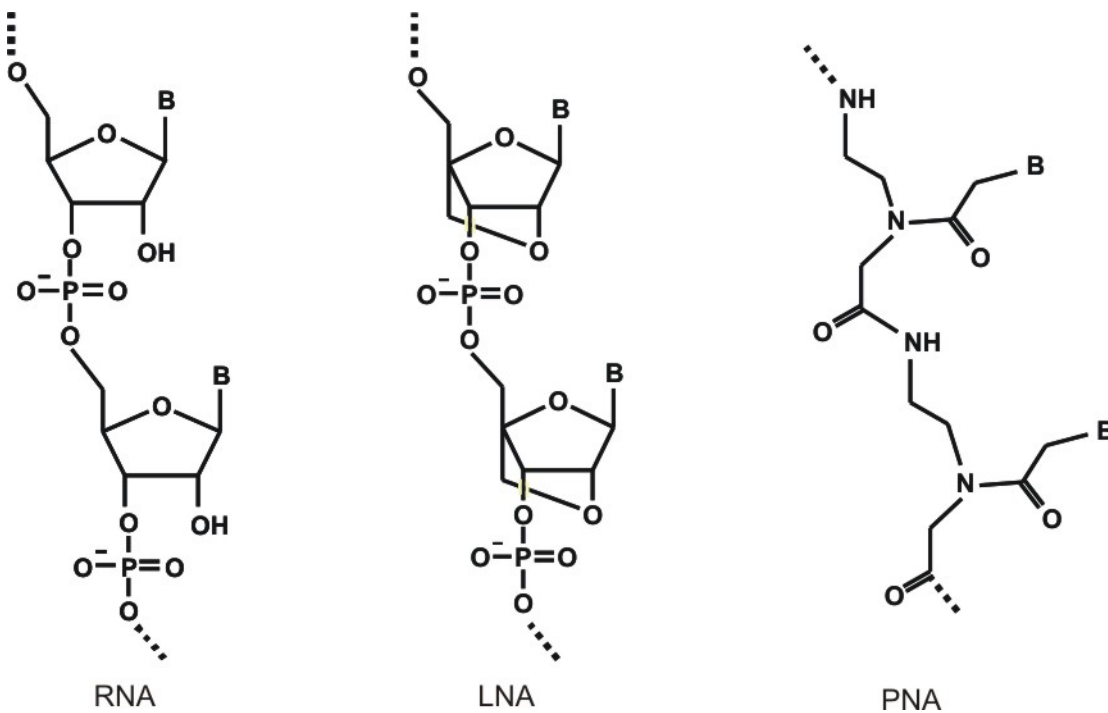


Abb. 1.1: Struktur der RNA-, LNA- und PNA-Bausteine

1.1.1.2 Peptide Nucleic Acids (PNA)

1991 berichteten Nielsen et al. das erste Mal von der Synthese einer Peptide Nucleic Acid (PNA, Abb. 1.1, Nielsen 1991). PNA besteht aus einem Peptid-Rückgrat mit N-(2-Aminoethyl)-glycin Einheiten, die durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die Nukleo-Basen sind über Methylene-Carbonyl-*linker* mit dem Rückgrat verbunden. PNA und DNA sind homomorph zueinander, d.h. wie bei DNA besteht eine Einheit des Rückgrates aus sechs Bindungen und die Basen sind vom Rückgrat drei Bindungen entfernt. Die Interaktion mit anderen Oligonukleotiden geschieht über Watson-Crick-Basenpaarungen (Egholm 1993). Aufgrund des ungeladenen Rückgrates zeigen PNA-Oligomere im Vergleich mit natürlichen Oligonukleotiden eine höhere Affinität zu der komplementären RNA- oder DNA-Sequenz, da sich das ungeladene Rückgrat der PNA und das geladene Rückgrat der RNA bzw. DNA nicht abstoßen (Egholm 1993). Der T_m -Wert einer PNA/DNA-Hybridhelix von 15 Nukleotiden Länge liegt in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung ungefähr 15 °C über dem der entsprechenden DNA-Duplex, die Schmelztemperatur der analogen PNA:RNA-Hybridhelix liegt noch darüber (Egholm 1993, Jensen 1997). Die Hybridisierung findet nahezu unabhängig von der im Medium vorhandenen Salzkonzentration statt (Egholm 1993). Durch einen *mismatch* wird die PNA:DNA-Hybridhelix stärker destabilisiert als die DNA-Duplex, was darauf hindeutet, dass PNA-Oligomere spezifischer sind als DNA-Oligonukleotide (Jensen 1997). PNAs neigen zur Stranginvasion in doppelsträngige DNA, wobei sich das erste PNA-Oligonukleotid über Watson-Crick- und das zweite über Hoogsteen-Basenpaarung anlagert (Almarson 1993, Kaihatsu 2004). Eine solche Triplexbildung kann auch zwischen einem RNA- und zwei PNA-Oligomeren stattfinden (Almarsson 1993, Dias 2002).

Das Polyamid-Rückgrat ist kein gängiges Substrat für Nukleasen und Proteasen, was eine hohe Stabilität der PNA in biologischen Flüssigkeiten zur Folge hat. So konnte sowohl bei der Inkubation in humanem Serum, als auch mit Zellextrakten von *Micrococcus luteus* und *E. coli* kein signifikanter Abbau beobachtet werden (Larsen 1999). Die Aufnahme von PNA in die Zelle ist sehr gering, so dass häufig Peptide an die PNA-Oligomere angehängt werden, um die Zellaufnahme zu verbessern (Nielsen 1999). Dies ist bei PNA unproblematisch möglich, da PNA-Oligomere durch Peptidsynthese hergestellt werden. Dagegen gestaltet sich eine Kombination mit anderen auf der Zuckerchemie basierenden Nukleotidanaloga schwierig. In Versuchen mit Ratten konnten keine toxischen Effekte der PNA-Peptide festgestellt werden (Pooga 1998).

In der nachfolgenden Tabelle sind die Eigenschaften von LNA und PNA noch einmal zusammenfassend gegenübergestellt (Tab. 1.2). Allerdings gibt es für PNA und LNA in der Literatur bisher keine vergleichenden Studien zur Spezifität und RNA-Affinität.

Tab. 1.2: Vergleich der Eigenschaften von LNA und PNA

LNA	PNA
negativ geladen	ungeladen
Synthese wie DNA/RNA	Synthese wie Peptide
leichte Synthese von LNA/DNA-Mixmeren	gute Synthetisierbarkeit von PNA-Peptid-Konjugaten
gute Wasserlöslichkeit	schlechte Wasserlöslichkeit
LNA/DNA aktiviert RNase H	keine Aktivierung von RNase H
geringe Toxizität in Ratten	geringe Toxizität in Ratten
Stranginvasion wie bei RNA und DNA	verbesserte Stranginvasion durch neutrales Rückgrat
erhöhte Nuklease-/ Proteasestabilität	erhöhte Nuklease-/ Proteasestabilität

1.1.2 Antisense-Strategien bei Bakterien

Es gibt sehr wenig dokumentierte Versuche, AS-ON in Bakterien einzusetzen. Der Hauptgrund ist sicherlich die im Gegensatz zu eukaryontischen Zellen sehr massive Zellbarriere. Bei Gram-negativen Bakterien ist die Zellwand aus einer Peptidoglycanschicht, dem Mureinsacculus, und einer sich anschließenden Lipid-Doppelschicht (äußere Membran) aufgebaut. Die äußere Membran ist mit Phospholipiden und nach außen gerichteten Lipopolysacchariden bestückt. Zwischen dem Mureinsacculus und der Cytoplasmamembran befindet sich der periplasmatische Raum. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien ist einfacher aufgebaut, hier besteht der Mureinsacculus aus ungefähr 40 Schichten und liegt direkt auf der Cytoplasmamembran auf. An diese Peptidoglycanschicht sind Teichonsäuren angeheftet. Bei Gram-negativen Bakterien ist die hauptsächliche Barriere für Fremdstoffen die äußere Membran, in die wassergefüllte Porine eingelassen sind und durch die nicht zu große hydrophile Substanzen (wie z.B. Antibiotika) in die Zelle gelangen. Die Lipopolysaccharide bilden eine polyanionische Schicht, die teilweise durch zweiwertige Ionen neutralisiert wird. Die zweiwertigen Ionen können durch andere positiv geladene Substanzen ausgetauscht werden, die so die Möglichkeit haben, in die Zelle zu diffundieren. Hydrophobe Substanzen finden ihren Weg durch die Membran nur langsam, da sie zuerst die geladene äußere Schicht überwinden müssen. Desweiteren besitzen Gram-negative Bakterien verschiedene Translokasen, die die Aufgabe haben, eine Vielzahl fremder Substanzen aus der Zelle herauszubefördern (Hancock 1997, Zgurskaya 2000). Bei Gram-positiven Bakterien stellt der Mureinsacculus samt assoziierten anionischen Polymeren für Fremdstoffen bis zu einer Größe von 30 000 bis 57 000 Da keine Barriere dar. Die meisten Antibiotika sind kleiner, wohingegen Antisense-basierte Inhibitoren ungefähr in diesem Grenzgrößenbereich liegen. Antibiotikaresistenzen sind hier auf Inaktivierung, Modifizierung des *targets* oder effizientes Ausschleusen der Fremdstoffen zurückzuführen (Lampert 2002).

In einem der ersten Versuche, AS-ON bei Bakterien einzusetzen, sollte mit DNA-Methylphosphonaten komplementär zur Shine-Dalgarno-Sequenz der 16S rRNA das Wachstum von *E. coli* gehemmt werden. Die Inhibitoren hatten keinen Effekt auf den *E. coli*-Wildtyp, während ein LPS-defekter Stamm eine Inhibition bei sehr hohen AS-ON Konzentrationen zeigte (75 μ M; Jayaraman 1981). Ebenso konnte das Wachstum des *E. coli*-Wildtyps nur mit hohen Konzentrationen antiribosomaler PNA-Nukleotide (*target*: α -Sarcin Loop) inhibiert werden, während bei einem LPS-defekten Stamm Effekte bei deutlich geringeren Konzentrationen beobachtet werden konnten (Good 1998). Auch Cheng et al. waren nur unter Einsatz großer Mengen Triplex-formender DNA-Oligonukleotide (30 bis 200 μ M) in der Lage das *lac*-Operon in *E. coli* zu hemmen (Cheng 2001). Diese Versuche zeigen, dass die Zellbarriere auch für AS-ON ein schwer zu überwindendes Hindernis darstellt. Deswegen wurden in weiteren Arbeiten AS-ON in Kombination mit verschiedenen zellwandaktiven Substanzen, wie z.B. Antibiotika oder invasive Peptide, verwendet (Harth 2000, White 1997, Rapaport 1996, Good 2001).

Bezüglich der Aufnahme von PNA in Bakterienzellen wurden Experimente mit subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen und unterschiedlichen PNA-Konzentrationen alleine und in Kombination an verschiedenen *E. coli*-Stämmen getestet. Die eingesetzten Stämme hatten verschiedene Lipopolysaccharid (LPS)- oder Translokasedefekte. Die PNA-Oligomere wurden zusammen mit zellwandaktiven Substanzen deutlich besser in die Bakterienzelle aufgenommen. Dabei stellte sich heraus, dass hauptsächlich die Lipopolysaccharidschicht der *E. coli*-Zelle die Aufnahme von PNA-Oligomeren behindert, während die Translokase keinen Einfluß auf das Inhibitionspotential der PNAs hatte (Good 2000).

Eine weitere Strategie, die Zellaufnahme von AS-ON zu verbessern, stellt der Einsatz sogenannter invasiver Peptide dar, die zum Antikörper-unabhängigen angeborenen Immunsystem gehören und meist als Cocktail verschiedener Peptide zur Abwehr bakterieller Angriffe dienen (Zasloff 2002). Invasive Peptide wurden in hohen Konzentrationen direkt eingesetzt, um das Bakterienwachstum zu hemmen, oder in geringen Konzentrationen kombiniert mit anderen Inhibitoren, um deren Zellgängigkeit zu verbessern (Vaara 1996, Good 2001, Geller 2003, Nekhotiaeva 2004).

1.1.3 Invasive Peptide

Die meisten invasiven Peptide scheinen beim Eindringen in die Bakterienmembran eine amphiphatische Architektur mit einer räumlichen Trennung von hydrophoben und kationischen Aminosäuren anzunehmen (Epanand 1999). Die Diversität ist so groß, dass bei verschiedenen Spezies selten die gleiche Peptidsequenz gefunden wird. Mechanistische Modelle für die Wirkung antimikrobieller Peptide sind in Abb. 1.2. illustriert. Danach kommt es zunächst zu einer Anlagerung an die Außenseite der Membran (a) und anschließend zur Durchdringung der gesamten Lipiddoppelschicht (b). Dabei ergeben sich verschiedene Szenarien: so können die Peptide entweder Poren formen (c), die Membran zerstören (f), so

dass die Zelle ausläuft, oder schlicht hindurchdiffundieren (d), wodurch auch das Erreichen eines intrazellulären *targets* denkbar ist (e). In Gram-negativen Bakterien sorgen die kationischen Peptide für einen Austausch der Magnesium- und Calciumionen, die die Lipopolysaccharidschicht durch Verknüpfen der negativ geladenen Phosphozucker stabilisieren (Zasloff 2002).

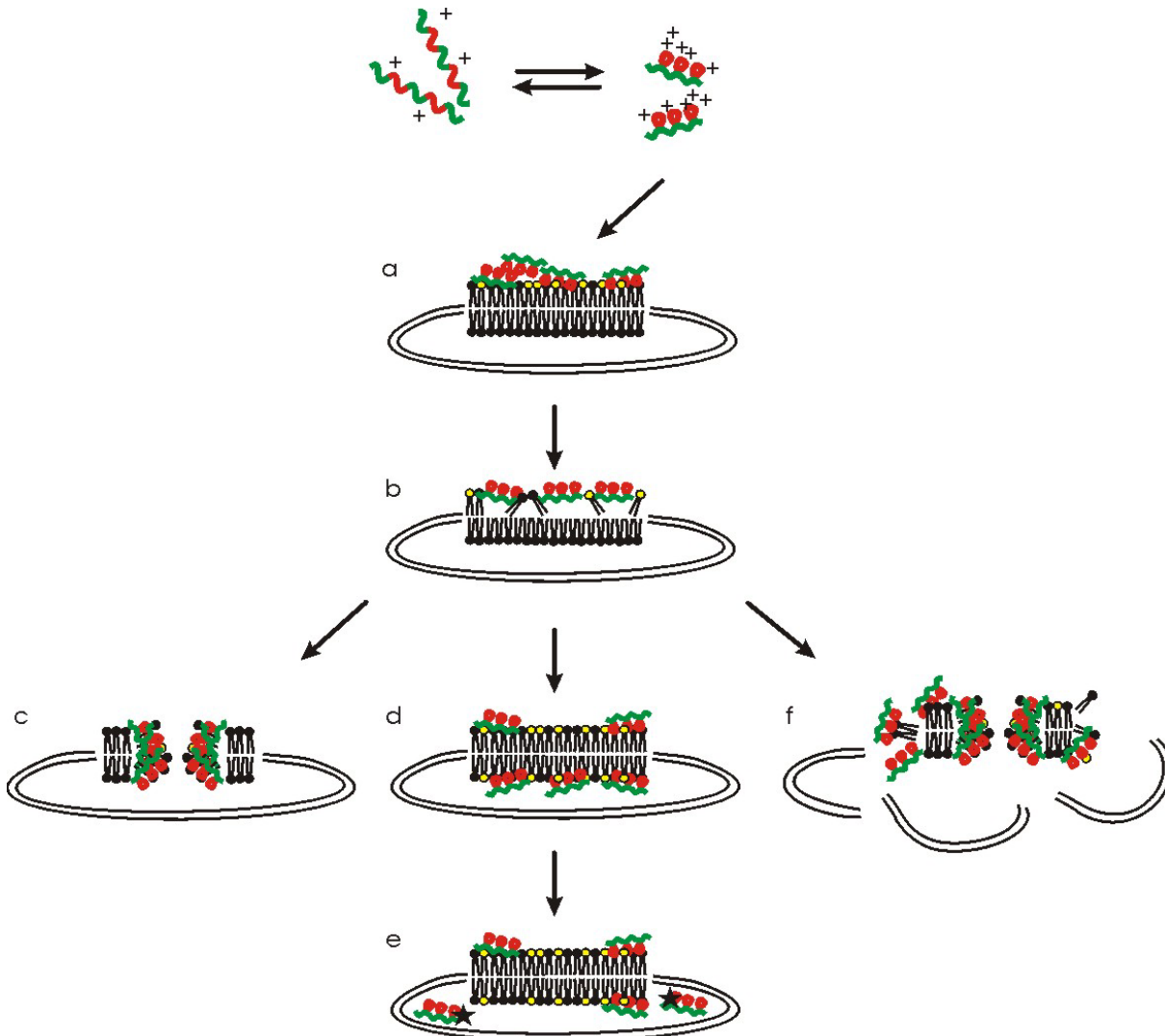


Abb. 1.2: Wirkung invasiver Peptide auf eine bakterielle Membran

Invasive Peptide sind in grün (hydrophober Teil) und rot (hydrophiler Teil) dargestellt, gelbe Köpfe: geladene Lipide, schwarze Köpfe: ungeladene Lipide, schwarzer Sterne: intrazelluläres Zielmolekül, modifiziert nach Zasloff (2002)

Im Gegensatz zu herkömmlichen Antibiotika ist die Resistenzbildung bei invasiven Peptiden überraschend gering. So konnte keine Resistenz gegen das invasive Peptid Pexignan in *E. coli* und *Staphylococcus aureus* durch chemische Mutagenese erzeugt werden (Ge 1999). Ein Grund für den Erfolg invasiver Peptide könnte in ihrem *target* begründet liegen. Für Bakterien wäre eine Umorganisation der Zellmembran(en), also eine Änderung in der Organisation und/ oder Komposition der Lipide wahrscheinlich zu kostspielig. Ein proteolytischer Abbau der Peptide ist ebenfalls schwer zu realisieren, weil *in vivo* meist ein

ganzer Cocktail von Peptiden vorhanden ist, die keinerlei Sequenzübereinstimmungen zeigen, so dass die Ausbildung von Resistenzmechanismen erschwert wird (Zasloff 2002).

1.1.4 Antibiotika-Resistenzen

Die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in pathogenen Bakterien stellt ein wachsendes Problem bei der Behandlung von Infektionskrankheiten dar, da neue Antibiotika nicht im selben Maße entwickelt werden. Ein großes Problem sind durch Krankenhaus-assoziierte Bakterienstämme ausgelöste Infektionskrankheiten bei immunschwachen Patienten (Overbye 2005, Walsh 2004, Walsh 2003, Fauci 2001). Einige der Bakterien, die die Ursache für die im Folgenden aufgeführten Erkrankungen sind, gelten heute schon als vollständig resistent gegen alle etablierten Antibiotika bzw. werden diesen Status voraussichtlich in naher Zukunft erreichen (Payne 2004, Cohen 2000). So sind bei den *Staphylococcen* (Lebensmittelvergifter, Eitererreger) multiresistente Stämme (sog. MRSA = multiresistente *Staphylococcus aureus*-Isolate) weit verbreitet. Die Ursachen liegen in der hohen Mutationsfrequenz dieser Bakterien, sowie in der Fähigkeit Resistenzgene in das eigene Genom zu integrieren (Weigel 2003). Ein weiteres Beispiel ist die neuerliche Ausbreitung von Tuberkulose als Koinfektion in Zusammenhang mit AIDS durch *Mycobacterium tuberculosis*-Stämme, die resistent gegen alle gängigen Medikamente sind (Walsh 2004). *Enterococcus faecium* und *faecalis* (VRE = Vancomycin resistant *Enterococcus*) sind die ersten Krankenhaus-assoziierten Bakterien, die vollständig therapieresistent (pan-resistent) sind (Patterson 2001). Auch *Pseudomonas aeruginosa* steht aufgrund seiner großen Vielfalt an unterschiedlichen β -Lactamasen auf der Liste der multiresistenten Bakterien mit Potential zur Pan-Resistenz (Senda 1996). Die oben geschilderte Problematik macht die Suche nach neuen Ansätzen zur Bekämpfung von pathogenen Bakterien notwendig. Demgegenüber sind neue Antibiotika-Strategien rar: unter den neuen Antibiotika, die zur Zeit in klinischen Studien getestet werden, befindet sich nur eine vollständig neue Klasse, die Peptid-Deformylase-Inhibitoren (Bush 2004).

1.2 RNA als drug target

Bis zur Entdeckung ihrer katalytischen Aktivität in den frühen 80er Jahren waren RNAs nur als Informationsüberträger in Form von mRNA oder als stabile RNA in Form von tRNA und ribosomaler RNA bekannt. Seitdem nehmen die Erkenntnisse zur Bedeutung und Vielfältigkeit der RNA und damit auch das Interesse an diesem Molekül immer weiter zu. Eine faszinierende Feststellung in diesem Zusammenhang war sicherlich, dass das aktive Zentrum des Ribosoms vollständig aus RNA besteht, folglich das Ribosom das größte Ribozym ist (Ban 2000). Die Entdeckung der regulatorischen Funktion der RNA-Interferenz in Eukaryonten sowie kleiner RNAs in Bakterien machte eine weitere Facette dieses vielfältigen Moleküls sichtbar. Mit dieser Entwicklung nimmt auch das Interesse an RNA als *drug target* zu (Sullenger 2002). Ein *RNA-target* hat gegenüber einem *Protein-target*

insbesondere den Vorteil, dass man spezifische AS-ON allein auf der Basis von Watson-Crick-Basenpaarungsregeln konzipieren kann (Hermann 1998).

Die Ansätze, durch die auf der RNA-Ebene versucht wird, zelluläre Vorgänge zu beeinflussen, sind vielfältig und umfassen das gezielte Ausschalten von mRNAs mittels AS-ON oder siRNAs (Dorsett 2004, Kurreck 2003), die Inhibition viraler RNA (Clerq 2002), den Einsatz von Ribozymen (Schubert 2004) oder die Hemmung stabiler RNAs wie im Falle des Ribosoms und der RNase P RNA (1.2.1, Wilson 2003, Tekos 2004). Ein Vorteil der RNase P RNA als *target* ist die im Vergleich zum Ribosom geringe zelluläre Konzentration. So enthalten *E. coli* Zellen einen 60- bis 100-fachen Überschuss an Ribosomen über RNase P RNA (Dong 1996). Die Übersichtsartikel von Cobaleda, Eder und Tekos beschäftigen sich mit RNase P als *drug target* bzw. als Werkzeug für eine gentechnische Anwendung und zeigen ein wachsendes medizinisches Interesse an diesem Enzym (Cobaleda 2001, Eder 2003, Tekos 2004).

1.2.1 Struktur und Funktion der bakteriellen RNase P

Ribonuklease P (RNase P) ist ein ubiquitäres und essentielles Ribonukleoprotein, das für die Reifung der Vorläufer-tRNAs (ptRNA) in sämtlichen Organismen zuständig ist. Es besteht in Bakterien aus einer Protein- (P Protein) und einer RNA-Untereinheit (P RNA), wobei die RNA-Untereinheit die katalytische Aktivität besitzt (Frank 1998, Altman 1999, Xiao 2002). Bei der tRNA-Reifung wird eine definierte Phosphodiesterbindung in der Vorläufer-tRNA hydrolysiert. Dadurch wird die 5' Flanke der ptRNA abgespalten und das reife 5' Ende der tRNA generiert (Altman 1999). Bei einer systematischen Inaktivierung von *Bacillus subtilis*-Genen stellte sich heraus, dass die Gene für die RNase P-Komponenten zu den 7 % der essentiellen Gene gehören (300 essentielle (getestet oder als essentiell vorhergesagt) von 4100 getesteten) (Kobayashi 2003). Das bakterielle Enzym ist aus einer 350 bis 400 Nukleotide langen RNA-Untereinheit und einem kleinen Protein mit 120 Aminosäuren zusammengesetzt (Tsai 2003). Die globale P RNA- Struktur ist weitgehend konserviert im Gegensatz zu einer geringen Primärsequenz-konservierung (Kurz 2000). Aufgrund ihrer Strukturcharakteristika lassen sich die RNA-Untereinheiten in zwei Subtypen unterteilen, den Typ A und B (Abb. 1.3, Brown 1998). Während die *E. coli*-P RNA ein typischer Vertreter der Typ A-P RNAs ist, sind die Typ B-P RNAs hauptsächlich in Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt anzutreffen. Als Vertreter der Typ B-P RNAs ist in Abb. 1.3 die *Mycoplasma hyopneumoniae* P RNA dargestellt.

In beiden RNase P-Strukturtypen lassen sich eine Spezifitäts- (S-Domäne, *specificity domain*) und eine Bindungsdomäne (C-Domäne, *catalytic domain*) unterscheiden, die jeweils eine unabhängige Funktion besitzen (Abb. 1.3, Loria 1996). In der Spezifitätsdomäne liegen die Helices P7 bis P12 und die *joining regions* J11/12 bzw. J12/11 (Abb. 1.3). Bei der *E. coli*-P RNA interagiert dieser Teil des Ribozyms mit dem T-Stamm und T-Loop der ptRNA, wobei es zu Kontakten zwischen einem konservierten Adenosin in P11 und den 2'OH-Gruppen des T-Stamms kommt (Pan 1995). Bei beiden Strukturtypen besteht die katalytische Domäne

unter anderem aus einer komplexen *multihelix junction*, in deren Zentrum die hoch konservierte P4-Helix plaziert ist. Ebenso befindet sich in diesem Bereich das katalytisch aktive Zentrum, dem auch die CCA-Bindungsregion zugeordnet wird (Harris 2003).

In vitro ist die RNA-Untereinheit in Abwesenheit der Proteinuntereinheit bei hohen Salzkonzentrationen katalytisch aktiv. Die Katalyse ist abhängig von Magnesiumionen, die dazu beitragen, die RNA-Untereinheit in einer aktiven Form zu organisieren (Guerrier-Takada 1983). Für die Prozessierungsreaktion bindet die ptRNA mit ihrem CCA-Ende über Watson-Crick-Basenpaarung an die beiden mit einem dunkelgrauen Kästchen markierten G's in der P15-Schleife (CCA-Bindungsstelle) der RNA-Untereinheit (Abb. 1.3). Diese Watson-Crick-Basenpaare sind ebenfalls wichtig, um katalytisch wirksame Magnesiumionen in der CCA-Bindungsstelle zu positionieren (Altman 1999, Kirsebom 1994, Heide 1999, Busch 2000). *In vivo* sorgt die Proteinuntereinheit dafür, dass die Reaktion unter physiologischen Salzkonzentrationen ablaufen kann, indem sie die Bindungsaffinität der P RNA für das Substrat durch Verbesserung des Kontaktes mit der 5' Flanke erhöht, ohne die Produktinhibition zu verstärken (Hsieh 2004).

1.2.2 Eukaryontische und archaeale RNase P

Die RNase P von Archaea und Eukarya ist verglichen mit der bakteriellen RNase P mit 4 bis 11 verschiedenen Proteinuntereinheiten deutlich komplexer aufgebaut (Jarrous 2002, Xiao 2002). Die Kernstruktur der RNA-Untereinheit ist sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten sehr ähnlich - die Helices P1, P2, P3, P4 und P 10/11, wobei allerdings nur wenige Nukleotide strikt konserviert sind (Frank 1998). Anders als bei der bakteriellen RNase P ist die RNA-Untereinheit der Archaea und Eukarya *in vitro* nicht katalytisch aktiv. In *Saccharomyces cerevisiae* sind alle 10 Proteinuntereinheiten für die katalytische Aktivität *in vivo* erforderlich (Chamberlain 1998). Die eukaryontische RNA-Untereinheit scheint keine Bindungsstelle für das 3'-CCA-Ende der ptRNA zu besitzen, ebenso wie ein Strukturäquivalent zur bakteriellen P15-Schleife fehlt. Es ist unklar, ob auch hier die Sequenzen des 3' und 5'- Endes der ptRNA eine Rolle bei der Substraterkennung durch die RNase P spielen und in welchem Umfang die Proteinuntereinheiten daran beteiligt sind. Zumindest unmittelbar nach der Transkription besitzen die eukaryontischen ptRNAs kein 3'-CCA- sondern ein Oligo-U-Ende (Xiao 2002).

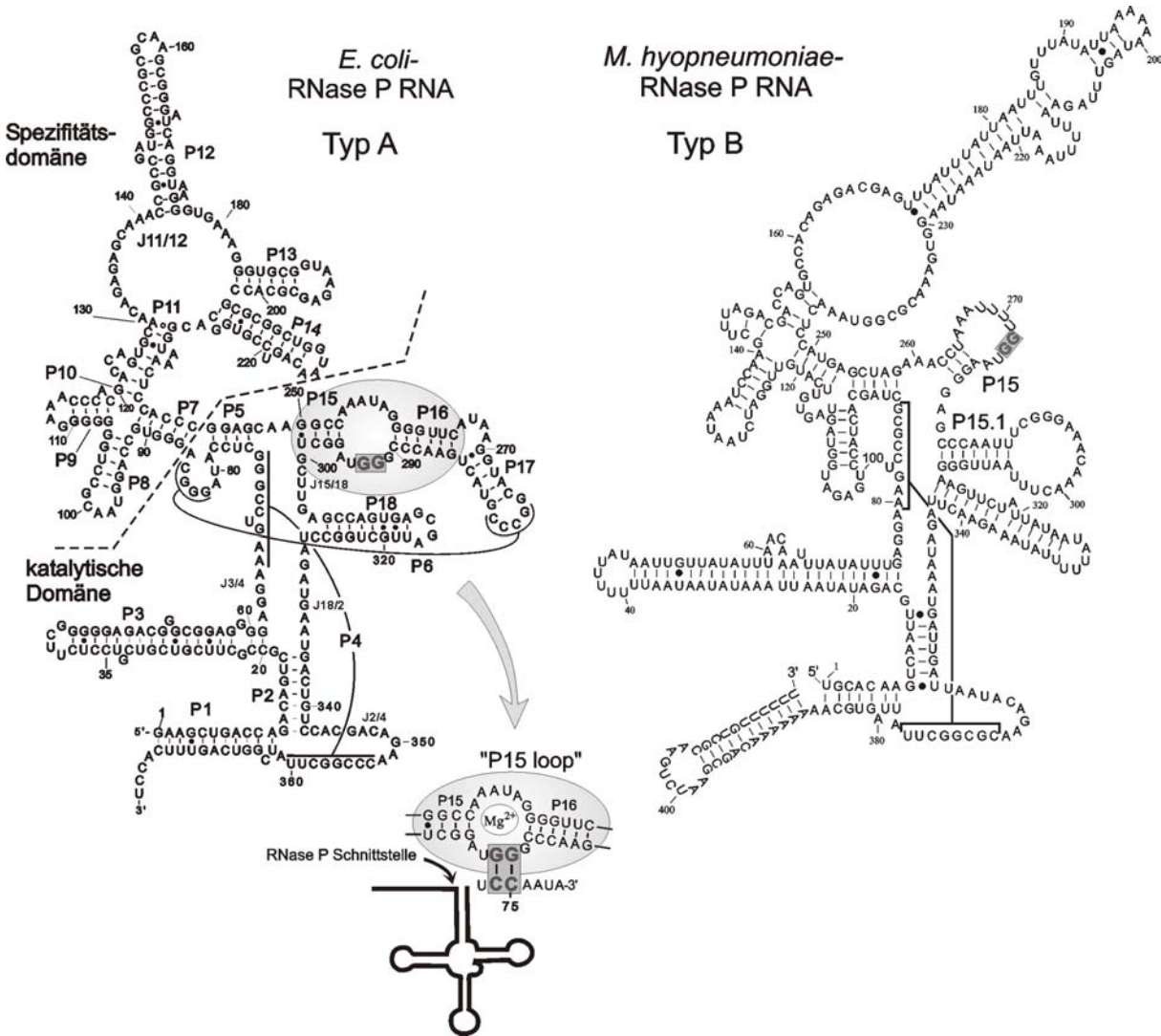


Abb. 1.3: Sekundärstrukturen der *E. coli*-RNase P RNA und *M. hypopneumoniae*-RNase P RNA
 Links: *E. coli*-RNase P RNA, die zum Strukturtyp A gehört, P bezeichnet Helices, J die sie verbindenden Abschnitte, die entsprechend den Helices, die sie miteinander verbinden, benannt werden. Die CCA-Bindungsregion ist mit hellgrauen Ovalen unterlegt, mit einem dunkelgrauen Kästchen sind die beiden G's markiert, die in die Watson-Crick-Basenpaarung involviert sind. Die gestrichelte Linie trennt die Spezifitäts- und die katalytische Domäne voneinander. Rechts: *M. hypopneumoniae*-RNase P RNA, die zum Strukturtyp B gehört, Bezeichnungen der einzelnen Segmente wie für *E. coli* beschrieben. Mitte unten: Bindung einer pTfRNA an G292 und G293 in der P15-Schleife (P15 loop) der *E. coli*-P RNA über intermolekulare Watson-Crick-Basenpaarung (dunkelgraue Box). Der schwarze Pfeil zeigt die RNase P-Schnittstelle. Mindestens zwei Magnesiumionen sind wichtig für den Spaltungsprozeß.

1.2.3 Strategien zur Inhibition bakterieller RNase P

RNase P ist nicht nur essentiell, sondern bietet sich aufgrund der Unterschiede zwischen Bakterien und Archaea bzw. Eukarya auch als potentielles *drug target* an. Neben den Antisense-basierten Strategien zur Inhibition bakterieller RNase P (Willkomm 2003, Gruegelsiepe 2003, Child 2003) wurden verschiedene Ansätze der Inhibition durch

Antibiotika (Eubank 2002, Hori 2001, Kalavrizioti 2003, Mikkelsen 1999, Papadimou 2000, Stathopoulos 2000, Vioque 1989) veröffentlicht, von denen hier einige vorgestellt werden sollen. So wurden Aminoglykoside auf ihr Inhibitionspotential sowohl bezüglich der bakteriellen RNA-Untereinheit als auch bezüglich des Holoenzym getestet. Dabei hatte Neomycin die größte Wirksamkeit mit einem K_i -Wert von 35 μM in der P RNA-Reaktion und 60 μM in der Holoenzym-Situation (Mikkelsen 1999). Eubank et al. untersuchten die Wirkung eines Hexa-Arginin-Derivates von Neomycin (NeoR) und eines Tri-Arginin-Derivates von Gentamycin (R3G) auf die katalytische Aktivität der *E. coli*-RNase P und verglichen dies mit der Wirkung auf die humane RNase P (Eubank 2002). Durch das Anhängen der Arginine konnte die Wirksamkeit des Neomycins um den Faktor 500 verbessert werden, im Gegensatz dazu wurde die humane RNase P eindeutig schlechter gehemmt. Neomycin R und R3G inhibierten auch die RNase P's von *Neisseria gonorrhoeae* und *Streptococcus pneumoniae* mit ähnlicher Effizienz, dagegen die von *Porphyromonas gingivalis* deutlich schlechter. Die Daten zeigen den Wirkungssynergismus bei der Kopplung von zwei RNA-bindenden Motiven, das der Aminoglykoside und das Arginin-reicher-Peptide. Es verdeutlicht aber auch den Anwendungsbereich von Antibiotika. Aminoglykoside binden unspezifisch an RNAs, wobei die Funktion der Ziel-RNA verändert werden kann. So entsteht bei Ribozymen eine Konkurrenzsituation bezüglich der Bindung der vorhandenen Magnesiumionen. Spezifität und Inhibitionspotential von Aminoglykosiden kann durch geschicktes Positionieren von Aminogruppen beeinflusst werden. Dieser eher unspezifischen Inhibition steht eine Organismus-gerichtete Konzeption der AS-ON entgegen.

1.2.4 Eignung der CCA-Bindungsstelle für eine Antisense-Strategie

Aus dem diskutierten Kenntnisstand ergibt sich, dass RNase P ein sehr geeignetes Zielmolekül für eine Antisense-basierte Inhibitionsstrategie ist. Dabei stellt vor allem die CCA-Bindungsstelle aus einer Reihe von Gründen eine interessante Zielsequenz innerhalb der bakteriellen RNase P dar:

- Die CCA-Bindungsregion ist von entscheidender Bedeutung für die katalytische Aktivität der bakteriellen RNase P.
- Die CCA-Bindungsregion liegt in direkter Nachbarschaft zum aktiven Zentrum.
- Die Bindung des CCA-Endes von tRNA-Molekülen ist die einzige Substrat-Ribozym-Interaktion, die auf einer kurzen Watson-Crick-Basenpaarung basiert.
- Die CCA-Bindungsregion ist an der Oberfläche des Holoenzym lokalisiert, so dass sie gut mit AS-ON zu erreichen ist.
- Die Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Bakterien in den flankierenden Bereichen der CCA-Bindungsstelle lassen es zu, AS-ON spezifisch für einen oder eine Subgruppe von Zielorganismen zu entwickeln.
- Die eukaryontische RNase P besitzt keine CCA-Bindungsstelle auf der RNA-Ebene.

2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro*- und *in vivo*-Inhibition bakterieller RNase P durch Antisense-Oligonukleotide. Ausgangspunkt waren dabei haarnadelförmige RNA-Oligonukleotide, deren Struktur auf einem in *E. coli* gefundenen Antisense-Prinzip basierten und die die Substratbindungsstelle in der *E. coli*-P RNA adressierten. Eine Optimierung sollte zu einem möglichst wirksamen Inhibitor führen, der durch Modifikation so stabilisiert werden sollte, dass er in *in vivo*-Experimenten eingesetzt werden kann. Eine biochemische und kinetische Charakterisierung der verschiedenen modifizierten AS-ON sollte dabei helfen, die geeignetste Modifikation zur Inhibition der RNase P zu finden.

Der erfolgreiche Einsatz der AS-ON hängt bei einem bakteriellen *target* nicht nur von einer ausreichenden Stabilisierung der Inhibitoren gegen den Abbau im Cytoplasma ab, sondern auch von der Zellaufnahme. Da die Zellbarriere von Bakterien wenig durchlässig für AS-ON ist, sollte der Import in die Zelle durch geeignete Nukleotidmodifikationen verbessert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterielle Zellkultur

Alle für die bakterielle Zellkultur verwendeten Geräte, Puffer und Medien wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Glasgeräte wurden alternativ auch bei 180 °C 3 h hitzesterilisiert und temperaturempfindliche Lösungen wurden steril filtriert.

3.1.1 Zellaufzucht

E. coli-Zellen wurden in LB-Medium bei 37 °C in der Regel über Nacht im Schüttelinkubator angezogen. Für Vorkulturen wurden 3 ml LB-Medium im Kulturröhrchen von einer Glycerinkultur oder von einer Einzelkolonie inokuliert. Die 3 ml-Kulturen wurden für Plasmidpräparationen oder als Vorkultur für 500 ml-Kulturen im Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme wurde dem Medium Antibiotikum (100 µg/ ml Ampicillin) hinzugefügt. Die Zelldichte (OD) wurde, wenn nötig, photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt. Zur Stammhaltung wurden die Zellen 1:1 mit sterilem Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –70 °C gelagert. Zusätzlich wurden 3-Ösen-Ausstriche (Verdünnungsausstrich) auf LB-Platten angelegt, um Einzelkolonien zu erhalten.

3.1.2 Inhibition von *E. coli*-Zellen

Zwei verschiedene *E. coli*-Stämme, der Wildtyp K12 und der LPS-defekte Stamm AS19 (Sekiguchi 1967), wurden für Inhibitionsexperimente mit PNA-Peptid-Konstrukten verwendet. Es wurde aus der Glycerinkultur ein 3-Ösen-Ausstrich (Verdünnungsausstrich) auf einer LB-Agarplatte angelegt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Eine 3 ml-Kultur (100 % LB-Medium) wurde anschließend mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Zellen wurden 5 bis 6 Stunden bis zur spätlogarithmischen oder frühen stationären Phase (OD zwischen 2,4 und 3,7) angezogen, die Zellzahl mittels photometrischer Messung bei 578 nm bestimmt und aus Abb. 3.1 die ungefähre Zellzahl abgelesen. Die Zellzahl wurde dann mit 10 % LB-Medium auf $0,5 \times 10^5$ Zellen/ ml eingestellt. Das 10 % LB-Medium wurde für K12 mit bidestilliertem Wasser und für AS19 mit 0,9 % Kochsalzlösung hergestellt, da die Ionenkonzentration des mit Wasser verdünnten Mediums für den LPS-defekten Stamm zu niedrig war und zum Platzen der Zellen führte.

Die Inhibitionsversuche erfolgten im 100 µl-Maßstab (Eppendorf-Gefäße) in einem Eppendorf Thermoshaker bei 37°C und 850 rpm in 10 % LB-Medium. Nach Zugabe des jeweiligen Inhibitors wurden 10 µl Probe nach 0, 10, 30, 60 und 180 min entnommen. Von den ersten vier Zeitwerten wurden 100 µl einer 1:100- und einer 1:1000-Verdünnung und von dem 180 min-Wert 100 µl einer 1:1000- und 1:10000-Verdünnung ausplattiert. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und am nächsten Morgen die Anzahl der Kolonien bestimmt.

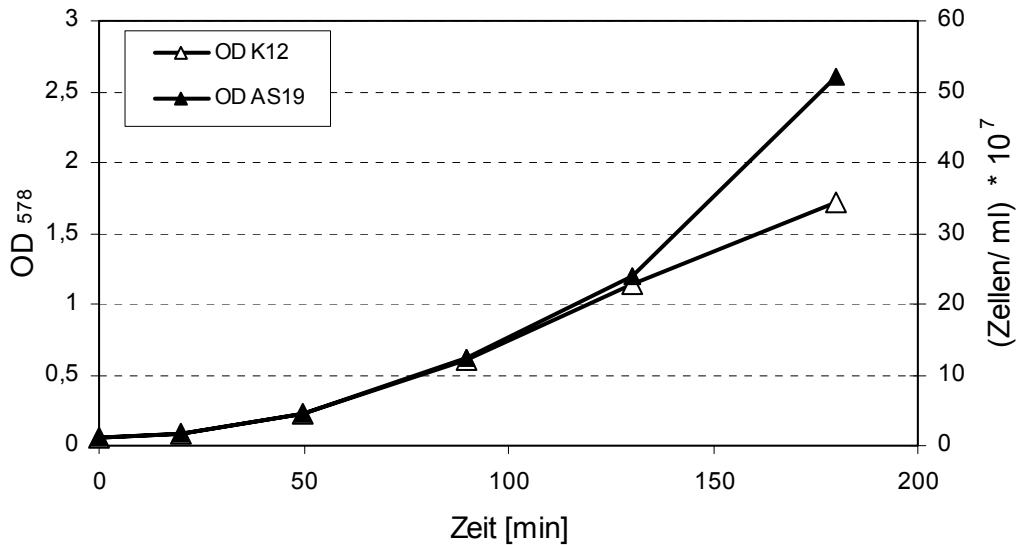


Abb. 3.1: Wachstumskurve für 3-ml LB-Kulturen des *E. coli*-Wildtyps K12 und des LPS-defekten Stamms AS19

Die bei 578 nm gemessene optische Dichte ist auf der rechten Seite mit der Zellzahl korreliert.

3.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um Fremd-DNA in *E. coli*-Zellen einzuschleusen: Transformation mittels CaCl_2 -Methode und Elektroporation. Entsprechend wurden CaCl_2 -kompetente und elektrokompente Zellen benötigt.

Zur Herstellung von CaCl_2 -kompetenten Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit einer 3 ml-Übernachtskultur (3.1.1) inokuliert und bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 180 rpm bis zur frühen logarithmischen Phase (OD von ungefähr 0,6) angezogen, bei 4 °C 10 min mit 4000 x g pelletiert und in 50 ml 100 mM CaCl_2 resuspendiert. Nach 25 min auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (siehe oben) und in 7 ml eiskaltem 75 mM CaCl_2 / 25 % Glycerin resuspendiert. 100- und 400 μl -Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Die Herstellung elektrokompenter Zellen orientierte sich an den Vorgaben der Firma Biorad. Auch hier wurden Zellen aus der frühen logarithmischen Phase verwendet. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Materialien durchgeführt. Die Zellen wurden 20 min auf Eis gestellt, 15 min bei 4 °C mit 4000 x g geerntet und das Zellpellet dreimal mit eiskaltem 10 % Glycerin gewaschen (1. Waschschrift 500 ml, 2. Waschschrift: 250 ml, 3. Waschschrift 20 ml). Das Pellet wurde in 1-2 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert, in 30 bis 50 μl -Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

3.1.4 Transformation von *E. coli*-Zellen

Transformation von CaCl₂-kompetenten Zellen

Es wurden 100 µl kompetente Zellen (3.1.3) auf Eis aufgetaut, mit 10 bis 100 ng Plasmid gemischt und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen 45 s in einem 42 °C warmen Wasserbad inkubiert, 2 min auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium 1 h bei 37 °C im Eppendorf-Thermoshaker geschüttelt. Die Zellen wurden 20 s in einer Tischzentrifuge pelletiert, 700 µl des Überstandes verworfen und das Pellet in dem restlichen Überstand resuspendiert. Es wurden 100 µl unverdünnt und 100 µl einer 1:100 Verdünnung auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Transformation elektrokompeter Zellen

Die Elektroporation wurde im Wesentlichen so durchgeführt, wie in der Bedienungsanleitung von Biorad vorgeschlagen. Es wurden 30 µl kompetente Zellen (3.1.3) auf Eis aufgetaut, mit 10 ng vorgekühltem Plasmid gemischt und 2 bis 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Lösung in eine 0,1 cm Elektroporationsküvette pipettiert und ein Puls von 1,8 kV gegeben wurde. Danach wurden die Zellen sofort mit 1 ml SOC- oder LB-Medium gemischt und 1 h bei 37 °C im Eppendorf-Thermoshaker geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert, sowie ein 3-Ösen-Ausstrich (Verdünnungsausstrich) angelegt und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.2 Allgemeine Nukleinsäuretechniken

3.2.1 Gelelektrophoretische Methoden

Die Trennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen verschiedener Ladung und Masse im elektrischen Feld. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der angelegten elektrischen Feldstärke und dem Vernetzungsgrad der Gelmatrix ab. Die Durchführung erfolgt auf Agarose- und Polyacrylamidgelen mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden der entsprechenden Gelbildner (Polymere). Bei Agarose handelt es sich um vernetzte Polysaccharide, bei Polyacrylamid (PAA) um mehr oder weniger stark vernetzte polymere Acrylamidstränge. Des Weiteren kann sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen (z.B. mit Harnstoff) aufgetrennt werden.

3.2.1.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Diese Methode wurde zur Qualitätskontrolle und präparativen Reinigung von Nukleinsäuren benutzt.

Die Gelmatrix entsteht durch eine radikalische Polymerisationsreaktion von Acrylamidsträngen (Gelbildner) mit N,N'-Methylenbisacrylamid (Vernetzer), die mit APS gestartet und durch TEMED katalysiert wird. Unter denaturierenden Bedingungen werden Sekundär- und Tertiärstrukturen von Nukleinsäuren i.A. weitgehend aufgelöst, damit diese die Auftrennung so wenig wie möglich beeinflussen und die Nukleinsäuren somit aufgrund

ihrer Kettenlänge getrennt werden können. Dies wird durch Zusatz von Formamid und/ oder Harnstoff zu Probenpuffer bzw. Gellösung erreicht.

Die nachfolgende Tab. 3.1 dient zur Ermittlung der geeigneten Acrylamidkonzentration im Gel. Der Lauf kann anhand der beiden mitlaufenden Farbstoffe Bromphenolblau (BPB) und Xylencyanolblau (XCB) verfolgt werden.

Tab. 3.1: Komigrationsverhalten einzelsträngiger Nukleinsäurefragmente (Länge in Nukleotiden) und der Farbstoffe BPB und XCB in denaturierenden Polyacrylamidgelen.

% Acrylamid	BPB/ [nt]	XCB/ [nt]
5	35	130
6	26	106
8	19	75
10	12	55
20	8	28

Analysegel: Zur Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren wurden denaturierende 8 bis 15 % Gele der Größe 16 cm x 24 cm x 1 mm (BxHxD) und zur Untersuchung von Kinetiken 20 % Gele der Größe 30 cm x 17cm x 1 mm (BxHxD) mit Zusatz von 8 M Harnstoff verwendet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1 % des Gelvolumens TEMED und 1 % des Gelvolumens APS (einer 10 % Stammlösung) gestartet. Vor der Beladung wurde das Gel 10 bis 20 min bei 15 mA elektrophoretisiert, die Probenaschen mit 1xTBE gespült, bei 3 mA mit Probe (5 bis 20 µl in 1 bis 2,5 x RNA-Probenpuffer) beladen und die Nukleinsäuren bei 25 bis 35 mA aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet.

Gellösung (Bsp. 10 % Gel):		
24,0 g	Harnstoff	
10,0 ml	Acrylamid/ Bisacrylamid (48 %/ 2 %)	
10,0 ml	5 x TBE-Puffer	
ad	50,0 ml	H ₂ O _{bidest}

Aufreinigungsgele: Zur präparativen Aufreinigung von RNA aus T7-Transkriptionen (3.4.1) wurden denaturierende 6 bis 10 % Gele der Größe 16 cm x 24 cm x 1 mm (BxHxD) gegossen, während zur Aufreinigung von 5' bzw. 3' markierter RNA denaturierende 6 bis 10 % Gele der Größe 16 cm x 40 cm x 0,4 mm (BxHxD) verwendet wurden. Die Mengen an TEMED und APS wurden hier halbiert, um die Polymerisation zu verzögern. Teilweise wurde eine der beiden Glasplatten mit BlueSlick vorbehandelt, um die Gele nach der Elektrophorese besser von der Glasplatte lösen zu können.

Gele für P RNA-Spaltungsanalysen:

Zur Analyse Bleiionen-induzierter und enzymatischer RNA-Spaltungen (3.4.5) wurden denaturierende 12 und 15 % Gele der Größe 16 cm x 40 cm x 0,4 mm (BxHxD) und Gele der Größe 33 cm x 40 cm x 0,4 mm (BxHxD) benutzt. Die PAA-Lösung wurde vor Gebrauch filtriert, die Vorlaufzeit auf 30 min erhöht und eine Stromstärke von 15 mA für die kleinen bzw. 25 mA für die großen Gele angelegt. Außerdem wurden die Gele vor der Exposition getrocknet: 30 min bei 60 °C und weitere 30 min bei ausgeschalteter Heizung.

3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente hauptsächlich zur Kontrolle von Plasmidpräparationen und Restriktionsverdau. Die benötigte Agarosekonzentration wurde an Hand von Tab. 3.2 ermittelt. Zur Herstellung eines Gels wurde Agarose in 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis beim Schwenken keine Schlieren mehr auftraten. Nach der Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,32 mg/ml) und Durchmischung wurde die flüssige Agarose in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels und Entfernen des Kamms wurden die Proben in 1 x DNA-Probenpuffer in einem Gesamtvolumen von 5 – 15 µl aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Flachgel-Kammer bei 60 mA mit 1xTBE als Laufpuffer.

Tab. 3.2: Trennbereich von Agarosegelen

% Agarose [w/v]	Trennbereich [bp]
0,7	800 – 10000
0,8	500 – 7000
1,2	400 – 6000
1,5	200 – 4000
2	100 – 3000
3 - 4	< 100

3.2.2 Nachweis von Nukleinsäuren in Gelen

Abhängig vom experimentellen Aufbau gab es verschiedene Möglichkeiten zur Visualisierung von Nukleinsäuren in PAA- und Agarosegelen.

3.2.2.1 Ethidiumbromidfärbung

Mittels Ethidiumbromidfärbung wurden die Nukleinsäurebanden sowohl in PAA- als auch in Agarosegelen angefärbt. Ethidiumbromid ist ein roter, heterozyklischer Farbstoff, der bevorzugt zwischen Basenpaare interkaliert und in diesem Zustand stark fluoresziert. Agarosegelen wurde Ethidiumbromid direkt zugesetzt (3.2.1), PAA-Gele nach der Elektrophorese 20 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ ml in 1 x TBE) geschwenkt. Im UV-Licht waren die Nukleinsäuren als leuchtend orange Banden sichtbar.

3.2.2.2 UV-shadowing

Durch UV-shadowing können Nucleinsäuren ohne vorherige Färbung detektiert werden. Dazu wurde das Gel in Haushalts-Frischhaltefolie eingeschlagen und auf eine fluoreszierende Dünnschichtchromatographie-Platte gelegt. Aufgestrahltes UV-Licht (254 nm) wird von den Nucleinsäuren absorbiert, so dass an dieser Position ein dunkler Schatten auf der Kieselgelplatte entsteht. Da die Methode sehr unempfindlich ist, wurde sie ausschließlich für präparative Zwecke genutzt. Um UV-induzierte Schäden an den Nucleinsäuren zu vermeiden, sollte die Exposition möglichst kurz gehalten werden.

3.2.2.3 Radioluminographie

Die Radioluminographie ermöglicht alternativ zur Autoradiographie die Detektion radioaktiv (z.B. ^{32}P) markierter Nucleinsäuren. Während bei der Autoradiographie ein Röntgenfilm belichtet und entwickelt wird, nutzt man bei der sehr viel sensitiveren Radioluminographie eine Bio-Imaging Bildplatte. Für die Auswertung wurde ein Gerät der Firma Raytest verwendet, der Bio-Imaging Analyser BAS 1000 (Fujifilm).

Diese Methode wurde zur Detektion gelgereinigter 5'-markierter RNA sowie zur Auswertung von Kinetiken und hydrolytischer Spaltpmuster verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die PAA-Gele in Haushalts-Frischhaltefolie eingeschlagen, und bei präparativen Gelen zur Orientierung radioaktive Markierungen an den Rändern des Gels angebracht. Die Expositionszeiten der Bio-Imaging-Bildplatten lagen in Abhängigkeit von der aufgetragenen Radioaktivitätsmenge zwischen 1 Minute und 12 Stunden.

3.2.3 Gelelution von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren wurden durch Diffusion aus den Gelen eluiert. Bei radioaktiv markierten Nucleinsäuren wurde zunächst mit einem 1:1 Ausdruck des *Imaging*-Bildes (Bild nach Auswertung der exponierten Bio-Imaging Bildplatte, s.o.) als Schablone die gewünschte Bande aus dem PAA-Gel ausgeschnitten, bei nicht radioaktiv markierten Nucleinsäuren wurde die Lage der Bande durch UV-shadowing bestimmt. Pro cm^2 Gelstück wurden 400 μl Elutionspuffer verwendet und die Gelstücke über Nacht bei 4 °C oder vier Stunden bei 37 °C geschüttelt. Die Nucleinsäuren wurden durch Ethanol-fällung konzentriert (3.2.5).

3.2.4 Phenol- und Chloroformextraktion

Durch Phenol- und Chloroformextraktion können Proteine aus wässrigen Nucleinsäurelösungen ausgefällt werden, z.B. zur Abtrennung von T7-RNA-Polymerase aus präparativen Transkriptionen oder Restriktionsenzymen aus präparativen Verdaus.

Nach Zugabe von einem Volumen Phenol (0,1 M Tris-gepuffert auf pH 7,6) zu der wässrigen Lösung wurde 30 s gevortext, 1 bis 5 min je nach Proteinmenge zentrifugiert (Tischzentrifuge) und der wässrige Überstand abgenommen. Phenolreste wurden in einem Extraktionsschritt mit Chloroform entfernt. Dazu wurde die Probe 1:1 mit Chloroform versetzt, 30 s gevortext, 3 min zentrifugiert (Tischzentrifuge) und der wässrige Überstand

abgenommen. Eventuelle Chloroformreste wurden durch anschließende Ethanolfällung entfernt (3.2.5).

3.2.5 Ethanolfällung

Nukleinsäuren können aus wässrigen Lösungen durch Ethanolpräzipitation isoliert und konzentriert werden. Die Präzipitation erfolgt durch Ethanol in Anwesenheit monovalenter Kationen. Für routinemäßige Präzipitationen von DNA und RNA wurde Natriumacetat mit einem pH Wert von etwa 5,0 verwendet.

Präzipitation mit Natriumacetat:

x µl	Nukleinsäurelösung
1/10 x Vol	Natriumacetat (3 M, pH 5,0)
2,5 x Vol	Ethanol (96 %) eiskalt

Bei sehr kleinen Nukleinsäuremengen oder kurzen Nukleinsäuren wurde der wässrigen Lösung 1 µl Glykogen (Stammlösung 20 mg/ml) als Fällungshilfe zugesetzt. Es wurde für mindestens 1 h bei – 20 °C oder 10 min bei – 80 °C gefällt und die Nukleinsäuren durch eine anschließende, mindestens 15- (Plasmid-DNA) bis zu 1-stündige (bei sehr geringen Nukleinsäurekonzentrationen oder Oligonukleotiden) Zentrifugation bei 13000 Upm / 4 °C (Heraeus, Biofuge 15R) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit etwa 200 µl eisgekühltem 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 – 15 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und in bidestilliertem Wasser aufgenommen.

3.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Durch Bestimmung der Absorption von Nukleinsäuren im UV-Bereich bei 260 nm lässt sich auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration wässriger Nukleinsäurelösungen bestimmen. Die Messungen wurden in bidestilliertem Wasser mit Quarzküvetten (1 ml) oder Ultra-Mikro-Quarzküvetten (70 µl) durchgeführt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm (A_{260}) entspricht etwa folgender Nukleinsäuremenge (Hartmann 2005):

1 A_{260} dsDNA entspricht 50 µg/ ml

1 A_{260} ssDNA entspricht 37 µg/ ml

1 A_{260} RNA entspricht 37 µg/ ml

Um Verunreinigungen in den Nukleinsäurelösungen zu beurteilen, wurde ein Wellenlängenscan von 200 bis 300 nm durchgeführt. Das Verhältnis der OD-Werte bei 260 nm (Absorptionsmaximum Nukleinsäuren) zu 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) sollte bei einer reinen DNA-Lösung 1,8 und bei einer reinen RNA-Lösung 2 betragen. Bei Verunreinigungen mit Protein oder Phenol ist dieser Wert signifikant kleiner.

3.3 DNA-Techniken

3.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von DNA wurde im analytischen (1,5 – 3 ml Übernachtskultur) oder präparativen (500 – 1000 ml) Maßstab durchgeführt. Die verwendete Methode zur Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA aus Bakterienzellen beruht auf der Zellyse durch SDS im alkalischen Milieu. Während das SDS an Proteine bindet und diese denaturiert, werden chromosomale und Plasmid-DNA bei stark alkalischem pH denaturiert. Durch Zugabe von Kaliumacetat wird die Mischung neutralisiert, so dass die Plasmid-DNA renaturiert. Die größere, chromosomale DNA bleibt einzelsträngig und präzipitiert durch die hohe Salzkonzentration ebenso wie denaturierte Proteine und Kalium-komplexiertes SDS.

Plasmid-DNA-Präparation im analytischen Maßstab (Plasmid-Minipräparation)

Die Plasmid-Minipräparation wurde im Wesentlichen wie im Protokoll der Firma Macherey-Nagel vorgeschlagen durchgeführt. 1,5 bis 3 ml der Übernachtskultur wurde 30 s bei 11 000 x g zentrifugiert und das Pellet in 250 µl RNase A - haltigem Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lysispuffer (alkalischer pH, SDS) wurde die Probe vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden 300 µl Neutralisierungspuffer zugegeben und bei 11000 x g 10 min zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine Silicagel-Säule gegeben und 1 min bei 11 000 x g zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit Ethanol-haltigem Puffer wurde die Säule durch Zentrifugation bei 11 000 x g 2 min entwässert und die Plasmid-DNA mit 5 mM Tris-Cl, pH 8,5 oder bidestilliertem Wasser eluiert.

Plasmid-DNA-Präparation im präparativen Maßstab (Plasmid-Maxipräparation)

Auch hier wurde ein Protokoll der Firma Macherey-Nagel verwendet, dem das gleiche Trennprinzip wie bei der Plasmid-Minipräparation zu Grunde lag. Nach der Elution wurde allerdings die DNA mit 0,7 x Volumina Isopropanol gefällt und 30 min bei 15 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in bidestilliertem Wasser resuspendiert.

3.3.2 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen 4 bis 8 Basenpaare umfassende, meist palindromische Sequenzabschnitte doppelsträngiger DNA. Sie katalysieren die Hydrolyse an genau definierten Stellen innerhalb solcher Zielsequenzen. Es entstehen je nach Enzym 5'- bzw. 3'- überhängende oder stumpfe Enden mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen.

Für die Spaltungsreaktion wurden die von Hersteller mitgelieferten 10 x Reaktionspuffer verwendet. Sofern nicht im mitgelieferten Puffer enthalten, wurde 1/10 Volumen BSA (1 mg/ml) hinzugefügt, um die Enzymstabilität zu erhöhen und eine Inaktivierung der Restriktionsenzyme durch unspezifisches Anhaften an der Wandung des Plastikgefäßes zu verhindern. Da die Restriktionsenzyme in Glycerin-haltigem Puffer vorliegen, darf maximal

1/10 Reaktionsvolumen an Restriktionsenzym zugegeben werden, um Fehlsplattungen durch zu hohe Glycerinkonzentrationen im Reaktionsansatz zu verhindern. Es wurde 1 (bis 10) U/ µg DNA eingesetzt und die Reaktion bei den vom Enzymhersteller angegebenen Temperaturen durchgeführt. Die Inkubationszeit für analytische Restriktionsansätze (meist 10 µl-Ansätze) betrug 30 min bis 1 h. Präparative Ansätze wurden 2 bis 3 h oder über Nacht inkubiert, und teilweise die gleichen Mengen an Enzym erneut hinzugefügt, gefolgt von einer 2-stündigen Inkubation. Bei Doppeltverdaus mußte bei Pufferinkompatibilität der verwendeten Restriktionsenzyme die DNA nach dem ersten Spaltungsansatz gefällt (3.2.4, 3.2.5) und der zweite Restriktionsverdaus in dem neuen Puffer angesetzt werden.

3.4 RNA-Techniken

Beim Arbeiten mit RNA ist darauf zu achten, dass RNAs bei pH-Werten unter 4 und über 8 hydrolyseempfindlicher werden. Vor allem muß steril und RNase-frei gearbeitet werden, um den enzymatischen Abbau der RNAs zu verhindern. RNasen können durch Speichel oder Hautkontakt in die RNA-Probe gelangen. Deshalb wird grundsätzlich mit Einweghandschuhen gearbeitet. Die meisten RNasen stammen aus Mikroorganismen, die in Puffern bei Raumtemperatur wachsen. Aus diesem Grund sollte die Puffer aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden. Glasgeräte werden bei 180 °C für drei Stunden ausgeheizt, Lösungen autoklaviert oder steril filtriert.

3.4.1 T7-Transkription

Durch T7-Transkription kann von einer DNA-Sequenz die komplementäre RNA-Sequenz erzeugt werden, wobei RNA-Polymere von weniger als 100 bis zu 30 000 Nukleotiden Länge im mg-Maßstab hergestellt werden können (Pokrovskaya 1994, Milligan 1989). Dazu wird die aus dem Bakteriophagen T7 isolierte DNA-abhängige RNA-Polymerase (T7 RNAP) verwendet. Die T7 RNAP erkennt auf dem DNA-Strang einen Bereich von 17 Basenpaaren, i.A. den T7- (Klasse II) Promotor (Milligan 1989). Zur Initiation der Transkription wird der DNA-Doppelstrang entwunden, die Base -1 des nicht kodierenden Strangs in einer hydrophoben Tasche in direkter Nähe zum aktiven Zentrum positioniert und der Gegenstrang zum Promotor als Matrize benutzt (Cheetham 2000). Die Polymerisation wird beendet, sobald die T7 RNAP auf ein Terminationssignal stößt oder am Ende einer linearen Matrize vom DNA-Strang herunterfällt (*run-off transcription*, Diaz 1996, Kochetkov 1998). Der Bereich unmittelbar stromabwärts des T7-Promotors ist hoch konserviert und die Transkriptionseffizienz hängt stark von der Identität der Nukleotide an Position +1 und +2 ab. Die maximale Syntheseleistung wird i.A. erreicht, wenn die Sequenz der zu transkribierenden RNA mit zwei Guanosinresten beginnt (Milligan 1989).

3.4.1.1 Nicht radioaktive T7-Transkription

Da die Transkriptionseffizienz stark von der Sequenz des Templates abhängig ist, wurden für jedes Templat zuerst 50 µl-Testtranskriptionen nach drei verschiedenen Protokollen durchgeführt und anschließend mit dem erfolgreichsten Protokoll weitergearbeitet, oder dieses gegebenenfalls optimiert. Bei der Optimierung wurde hauptsächlich die MgCl₂-, die Templat- und/ oder die T7 RNAP- Konzentration variiert.

T7 Transkriptionsprotokoll	1	2	3
5 x Transkriptionspuffer (MBI Fermentas)			1 x Puffer
HEPES pH 7,5, 1 M	80 mM	80 mM	
DTT 100 mM	5 mM	15 mM	
MgCl ₂ 3 M	22 mM	33 mM	40 mM
Spermidine 100 mM	1 mM	1 mM	
BSA 20 mg/ml	0,12 mg/ml		
rNTPs jeweils 25 mM	3,75 mM	3,75 mM	3 mM
Templat 1 µg/µl (linearisiertes Plasmid ca. 3,2 kb)	40 µg/ml	80 µg/ml	80 µg/ml
Pyrophosphatase 200 U/ml	1 U/ml	2 U/ml	
T7 RNAP 200 U/µl	1000-2000 U/ml	2000-3000 U/ml	2000–3000 U/ml
H ₂ O bidest.	ad 1000 µl	ad 1000 µl	ad 1000 µl

Die Transkriptionsansätze wurden 4 bis 6 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Hälfte der Zeit wurde ein weiteres Aliquot T7 RNAP hinzupipettiert (200 U pro 100 µl-Ansatz). Präparative T7-Transkriptionen wurden für gewöhnlich im 1 ml-Maßstab durchgeführt, wobei der Ansatz, um eine gleichmäßigere Wärmeverteilung zu gewährleisten, in 200 µl-Aliquots inkubiert wurde. Mit einer gut funktionierenden Transkription können ungefähr 3 nmol RNA pro 1 ml-Ansatz hergestellt werden.

Anschließend wurde die T7 RNAP durch eine Phenol/ Chloroform-Extraktion (3.2.4) entfernt, die RNA-Probe durch Ethanol-fällung konzentriert, über ein präparatives, denaturierendes PAA-Gel gereinigt (3.2.1), die gewünschte Bande mittels *UV-shadowing* lokalisiert, ausgeschnitten und bei 4°C über Nacht aus dem Gel eluiert. Nach einer weiteren Ethanol-fällung wurde die Qualität der hergestellten RNA auf einem denaturierenden PAA-Gel überprüft und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (3.2.2).

3.4.1.2 Guanodin-gestartete T7-Transkription

Bei der T7-Transkription entstehen RNA-Moleküle mit Triphosphaten am 5'-Ende. Für Kinasierungsreaktionen, wie z. B. radioaktive Markierungen, wird dagegen ein 5'-OH-Ende benötigt. Dies kann durch ApG-oder Guanodin-gestartete T7-Transkriptionen realisiert werden. Liegt Guanodin im Transkriptionsansatz im Überschuss vor, so werden hauptsächlich Transkripte mit einem Guanodin und damit einer Hydroxylgruppe am 5'-Ende

hergestellt. Da Guanosin schwer löslich ist, muß es vor der Zugabe zum Reaktionsansatz auf 75°C erhitzt werden.

Guanosin-gestartete T7-Transkription

HEPES pH 7,5, 1 M	80 mM
DTT 100 mM	5 mM
MgCl ₂ 3 M	22 mM
Spermidin 100 mM	1 mM
BSA 20 mg/ml	0,12 mg/ml
rNTPs je 25 mM	3,75 mM
Templat (linearisiertes Plasmid ca. 3,2 kb)	40 µg/ml
Pyrophosphatase 200 U/ml	5 U/ml
H ₂ O bidest.	

- vorwärmen auf 37°C

- Zugabe von Guanosin (30 mM, vorher auf 75°C erwärmt) 9 mM

T7 RNAP 200 U/µl 2000 U/ml

Inkubation und Aufreinigung wie oben beschrieben (3.2.4, 3.2.5)

3.4.2 Entfernung von 2',3'-Cyclophosphaten

Mittels der 3'-Phosphatase-Aktivität der Polynukleotidkinase des Phagen T4 können die zum Beispiel durch Abspalten eines Hammerheads entstandenen 2',3'-Cyclophosphate entfernt werden. Ein typischer Reaktionsansatz sieht wie folgt aus:

Entfernung von 2',3'-Cyclophosphaten:

0,1 mM	ATP
100 mM	Imidazol/HCl, pH 6
10 mM	MgCl ₂
10 mM	β-Mercaptoethanol
20 ng	BSA
3 µM	RNA
10 U	T4 Polynukleotidkinase
ad 100 µl	H ₂ O bidest.

Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Dephosphorylierung auf einem denaturierenden PAA-Gel überprüft (3.2.1). Dazu wurde bei der *E. coli* RNase P RNA ein 10 % iges PAA-Gel verwendet und das Gel solange elektrophoriert, bis XCB aus dem Gel herausgelaufen war. Die dephosphorylierte RNA lief geringfügig schneller. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.4) und Ethanol-fällung (3.2.5) kann die dephosphorylierte RNA z.B. für Ligationsreaktionen (3.4.4) verwendet werden.

3.4.3 5'-Phosphorylierung von RNA

Die Polynukleotidkinase des *E. coli* Phagen T4 katalysiert zudem den Transfer des γ -Phosphats eines ATP-Moleküls auf ein freies 5'-Ende von DNA oder RNA. Das γ -Phosphat wird dabei mit dem 5'-Hydroxylende des Zielmoleküls verestert.

Pro Ansatz wurden etwa 10 pmol RNA eingesetzt und die Reaktion 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der 5'-Phosphorylierung wurden die überschüssigen radioaktiven Nukleotide durch Ethanolfällung entfernt und die Probe über ein denaturierendes PAA-Gel (8 M Harnstoff) gereinigt. Die gewünschte Bande wurde mittels Radioluminographie detektiert, ausgeschnitten, eluiert und durch Ethanolfällung konzentriert (3.2.2.3, 3.2.3, 3.2.5). Anschließend wurde die Aktivitätsmenge über Cerenkov-Zählung ermittelt.

5' Markierung:

10 pmol	RNA
1 x	Kinase-Puffer
30 μ Ci	[γ - ³² P]-ATP (3000 Ci/ mmol)
10 U	Polynukleotidkinase
ad 15 μ l	H ₂ O bidest.

3.4.4 3'-Markierung von RNA mit [5'-³²P]pCp

Die RNA-Ligase des *E. coli*-Phagen T4 katalysiert die ATP-abhängige Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylterminus einzelsträngiger RNA oder DNA. Das kleinstmögliche Donor-Substrat ist dabei ein Nukleosid-3'-5'-Bisphosphat. Eventuell am 3'-Ende der zu markierenden RNA vorhandene 2',3'-Cyclophosphate müssen vor der Ligationsreaktion entfernt werden (3.4.2). Pro Ansatz wurden etwa 10 pmol RNA eingesetzt.

Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die RNA über ein denaturierendes PAA-Gel (8 M Harnstoff) gereinigt und aufgearbeitet (3.2.1, 3.2.4, 3.2.5).

3'- Markierung:

10 pmol	RNA
1 x	T4-RNA-Ligase-Puffer
85 μ M	ATP (100 mM)
30 μ Ci	[5'- ³² P]pCp (3000 Ci/ mmol)
15 U	T4-RNA-Ligase
ad 6 μ l	H ₂ O bidest.

Die ATP-Lösung wurde vor jedem Versuch aus einer 100 mM Stammlösung frisch angesetzt.

3.4.5 Nukleolytische Spaltungen von Ribonukleinsäuren

Spezifische Spaltungen durch Ribonukleasen liefern Informationen über zugängliche Bereiche bzw. Sekundärstrukturen in Ribonukleinsäuren. Durch die verwendeten Endonukleasen entstehen entweder 5'-Hydroxy- und 2',3'-Cyclophosphat oder 3'-Phosphat-Termini oder 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyl-Enden. Neben enzymatischen Spaltungen werden auch chemisch induzierte Spaltungen durchgeführt, die ebenfalls Aufschluss über die Sekundärstruktur der untersuchten RNA geben. Für jede RNA empfiehlt es sich, die jeweilige Spaltung hinsichtlich der Reaktionszeit und Konzentration des Spaltungsreagenz zu optimieren.

In dieser Arbeit wurden Bleiionen-induzierte Spaltungen verwendet, um die Helixbildung zwischen AS-ON und P RNA zu überprüfen. Dafür wurde die P RNA von *E. coli* am 3'-Ende mit [5'-³²P]pCp radioaktiv markiert (3.4.4). Dem Reaktionsansatz wurde Carrier-RNA (z.B. U6 oder U1, Mitglieder der U-reichen Subklasse von snRNA) zugegeben, um zu vermeiden, dass Schwankungen beim Einstellen der geringen P RNA-Konzentrationen (10 nM) zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit der Spaltungsmuster führen. Die Spaltprodukte wurden auf denaturierenden PAA-Gelen dargestellt (3.2.1).

Spaltung mit Ribonuklease (RNase) T1

Die RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* ist eine Endoribonuklease, die spezifisch Phosphodiesterbindungen benachbart zum 3'-Phosphat von Guanosinnukleotiden einer RNA spaltet (Gp▼Np). Es entstehen Produkte mit terminalen Guanosin-3'-Phosphaten, die im denaturierenden PAA-Gel eine Guanosin-spezifische Leiter ergeben. RNase T1 spaltet sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen (~4,3 M Harnstoff) und ermöglicht zusammen mit der partiellen alkalischen Hydrolyse die Zuordnung von Banden aus z.B. Bleispaltungen. Die denaturierende Spaltung erfolgte 10 min bei 55 °C. Die Reaktion wurde mit 7 µl RNA-Probenpuffer/EDTA und durch sofortiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt.

denaturierende Spaltung:

1-2 x 10⁴ cpm 3'- P³²-markierte P RNA*
1,3-1,8 µg U6-RNA bzw. U1-RNA (3.4.5)
1 x T1-Spaltungspuffer
0,06 U/µl RNase T1
ad 10 µl H₂O bidest.

* die Assaykonzentration wurde durch Zugabe kalter P RNA auf 10 nM eingestellt

3.4.6 Partielle alkalische Hydrolyse

Durch alkalische Hydrolyse kann RNA nach jedem Nukleotid gespalten werden, so dass sich bei einer partiellen alkalischen Hydrolyse im denaturierenden PAA-Gel eine lückenlose Leiter ergibt, die zusammen mit der T1-Leiter eine Zuordnung von z.B. Bleispaltungsprodukten ermöglicht. Zu diesem Zweck wird die 3'-markierte RNA mit NaHCO₃ versetzt, 5 min bei

100 °C inkubiert und die Reaktion mit 13 µl RNA-Probenpuffer/EDTA und durch sofortiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet.

Alkalische Hydrolyse (5 min, 100 °C):

1-2 x 10⁴ cpm 3'-P³²-markierte P RNA*
 1,3-1,8 µg U6-RNA bzw. U1-RNA (3.4.5)
 50 mM NaHCO₃
 ad 13 µl H₂O bidest.

* die Assaykonzentration wurde durch Zugabe kalter P RNA auf 10 nM eingestellt

3.4.7 Bleiinduzierte Spaltung von RNA

Es gibt zwei verschiedene Modi der Bleispaltung. Bei niedrigen Bleiionenkonzentrationen beobachtet man hochspezifische Spaltungen an bestimmten Positionen der RNA (Kirsebom 2005). Erhöht man die Bleiionenkonzentration, so finden generell in einzelsträngigen Regionen Hydrolysen statt (Kirsebom 2005); die Bleispaltung in basengepaarten Bereichen der RNA ist wesentlich schwächer. Spezifität und Intensität der bleiinduzierten Hydrolyse sind stark abhängig vom pH-Wert, der Mg²⁺-Konzentration, der Temperatur und der Konformation der RNA.

Der Reaktionsansatz wurde ohne Bleiacetat 40 min bei 37 °C inkubiert, damit die RNA in einer möglichst nativen Konformation vorlag. Nach Zugabe von 1 µl Bleiacetat wurde weitere 10 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1,2 x Volumina RNA-Probenpuffer/ EDTA und durch sofortiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt.

Bei hohen Bleiionenkonzentrationen kann es zu Salzeffekten im Gel kommen, die durch eine Ethanolfällung der Proben vor dem Gelauftrag verhindert werden können.

Bleispaltung (10 min, 37 °C):

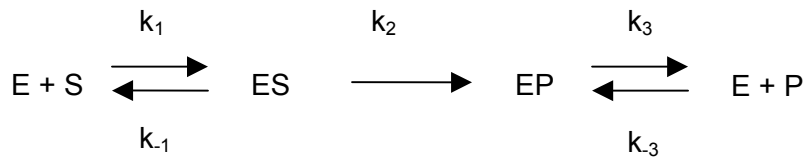
1-2 x 10⁴ cpm 3'-P³²-markierte P RNA*
 1,3-1,8 µg U6-RNA bzw. U1-RNA (3.4.5)
 1,25 x Inhibitionsbuffer
 ad 4 µl H₂O bidest.
 10-100 mM Pb-Acetat

* die Assaykonzentration wurde durch Zugabe kalter P RNA auf 10 nM eingestellt

3.5 Kinetische und thermodynamische Methoden

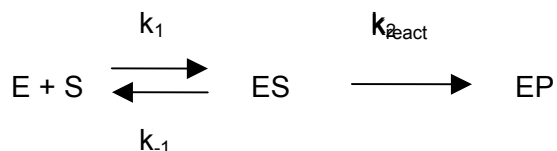
Zur Untersuchung von kinetischen Parametern können entweder *multiple* oder *single turnover*-Bedingungen verwendet werden. Bei *multiple turnover*-Kinetiken liegt das Substrat im Überschuss zum Enzym vor, so dass im Reaktionsverlauf mehrere Substratmoleküle von einem Enzymmolekül gespalten werden. Es wird die katalytische Geschwindigkeit k_{cat} gemessen (Umsatz µmol Substrat pro Minute und µmol Enzym). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt kann entweder die Substratassoziation (k_1), die eigentliche Spaltung

(k_2), die Produktfreisetzung (k_3) oder eine konformative Umlagerung des Enzym/Substrat- bzw. des Enzym/Produkt-Komplexes sein (in Gleichung 1 nicht berücksichtigt).



Gleichung 1: Reaktionsschema der RNase P Prozessierungskinetik; E: RNase P RNA; S: ptRNA; P: mature tRNA, k: Reaktionsrate

Unter *single turnover*-Bedingungen liegt dagegen das Enzym im Überschuss zum Substrat vor, also setzt ein Enzymmolekül maximal ein Substratmolekül um. Da durch Abstoppen der Spaltreaktion unter geeigneten Bedingungen auch der Enzym-Produkt-Komplex denaturiert werden kann, wird bei *single turnover*-Bedingungen die Reaktionsrate k_{react} gemessen, die den chemischen oder vorgelagerte Schritte beschreibt. Die Rate der Produktfreisetzung (k_3) bleibt in diesem Fall ohne Einfluss auf die Kinetik.



Gleichung 2: Reaktionsschema einer *single turnover* Kinetik E: RNase P RNA; S: ptRNA; P: mature tRNA, k: Reaktionsrate

3.5.1 Inhibitionsassay *in vitro*

Die *in vitro*-Inhibition bakterieller P RNA wurde unter *multiple turnover*-Bedingungen untersucht. Es wurden 100 nM ptRNA^{Gly} (aus *T. thermophilus*), inklusive Spuren Mengen 5'-³²P-markierter ptRNA^{Gly}, 10 nM P RNA und unterschiedliche Konzentrationen Inhibitor eingesetzt. Um sicherzustellen, dass die RNA in einer nativen Konformation vorlag, wurden alle verwendeten RNAs in Inhibitionsbuffer präinkubiert: ptRNA^{Gly}: 5 min bei 55 °C und 25 min bei 37 °C, alle P RNAs: 40 min bei 37 °C, bis auf *T. thermophilus* P RNA: 10 min bei 55 °C und 30 min bei 37 °C.

Der Inhibitor wurde entweder vor oder nach der Präinkubation der P RNA hinzupipettiert und die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen (z.B. nach 2, 5, 10, 30, 60, 120 min), mit 1,4 Volumina RNA-Probenpuffer/ EDTA gemischt und bis zum Gelauftrag auf Eis gestellt.

in vitro-Inhibition:

P RNA-Mix:

10 nM P RNA
 1 x Inhibitionsbuffer
 ad 20 µl H₂O bidest.

ptRNA-Mix:

2000 cpm 5'-P³²-ptRNA^{Gly}
 (pro Zeitwert)
 100 nM ptRNA^{Gly}
 1 x Inhibitionsbuffer
 ad 5 µl H₂O bidest.

Reaktion:

20 µl P RNA-Mix
 2 µl Inhibitorlösung
 4 µl ptRNA-Mix

Als Kontrolle wurde 1 µl ptRNA-Mix für die Dauer des Meßzeitraums bei 37°C inkubiert und ebenfalls aufs Gel aufgetragen.

Nach Trennung der Reaktionsprodukte auf einem denaturierenden 20 % PAA-Gel wurde das Gel auf eine Bioimaging-Bildplatte gelegt und diese über Nacht exponiert. Die beiden aufgrund der radioaktiven Markierung sichtbaren Banden entsprachen der ungespaltenen ptRNA sowie der 5'-Flanke, die wiederum der Menge an maturer tRNA entsprach. Die Banden wurden mit dem Bio-Imaging System der Firma Raytest quantifiziert. Dabei ergibt sich der Anteil prozessierter ptRNA aus:

$$\text{Anteil prozessiert: } \text{ptRNA} = \frac{[\text{5'-Flanke}]}{[\text{5'-Flanke} + \text{ptRNA}]}$$

Die Daten wurden mit Hilfe des Computer Programms GraFit (Erithacus Software, London, U.K.) ausgewertet, wobei die beobachtete Geschwindigkeit k_{obs} nach einer Gleichung erster Ordnung berechnet wurde.

$$A_t = A (1 - e^{-k_{\text{obs}} \times t})$$

mit: t: Zeit in min, A: maximal umgesetzte ptRNA-Konzentration, A_t : umgesetzte ptRNA-Konzentration zum Zeitpunkt t, k_{obs} : beobachtete Reaktionsrate

In einer Sekundärgrafik wurden die k_{obs} -Werte über der Inhibitorkonzentration aufgetragen und aus dem Diagramm die Inhibitionskonstante K_i abgelesen. K_i entspricht der Inhibitorkonzentration, bei der die Umsatzrate im Vergleich zur nicht inhibierten Reaktion halbiert ist.

3.5.2 Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D)

Zur Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D von *E. coli* P-RNA und Antisense-Inhibitor wurde ein Gelfiltrationssäulchen-Assay verwendet. Dabei wurde *E. coli*-P RNA in steigender Konzentration mit Spuren Mengen 5' radioaktiv markierten Inhibitors gemischt, 40 min präinkubiert und der Komplex anschließend auf einer Sephadex G 75-Säule von dem nicht gebundenen Inhibitor getrennt.

Zur Herstellung der Sephadex-Säulen wurden 2,5 g Sephadex G 75 in 46 ml 1 x Inhibitionsbuffer mit und ohne Zusatz von 0,1 % SDS und 0,05 % NP40 über Nacht quellen gelassen. Die Suspension sollte so eingestellt sein, dass sie gerade noch flüssig ist und fließt, wenn ein 50 ml-Falcongefäß hin und her gekippt wird. Davon wurden 650 µl in eine Säule (Microspin™ Columns, Amersham Pharmacia) pipettiert und 1 min bei 2000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 20 µl Probe auf die Mitte der Säule gegeben und wieder 1 min bei 2000 x g zentrifugiert. In dem Gelfiltrationsmaterial wird der Antisense-Inhibitor zurückgehalten, während der Komplex im Eluat vorliegt. Säule und Eluat wurden getrennt im Szintillationszähler vermessen, der Anteil des Komplexes über der P RNA-Konzentration dargestellt und mit dem Computerprogramm Grafit ausgewertet (Kurvenanpassung mit: Ligand Binding-1 site).

Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante definiert als:

$$K_D = \frac{[AS - ON_{\text{frei}}] \times [P RNA_{\text{frei}}]}{[AS - ON - P RNA]}$$

$$\text{Mit } [P RNA]_{\text{frei}} = [P RNA]_{\text{total}} - [P RNA - AS - ON]$$

$$= [P RNA]_{\text{total}} - [P RNA]_{\text{gebunden}}$$

$$[AS - ON]_{\text{frei}} = [AS - ON]_{\text{total}} - [AS - ON]_{\text{gebunden}} \text{ und } [P RNA - AS - ON] = [AS - ON]_{\text{gebunden}}$$

$$[P RNA]_{\text{gebunden}} = [AS - ON]_{\text{gebunden}}$$

ergibt sich nach Einsetzen:

$$K_D = \frac{([AS - ON]_{\text{total}} - [AS - ON]_{\text{gebunden}}) \times ([P RNA]_{\text{total}} - [P RNA]_{\text{gebunden}})}{[P RNA]_{\text{gebunden}}}$$

und Umformen:

$$\frac{K_D}{[AS - ON]_{\text{total}} - [AS - ON]_{\text{gebunden}}} = \frac{[P RNA]_{\text{total}} - [P RNA]_{\text{gebunden}}}{[P RNA]_{\text{gebunden}}} = \frac{[P RNA]_{\text{total}}}{[AS - ON]_{\text{gebunden}}} - 1$$

Bei halbmaximaler Sättigung: $[AS - ON]_{\text{gebunden}} = 0,5 \times [AS - ON]_{\text{total}}$

$$\frac{K_D}{0,5 \times [AS - ON]_{\text{total}}} = \frac{[P RNA]_{\text{total}}}{0,5 \times [AS - ON]_{\text{total}}} - 1$$

Mit dem Graphen wird die maximale Komplexausbeute bestimmt und aus der P RNA-Konzentration, bei der 50 % der maximalen Komplexausbeute erreicht ist, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante berechnet (Pyle 1990):

$$K_D = [\text{RNase P RNA}]_{50\% \text{ Komplex}} - 0,5 \times [\text{AS-ON}]$$

Ist die erwartete AS-ON-Konzentration wesentlich niedriger als die erwartete Gleichgewichtsdissoziationskonstante, lässt sich der letzte Teil des Terms vernachlässigen und die Gleichung vereinfacht sich zu:

$$K_D = [\text{RNase P RNA}]_{50\% \text{ Komplex}}$$

3.5.3 Bestimmung von Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsrate (k_{off})

Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um die Assoziationsrate k_{on} und die Dissoziationsrate k_{off} zu bestimmen. Da zwischen k_{on} (entspricht k_1 in Gleichung 1, 3.5) und k_{off} (entspricht k_{-1}) folgender Zusammenhang besteht:

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$$

wurde entweder die Assoziations- oder die Dissoziationsrate bestimmt und die jeweils andere unter Berücksichtigung des K_D -Wertes berechnet.

Bestimmung der Dissoziationsrate mit dem Säulchen-Assay

Es wurden P RNA (2 nM P RNA bei RNA-14mer und 5 nM P RNA bei DNA-14mer) und radioaktiv markiertes Antisense-Oligonukleotid (ca. 70 000 cpm) bis zur Gleichgewichtseinstellung 40 min bei 37 °C in Puffer A inkubiert. Die Messung der Dissoziationskinetik erfolgte auf zwei Wegen:

1) Für die Verdünnungsexperimente wurden 2 nM P RNA bei RNA-14mer und 5 nM P RNA bei DNA-14mer eingesetzt. Die Probe wurde 1: 20 mit vorgewärmten Inhibitionsbuffer (37 °C) verdünnt und die Einstellung des Gleichgewichtes bei 37 °C in der verdünnten Lösung bestimmt.

2) Es wurde unmarkierter Inhibitor in 100-fachen Überschuss als Kompetitor eingesetzt und so das markierte Antisense-Oligonukleotid aus dem Komplex bei 37 °C heraustritiert (2 nM P RNA und 200 nM RNA-14mer bzw. 16 nM P RNA und 1,6 µM DNA-14mer).

Probenahme und Auswertung wurde bei beiden Ansätzen wie folgt durchgeführt: zu verschiedenen Zeiten wurde ein Aliquot (z.B. nach 0 min, 1, 2, 3,5, 5,5, 9, 21, 24, 27 h) auf ein Sephadex G 75-Säulchen (3.5.2) geladen und wie in (3.5.2) zentrifugiert, die Radioaktivität in Säule und Eluat im Szintillationszähler vermessen und der Anteil an verbliebenem Komplex:

$$1 - \frac{C}{C_0}$$

zum Zeitpunkt der Probenahme berechnet, mit C = Komplexkonzentration zum Zeitpunkt t , C_0 Komplexkonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$. Der Anteil des Komplexes wurde über der Zeit aufgetragen und k_{off} mit einer Geschwindigkeitsgleichung erster Ordnung berechnet. Dabei wird die Annahme gemacht, dass sich praktisch nur die Konzentration des Inhibitors ändert und nicht die der in viel größerer Menge vorliegenden P RNA (Reaktion pseudo-erster Ordnung).

Liegt eine einfache bimolekulare Reaktion vor, dann ist k_{off} unabhängig von der verwendeten Methode. Eine schnellere Dissoziation bei kompetitiver Hemmung deutet auf eine negative Kooperativität, eine schnellere Dissoziation bei der Verdünnung auf eine positive Kooperativität der Inhibitorbindung (Repke 1987).

Bestimmung der Assoziationsrate mittels Kinetik

Um die Assoziationsrate k_{on} zu bestimmen, wurde zuerst untersucht, ob eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Substratumsatz und der P RNA-Konzentration bestand. Es wurden *multiple turnover*-Kinetiken mit 1 bis 10 nM P RNA und 100 bzw. 500 nM ptRNA durchgeführt. Da eine lineare Abhängigkeit vorlag, konnte der Anteil nicht inhibierter P RNA durch die Messung der beobachteten Geschwindigkeit k_{obs} bei verschiedenen langen Vorinkubationszeiten von P RNA und Inhibitor bestimmt werden.

In Experimenten mit 10-fachem Überschuss an Inhibitor und 10 bzw. 50-fachem Überschuss an Substrat über P RNA wurde die Vorinkubationszeit von Inhibitor und P RNA von 0 min bis 40 min variiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Substrat gestartet, nach 2 min mit RNA-Probenpuffer/EDTA gestoppt und die Spaltprodukte auf einem denaturierenden PAA-Gel analysiert. Da die nach 2 min gebildete Menge an Spaltprodukt proportional zu der Menge an inhibiertem Enzym war, konnte die relative Reaktionsrate k_{rel} berechnet werden (Verhältnis von k_{obs} bei einer bestimmten Vorinkubationszeit mit AS-ON zum k_{obs} -Wert nach 40 min Vorinkubationszeit ohne AS-ON). Aus der Auftragung $1-k_{\text{rel}}$ über der Vorinkubationszeit wurde mit einer Geschwindigkeitsgleichung erster Ordnung der k_{on} -Wert bestimmt.

3.5.4 β -Galaktosidase-Assay

Der β -Galaktosidase-Assay wurde in der vorliegenden Arbeit mit zwei verschiedenen *E. coli*-Stämmen, dem Wildtyp K12 und dem LPS-defekten Stamm AS19 (Sekiguchi 1967), im 100 μ l-Maßstab durchgeführt. β -Galaktosidase setzt O-Nitrophenol- β -D-galaktosid (ONPG) zu Galaktose und gelbem Orthonitrophenol um, das anschließend photometrisch vermessen werden kann.

E. coli-Zellen (1×10^4 Zellen/ml) wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln in 10 % LB-Medium bei 850 rpm im Eppendorf-Thermoschüttler kultiviert. Das 10 % LB-Medium wurde für K12 durch Verdünnung von LB-Medium mit bidestilliertem Wasser und für AS19 mit 0,9 % Kochsalzlösung angesetzt. IPTG (2,8 mM) wurde entweder sofort hinzugefügt und die Zellen am nächsten Morgen geerntet. Alternativ wurde das IPTG am nächsten Morgen

hinzugegeben und die Zellen 4 Stunden weitergeschüttelt. Im Anschluß an die IPTG-Induktion wurden die Zellen mit 0,1 % TritonX100 und 5 µl Toluol/ Ethanol (1:4) lysiert. Nach 2-minütigem vortexen wurde die Probe 5 min bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Z-Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Die Reaktion wurde mit 900 µl einer vorgewärmten 25 mM ONPG-Lösung gestartet und mit 250 µl einer 2,5 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt, sobald die Probe eine deutlich gelbe Farbe aufwies. Nach 5 min Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand photometrisch bei 420 nm vermessen.

Außerdem wurde der kinetische Verlauf direkt photometrisch bei 420 nm verfolgt (eine Messung alle 30 s, für eine Dauer von ungefähr 15 min). Die Anzucht der Zellen erfolgte wie oben beschrieben, nur daß für diese Experimente ausschließlich Zellen verwendet wurden, die über Nacht mit IPTG behandelt worden waren. Aus der Steigung der Gerade wurde die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet und aus der Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeiten über der eingesetzten AS-ON-Konzentration konnte der K_i-Wert bei 50 % Inhibition abgelesen werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro*- und *in vivo*-Inhibition bakterieller Ribonuklease P (RNase P) mit Antisense-Oligonukleotiden (AS-ON). Dafür wurden zunächst effiziente Inhibitoren für die RNA-Untereinheit (P RNA) der RNase P von *Escherichia coli* gesucht. Die P RNA von *E. coli* ist das wichtigste Modellsystem für bakterielle P RNAs des Strukturtyps A (Abb. 4.2). Vergleichend dazu wurden ebenfalls Experimente mit einer P RNA des Strukturtyps B durchgeführt, repräsentiert durch die P RNA des Schweine-pathogenen Bakteriums *Mycoplasma hyopneumoniae*. Bei beiden Strukturtypen bindet die ptRNA an die sogenannte CCA-Bindungsstelle in der P15-Schleife (P15 loop) der RNA-Untereinheit (Abb. 1.3, Svärd 1994, Busch 2000, Svärd 1996).

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Inhibitionsstrategie verfolgt, bei der die Substratbindungsstelle mit haarnadelförmigen RNA-AS-ON in Analogie zu einem natürlichen bakteriellen Antisense-Mechanismus blockiert werden sollte (Willkomm 2003, Kolb 2000a, Kolb 2000b). Dabei stellten sich einzelsträngige RNA-Oligonukleotide als im Vergleich mit den haarnadelförmigen deutlich effektivere Inhibitoren heraus. Die Einzelstrang-oligonukleotide wurden daraufhin weiter optimiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der wirksamste Inhibitor als DNA-, PNA- (Peptide Nucleic Acid) und LNA-Analogon (Locked Nucleic Acid) ebenfalls *in vitro* getestet und die Inhibition biochemisch charakterisiert. Im dritten Teil wurde die PNA-Variante in *E. coli* auf ihr *in vivo*-Inhibitionspotential untersucht und mit einem invasiven Peptid gekoppelt, das die Durchlässigkeit der bakteriellen Zellbarriere für den Antisense-Inhibitor verbessern sollte.

4.1 Inhibitionsstrategie

4.1.1 Inhibierung der CCA-Bindungsstelle mit haarnadelförmigen RNA-AS-ON

Die ersten RNA-AS-ON mit dem Ziel der RNase P-Inhibition wurden in Anlehnung an das in *E. coli* natürlich vorkommende CopA-CopT-System konzipiert (Willkomm 2003, Kolb 2000a, Kolb 2000b). CopA-CopT steuert die Plasmidreplikation des Plasmides R1 durch einen Antisense-Mechanismus. Dazu bindet die Antisense-RNA CopA an eine Region auf der *repA*-mRNA (CopT), die ungefähr 80 Nukleotide stromaufwärts des *repA*-Startcodons liegt. Dies verhindert die Translation des Proteins RepA, welches die Replikation des Plasmides R1 initiiert (Kolb 2000b).

Charakteristisch für das CopA-CopT-System ist, dass Haarnadelstrukturen der Antisense-RNA zuerst mit den apikalen Schleifen der Ziel-RNA einen sogenannten *kissing complex* formen (Abb. 4.1). Die Schleifen weisen ein YUNR-Motiv (Y = Pyrimidin, R = Purin, U = Uracil, N = beliebiges Nukleotid) auf, von dem angenommen wird, dass es eine wichtige Rolle in der Bindungsspezifität und -geschwindigkeit spielt, indem es die Schleifennukleotide stromabwärts des konservierten U-Restes in einer A-helikalen Konformation vorstrukturiert. Die Bildung der Hybridhelix beginnt mit den beiden Nukleotiden, die auf das U folgen und

setzt sich dann jeweils unidirektional unter Aufschmelzung der Stammbereiche von CopA und CopT fort. Interne Schleifen destabilisieren den Stamm der Haarnadelstrukturen, um die Bildung der neuen Helix zu erleichtern (Kolb 2000a, Kolb 2000b).

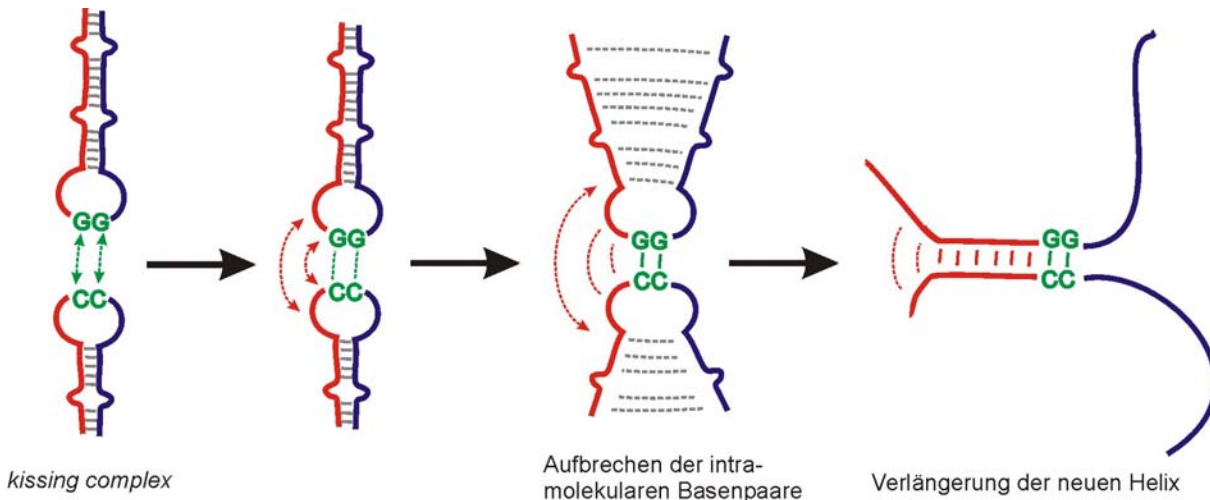


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des *kissing complex*

Die an der Initiation der Interaktion beteiligten Nukleotide sind in Grün, die zueinander komplementären Bereiche der beiden haarnadelförmigen Moleküle in Rot dargestellt.

Analog zum CopA-CopT-System wurden AS-ON entworfen, die komplementär zu Sequenzen in 5' und 3' Richtung der CCA-Bindungsstelle der *E. coli*-P RNA waren (Eco3' und Eco5'; Abb. 4.2). Die oben aufgeführten Charakteristika des CopA-CopT-Systems wurden, soweit möglich, für beide AS-ON adaptiert. So sind die RNA-AS-ON haarnadelförmig und es kann sich ein *kissing complex* zwischen den beiden Cytosinen (orange) und den zentralen Guanosinen (violett) der P15-Schleife ausbilden. Eco5' weist ein YUNR-Motiv auf, während bei Eco3' die feststehende Zielsequenz die Integration eines solchen Motivs nicht zuließ. Die Stammbereiche von Eco5' und Eco3' wurden durch interne Schleifen destabilisiert.

Ebenso sollten entsprechende AS-ON für die P RNA von *M. hyopneumoniae* konzipiert werden. Die *M. hyopneumoniae*-P RNA-spezifischen RNA-Oligonukleotide wurden analog zu den *E. coli*-AS-ON Mhyo3' bzw. Mhyo5' genannt (Abb. 4.2).

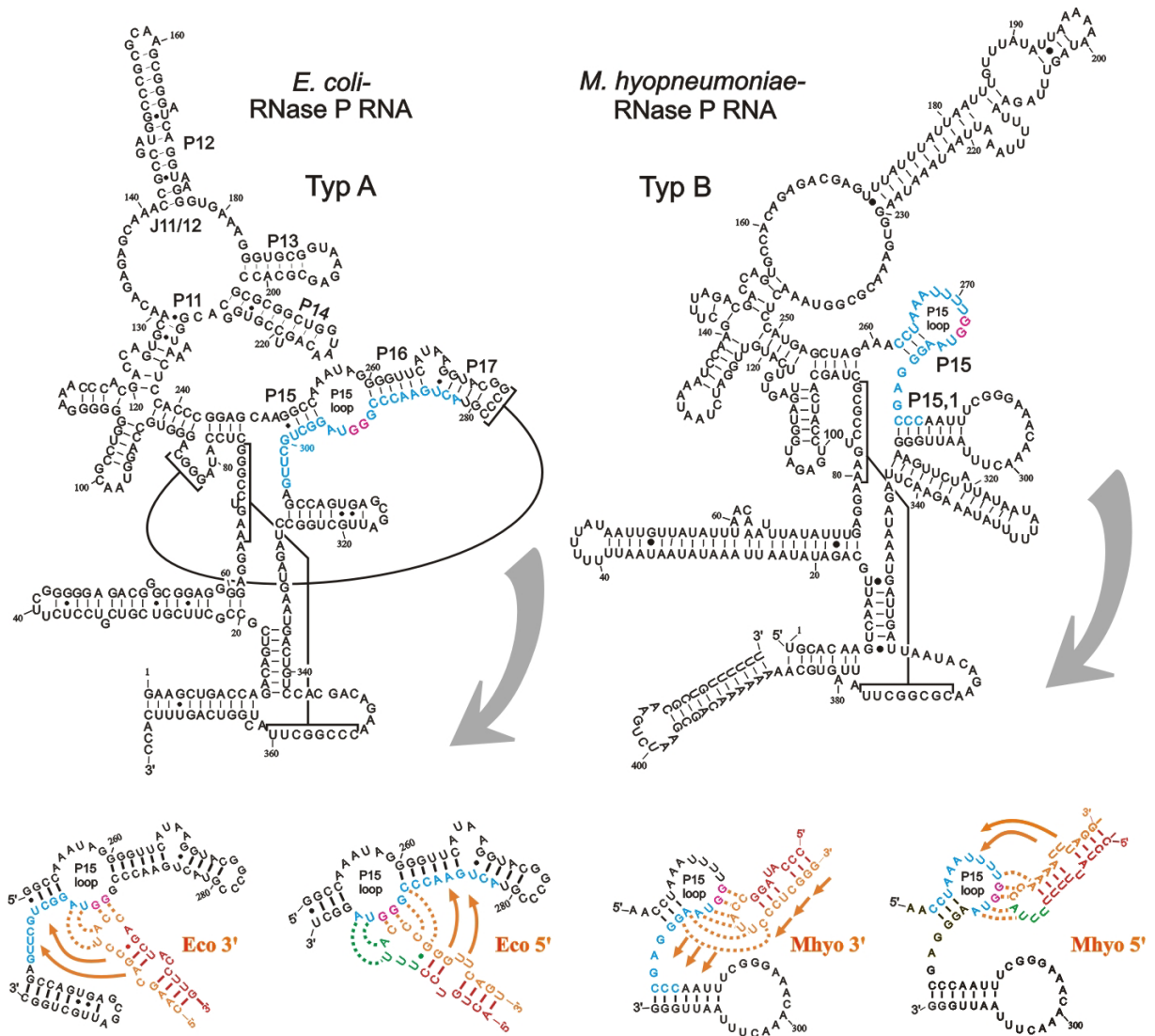


Abb. 4.2: Postulierte Invasion der haarnadelförmigen AS-ON in die RNA-Untereinheiten von *E. coli*- und *M. hyopneumoniae*-RNase P RNA

In Analogie zum CopA-CopT-System (siehe oben) wurde erwartet, dass sich zwischen den beiden zentralen Guanosinen (violett) der P15-Schleife (P15 loop) und den komplementären Cytosinen (orange) im Schleifenbereich der AS-ON ein initialer *kissing complex* ausbildet. Eine Verlängerung der Paarung ist durch die zueinander komplementären blau bzw. orange dargestellten Nukleotide möglich, während die rot gekennzeichneten Nukleotide des AS-ON nicht an der Interaktion teilnehmen.

Die AS-ON wurden im *in vitro* Inhibitionsassay unter *multiple turnover*-Bedingungen nach einer 40-minütigen Vorinkubation von Inhibitor und P RNA auf ihre Wirksamkeit getestet. Dabei wurde mit einem 100-fachen Überschuss an Inhibitor (1 μ M) über P RNA (10 nM) gearbeitet. Die Prozessierungsexperimente zeigten, dass Eco5' die *E. coli*-P RNA unter den gewählten Bedingungen nicht inhibieren konnte, während Eco3' die Enzymreaktion fast vollständig hemmte (Abb. 4.3 A, Willkomm 2003). *Mycoplasma*-P RNA konnte weder mit Mhyo3' noch mit Mhyo5' inhibiert werden (Abb. 4.3 B). Zur weiteren Charakterisierung der *E. coli*-P RNA-Inhibition wurde der K_i -Wert von Eco3' mit 60 nM bestimmt (Abb. 4.3 C). Da RNA-Oligonukleotide aufgrund ihrer Nukleasesensitivität schlecht für *in vivo*-Anwendungen geeignet sind, wurden DNA-Varianten des Eco3' und Eco5' AS-ON getestet. Beide

hemmen die *E. coli*-RNase P-Reaktion bei 1 μM Assaykonzentration im *in vitro*-Inhibitionsassay nicht (Abb. 4.3 B).

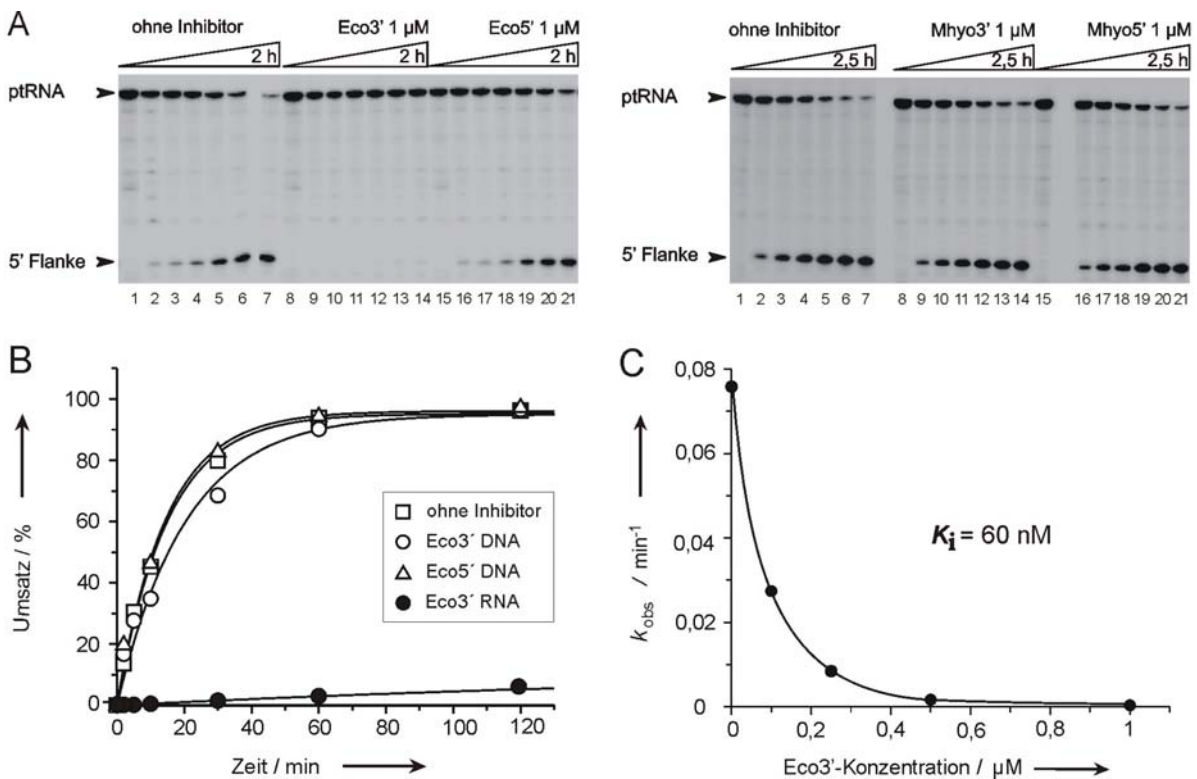


Abb. 4.3: Inhibition der RNA-Untereinheit von *E. coli* und *M. hyopneumoniae* durch haarnadelförmige AS-ON

A: links: *E. coli*-P RNA und Eco3' bzw. Eco5', rechts: *M. hyopneumoniae*-P RNA mit Mhyo3' und Mhyo 5'; die P RNAs (10 nM) wurden 40 min mit und ohne AS-ON in Inhibitionsbuffer bei 37°C inkubiert. Es wurde ein 100-facher molarer Überschuss an Oligonukleotid über P RNA eingesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 5' radioaktiv markierter ptRNA^{Gly} als Substrat (100 nM) gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (2, 5, 10, 30, 60, 120 min) wurden Aliquots entnommen und auf einem 20 % PAA-Gel analysiert. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne P RNA unter den gleichen Bedingungen inkubiert (Spuren 1, 8, 15). Aus dem Verhältnis der abgespaltenen 5' Flanke zu ungeschnittener ptRNA wurden die Umsatzraten berechnet. **B:** Graphische Auswertung von Kinetiken, die auf Gelanalysen wie in (A) gezeigt basieren. Dargestellt ist der prozentuale Umsatz an ptRNA über der Zeit in Ansätzen ohne Inhibitor, in Anwesenheit der RNA-Variante von Eco3', sowie mit DNA-Analoga von Eco3' und Eco5'. **C:** *E. coli*-P RNA-Inhibition bei verschiedenen Eco3'-Konzentrationen. Die Inhibitionskonstante K_i beschreibt die Konzentration, bei der die Inhibition gerade halbmaximal ist. Die Einzelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt.

Die unterschiedliche Wirksamkeit der *E. coli*-spezifischen AS-ON lässt sich möglicherweise durch die Struktur der P RNA erklären. So erforderte die Invasion von Eco5' als Voraussetzung für eine Hemmung das Aufbrechen der relativ stabilen Helix P16, während für Eco3' das Aufschmelzen der Helix P15 eine deutlich geringere energetische Barriere darstellte (Willkomm 2003). Es ist unklar, warum die P RNA von *M. hyopneumoniae* weder durch Mhyo3' noch Mhyo5' inhibiert wurde. Anders als bei Eco5' musste hier nur die aus drei Basenpaaren bestehende Helix P15 geöffnet werden, wobei die Wirksamkeit von Eco3'

zeigt, dass sogar eine Invasion in eine Helix, die aus drei GC- und einem GU-Basenpaar besteht, möglich ist. Eine Erklärung für die Unwirksamkeit der *Mycoplasma* AS-ON könnte in dem hohen AU-Gehalt der *Mycoplasma*-P RNA liegen. Eine dadurch verursachte konformative Heterogenität und Flexibilität könnte die Zugänglichkeit für die AS-ON Mhyo5' und 3' sowie die Prozessivität ihrer Invasion beeinträchtigt haben. Außerdem ist denkbar, dass bei Mhyo3' das Aufbrechen der Helix P15,1 eine besondere Barriere darstellte (Abb. 4.2, Willkomm 2003).

4.1.2 Inhibitionsmechanismus der haarnadelförmigen AS-ON

Um sicherzustellen, dass dem Inhibitionsmechanismus von Eco3' tatsächlich eine Antisense-Interaktion mit der P15-Schleife zugrunde liegt, wurden Eco3'-Varianten eingesetzt, bei denen die beiden Cytosin-Reste in der endständigen Schleife durch zwei Uracil- bzw. zwei Adenin-Reste ausgetauscht wurden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob der haarnadelförmige Charakter der Inhibitoren für deren Wirksamkeit notwendig ist. Dazu wurde ein einzelsträngiges RNA-AS-ON getestet, das nur aus derjenigen Hälfte von Eco3' bestand, die komplementär zur *E. coli*-P RNA war (15mer, Abb. 4.4).

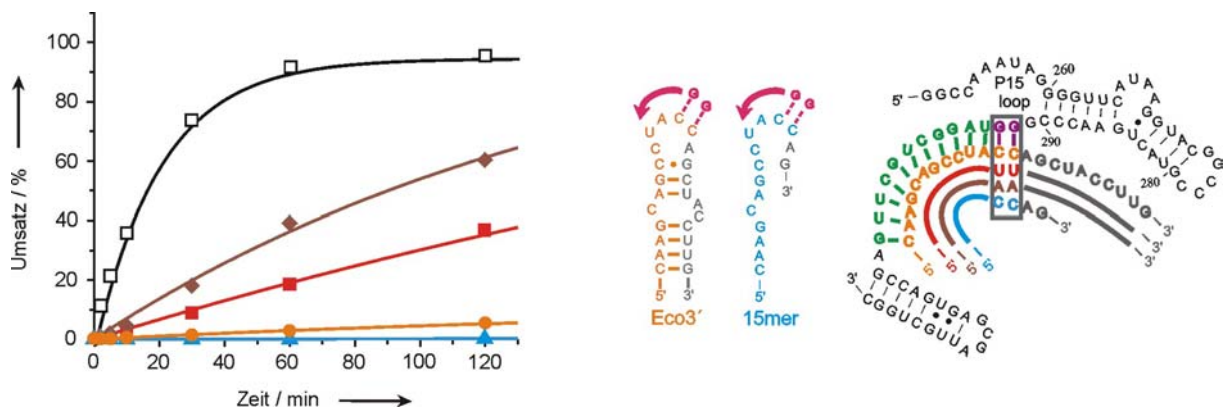


Abb. 4.4: Charakterisierung des Inhibitionsmechanismus der haarnadelförmigen AS-ON

Linke Teilabbildung: der $\text{ptRNA}^{\text{Gly}}$ -Umsatz durch *E. coli*-P RNA ohne Inhibitor (weiße Quadrate) und in Gegenwart von je 1 μM Eco3' (orange Kreise), Eco3' (AA) (braune Rauten), Eco3' (UU) (rote Quadrate) oder 15mer (blaue Dreiecke); rechts sind die Oligonukleotidvarianten im Komplex mit der P15-Region von *E. coli*-P RNA dargestellt, in der Mitte die Strukturen von Eco3' und der verkürzten 15mer-Variante.

Das Inhibitionspotential der einzelnen AS-ON wurde wie in Abb. 4.3 beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.4 dargestellt. Eco3' (AA) zeigte die geringste Hemmstärke, gefolgt von Eco3' (UU) und Eco3', während das 15mer die P RNA-Reaktion unter diesen Bedingungen vollständig hemmte. Dies Ergebnis legte nahe, dass die Inhibition tatsächlich durch eine Invasion in die CCA-Bindungsregion erfolgte. Die bessere Wirksamkeit der Eco3' (UU)-Variante im Vergleich zu der Eco3' (AA)-Variante lässt sich dadurch erklären, dass G292 und G293 der *E. coli*-P RNA mit den Uracil-Resten, aber nicht mit den Adenosin-Resten des jeweiligen AS-ON Wobble-Basenpaarungen ausbilden konnte. Die effektivste

Inhibition durch das 15mer machte die Bildung eines *kissing complex* bei der Invasion sehr unwahrscheinlich. Auch der Haarnadelcharakter war offensichtlich für die Wirksamkeit ungünstig (Willkomm 2003).

4.1.3 Spezifität der haarnadelförmigen RNA-AS-ON

Da ein Austausch von zwei Nukleotiden schon zu einem deutlichen Einbruch in der Wirksamkeit der haarnadelförmigen AS-ON führte, sollte die Spezifität von Eco3' weitergehend untersucht werden. Dazu wurden Inhibitionsversuche mit Eco3' und den Typ B- bzw. Typ A-P RNAs von *Bacillus subtilis* und *Thermus thermophilus* durchgeführt (Willkomm 2003). Die P RNAs von *E. coli* und *T. thermophilus* unterscheiden sich in der CCA-Bindungsregion in vier Nukleotiden, so dass eine Paarung mit Eco3' ein ausgeschleiftes Nukleotid und drei *mismatches* beinhalten würde. Im Fall der *B. subtilis*-P RNA ist die Komplementarität sogar auf nur sieben von 13 möglichen Basenpaaren reduziert.

Die Versuche zeigten für Eco3' eine deutliche Diskriminierung zwischen den verschiedenen P RNAs, da bei 1 μ M Inhibitorkonzentration die P RNA-Aktivität von *E. coli* nahezu vollständig gehemmt war, während bei *M. hyopneumoniae*-, *T. thermophilus*- und *B. subtilis*-P RNA keine Aktivitätsunterschiede zwischen den Ansätzen mit und ohne Inhibitor festgestellt werden konnten (Willkomm, 2003).

4.1.4 Optimierung der einzelsträngigen RNA-AS-ON

Das einzelsträngige 15mer, das deutlich wirksamer als die haarnadelförmigen AS-ON war, wurde als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen verwendet (Abb. 4.5 A). Zum einen wurde das überhängende, nicht zur P RNA komplementäre AG-Dinukleotid am 3'-Ende deletiert (13mer) oder durch ein C ersetzt (14mer), das komplementär zu G291 ist. Außerdem wurden die 5'-Enden des 15- und 14mers verkürzt, wodurch das 12mer bzw. das 11mer entstand. Das 27mer stellte eine um 13 Nukleotide verlängerte Variante des 14mers dar, bei der die P18-Helix in die Interaktion einbezogen werden sollte. Alle Inhibitoren wurden bei 20 nM Assaykonzentration und nach 40 min Vorinkubationszeit im Prozessierungsassay getestet. Die RNase P-Reaktion konnte am effektivsten mit dem 14mer inhibiert werden, gefolgt vom 13-, 11-, 15-, 12- und 27mer (Abb. 4.5 C). Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten K_i bestätigte die Rangfolge der Inhibitionseffizienzen (Abb. 4.5 B, Gruegelsiepe 2003).

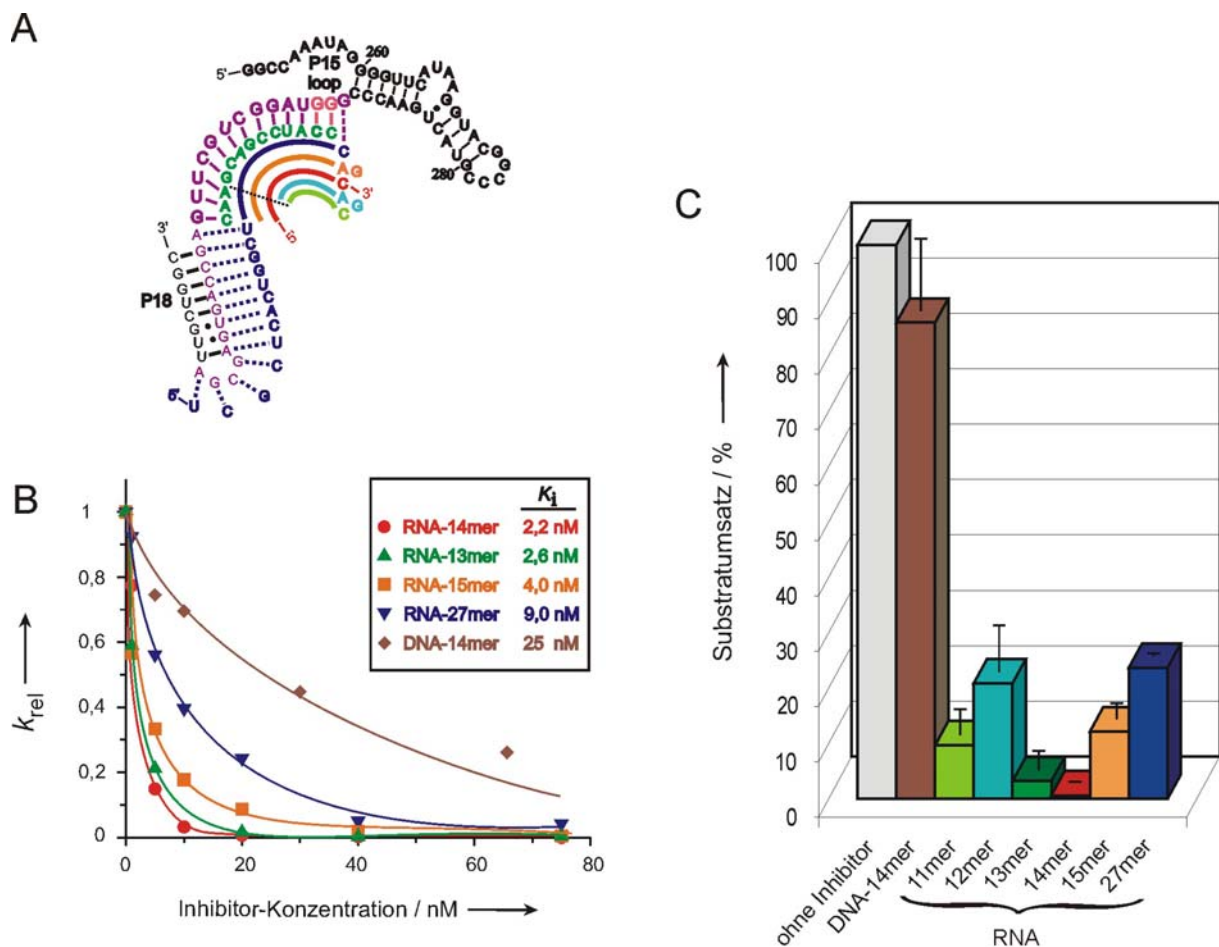


Abb. 4.5: Längenoptimierung der einzelsträngigen RNA-AS-ON

A: postulierte Hybridhelix zwischen den Oligonukleotiden verschiedener Länge und der P15-Region der *E. coli*-P RNA, die Nukleotide der *target*-Region sind violett gekennzeichnet (nt 292 und 293 in pink), die RNA-Inhibitoren sind dunkelblau (RNA-27mer), dunkelgrün (RNA-13mer), orange (RNA-15mer), rot (RNA-14mer), hellblau (RNA-12mer) und hellgrün (RNA-11mer) markiert. Der gleiche Farbcode wurde für die Teilabbildungen B und C verwendet. **B:** aus der Darstellung der normalisierten Umsatzraten (k_{rel} : Umsatzrate bei der jeweiligen Inhibitorkonzentration bezogen auf die Umsatzrate ohne Inhibitor) über der Inhibitorkonzentration wurden die K_i -Werte ermittelt. Der Fehler lag für gewöhnlich unter 10 %, in Ausnahmefällen traten auch bis zu 30 % Fehler auf. Die Experimente wurden mit einer nominalen *E. coli*-P RNA-Konzentration von 10 nM durchgeführt; auf der Grundlage einer früheren Studie (Hardt 1993) ist davon auszugehen, dass jedoch nur ca. 60 % der P RNA nach einer 40-minütigen Inkubation bei 37 °C in einer aktiven Konformation vorliegen; dies erklärt die zum Teil niedrigen K_i -Werte von < 5 nM. **C:** Wirksamkeit des RNA-11mers und -12mers im Vergleich zu den anderen Oligonukleotiden bei einer Inhibitorkonzentration von 20 nM, auf der y-Achse ist der $ptRNA^{Gly}$ -Umsatz (in Prozent) bei einer P RNA-Konzentration von 10 nM aufgetragen. Sämtliche Daten basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die vergleichsweise geringe Wirksamkeit des 27mers kann dadurch erklärt werden, dass das Aufbrechen der Helix P18 energetisch kostspielig ist. Ebenso scheinen die beiden überhängenden AG-Nukleotide beim 12- und 15mer die Invasion zu stören, da das 11mer ein besserer Inhibitor als das 12mer und das 13mer ein besserer Inhibitor als das 15mer ist.

Die besten Ergebnisse wurden mit dem vollständig komplementären 14mer erreicht. Eine weitere Verlängerung des 14mers am 5'-Ende wurde aufgrund der relativ geringen Inhibitionseffizienz des 27mers nicht weiter verfolgt.

4.1.5 Vergleich mit anderen Antisense-Inhibitionsstrategien

In einem zweiten Ansatz zur Inhibierung der P RNA von *E. coli* wurden einzelsträngige DNA-AS-ON von 18 bis 20 Nukleotiden Länge komplementär zu verschiedenen Regionen der *E. coli*-P RNA mit einem Algorithmus konzipiert, der ursprünglich für die Entwicklung von AS-ON gegen mRNAs entwickelt worden war (Willkomm 2003, Abb. 4.6 A). Dabei wurden besonders jene Regionen des katalytischen Kernbereichs der P RNA (P5/ P15/ P16) berücksichtigt, die auf der Grundlage der existierenden Sekundär- und Tertiärstrukturmodelle als zugänglich gelten (Brown 1998, Massire 1998). Die DNA-AS-ON wurden mit einem 100-fachen Überschuss an Inhibitor über P RNA im Inhibitionsassay getestet. Dabei hemmten die drei zur P11-Region komplementären AS-ON die RNase P-Aktivität am effektivsten. Die Wirksamkeit der P11-spezifischen AS-ON als RNA-Varianten lag in einem Konzentrationsbereich, der vergleichbar zu dem des RNA-15mers war, so dass durch diesen Ansatz eine zweite vielversprechende *target*-Region in *E. coli* aufgezeigt wurde (Abb. 4.6 B, Willkomm 2003).

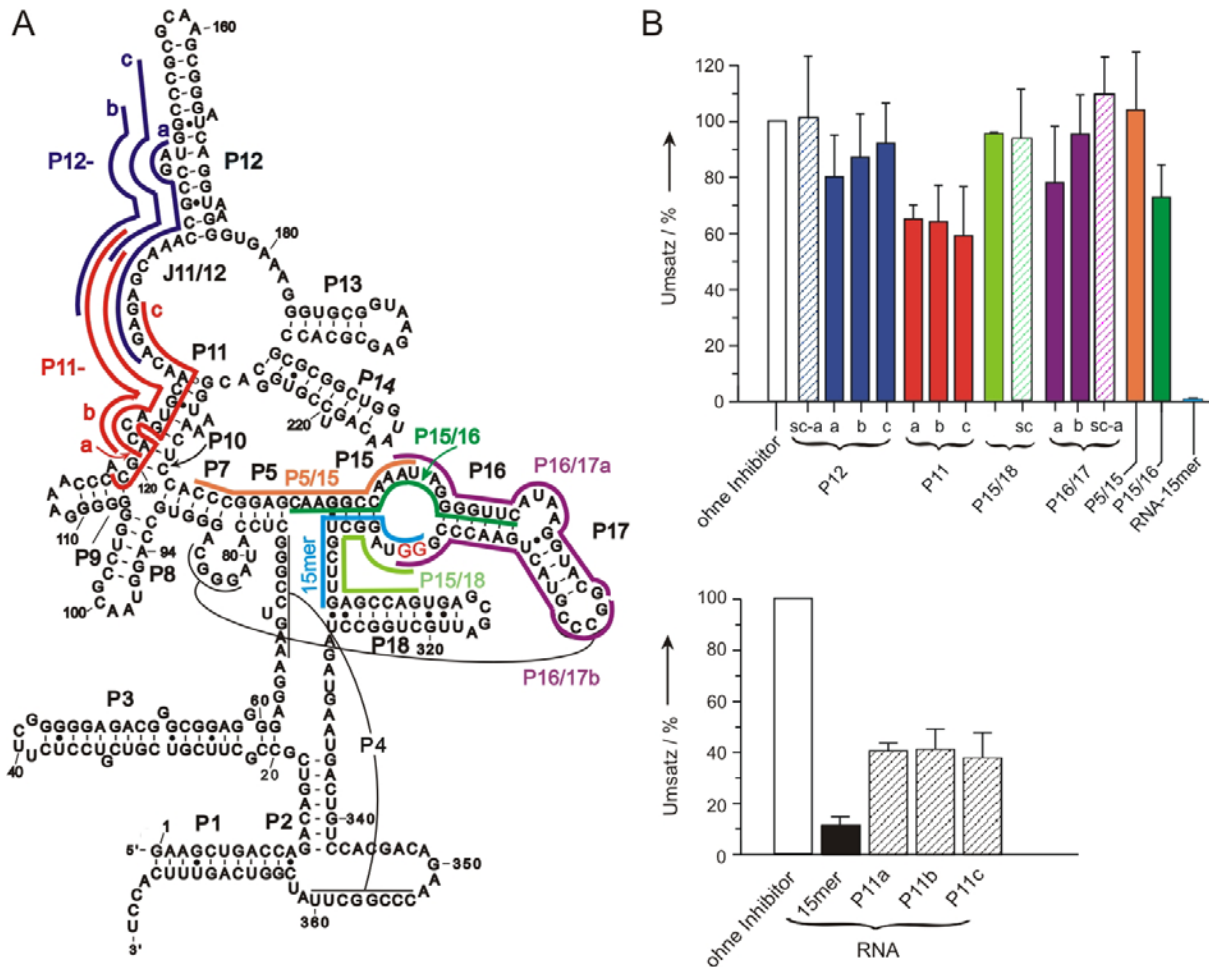


Abb. 4.6: Inhibitionspotential der gegen verschiedene *E. coli*-P RNA-Regionen gerichteten DNA-AS-ON

A: *Target*-Sequenzbereiche der 18-20 nt langen DNA-AS-ON sowie des RNA 15mers. **B:** oben, Prozessierung von ptRNA^{Gly} durch *E. coli*-P RNA in Anwesenheit der einzelnen DNA-Oligonukleotide (1 µM Assaykonzentration); sc (scrambled), Kontroll-Oligonukleotide mit randomisierter Sequenz aber gleicher Basenkomposition; untere Teilabbildung: Inhibition der ptRNA^{Gly}-Spaltung durch *E. coli*-P RNA mit RNA-Varianten der effizientesten DNA-AS-ON; die Assaykonzentration der Inhibitoren betrug 20 nM; zum Vergleich ist die Inhibitionseffizienz des RNA-15mers dargestellt.

In der Studie einer anderen Arbeitsgruppe (Childs 2003) wurden zur *E. coli*-P RNA komplementäre DNA-Oligonukleotide auf die Fähigkeit untersucht, die P RNA während ihrer Transkription in einer inaktiven Konformation zu arretieren. Es wurden 32 komplementäre DNA-Oligonukleotide (12mere) konzipiert, die in ihrer Gesamtheit die komplette Sequenz der *E. coli*-P RNA abdeckten. Der Transkriptionsassay enthielt neben einem linearisierten Plasmid, das die RNase P RNA kodiert, die C5-Proteinuntereinheit der RNase P, radioaktiv markierte ptRNA und das jeweilige DNA-Oligonukleotid. Die besten Inhibitoren wurden anschließend als 2'-O-Methyl-Analoga in ptRNA-Prozessierungsassays mit und ohne C5-Protein getestet. Auch in dieser Studie war der gegen die CCA-Bindungsregion (von Nukleotid 289-300) gerichtete Inhibitor mit einem K_i-Wert von 9 nM der wirksamste. Der K_i-Wert liegt damit im gleichen Bereich wie die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten K_i-Werte der 11- bis 15mere. Vergleicht man die Daten von Childs et al. (2003) mit jenen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Willkomm, 2003), so lässt sich zusammenfassend feststellen, dass beide Ansätze wirksame AS-ON gegen die P15-Region lieferten, während auf der Grundlage unserer Experimente (ohne C5-Proteinuntereinheit) auch AS-ON vielversprechend erscheinen, die komplementär zu den Regionen P11 und J11/12 sind. Eine geringere Zugänglichkeit der letzteren beiden Regionen in Anwesenheit des Proteins stände mit RNA-Protein-Quervernetzungsdaten im Einklang (Sharkady 2001). In dem aus der genannten Studie abgeleiteten Modell des Holoenzym interagiert die P11-Region sowohl mit dem Substrat als auch mit der Proteinuntereinheit. Allerdings konnten diese Interaktionen in neueren *footprinting*-Experimenten nicht bestätigt werden (Tsai 2003).

4.2 Biochemische Charakterisierung der 14mer-Inhibitoren

Für zukünftige *in vivo*-Experimente ergab sich die Notwendigkeit, die AS-ON mittels Modifikationen gegen den Abbau durch Nukleasen zu stabilisieren. In dieser Arbeit wurde das RNA-14mer sowohl als DNA-, als auch als PNA- (Peptide Nucleic Acid) und LNA- (Locked Nucleic Acid) Variante verwendet (1.1.1). Im folgenden Teil ist die biochemische Charakterisierung der vier analogen, sequenzidentischen 14mere beschrieben. Ein *blastsearch* zeigte zudem, dass die *target*-Sequenz des 14mers nur einmal im Genom von *E. coli* und überhaupt nicht im humanen Genom vorkommt.

4.2.1 Vergleich des Inhibitionspotentials

Um das Inhibitionspotential der vier 14mer-Analoga zu beurteilen, wurden K_i -Werte bestimmt (Tab. 4.1). Das DNA-14mer zeigte mit einem K_i -Wert von 25 nM mit Abstand die schwächste Hemmwirkung, während das RNA-14mer mit einem K_i -Wert von 2,2 nM eindeutig der beste Inhibitor war. Die LNA-Variante hatte nur einen geringfügig höheren K_i -Wert als das RNA-Oligonukleotid, während das PNA-14mer mit 12,5 nM einen deutlich höheren K_i -Wert aufwies.

Tab. 4.1: K_i -Werte für die Interaktion der 14mer-Analoga mit den P RNAs von *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. vinosum* und *T. thermophilus*

Vorinkubation von Inhibitor und P RNA jeweils 40 min; bei den Experimenten mit dem LNA-14mer wurde 80 min vorinkubiert. Die K_i -Werte wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt; n.u., nicht untersucht. In der linken Spalte sind in Klammern die Abweichungen in der Komplementarität für Hybridisierungen des *E. coli*-14mers mit den heterologen P RNAs angegeben. In Klammern unter den K_i -Werten (z.B. 9-fach) ist der Faktor angegeben, um den sich die Interaktion mit der jeweiligen nicht kognaten gegenüber der kognaten P RNA verschlechtert. Die mit *mfold* berechneten Werte für die freie Energie der jeweiligen Hybridhelix sind in Blau markiert.

P RNA	RNA-14mer [nM] [kcal/mol]	LNA-14mer [nM]	PNA-14mer [nM]	DNA-14mer [nM]	RNA-14mer Allo [nM] [kcal/mol]	RNA-14mer Thermus [nM] [kcal/mol]
<i>E. coli</i>	2,2 ± 0,6 -28,0	3,9 ± 1,8	12,5 ± 0,5	25 ± 5	160 ± 10 (53-fach) -17,5	80 ± 20 (6-fach) -18,2
<i>P. aeruginosa</i> (1 mismatch, 1 GU-Paar)	19,0 ± 1,5 (9-fach) -21,8	18,2 ± 0,8 (5-fach)	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
<i>A. vinosum</i> (2 mismatches, 1 GU-Paar)	125 ± 53 (56-fach) -19,3	25 ± 5 (6-fach)	3200 ± 1500 (256-fach)	n.u.	3,0 ± 0,6 -27,8	n.u.
<i>T. thermophilus</i> (1 mismatch, 1 GU-Paar 1ausgeschleiftes Nukleotid)	1200 ± 25 (550-fach) -19,3	36 ± 13 (9-fach)	7000 ± 3000 (560-fach)	n.u.	n.u.	13,3 ± 2,5 -30,9

Die Rangfolge der Inhibitionsstärke war unerwartet, da für LNA:RNA-Hybridhelices deutlich höhere Schmelztemperaturen gemessen wurden als für RNA:RNA-Duplexe (Singh 1998). Die Schmelztemperaturen für PNA:RNA-Hybridhelices liegen wiederum niedriger als die für LNA:RNA-Helices (Elayadi 2002). Höhere Schmelztemperaturen lassen eine stärkere Affinität des Inhibitors zu seinem Zielmolekül und damit eine bessere Wirksamkeit erwarten. Die für die 14mere ermittelte Rangfolge legt nahe, dass noch andere Parameter das

Inhibitionspotential beeinflussen. So haben frühere vergleichende Studien gezeigt, dass je nach Kontext unterschiedliche Modifikationen am geeignetsten waren. In einer Studie zur Inhibierung der humanen Telomerase wurden AS-ON komplementär zur RNA-Templat-Domäne eingesetzt (Elayadi 2002). Dabei stellte sich heraus, dass bei der Verwendung von Oktameren LNA-Oligonukleotide deutlich bessere Inhibitoren als PNA- oder 2'-O-methylierte Oligomere waren. Im Gegensatz dazu zeigten Nulf et al. (2004), dass PNA-Oligomere die interne ribosomale Bindungsstelle (IRES, *internal ribosomal entry site*) des Hepatitis C-Virus etwas effizienter blockierten als die entsprechenden allLNA- oder LNA:2'-O-Methyl-Mixmere. PNA- und LNA-Inhibitoren waren dabei im gleichen Konzentrationsbereich wirksam (50 bis 200 nM) wie AS-ON mit z.B. Phosphothioat- und 2'-Modifikationen (Nulf 2004, Hanecak 1996).

Arzumanov et al. (2001) verfolgten einen Ansatz zur Blockierung der TAR-Region von HIV (HIV-1 *trans-activation response element*) mit AS-ON, um die Bindung des Tat- (*trans-activator*) Proteins zu verhindern, das zusammen mit einigen anderen Faktoren für die Replikation der Virus-RNA benötigt wird. Es wurde das Inhibitionspotential verschieden modifizierter AS-ON in Abhängigkeit von der Salzkonzentration getestet. 2'-O-Methyl-Oligonukleotide waren am effektivsten, gefolgt von der PNA-, der LNA/DNA-Mixmer- und der allLNA-Variante, wobei nur bei dem PNA-Inhibitor die Wirksamkeit nahezu unabhängig von der Salzkonzentration war (Arzumanov 2001).

Es muss letztlich für jedes *target* der optimale Modifikationstyp und -grad ermittelt werden. Dabei spielt auch die Beschaffenheit des Zielmoleküls eine Rolle. So hat zum Beispiel LNA eine sehr hohe Affinität zur Zielsequenz und sollte daher bei nicht so stark strukturierten *targets* von Vorteil sein, während PNA aufgrund des ungeladenen Rückgrates leichter in vorhandene RNA- oder DNA-Strukturen invadieren und somit erfolgreicher bei stärker strukturierten Zielsequenzen eingesetzt werden kann. Ebenso ist im Fall sehr kurzer Oligomere für LNA-modifizierte Varianten aufgrund des höheren T_m -Wertes eine bessere Wirksamkeit zu erwarten als für entsprechende PNA-Oligomere.

Bezüglich des PNA-14mers könnte die schlechtere Löslichkeit von PNA-Oligomeren in wässrigen Lösungen ein weiterer Grund für das etwas geringere Inhibitionspotential der PNA- gegenüber der RNA-Variante sein (Tab. 4.1). Es kommt zur Bildung von Clustern, die durch Erhitzen der PNA-Lösung auf 80°C aufgelöst werden können (Herstellieranweisung der Firma PerSeptive Biosystems). Deshalb wurden alle PNA-Lösungen bei 80°C hergestellt, pipettiert und quantifiziert. Denkbar ist, dass trotz dieser Sonderbehandlung noch PNA-Cluster während der Inhibitionsexperimente vorlagen, die dann zu einer Verringerung der effektiven Konzentration und somit zu einer Erhöhung des K_i -Wertes geführt haben könnten. Desweiteren neigen PNA-Oligomere zur Ausbildung von Tripelhelices, die aus zwei PNA-Molekülen und einem RNA-Molekül bestehen. Eine Triplexbildung wurde mit RNA-Molekülen palindromischer Sequenz nachgewiesen, wobei der erste PNA-Strang über Watson-Crick- und der zweite über Hoogsteen-Basenpaarungen an die Ziel-RNA bindet. Für eine RNA:PNA₂-Triplex wurde annähernd die gleiche potentielle Energie für die parallele und

antiparallele Orientierung der beiden PNA-Stränge zueinander errechnet, wobei die antiparallele Orientierung energetisch leicht bevorzugt war (Almarsson 1993, Dias 2002). Dias et al. (2002) konnten im Ha-*ras*-System eine Triplexbildung bestehend aus sieben Basenpaaren (1 TAT-Tripel und 6 CGC-Tripel) in antiparalleler Orientierung nachweisen. Dabei wurde die Triplexstruktur auch aufrechterhalten, wenn ein zentraler *mismatch* eingefügt wurde. Es besteht daher die Möglichkeit, dass zwei PNA-14mere mit der CCA-Bindungsstelle eine Triplex ausgebildet haben könnten, wobei der zweite PNA-Strang mit dem ersten über sieben Basenpaare in paralleler Orientierung oder über fünf Basenpaare mit einem zentralen *mismatch* in antiparalleler Orientierung komplexiert sein könnte (Abb. 4.7). Inwieweit eine solche Triplexbildung tatsächlich stattgefunden hat, bleibt ungewiss. Allerdings könnte die Triplexbildung eine Erklärung für das diffuse Laufverhalten von P RNA-PNA-Komplexen im denaturierenden PAA-Gel der Abb. 4.10 sein. Im erwähnten Ha-*ras* System konnte ebenfalls gezeigt werden, dass überhängende Enden sowohl des Zielmoleküls als auch des PNA-Inhibitors zur Stabilität der Triplexstruktur beitragen (Dias 2002). Es ist also vorstellbar, dass im Fall des PNA-14mers die nicht komplementären Nukleotide einen Beitrag zur Stabilität eines solchen RNA:PNA₂-Komplexes leisten.



Abb. 4.7: mögliche Triplexbildung zwischen einem *E. coli*-P RNA-Molekül und zwei PNA-14meren

4.2.2 Spezifität

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Qualität von AS-ON ist die Spezifität. Es wurden Inhibitionsversuche mit den *E. coli*-spezifischen RNA-, LNA- und PNA-14mer-Varianten und den P RNAs verschiedener Bakterien durchgeführt, die bezogen auf *E. coli*-P RNA eine abnehmende Sequenzähnlichkeit in der CCA-Bindungsregion zeigten. Die *E. coli*-spezifischen 14mere können mit der P RNA von *Pseudomonas aeruginosa* eine Helix mit einem *mismatch* und einem GU Wobble-Basenpaar bilden, während bei der P RNA von *T. thermophilus* noch ein ausgeschleiftes Nukleotid hinzukommt (Abb. 4.8). Die postulierte Helix mit der P RNA von *Allochrochromatium vinosum* weist zwei *mismatches* und ein GU Wobble-Basenpaar auf. Zusätzlich wurden spiegelbildliche Experimente mit RNA-14meren durchgeführt, die vollständig komplementär zur P RNA von *A. vinosum* (RNA-14mer Allo) bzw. *T. thermophilus* (RNA-14mer Thermus) waren.

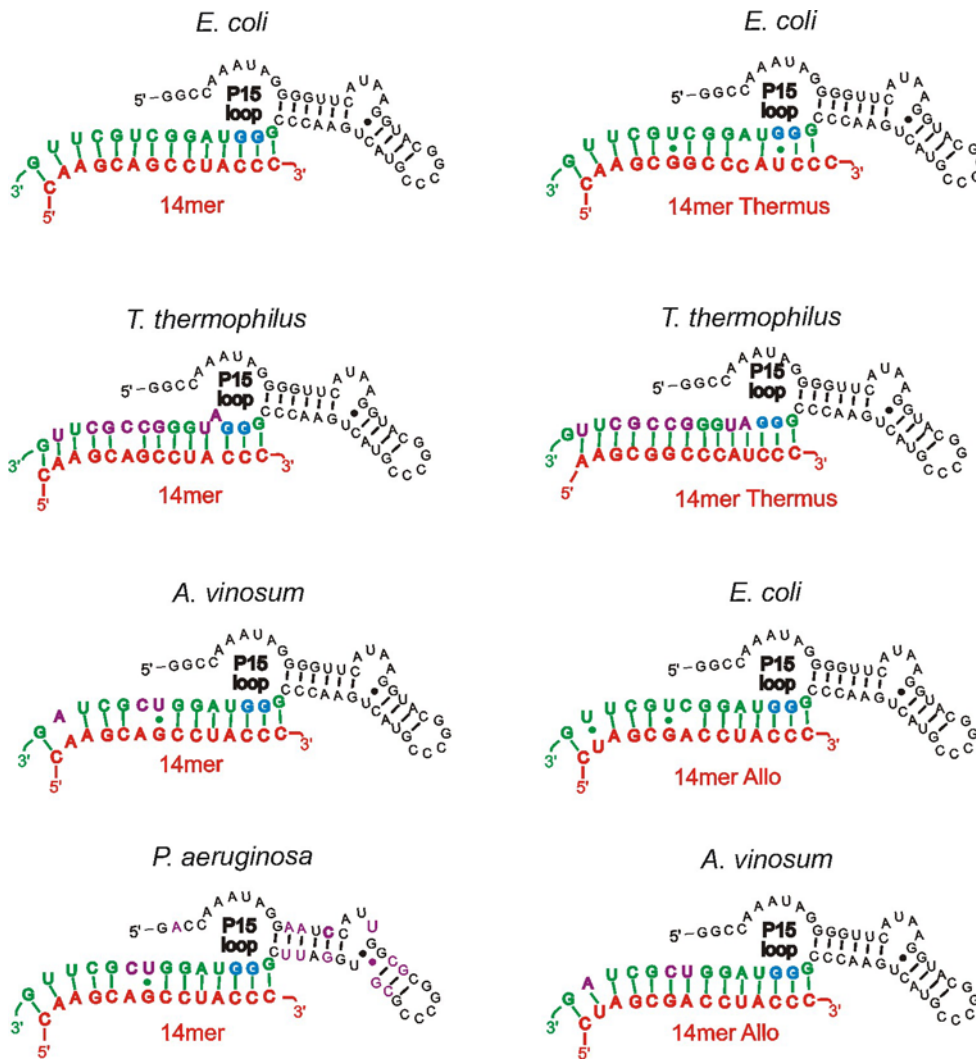


Abb. 4.8: Postulierte Invasion des *E. coli*-spezifischen 14mers in die P15-Region verschiedener bakterieller P RNAs

Der Inhibitor ist rot, die *target*-Sequenz in der P RNA grün dargestellt; in Blau: G292 und G293 (*E. coli*-Nummerierung); violett markierte Nukleotide kennzeichnen die Sequenzabweichungen relativ zur *E. coli*-P RNA.

Für jedes Inhibitor/ P RNA-Paar wurde der K_i -Wert unter *multiple turnover*-Bedingungen nach 40-minütiger Vorinkubation von Inhibitor und P RNA bestimmt (Tab. 4.1). Die Vorinkubationszeit des LNA-14mers mit der P RNA wurde auf 80 min verlängert, da in Vorexperimenten bei einer Inhibitorkonzentration von $5 \times K_i$ die Komplexbildung zwischen LNA-Inhibitor und P RNA erst nach 80 min vollständig erfolgt war. Die Gleichgewichtseinstellung des PNA-, RNA- und DNA-14mers war dagegen schon nach 15, 20 bzw. 40 min abgeschlossen.

Außerdem wurde für die RNA-Inhibitor/ P RNA-Paare die freie Energie mittels *mfold* (Mathews 1999) berechnet und der K_i -Wert über der freien Energie aufgetragen (Abb. 4.9). Dabei stellte sich heraus, dass in einer halblogarithmischen Darstellung alle Datenpunkte auf einer Geraden lagen, der K_i -Wert also mit der freien Energie der Helix korreliert. Nur die beiden zu der P RNA von *T. thermophilus* gehörenden Datenpunkte lagen weit oberhalb der

Geraden. Dies lässt vermuten, dass die Inhibition der P RNA von *T. thermophilus* eine Sonderstellung unter den betrachteten P RNAs einnimmt.

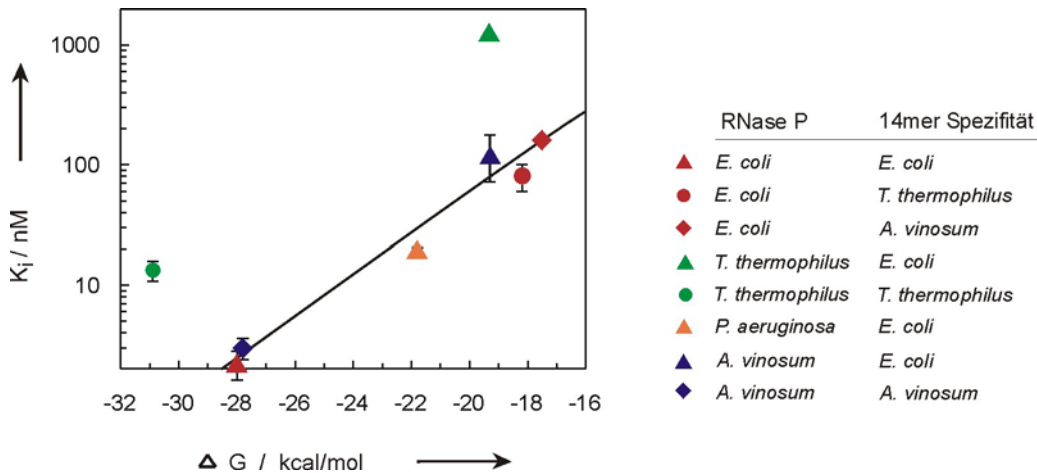


Abb. 4.9: Darstellung der K_i -Werte über der freien Energie für die Inhibition der P RNAs von *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. vinosum* und *T. thermophilus* durch die verschiedenen RNA-14mere. Die Fehlerbalken sind teilweise so klein, dass sie nicht über den Datenpunkt herausragen.

So war der K_i im *Thermus*-System mit 13,3 nM sechsmal schlechter als die Inhibitionskonstante des *E. coli*-Systems, obwohl die freie Energie für die Inhibitor/ P RNA-Helix sogar über der des *E. coli*-Systems liegt. Genauso ist der K_i -Wert des *E. coli*-spezifischen RNA-14mers mit der P RNA von *T. thermophilus* deutlich höher als der des inversen Paares (1200 nM zu 80 nM). Die Ursachen liegen wahrscheinlich in dem insgesamt höheren GC-Gehalt der *T. thermophilus*-P RNA. So könnte das Aufbrechen der Helix P15, die bei *T. thermophilus* aus 4 GC-Basenpaaren besteht, im Vergleich zu *E. coli* erschwert sein und somit zu erhöhten K_i -Werten führen.

In der vergleichenden Betrachtung der K_i -Werte, mit dem Ziel, Aussagen über die Spezifität zu treffen, wurden deswegen die Daten der P RNA von *T. thermophilus* nicht berücksichtigt. Im Fall der *A. vinosum*-P RNA reduzieren die postulierten zwei *mismatches* und das GU Wobble-Basenpaar den K_i -Wert des RNA-14mers 56-fach, den K_i -Wert des LNA-14mers nur 6-fach, während der K_i -Wert des PNA-14mers sogar 256-fach geringer war (Tab. 4.1). Das PNA-14mer ist demnach der am besten diskriminierende Inhibitor. Trotzdem ist das LNA-14mer spezifisch genug, um Sequenzen zu differenzieren, die sich nur in einem Nukleotid und einem GU Wobble-Basenpaar unterscheiden, wodurch sich der K_i -Wert bei *P. aeruginosa* 5-fach verschlechterte (Tab. 4.1). Durch das Einfügen eines weiteren *mismatches* blieb der K_i -Wert dagegen nahezu konstant (siehe *A. vinosum*).

In den spiegelbildlichen Experimenten mit dem *A. vinosum*-spezifischen RNA-14mer wurde für die P RNA von *A. vinosum* ein vergleichbar niedriger K_i -Wert (3 nM) wie für das *E. coli*-System erreicht. Ebenso nahm der K_i -Wert bezüglich der P RNA von *E. coli* im gleichen Maße wie in dem korrespondierenden Experiment ab.

In der P12-Region der P RNA von *E. coli* kann eine zusätzliche *target site* für das RNA-14mer *Thermus* mit neun möglichen Basenpaaren postuliert werden (Abb. 4.10, grau

unterlegt). Eine Bindung des RNA-14mer Thermus an diese Region erscheint jedoch fraglich, da sechs der neun komplementären Nukleotide in einem stabilen Stamm aus GC-Basenpaaren liegen, deren Wasserstoffbrücken bei einer Interaktion erst geöffnet werden müssten.

4.2.3 Strukturanalyse durch Bleispaltung

Mit Hilfe von Bleispaltungsexperimenten sollte der postulierte Antisense-Mechanismus für die Inhibition nachgewiesen werden. Bleiionen hydrolysieren RNAs in einzelsträngigen und flexiblen Bereichen, während helikale Regionen nicht gespalten werden. Besonders prominente Spaltstellen, die auf hochaffine Metallionen-Bindungsstellen zurückzuführen sind, sind für die *E. coli*-P RNA in Abb. 4.10 A mit blauen römischen Zahlen markiert. Das entsprechende Bleispaltungsmuster ist in den Spuren 5 und 6 in Abb. 4.10 B dargestellt. Die Guanosinleiter der *E. coli*-P RNA aus einem Verdau mit RNase T1 bzw. eine durch alkalische Hydrolyse gewonnene Nukleotidleiter wurden in den Spuren 1 und 2 aufgetragen. Anhand der beiden Leitern können die Bleispaltungsprodukte zu den entsprechenden Positionen in der Sekundärstruktur der *E. coli*-P RNA zugeordnet werden. Als Kontrollinhibitor wurde ein RNA-25mer verwendet, das keine Sequenzähnlichkeiten zum 14mer aufwies (Spuren 7 und 8). Außerdem wurde die am 3'-Ende radioaktiv markierte *E. coli*-P RNA direkt und nach 50-minütiger Inkubation im Bleispaltungspuffer auf das Gel aufgetragen (Spuren 3 und 4).

Nach Präinkubation mit dem RNA-14mer (Spuren 11 und 12) änderte sich das Bleispaltungsmuster. So trat ein neues Hydrolyseprodukt (horizontaler Pfeil in Abb. 4.10 B) zwischen den Spaltungsstellen IIc und III auf und die Spaltungen an Position V und VI wurden unterdrückt. Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Helix P15 aufgebrochen wurde und außerdem das 14mer über seine gesamte Länge eine Basenpaarung mit der Zielsequenz ausbildet.

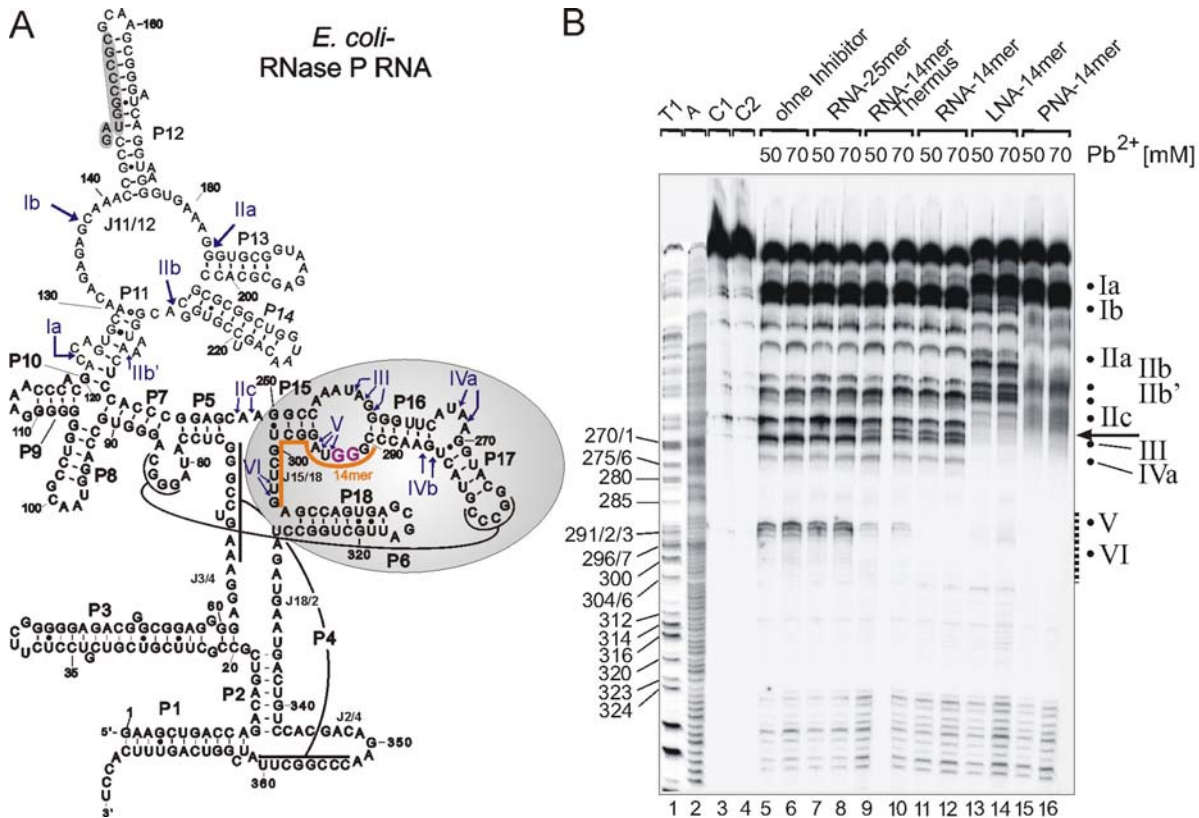


Abb. 4.10: Nachweis des Antisense-Mechanismus für die 14mer-Inhibitoren mittels Bleispaltung

A: Sekundärstruktur der *E. coli*-P RNA nach Massire et al. (1998), die Bleispaltungsstellen sind mit blauen römischen Zahlen markiert (nach Ciesiolka et al., 1994); die *target*-Region ist durch eine orange Linie gekennzeichnet; eine potenzielle zweite Bindungsstelle des RNA-14mer Thermus in Helix P12 ist grau unterlegt, die einzelnen Strukturelemente der P RNA sind mit P für Helices und J für *joining regions* gekennzeichnet, (Massire 1998, Ciesiolka 1994). **B:** Bleispaltungsmuster nach Auftrennung der Proben auf einem denaturierenden PAA-Gel; T1: T1-Leiter, A: Alkalileiter, C1 und C2: Kontrollen, bei denen die P RNA direkt auf das Gel aufgetragen wurde; am linken Rand sind die Fragmentlängen (in Nukleotiden) entsprechend der Nummerierung in (A) und am rechten Rand die prominenten Bleispaltungsstellen angegeben. Der Pfeil kennzeichnet die neu entstandene Bleispaltungsstelle bei den Ansätzen mit Inhibitor.

In den Spuren 13 bis 16 wurden die Ansätze mit dem LNA- bzw. PNA-14mer aufgetragen, wobei jene Fragmente, die die *target*-Region beinhalten, in ihrer gelelektrophoretischen Mobilität verlangsamt waren. Dies deutet darauf hin, dass weder das LNA- noch das PNA-Oligomer unter den denaturierenden Bedingungen des PAA-Gels von der *target*-Region dissoziierten. Die diffusen Banden in den Spuren 15 und 16 lassen sich dadurch erklären, dass das PNA-14mer während des Gellaufs von der *E. coli*-P RNA dissoziierte und reassozierte, während das LNA-14mer fest assoziiert blieb. Damit scheint die Affinität des LNA-14mers höher als die des PNA-14mers zu sein, beide haben aber eine höhere Affinität als das RNA-Oligonukleotid. Ein alternative Erklärung für das diffuse Laufverhalten der P RNA-PNA-Komplexe könnte die in 4.2.2 diskutierte Triplexbildung unter Einbindung eines zweiten PNA-Oligomers sein.

Zusätzlich wurden Bleispaltungsexperimente mit dem *T. thermophilus*-spezifischen RNA-14mer durchgeführt (Spuren 9 und 10). Dadurch sollte geklärt werden, ob sich der Inhibitor neben der CCA-Bindungsstelle auch an die zweite postulierte Bindungsstelle in der P12-Region anlagerte (Abb. 4.10 A). Es konnte aber keine Veränderung des Bandenmusters zwischen den Spaltstellen Ib und IIa gefunden werden, die auf eine derartige Interaktion hindeuten würde. Die Anlagerung ist unter Umständen zu schwach, um sich auf das Bleispaltungsmuster auszuwirken. Die schwächeren Bleispaltungen an Position V und VI lassen auf eine Teilprotektion der CCA-Bindungsregion durch das RNA-14mer Thermus schließen. Das Ergebnis zeigte, dass die Helix aus *E. coli*-P RNA und RNA-14mer Thermus mit nur 10 Watson-Crick-Basenpaaren, einem internen *mismatch* sowie zwei GU Wobbel-Basenpaaren tatsächlich gebildet wird (Abb. 4.8).

Die vorgestellten Bleispaltungsdaten dokumentieren, dass die 14mere in die gefaltete P RNA invadieren, die Helix P15 aufbrechen und eine neue Hybridhelix ausbilden. In der Zelle ist zudem vorstellbar, dass sich die AS-Oligomere bereits bei der Synthese der P RNA anlagern. Mechanistisch ist zu erwarten, dass die Anlagerung die Substratbindung in der P15-Region blockiert und das Ribozym zusätzlich durch Fehlfaltung in einer inaktiven Konformation fixiert wird. Die funktionelle Bedeutung der P15-Region wird durch Experimente unterstützt, bei denen nach Einführung von Punktmutationen in der P15-Region (G300 ausgetauscht durch C und C301 ausgetauscht durch G) keine RNase P-Aktivität in *E. coli in vivo* gefunden wurde (Hardt 1996). Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien mit P RNA-Varianten von *E. coli*, die Deletionen an den Positionen G291 und G292 aufwiesen (Lawrence 1986).

Die Strategie der Antisense-induzierten Fehlfaltung wurde am Beispiel der *E. coli*-P RNA, sowie der Selbstspaltung eines Gruppe I-Introns der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* getestet (Childs 2002, Childs 2003). Childs et al. führten Experimente durch, bei denen verschiedene 2'-O-Methyl-AS-ON entweder zu einem vollständig gefalteten RNase P-Holoenzym gegeben wurden oder die Inhibitoren schon während der Transkription der *E. coli*-P RNA in Gegenwart des P Proteins anwesend waren. Das erfolgreichste AS-ON war das zur CCA-Bindungsregion komplementäre, und es zeigte sich, dass sein K_i -Wert im genannten Transkriptionsassay 10-mal niedriger war als in den Experimenten mit vollständig ausgebildetem Ribonukleoprotein (Childs 2003). Dies deutete darauf hin, dass die Inhibition hauptsächlich in der induzierten Fehlfaltung begründet lag. Die Childs-Studie untermauert zudem, dass die Zielsequenz des 14mers in einem für die Funktionstüchtigkeit der P RNA sensiblen Bereich liegt und somit eine vielversprechende *target*-Region identifiziert und verifiziert wurde.

4.2.4 Assoziations- und Dissoziationsverhalten der Inhibitoren

Um einen ersten Eindruck vom Assoziations- und Dissoziationsverhalten der 14mer-Inhibitoren zu bekommen, wurde die Vorinkubationszeit von Inhibitor und P RNA von 0 bis 40 min bei einer Inhibitorkonzentration von 100 nM variiert. Die schnellste Assoziation zeigte das PNA-14mer gefolgt von der LNA-, RNA- und DNA-Variante (Abb. 4.11).

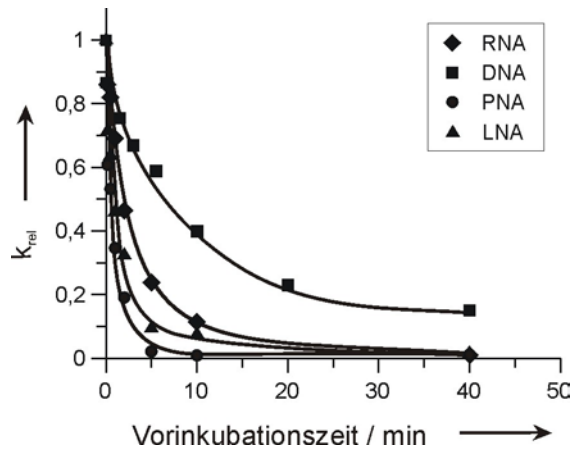


Abb. 4.11: Variation der Vorinkubationszeit der 14mer-Analoga

k_{rel} stellt die relative Prozessierungsrate dar, die sich aus dem Verhältnis der Raten in Anwesenheit und Abwesenheit des Inhibitors ergibt; dargestellt sind aus drei Experimenten gemittelte Kurven.

Weiteren Aufschluss über das Assoziations- und Dissoziationsverhalten gab die Bestimmung der K_D - und k_{off} -Werte mittels eines Säulchen-Assays, bei dem der freie radioaktiv markierte Inhibitor von dem im Komplex gebundenen Inhibitor mittels Gelausschlusschromatographie getrennt wurde. Da sich PNA und LNA nicht radioaktiv markieren ließen, konnten hier weder K_D -Werte noch die Dissoziationsraten bestimmt werden. Die Assoziationsrate dagegen ließ sich aus Kinetiken, bei denen die Vorinkubationszeit von Inhibitor und P RNA variiert wurde, für alle vier 14mer-Analoga berechnen (4.2.4.3).

4.2.4.1 K_D -Werte

Unter der Bedingung $[Inhibitor] \gg [P\ RNA]$ beschreibt der K_D -Wert die Inhibitorkonzentration, bei der sich 50 % der P RNA-Moleküle im Komplex mit einem Inhibitor-Molekül befinden. Der K_i -Wert gibt die Konzentration des Inhibitors an, bei der das Enzym genau zu 50 % gehemmt ist. Unter der Voraussetzung, dass 50 % Hemmung darauf zurückzuführen sind, dass sich 50 % der P RNA-Moleküle im Komplex mit dem Inhibitor befinden, sollten K_D - und K_i -Wert übereinstimmen.

Der K_D -Wert des DNA-14mers betrug mit 2,6 nM ungefähr das vierfache des K_D -Wertes des RNA-14mers mit (0,7 nM; Tab. 3.1). Während für das RNA-14mer K_i - und K_D -Wert ungefähr übereinstimmten, war der K_i -Wert des DNA-14mers zehnmal höher als der K_D -Wert. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche Temperatur sein, bei der die beiden Konstanten bestimmt wurden. So wurde der K_i -Wert bei 37 °C und der K_D -Wert bei Raumtemperatur gemessen (Gruegelsiepe 2003). Zudem besteht die Möglichkeit, dass das DNA-14mer

während des Prozessierungsassays signifikant dissoziiert und von einem ptRNA-Substrat verdrängt wird, was zu einer Erhöhung des K_i -Wertes führen würde.

Tab. 4.2: Kinetische Daten der 14mer-Analoga

[∞] Dissoziationsrate, mittels Verdünnungsexperiment bestimmt (3.5.3); [∞] Bestimmung der Dissoziationsrate durch Konkurrenzexperiment (3.5.3), * Assoziationsrate berechnet aus K_D und k_{off} nach $K_D = k_{off}/k_{on}$; # aus Vorinkubationskinetiken ermittelte Assoziationsraten (3.5.3); die kinetischen Parameter wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten abgeleitet; n.u., nicht untersucht.

	K_i [nM]	K_D [nM]	k_{off}^{∞} [h ⁻¹]	k_{off}^{∞} [h ⁻¹]	k_{on}^* [M ⁻¹ s ⁻¹]	$k_{on}^{\#}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]
RNA-14mer	2,2 ± 0,6	0,7 ± 0,2	0,016 ± 0,01	n.u.	0,63*10 ⁴	(6,8 ± 2,0)*10 ⁴
DNA-14mer	25 ± 5	2,6 ± 0,4	0,22 ± 0,07	0,27 ± 0,07	2,3*10 ⁴	(2,3 ± 0,7)*10 ⁴
LNA-14mer	3,9 ± 2,5	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	(8,6 ± 4,5)*10 ⁴
PNA-14mer	12,5 ± 2,5	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	(2,2 ± 0,5)*10 ⁵

4.2.4.2 Dissoziationskinetik

Dissoziationsraten wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden ermittelt. Inhibitor und RNase P RNA wurden bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert und der Ansatz entweder mit Puffer 1: 20 verdünnt (Verdünnungsexperiment), oder ein Überschuss an nicht radioaktiv markiertem Inhibitor hinzugefügt (Konkurrenzexperiment). Die Einstellung des jeweils neuen Gleichgewichts wurde durch Auftrennen von Inhibitor und Komplex auf einem Gelfiltrationssäulchen und Vermessen von Eluat und Säule verfolgt. Mit der Konkurrenzmethode wurde für das RNA-14mer eine Dissoziationsrate (k_{off}) von 0,016 h⁻¹ und für das DNA-14mer von 0,22 h⁻¹ gemessen (Tab. 4.2, Abb. 4.12). Daraus wurde anhand des ermittelten K_D -Wertes die Assoziationsrate berechnet, die sich für das RNA-14mer als $k_{on} = 0,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für das DNA-14mer als $k_{on} = 2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ergab. Für das DNA-14mer wurden mit beiden Methoden fast identische k_{off} -Werte von 0,22 und 0,27 h⁻¹ bestimmt (Tab. 4.2). Die Dissoziation des RNA-14mers verlief sehr langsam (10 % in sechs Stunden), wodurch eine exakte Messung deutlich erschwert wurde, wie auch an dem hohen Fehler zu erkennen ist. Deswegen konnte der k_{off} -Wert in diesem Fall nur mit der Konkurrenzmethode und nicht mit der Verdünnungsmethode ermittelt werden.

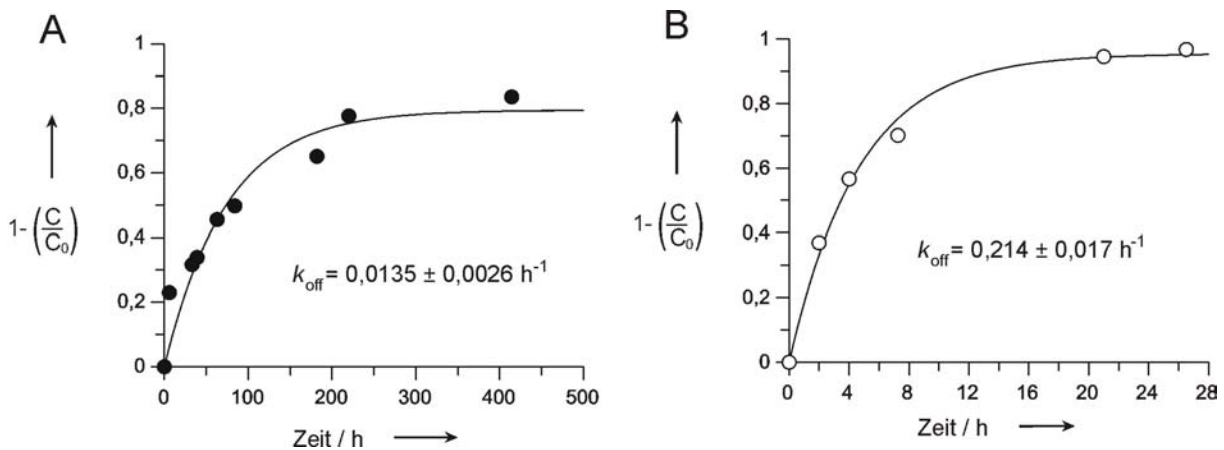


Abb. 4.12: Bestimmung der Dissoziationsrate von *E. coli*-P RNA und RNA-14mer bzw. DNA-14mer nach der Kompetitionsmethode

Die Teilabbildungen repräsentieren je eines von mehreren Einzelexperimenten für das RNA-14mer (A) und das DNA-14mer (B). Die Abnahme des radioaktiv markierten AS-ON im Komplex nach Zugabe des Überschusses an unmarkiertem Oligonukleotid ist als Funktion der Zeit dargestellt. Die Daten wurden mit einer Gleichung erster Ordnung bearbeitet und ergaben so die oben aufgeführten k_{off} -Werte. C_0 , die maximale Komplexkonzentration zum Zeitpunkt Null, wurde dabei um die Menge an Oligonukleotid korrigiert, die in Ansätzen ohne P RNA nicht von der Säule zurückgehalten wurde; C entspricht der durch Szintillationsmessung bestimmten Komplexkonzentration aus radioaktivem AS-ON und P RNA zum Zeitpunkt der Einzelexperimenten.

4.2.4.3 Assoziationskinetik

Assoziationsraten der Bindung der 14mer-Oligomere an die P RNA von *E. coli* wurden über die Inaktivierung des Ribozyms bestimmt, wobei die Vorinkubationszeit des Inhibitors und der P RNA von 0 bis 40 min variiert wurde. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit linear von der freien P RNA-Konzentration abhängig war. Dazu wurde die P RNA-Konzentration von 1 bis 10 nM variiert und die Umsatzgeschwindigkeit bei 100 und 500 nM ptRNA gemessen (Abb. 4.13 A und B). Der Unterschied von ungefähr 10 fmol/ min, der sich zwischen den beiden Substratkonzentrationen bei den Kurven der 5 und 10 min-Werte ergab, kann damit begründet werden, dass geringe Abweichungen in der Umsatzgeschwindigkeit bei 500 nM Substrat stärker in den Endwert eingehen als bei 100 nM Substrat. So erklären sich auch die relativ hohen Fehlerbalken der 10 min-Kurve bei 500 nM ptRNA.

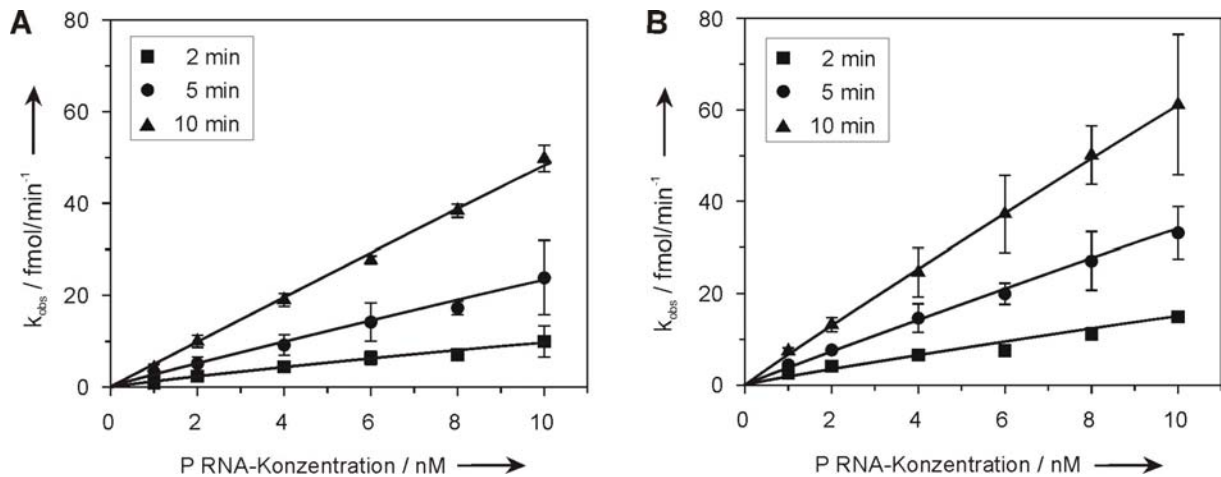


Abb. 4.13: Lineare Abhängigkeit des Substratumsatzes von der *E. coli*-P RNA-Konzentration

Die Datenpunkte stellen Mittelwerte dar, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten berechnet wurden, die Fehlerbalken waren teilweise so gering, dass sie nicht über die verwendeten Symbole hinausragten; k_{obs} , beobachtete Umsatzgeschwindigkeit. **A:** Assaykonzentration der $\text{ptRNA}^{\text{Gly}}$: 100 nM, **B:** Assaykonzentration der $\text{ptRNA}^{\text{Gly}}$: 500 nM

Die lineare Abhängigkeit des Substratumsatzes von der P RNA-Konzentration ermöglichte es, den Anteil an freier P RNA nach einer bestimmten Vorinkubationszeit von Enzym und Inhibitor aus der Umsatzgeschwindigkeit abzulesen und so auf den Anteil an Enzym-Inhibitor-Komplex zu schließen. Zu diesem Zweck wurde das Ribozym (10 nM) für unterschiedliche Zeitintervalle mit einem 10-fachen Überschuss an Inhibitor präinkubiert, anschließend die Prozessierungsreaktion durch Zugabe von ptRNA -Substrat (100 or 500 nM) gestartet und nach 2 min gestoppt. Die kurze Prozessierungszeit von 2 min wurde gewählt, um die initiale lineare Phase der Reaktion zu erfassen und um mögliche Inhibitor-Assoziationsereignisse während der Prozessierungsphase zu minimieren, was zu einer Überschätzung der Assoziationsrate hätte führen können. Mögliche Inhibitor-Dissoziationsereignisse während der 2-minütigen Prozessierungsphase konnten aufgrund der geringen Dissoziationsraten der Inhibitoren (Tab. 4.2) als vernachlässigbar betrachtet werden. Aus der Auftragung von $1-k_{\text{rel}}$ über der Vorinkubationszeit konnte mit einer Gleichung erster Ordnung die Assoziationsrate berechnet werden (Abb. 4.14), k_{rel} repräsentierte dabei das Verhältnis der Prozessierungsraten in An- versus Abwesenheit des Inhibitors. Zuerst wurde die Methode für das LNA-14mer bei beiden Substratkonzentrationen (100 und 500 nM ptRNA) angewandt, wobei die Assoziationskurven praktisch identisch waren (Abb. 4.14 A). Das Ergebnis bestätigte, dass keine signifikante Inhibitorassoziation während der Prozessierungsphase stattfand. Ansonsten hätte man Unterschiede zwischen den bei 100 und 500 nM erhaltenen Daten erwartet, da 500 nM Substrat den Zugang des Inhibitors zur CCA-Bindungsstelle effektiver hemmen sollten als 100 nM. Für die übrigen 14mer-Inhibitoren wurden ebenfalls Assoziationskurven bei beiden Substratkonzentrationen ermittelt und die mittlere Assoziationsrate aus mindestens drei unabhängigen Experimenten berechnet (Tab. 4.2). Für die PNA-, RNA- und DNA-Inhibitoren sind in Abb. 4.14 B die

Assoziationskurven je eines Beispielerperiments bei 100 nM Substratkonzentration dargestellt.

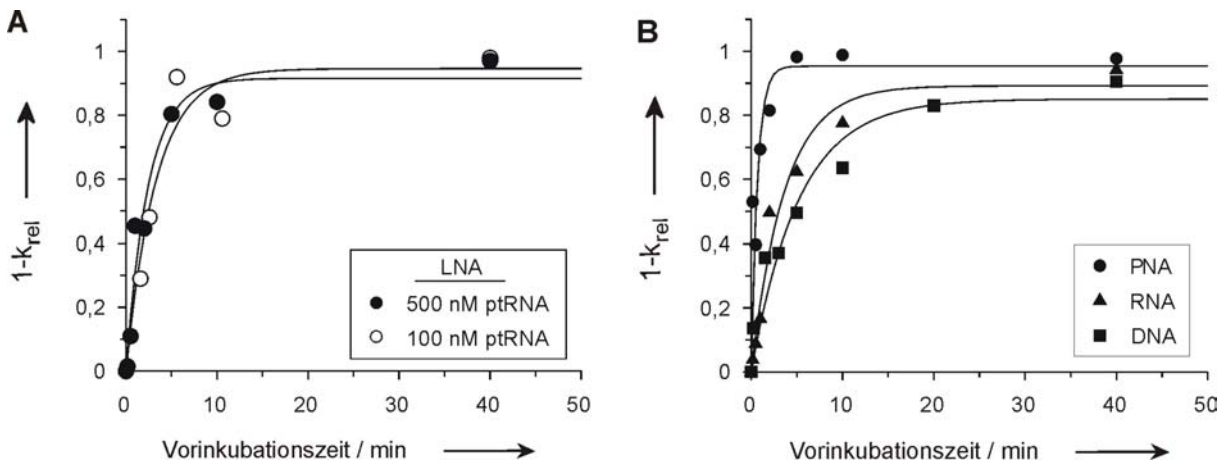


Abb. 4.14: Bestimmung der Assoziationsraten für das DNA-, RNA-, LNA- und PNA-14mer

A: Assoziationskurven des LNA-14mers bei 100 und 500 nM $\text{ptRNA}^{\text{Gly}}$; k_{rel} beschreibt den Quotienten der Umsatzgeschwindigkeiten in Gegenwart (100 nM) versus Abwesenheit des Inhibitors; $1-k_{\text{rel}}$ spiegelt die Zunahme des *E. coli*-P RNA-AS-ON-Komplexes wider; **B:** Assoziationskurven für das PNA-, RNA- und DNA-14mer; dargestellt ist jeweils eine Beispielkurve. Die LNA-Kurve ist in dieser Teilabbildung nicht enthalten, da sie zwischen der PNA- und der RNA-14mer Kurve verläuft und dadurch die Übersichtlichkeit der Darstellung beeinträchtigt worden wäre.

Bezüglich der Assoziationsraten ergab sich die gleiche Rangfolge wie in dem Vorexperiment zur Variation der Vorinkubationszeit (Abb. 4.11). Die schnellste Assoziation zeigte das PNA-14mer mit einem k_{on} von $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, gefolgt von dem LNA-14mer mit $8,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dem RNA-14mer mit $6,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und dem DNA-14mer mit $2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tab. 4.2).

4.2.4.4 Vergleich der Assoziations- und Dissoziationsdaten

Die Unterschiede zwischen den mit verschiedenen Methoden ermittelten Assoziationsraten können auf die unterschiedlich gute Eignung der Methoden für diese Problemstellung zurückgeführt werden. Für AS-ON mit einer langsamen Dissoziationskinetik scheint die Verdünnungsmethode nicht gut geeignet zu sein, da für das RNA-14mer kein zuverlässiger k_{off} -Wert bestimmt werden konnte. Die Dissoziation war mit 10 % in sechs Stunden zu langsam. Die Kompetitionsmethode lieferte zwar einen Wert für die Dissoziationsrate, allerdings war dieser mit einem großen Fehler (60 %) behaftet (Tab. 4.2). Bei der k_{on} -Bestimmung für das RNA-14mer mittels Vorinkubationskinetiken wurde eine Assoziationsrate gemessen, die 10-mal höher war als jene, die aus k_{off} und K_{D} -Wert abgeleitet wurde (Tab. 4.2). Die auf Vorinkubationskinetiken basierende Methode scheint aufgrund der geringeren Schwankungen in den Einzelwerten und dem daraus resultierenden kleineren Fehler ($\pm 30 \%$) die geeignetere Methode für die Bestimmung der Assoziationsrate zu sein. Dass jedoch prinzipiell die Bestimmung der Assoziationsrate mit allen drei Methoden

möglich ist, zeigen die Daten des DNA-14mers. Hier konnten mit jeder Methode nahezu identische Werte mit relativ geringen Fehlern ermittelt werden (Tab. 4.2).

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Assoziationsraten liegen in der gleichen Größenordnung wie bereits veröffentlichte Daten zu RNA- und PNA-Oligomeren sowie 2'-O-Methyloligoribonukleotid/LNA-Mixmeren (mit einem endständigen 2'-O-Methyl-Ribonukleotid), die ebenfalls bei mittleren Salzkonzentrationen gemessen wurden (Eckardt 1997, Arzumanov 2001). In den beiden genannten Studien wurde HIV als *target* verwendet. Während Eckardt et al. (1997) ein 69 Nukleotide langes Antisense-RNA-Oligonukleotid einsetzen, untersuchten Arzumanov et al. (2001) 12 Nukleotide lange 2'-O-Methyloligoribonukleotide, O-Methyloligoribonukleotid/LNA-Mixmere und PNA-Oligomere, die komplementär zu einer Sequenz in der TAR-RNA-Region von HIV waren und durch Inhibition der Bindung des Tat-Proteins die Transkription des kompletten HIV-Genoms verhindern. Sie blockieren die Tat-abhängige Transkription, wodurch die vollständige Transkription von HIV inhibiert wird. Arzumanov et al. (2001) testeten die verschiedenen Oligonukleotide in *in vitro*-Assays bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (eine niedrigere, eine mittlere Salzkonzentration und ein komplexer zusammengesetzter Puffer mittlerer Salzkonzentration). Dabei schwankten die kinetischen Daten des PNA-Inhibitors bei verschiedenen Salzkonzentrationen nur geringfügig, während deutliche Unterschiede bei dem 2'-O-Methyloligoribonukleotid/LNA-Mixmer gemessen wurden. Das Ergebnis zeigt, dass Daten von Studien mit nicht identischen Pufferbedingungen nur sehr begrenzt vergleichbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig direkt und unter gleichen Salzbedingungen die kinetischen und thermodynamischen Parameter von sequenzidentischen RNA-, DNA-, LNA- und PNA-Oligomeren bezüglich ihrer Bindung an eine stabile RNA gegenübergestellt. Insbesondere existierten bisher keine vergleichbaren Daten für ein komplett LNA-modifiziertes AS-ON.

Die für einige natürliche Systeme gemessenen Assoziationsraten in der Größenordnung von $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ liegen klar über denen künstlicher Systeme (Kolb 2000a, Eckardt 1997, Arzumanov 2001). In natürlichen Systemen sind Antisense-RNA und *target* durch Koevolution optimiert worden. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Schwierigkeit, AS-ON zu entwerfen, die zu natürlichen Systemen vergleichbare Assoziationsraten aufweisen. Die anfängliche Annahme, dass sich durch Modifikation der AS-ON sowohl die K_i -Werte als auch die Assoziationskinetik verbessern lassen, trifft bezüglich des 14mer-Inhibitors nur auf letztere zu. Die K_i -Werte des LNA- und PNA-14mers lagen in einem zum RNA-14mer vergleichbaren Konzentrationsbereich.

4.2.5 Fazit aus der biochemischen Charakterisierung der 14mer-Inhibitoren

Die Bleispaltungsdaten belegen, dass die 14mere in die gefaltete P RNA invadieren, die Helix P15 aufbrechen und mit der *target*-Region eine neue Hybridhelix ausbilden. In der Bakterienzelle können die AS-ON auf zwei Wegen wirken. Zum einen können sie sich bereits bei der Synthese an das *target*-Molekül anlagern, zum anderen in das Holoenzym invadieren. In beiden Fällen wird die Substratbindungsstelle blockiert und das Ribozym in einer inaktiven Form fixiert.

Aufgrund des kinetischen Vergleichs der 14mere liegt hier ein Datensatz vor, auf dessen Grundlage über die Eignung der Inhibitoren für *in vivo*-Experimente entschieden werden kann. Die Ergebnisse sind im Folgenden noch einmal vergleichend zusammengestellt:

K_i-Wert: Das RNA-14mer war mit einem K_i von 2,2 nM geringfügig effektiver als das LNA-Oligonukleotid, das einen dreifach niedrigeren K_i -Wert als das PNA-Oligonukleotid aufwies. Das DNA-14mer zeigte den höchsten Wert für die Inhibitionskonstante und somit die relativ geringste Wirksamkeit (Tab. 4.2).

Spezifität: Das PNA-14mer besitzt eine höhere Sequenzspezifität als das RNA-14mer und beide binden ihre *target*-Sequenz deutlich spezifischer als das LNA-14mer (Tab. 4.1). Für das DNA-14mer wurden aufgrund seiner geringeren Wirksamkeit keine Experimente bezüglich der Spezifität durchgeführt.

Assoziation: Das PNA-14mer assoziiert am schnellsten, gefolgt vom LNA-, RNA- und DNA-14mer (Tab. 4.2).

Nukleasestabilität: Die Nukleasestabilität ist bei dem RNA- und DNA-14mer sehr gering im Vergleich zum LNA- und PNA-Analogon (Larsen 1999, Wahlestedt 2000).

Kopplungschemie: Aufgrund des Peptidrückgrates können PNA-Oligomere einfacher mit invasiven Peptiden gekoppelt werden als z.B. DNA-, RNA- und LNA-Oligonukleotide, die über ein Zucker-Phosphat-Rückgrat verfügen.

Werden die oben aufgeführten Punkte berücksichtigt, so erscheint das PNA-Oligonukleotid am geeignetsten für einen *in vivo*-Einsatz in Bakterien, da die Vorteile einer schnellen Assoziation, hohen Spezifität und geeigneteren Kopplungschemie den Nachteil eines minimal schlechteren K_i -Wertes überwiegen.

4.3 PNA-Peptid-Konjugate

Eines der Hauptprobleme bei Antisense-Strategien ist das Einschleusen der AS-ON in die Zelle. Dies gilt insbesondere für Bakterien, da deren aus mehreren unterschiedlichen Schichten bestehende Zellbarriere eine sehr effektive Abgrenzung zur Umwelt darstellt (1.1.2). Das Einschleusen von AS-ON in Bakterien kann jedoch durch Verknüpfen mit sogenannten invasiven Peptiden erheblich verbessert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das synthetische Peptid KFFKFFKFFK verwendet, für das ein MIC-Wert von 21 bis 71 μM für *E. coli* gemessen wurde (MIC: minimal inhibitor concentration: Konzentration, die ein Wachstum gerade verhindert; Vaara 1996). Um den Einfluss des *linkers* auf die

Wirksamkeit des Inhibitors zu untersuchen, wurden PNA-Oligomer und Peptid mit einem in der PNA-Chemie üblichen *AEEA-linker* (PNA-AEEA-Peptid) sowie dem deutlich kürzeren und unpolaren *Glycin-linker* (PNA-G-Peptid) verknüpft (Egholm 1995, Abb. 4.15 A). Beide Konjugate wurden zunächst im *in vitro*-Inhibitionsassay evaluiert, um beurteilen zu können, ob *linker* oder Peptid die Invasion in die P RNA von *E. coli* stören. In den anschließenden *in vivo*-Experimenten wurden die PNA-Peptid-Konjugate nicht nur an dem *E. coli*-Wildtyp K12 sondern auch an dem Lipopolysaccharid (LPS)-defekten *E. coli*-Stamm AS19 getestet.

4.3.1 *in vitro*-Experimente mit PNA-Peptid-Konjugaten

Die PNA-Peptid-Konjugate wurden unter *multiple turnover*-Bedingungen nach einer 40-minütigen Vorinkubationszeit von Inhibitor und *E. coli*-P RNA sowie bei einer Assaykonzentration am K_i -Wert des PNA-14mers (12,5 nM) getestet (Abb. 4.15 B). Die *in vitro*-Inhibition des PNA-AEEA-Peptids lag um 20 % niedriger verglichen mit der Wirksamkeit des PNA-14mers, während die des PNA-G-Peptids um 30 % reduziert war. Die Inhibition aller drei PNA-Inhibitoren lag jedoch im gleichen Konzentrationsbereich, so dass der Einfluß von *linker* und Peptid als minimal eingeschätzt wurde.

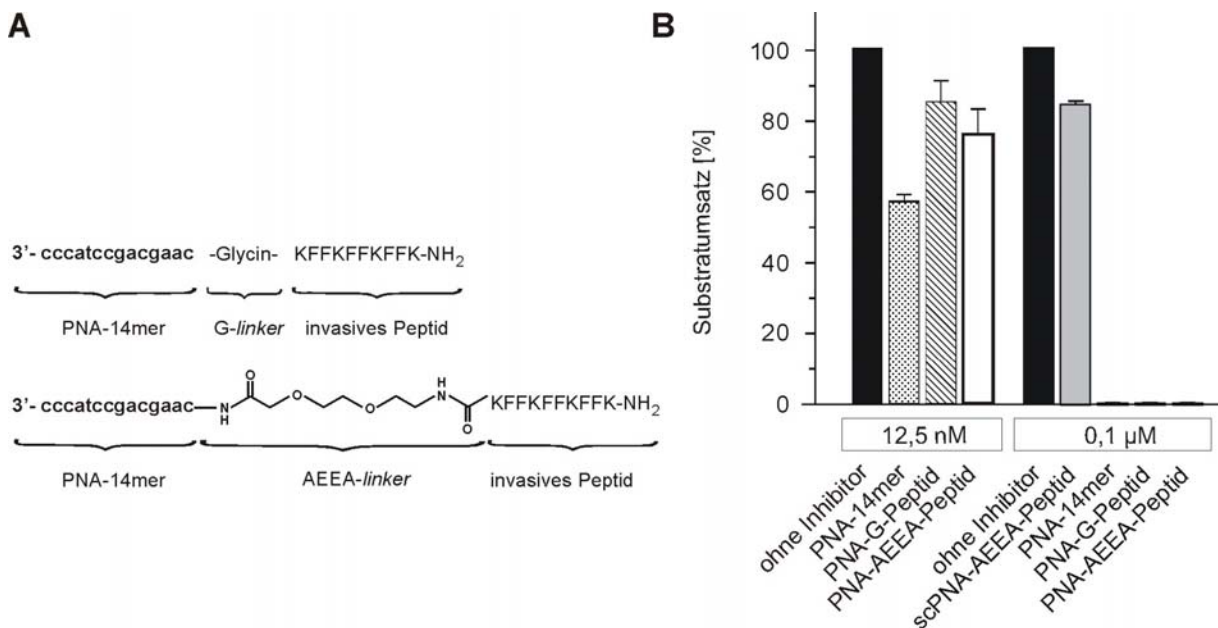


Abb. 4.15: PNA-Peptid-Konjugate zur Inhibition von *E. coli*-P RNA

A: Struktur des PNA-G-Peptids und des PNA-AEEA-Peptids, **B:** Test der PNA-Peptid-Konjugate in dem *in vitro*-Inhibitionsassay mit 40 min Vorinkubationszeit von Inhibitor und *E. coli*-P RNA; sc (scrambled), Kontroll-PNA-Peptid-Konjugat mit einem PNA-Oligomer gleicher Basenkomposition aber zufälliger Sequenz.

Als Kontrolle wurde an Stelle des PNA-14mers ein 14 Basen langes PNA-Oligomer zufälliger Sequenz über einen *AEEA-linker* mit dem invasiven Peptid KFFKFFKFFK verknüpft (scPNA-AEEA-Peptid) und bei 100 nM Assaykonzentration vergleichend mit den beiden anderen PNA-Peptid-Konjugaten getestet (Abb. 4.15 B). Die P RNA von *E. coli* wurde unter diesen Bedingungen von dem PNA-14mer, dem PNA-G-Peptid und dem PNA-AEEA-Peptid

vollständig inhibiert, während die Prozessierung durch das scPNA-AEEA-Peptid nur sehr geringfügig inhibiert wurde. Die PNA-Peptid-Konjugate zeigen also eine eindeutig spezifische Inhibition.

4.3.2 *in vivo*-Inhibition der RNase P RNA von *E. coli*

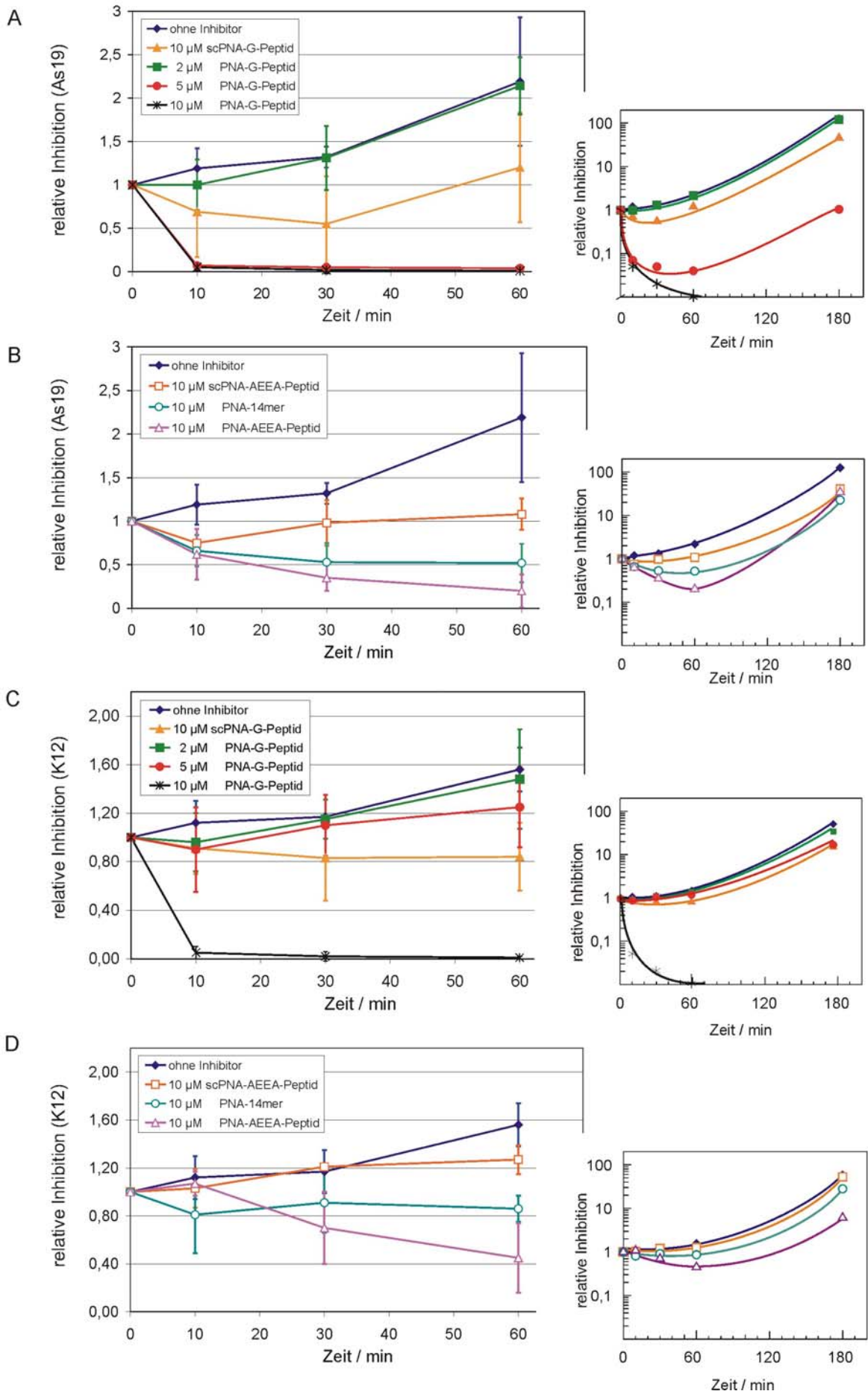
Es wurde das Wachstum des LPS-defekten *E. coli*-Stamms AS19 und des Wildtyps K12 in Gegenwart der *in vitro* getesteten PNA-Peptid-Konjugate bei verschiedenen Assaykonzentrationen verfolgt. Auf diese Weise sollte neben der relativen Wirksamkeit der einzelnen Verbindungen auch der Einfluss der Zellbarriere untersucht werden.

Dazu wurde die Anzahl der koloniebildenden *E. coli*-Zellen nach Zugabe der PNA-Inhibitoren und einer Inkubationszeit von 0, 10, 30, 60 und 180 min bestimmt. Die *in vivo*-Inhibitionsversuche zeigten, dass das Wachstum des LPS-defekten *E. coli*-Stamms AS19 generell stärker durch die PNA-Peptid-Konstrukte beeinflusst werden konnte als das des Wildtyps K12 (Abb. 4.16).

Eine Assaykonzentration von 10 μM des PNA-G-Peptids führte im Fall des AS19-Stamms bereits nach 10 min zu einer nahezu vollständigen Hemmung des Bakterienwachstums. Spätestens nach einer Inkubationszeit von 180 min wurden bei dem 10 μM -Ansatz überhaupt keine oder nur sehr wenige Kolonien des Stamms AS19 gefunden. Bei der Inhibitorkonzentration von 5 μM wurden bei einem der vier durchgeführten Versuche keine Kolonien, bei zweien sehr wenige und bei einem ein deutliches Wachstum beobachtet. Dagegen konnten sich die Zellen in Gegenwart von 2 μM Inhibitor genauso gut vermehren wie in dem Kontrollexperiment ohne Inhibitor (Abb. 4.16 A).

Abb. 4.16: Effekte der PNA-Peptid-Konjugate auf das Wachstum des LPS-defekten *E. coli*-Stamms AS19 sowie des Wildtyps K12

Nach einer Inkubationszeit von 0, 10, 30, 60 und 180 min in 10 % LB-Medium in Gegenwart der PNA-Inhibitoren wurde die Zahl der überlebenden *E. coli*-Zellen durch Ausstreichen auf LB-Agarplatten bestimmt. Die 0 bis 60 min-Werte sind im linken größeren Graphen und die Gesamtkurven inklusive der 180 min-Werte in den kleinen rechten Graphen (halblogarithmisch) dargestellt. Die relative Inhibition ergibt sich aus dem Verhältnis der Kolonienzahl in Experimenten mit zu der Kolonienzahl in Experimenten ohne Inhibitor. **A:** Koloniebildung von AS19-Zellen nach Inkubation mit 10 μM scPNA-G-Peptid, 2, 5 oder 10 μM PNA-G-Peptid bzw. in Abwesenheit eines Inhibitors; **B:** Koloniebildung von AS19-Zellen nach Inkubation mit 10 μM scPNA-AEEA-Peptid, 10 μM PNA-14mer, 10 μM PNA-AEEA-Peptid bzw. in Abwesenheit eines Inhibitors; **C:** Koloniebildung von K12-Zellen nach Inkubation mit 10 μM scPNA-G-Peptid, 2, 5 oder 10 μM PNA-G-Peptid bzw. ohne Inhibitor; **D:** Koloniebildung von K12-Zellen nach Inkubation mit 10 μM scPNA-AEEA-Peptid, 10 μM PNA-14mer, 10 μM PNA-AEEA-Peptid bzw. in Abwesenheit eines Inhibitors.



Die Inhibition durch Inkubation der Zellen mit 10 μM des PNA-AEEA-Peptids war deutlich schwächer als die für das PNA-G-Peptid gemessene (Abb. 4.16 A und B). So wurde auch nach weiteren zwei Stunden Inkubation mit dem PNA-AEEA-Peptid (180 min-Wert) wieder eine Zunahme der Kolonienzahl vergleichbar zu dem Ansatz mit der *scrambled*-Kontrolle beobachtet. Im Medium mit 10 μM PNA-14mer war das Wachstum der AS19-Zellen ebenfalls nur in den ersten 60 Minuten gehemmt (Abb. 4.16 B) und nahm nach 180 min wieder deutlich zu. Der *linker* hatte also bei AS19 einen Einfluß auf die Inhibitionseffizienz, da das Konjugat mit dem Glycin-*linker* verglichen mit dem AEEA-*linker*-Konjugat das höhere Inhibitionspotential aufwies.

Als Kontrolle wurde die *scrambled*-Version mit AEEA- (scPNA-AEEA-Peptid) bzw. Glycin-*linker* (scPNA-G-Peptid) angeboten. Beide Konjugate zeigten bei einer Konzentration von 10 μM einen gewissen Inhibitionseffekt (Abb. 4.16 A und B), der auf beginnende toxische Nebeneffekte der PNA-Peptid-Inhibitoren bei dieser Konzentration hindeutet.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Inhibition des Stamms K12 sind qualitativ ähnlich zu denen des Stamms AS19, wobei das Wachstum von K12 generell weniger durch die PNA-Peptid-Konjugate beeinflusst werden konnte (Abb. 4.16 A, B versus C, D). So kommt es erst bei 10 μM PNA-G-Peptid, jedoch noch nicht bei 5 μM zu einer nennenswerten Hemmung der Zellvermehrung des *E. coli*-Wildtyps (Abb. 4.16 C). Bezüglich der *scrambled*-Kontrollen wurde nur für das scPNA-G-Peptid (10 μM) ein geringer aber signifikanter Hemmeffekt gemessen (Abb. 4.16 C und D). Im Fall des PNA-AEEA-Peptids (10 μM) konnte nach einer Stunde ein Rückgang der Zellzahl auf 40 % beobachtet werden (Abb. 4.16 D), nach längerer Inkubation (180 min) nahm die Kolonienzahl jedoch wieder zu. Wie im Fall der AS19-Mutante wurde auch bei dem *E. coli*-Wildtyp ein Beitrag des *linkers* zum Inhibitionspotential gefunden. So konnten bei einer Konzentration von 10 μM PNA-G-Peptid im Gegensatz zu den Experimenten mit AEEA-*linker*-Konstrukt spätestens nach 180 min keine Kolonien mehr auf der LB-Platte nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Fall des LPS-defekten Stamms AS19 das Zellwachstum durch Inkubation der Zellen mit 5 und 10 μM des PNA-G-Peptids weitgehend bzw. vollständig inhibiert wurde, während 10 μM des PNA-AEEA-Peptids keine vollständige Hemmung bewirkten und die restlichen PNA-Konstrukte das Wachstum (fast) nicht beeinflussten. Im Fall des K12-Stamms wurde bei 5 μM des PNA-G-Peptids noch keine nennenswerte Hemmung der Koloniebildung erreicht. Das PNA-AEEA-Peptid (10 μM) und insbesondere die anderen Kontrollkonstrukte beeinflussen das Wachstum, wenn überhaupt, in nur geringem Maße.

Da angenommen werden kann, dass sich das PNA-G-Peptid, ebenso wie für das PNA-14mer in Bleispaltungsexperimenten nachgewiesen, an die RNase P RNA anlagert, ist vorstellbar, dass die Hemmung der ptRNA-Prozessierung letztendlich zum Zelltod führt. Somit hätte eine Inhibitorkonzentration von 10 μM auf beide Stämme eine bakteriozide Wirkung.

Bei beiden Stämmen fällt die schnelle Hemmwirkung des PNA-G-Peptids auf, die bereits nach einer Inkubationszeit von 10 min fast vollständig ist (Abb. 4.16 A und C). Die Unterschiede in der Wirkung der PNA-Peptid-Konstrukte auf den Wildtyp und den LPS-defekten Stamm AS19 machen deutlich, dass die Zellbarriere durch das Anhängen invasiver Peptide zwar passierbarer wird, aber nach wie vor ein Hindernis darstellt. Andererseits erscheint die Hemmung des K12-Stamms im Vergleich zur AS19-Mutante jedoch effizienter als auf der Grundlage vorhergehender Studien (Good 2000, Good 2001) zu erwarten gewesen wäre.

4.3.3 Fazit aus den Experimenten mit PNA-Peptid-Konjugaten

Auch in anderen Antisense-Studien konnte durch den Einsatz membranpermeabilisierender Moleküle die wirksame Konzentration der AS-ON deutlich verringert werden (Geller 2003, Good 2001, Eriksson 2002). So waren Geller et al. erst durch das Anhängen eines invasiven Peptids in der Lage, Phosphodiimidat-Morpholino-Oligonukleotide nicht nur in einen permeablen *E. coli*-Stamm sondern auch in den Wildtyp einzuschleusen (Geller 2003). Durch die Kopplung des invasiven Peptids KFFKFFKFFK an ein PNA-Oligomer konnte der IC_{50} -Wert für die Hemmung der β -Galaktosidase (*lacZ*)-Aktivität um bis zu 18-fach verbessert werden (Good 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Experimente mit dem von Good et al. benutzten anti- β -Galaktosidase PNA-Peptid-Konjugat (Nr. 1900 in Good 2001) durchgeführt, um die eigenen Daten in Relation zu den Literaturdaten setzen zu können. Dabei wurde eine zehnmal höhere Inhibitionskonstante als die von Good et al. veröffentlichte bestimmt (Daten nicht dargestellt). Diese Diskrepanzen lassen sich möglicherweise durch nicht vollständig identische Versuchsbedingungen erklären.

Neben invasiven Peptiden wurde versucht, die Zellbarriere durch simultane Gabe von subtoxischen Antibiotikakonzentrationen für AS-ON passierbarer zu machen (Rapaport 1996). Ebenso wurden Antibiotika kovalent mit AS-ON verknüpft oder es sollte die Aufnahme durch Nukleotidmodifikationen der AS-ON verbessert werden (Rapaport 1996, Harth 2000, Harth 2002). Vergleicht man die unterschiedlichen Strategien zur Verbesserung der Zellgängigkeit von AS-ON, so war der Effekt der Kombination von AS-ON und Antibiotika additiv, während er bei der Kombination mit invasiven Peptiden synergistisch war.

Zudem wurde bei der Inhibition der β -Galaktosidase mit PNA-Peptid-Konstrukten in *E. coli* festgestellt, dass der AEEA-*linker* erfolgreicher als ein zweiter getesteter *linker* (*smcc-linker*) war (Good 2001). Geller et al. untersuchten, ebenfalls in *E. coli*, die Inhibition der Luziferase-mRNA durch ein PNA-Peptid mit stabilem *linker* im Vergleich zu einem äquivalenten Konjugat mit einem *linker*, der im reduzierenden Umfeld des Cytoplasmas abgespalten wird (Geller 2003). Das PNA-Peptid mit dem spaltbaren *linker* war das wirksamere. Mit dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Glycin-*linker* konnte ein vollständig neuer *linker* gefunden werden, der zumindest bezüglich der P RNA-Inhibition in *E. coli* deutlich effektiver als der schon bekannte AEEA-*linker* war.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten legen nahe, dass sich der Oligomer-Transport in die Zelle durch das invasive Peptid beschleunigt, da 10 min nach Zugabe der PNA-14mer-Peptide die *E. coli*-Zellen nahezu vollständig inhibiert waren. Die hier gefundenen Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit denen von Eriksson et al., die feststellten, dass die dort eingesetzten PNA-Peptide weit weniger als 10 min benötigen, um die Zellbarriere von *E. coli* zu überwinden (Eriksson 2002).

Für die Hemmung essentieller *targets* scheinen höhere AS-ON Konzentrationen notwendig zu sein als für die nicht essentieller *targets*. Hier muß die Inhibition möglichst vollständig sein, um zu einem kompletten Arrest des Zellwachstums bzw. zum Zelltod zu führen. Außerdem wird die Inhibition essentieller Genprodukte (wie z.B. RNase P RNA) indirekt über das Zellwachstum bestimmt, während bei einem nicht essentiellen *target* (wie z. B. der β -Galaktosidase) die Wirkung direkt durch Bestimmung der Enzymaktivität gemessen wird. Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass eine Halbierung der Enzymaktivität einer Halbierung der Koloniezahlen im Fall essentieller Genprodukte entspricht. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung konnte in *E. coli* die halbmaximale Hemmung eines Reporterenzym (β -Galaktosidase) bei einer 4-mal niedrigeren Konzentration erreicht werden als die Wachstumshemmung durch entsprechende Anti-ACP (Acyl-Carrier-Protein)-PNA-Peptide (Good 2001). Bei ähnlichen Experimenten mit *S. aureus* wurden vergleichend ein plasmidales und ein essentielles Gen als *target* gewählt. Hier betrug der Faktor sogar 13 (Nekhotiaeva 2004).

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit für den Modell-Organismus *E. coli* erarbeiteten Daten zeigen, dass RNase P ein vielversprechendes *target* für AS-ON-basierte Strategien als Alternative zu Antibiotikatherapien darstellt. Auf dem weiten Weg zu einer Anwendung müsste sicher zuerst die wirksame Konzentration gesenkt werden. AS-ON sind, zumal mit einem angehängten Peptid, im Vergleich zu herkömmlichen Antibiotika relativ große Moleküle, was sich in der einzusetzenden Dosis widerspiegelt. So entspricht eine Konzentration von 10 μ M 53 μ g/ml.

Es bieten sich verschiedene Optimierungsmöglichkeiten an. Unter anderem liegt es nahe, die Assoziationskinetik durch den Einsatz von kürzeren AS-ON zu verbessern. Speziell bei dem LNA-Oligomer würde dadurch auch die Spezifität erhöht werden können. Der Einsatz von LNA/DNA-Mixmeren kann ebenfalls eine interessante Alternative darstellen, da bei dem richtigen Verhältnis von LNA- zu DNA-Nukleotiden und geschickter Positionierung der LNA-Bausteine die Spezifität gesteigert werden kann, ohne zu große Einbußen bei der Affinität hinnehmen zu müssen.

Einen weiteren Ansatzpunkt bietet die Auswahl sowohl des invasiven Peptids als auch des *linkers*. Ebenso vorstellbar ist ein *linker*, der sich im leicht sauren Milieu des Cytoplasmas abspaltet, den Inhibitor freisetzt und so zu einer höheren Wirksamkeit führt (Geller 2003). LNA-modifizierte Inhibitoren können ebenfalls an Peptide gekoppelt werden, wobei allerdings die Ausbeuten bei dieser Art von Synthese deutlich geringer ausfallen (Chen 2003).

Die Inhibition von P RNAs des Typs B ist bis jetzt nur mit haarnadelförmigen AS-ON komplementär zur CCA-Bindungsregion versucht worden. Es ist sicher eine interessante Option, die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Inhibition der Typ A-P RNA auf Typ B-P RNAs zu übertragen. Auch hier könnte der Einsatz einzelsträngiger AS-ON und ein Screening verschiedener Regionen zur Identifizierung effektiver Inhibitoren führen.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro*- und *in vivo*-Inhibition bakterieller RNase P mit Antisense-Oligonukleotiden (AS-ON). RNase P ist ein essentielles Ribonukleoproteinenzym, das in allen drei Reichen des Lebens für die Reifung der ptRNAs zuständig ist. Für die Inhibitionsversuche wurde je eine RNase P RNA des Strukturtyps A und B ausgewählt. Als Vertreter des Strukturtyps A wurde die RNase P RNA von *Escherichia coli* verwendet, die generell das Modellsystem für Typ A-RNase P RNAs darstellt. Die RNase P RNA des Schweine-pathogenen Bakteriums *Mycoplasma hyopneumoniae* repräsentierte den Strukturtyp B. Bei beiden Strukturtypen bindet das Substrat an die sogenannte CCA-Bindungsstelle in der P15-Schleife der RNA-Untereinheit als Voraussetzung für eine effiziente Abspaltung der 5'-Flanke der ptRNA. Die CCA-Bindungsstelle ist für die ptRNA-Reifung also von zentraler Bedeutung und sie ist gut zugänglich, da sie an der Oberfläche des Holoenzym liegt. Die Sequenzen in der Nähe der CCA-Bindungsstelle sind bei verschiedenen Bakterienstämmen nicht hoch konserviert, was die Möglichkeit bietet, AS-ON spezifisch für einen Bakterienstamm oder eine Subgruppe von Bakterien zu konzipieren. Außerdem ist in eukaryontischen P RNAs keine CCA-Bindungsstelle bekannt. Dies alles macht die CCA-Bindungsstelle zu einem interessanten *target* für Antisense-Strategien zur Bekämpfung pathogener Bakterien.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren haarnadelförmige RNA-AS-ON der teilweise komplementär zur CCA-Bindungsregion der *E. coli* RNase P RNA, die in Anlehnung an ein in *E. coli* natürlich vorkommendes Antisense-Prinzip entworfen worden waren. Der Versuch, die Strategie der haarnadelförmigen AS-ON auf die Typ B-RNase P RNA von *Mycoplasma hyopneumoniae* zu übertragen, schlug fehl. Untersuchungen zum Wirkmechanismus der AS-ON auf die *E. coli*-RNase P RNA zeigten, dass ein einzelsträngiges RNA-AS-ON (RNA-15mer), das nur aus jenem Teil des haarnadelförmigen Vorgänger-Inhibitors bestand, der komplementär zur CCA-Bindungsstelle war, ein deutlich höheres Inhibitionspotential aufwies. Im weiteren Verlauf wurde das RNA-15mer als Ausgangspunkt für Optimierungen der *E. coli*-spezifischen Inhibitoren gewählt. Veränderungen in der Länge der Oligonukleotide führten zu dem sogenannten RNA-14mer, das mit einem K_i -Wert von 2,2 nM den effektivsten Inhibitor darstellte.

Da die AS-ON langfristig *in vivo* eingesetzt werden sollten, wurde im zweiten Teil der Arbeit das Inhibitionspotential Nuklease-stabilisierter Analoga des RNA-14mers untersucht. Für das LNA-14mer (Locked Nucleic Acid) konnte ein vergleichbarer K_i -Wert wie für das RNA-14mer gefunden werden, dagegen lag der K_i -Wert der PNA-Variante (Peptide Nucleic Acid) mit 12,5 nM eindeutig darüber. Das DNA-14mer war bei weitem der schlechteste Inhibitor.

Um die Spezifität der 14mere zu adressieren, wurden sie an anderen bakteriellen RNase P RNAs getestet, die sich in ihrer Sequenz im Bereich der P15-Region geringfügig von der *E. coli*-RNase P RNA unterscheiden. Dabei stellte sich heraus, dass die PNA-Variante

spezifischer als das RNA-14mer und beide deutlich spezifischer als das LNA-14mer waren. Eine Untersuchung des Assoziationsverhaltens der vier sequenzgleichen 14mere ergab die höchste Assoziationsrate für das PNA-Analogon, gefolgt von der LNA-, RNA- und DNA-Variante.

In Bleispaltungsversuchen konnte der Nachweis geführt werden, dass die Inhibition tatsächlich über einen Antisense-Mechanismus abläuft. So wurde für alle vier 14mere die Invasion in die *E. coli*-P RNA gezeigt, bei der die Helix P15 aufgebrochen wird und es zur Bildung einer Hybridhelix über die gesamte Länge des 14mer-Inhibitors kommt. Die hier vorgestellten Daten legen in Zusammenhang mit Daten anderer Autoren nahe, dass nicht nur die Substratbindungsstelle des Ribozyms blockiert wird, sondern die RNase P RNA in einer inaktiven Konformation fixiert wird.

Aufgrund seiner hohen Assoziationsrate sowie guten Affinität und Spezifität wurde das PNA-Oligomer für die *in vivo*-Versuche ausgewählt. Die genannten Vorteile überwogen dabei den Nachteil eines geringfügig höheren K_i -Wertes. PNA-Oligomere können auf Grund der gleichen Kopplungschemie unproblematisch mit invasiven Peptiden verknüpft werden, die die Durchlässigkeit der bakteriellen Zellhüllen für AS-ON verbessern.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die PNA-Variante an zwei verschiedenen *E. coli*-Stämmen, dem Wildtyp K12 und dem LPS-defekten Stamm AS19, auf ihr *in vivo*-Inhibitionspotential untersucht. Das PNA-14mer wurde mit zwei verschiedenen *linker*-Varianten, dem unpolaren und kürzeren Glycin und dem polaren und längeren AEEA-*linker*, an das invasive Peptid KFFKFFKFFK gekoppelt. Die PNA-Peptid-Konjugate wurden zunächst *in vitro* auf ihre Fähigkeit zur Inhibition der RNase P RNA von *E. coli* getestet. Die Ergebnisse legten nahe, dass weder einer der beiden *linker* noch das Peptid einen signifikant störenden Einfluss auf die Inhibitionswirkung haben. In *in vivo*-Experimenten mit dem *E. coli*-Wildtyp K12 in 1:10 verdünntem LB-Medium konnte bei einer Konzentration von 10 μ M des PNA-Peptid-Konjugats mit dem Glycin-*linker* keine Koloniebildung mehr nachgewiesen werden, während das AEEA-*linker*-Konjugat das Wachstum nur partiell hemmte. Die Inhibitoren zeigten eine qualitativ sehr ähnliche, jedoch stärker ausgeprägte Hemmwirkung auf den LPS-defizienten Stamm AS19. Die unterschiedliche Hemmwirkung der PNA-Peptid-Konjugate auf die beiden Stämme veranschaulichte die Bedeutung der äußeren Zellmembran als Hindernis für die zelluläre Aufnahme der PNA-Peptid-Konjugate. Der Vergleich der Wirksamkeit des PNA-14mers mit und ohne invasiven Peptidanteil machte jedoch auch deutlich, dass über die Kopplung solcher Peptide die Aufnahme von AS-ON erheblich verbessert werden kann. Die Aufnahme in die Zelle scheint sehr effizient zu erfolgen, da bereits nach 10 min Inkubationszeit in Anwesenheit einer 10 μ molaren Konzentration des PNA-G-Peptids fast keine Koloniebildung mehr beobachtet wurde.

6 Literaturverzeichnis

S. Agrawal, E.R. Kandimalla (2004) Antisense and siRNA as agonists of Toll-like receptors, *Nat. Biotechnol.* 22: 1533-1537.

Ö. Almarsson, T.C. Bruice (1993) Peptide nucleic acid (PNA) conformation and polymorphism in PNA-DNA and PNA-RNA hybrids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9542-9546.

S. Altman, L. Kirsebom (1999) Ribonuclease P, in *The RNA world* (Eds.: R.F. Gesteland, T. Cech, J.F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2nd ed. 351-380.

A. Arzumanov, A.P. Walsh, V.K. Raywanshi, R. Kumar, J. Wengel, M.J. Gait (2001) Inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans activation by steric block chimeric 2'-O-methyl/LNA oligoribonucleotides, *Biochemistry* 40: 14645-14654.

N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P.B. Moore, T.A. Steitz (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4Å Resolution, *Science* 289: 905-920.

D.A. Braasch, D.R. Corey (2001) Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA, *Chem. Biol.* 8: 1-7.

O. Brandt, J. Feldner, A. Stephan, M. Schröder, M. Schnölzer, H.F. Arlinghaus, J.D. Hoheisel, A. Jakob (2003) PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples, *Nucleic Acids Res.* 31: e119, 1-9.

S. Brantl (2002) Antisense-RNAs in plasmids: control of replication and maintenance, *Plasmid* 48: 165-173.

J.W. Brown (1998) The ribonuclease P database, *Nucleic Acids Res.* 26: 351-352.

S. Busch, L.A. Kirsebom, H. Notbohm, R.K. Hartmann (2000) Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C₇₅ and G293-C₇₄ in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNase P RNA, *J. Mol. Biol.* 299: 941-951.

K. Bush, M. Macielag, M. Weidner-Wells (2004) Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond Phase 1, *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 466-476.

J.R. Chamberlain, Y. Lee, W.S. Lane, D.R. Engelke (1998) Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP, *Genes Dev.* 12: 1678-1690.

G.M.T. Cheetham, T.A. Steitz (2000) Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 117-123.

C.P. Chen, L.R. Zhang, Y.F. Peng, X.B. Wang, S.Q. Wang, L.H. Zhang (2003) A concise method for the preparation of peptide and arginine-rich peptide-conjugated antisense oligonucleotide, *Bioconjugate Chem.* 14: 532-538.

B. Cheng, R.L. Fourier, P.A. Relue, J. Schisler (2001) An experimental and theoretical study of the inhibition of *Escherichia coli lac* operon gene expression by antigene oligonucleotides, *Biotechnol. Bioeng.* 74: 220-229.

J.L. Childs, M.D. Disney, D.H. Turner (2002) Oligonucleotide directed misfolding of RNA inhibits *Candida albicans* group I intron splicing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11091-11096.

J.L. Childs, A.W. Poole, D.H. Turner (2003) Inhibition of *Escherichia coli* RNase P by oligonucleotide directed misfolding of RNA, *RNA* 99: 1437-1445.

J. Ciesiolka, W.D. Hardt, J. Schlegl, V.A. Erdmann, R.K. Hartmann (1994) Lead-ion-induced cleavage of RNase P RNA, *Eur. J. Biochem.* 219: 49-56.

E. de Clercq (2002) Strategies in the design of antiviral drugs, *Nat. Rev.* 1: 13-25.

C. Cobaleda, I. Sanchez-Garcia (2001) RNase P: from biological function to biotechnological applications, *Trends Biotechnol.* 19: 406-411.

M.L. Cohen (2000) Changing patterns of infectious disease, *Nature* 406: 762-767.

N. Dias, C. Senamaud-Beaufort, E. le Forestier, C. Auvin, C. Helene, T.E. Saison-Behmoaras (2002) RNA hairpin invasion and ribosome elongation arrest by mixed base PNA oligomer, *J. Mol. Biol.* 320: 489-501.

G.A. Diaz, M. Rong, W.T. McAllister, R.K. Durbin (1996) The stability of abortively cycling T7 RNA polymerase complexes depends upon template conformation *Biochemistry* 35: 10837-10843.

H. Dong, L.A. Kirsebom, L. Nilsson (1996) Growth rate regulation of 4.5 S RNA and M1 RNA the catalytic subunit of *Escherichia coli* RNase P, *J. Mol. Biol.* 261: 303-308.

Y. Dorsett, T. Tuschl (2004) siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 318-329.

S. Eckardt, P. Romby, G. Sczakiel (1997) Implications of RNA structure on the annealing of a potent antisense-RNA directed against the human immunodeficiency virus type 1, *Biochemistry* 36: 12711-12721.

P.S. Eder, C. Hatfield, A. Vioque, V. Gopalan (2003) Bacterial RNase P as a potential target for novel anti-infectives, *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 8: 937-943.

M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S.M. Freier, D.A. Driver, R.H. Berg, S.K. Kim, B. Norden, P.E. Nielsen (1993) PNA hybridises to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, *Nature* 365: 566-568.

M. Egholm, L. Christensen, K.L. Dueholm, O. Buchardt, J. Coull, P.E. Nielsen (1995) Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA, *Nucleic Acids Res.* 23: 217-222.

A.N. Elayadi, D.A. Braasch, D.R. Corey (2002) Implications of high-affinity hybridisation by locked nucleic acid oligomers for inhibition of human telomerase, *Biochemistry* 41: 9973-9981.

R.M. Epanand, H.J. Vogel (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanism of action, *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 11-28.

M. Eriksson, P.E. Nielsen, L. Good (2002) Cell permeabilization and uptake of antisense peptide-peptide nucleic acid (PNA) into *Escherichia coli*, J. Biol. Chem. 277: 7144-7147.

T.D. Eubank, R. Biswas, M. Jovanovic, A. Litovchick, A. Lapidot, V. Gopalan (2002) Inhibition of bacterial RNase P by aminoglycoside-arginine conjugates, FEBS Lett. 511: 107-112.

A.S. Fauci (2001) Infectious diseases: considerations for the 21st century, Clin. Infect. Disc. 32: 675-685.

R. Feltens, M. Gössringer, D.K. Willkomm, H. Urlaub, R.K. Hartmann (2003) An unusual mechanism of bacterial gene expression revealed for the RNase P protein of *Thermus* strains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 5724-5729.

A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, Nature 391: 806-811.

D.N. Frank, N.R. Pace (1998) Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme, Annu. Rev. Biochem. 67: 153-180.

Y. Ge, D.L. MacDonald, K.J. Holroyd, C. Thornsberry, H. Wexler, M. Zasloff (1999) *In vitro* antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin, Antimicrob. Agents Chemother. 43: 782-788.

B.L. Geller, J.D. Deere, D.A. Stein, A.D. Kroeker, H.M. Moulton, P.L. Iversen (2003) Inhibition of gene expression in *Escherichia coli* by antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers, Antimicrob. Agents Chemother. 47: 3233-3239.

L. Good, P. Nielsen (1998) Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2073-2076.

L. Good, R. Sandberg, O. Larsson, P.E. Nielsen, C. Wahlestedt (2000) Antisense PNA effects in *E. coli* are limited by the outer-membrane LPS layer, Microbiology 146: 2665-2670.

- L. Good, S.K. Awasthi, R. Dryselius, O. Larsson, P.E. Nielsen (2001) Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates, *Nat. Biotechnol.* 19: 360-364.
- H. Gruegelsiepe, D.K. Willkomm, O. Goudinakis, R.K. Hartmann (2003) Antisense inhibition of *Escherichia coli* RNase P RNA: mechanistic aspects, *ChemBioChem.* 4: 1049-1056.
- C. Guerrier-Takada, K. Gardier, T. Marsh, N. Pace, S. Altman (1983) The RNA moiety of Ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell* 35: 849-857.
- R.E.W. Hancock (1997) The bacterial outer membrane as a drug barrier, *Trends Microbiol.* 5: 37-42.
- R. Hanecak, V. Brown-Driver, M.C. Fox, R.F. Azad, S. Furusako, C. Ford, H. Sasmor, K.P. Anderson (1996) Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes, *J. Virol.* 70: 5203-5212.
- W.D. Hardt, R.K. Hartmann (1996) Mutational analysis of the joining regions flanking helix P18 in *E. coli* RNase P RNA, *J. Mol. Biol.* 259: 422-433.
- M.E. Harris, E.L. Christian (2003) Recent insight into the structure and function of the ribonucleoprotein enzyme ribonuclease P, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 325-333.
- G. Harth, P.C. Zamecnik, J.Y. Tang, D. Tabatadze, M.A. Horwitz (2000) Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 418-423.
- G. Harth, M.A. Horwitz (2002) Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: demonstration of efficacy *in vivo*, *Infect. Immun.* 71: 456-464.
- R.K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, E. Westhof (2005) Appendix: UV spectroscopy for the quantitation of RNA, in *Handbook of RNA Biochemistry*, Vol. 2, 910-913.

C. Heide, T. Pfeiffer, J.M. Nolan, R.K. Hartmann (1999) Guanosine 2-NH₂ groups of *Escherichia coli* RNase P RNA involved in intramolecular tertiary contacts and direct interactions with tRNA, RNA 5: 102-116.

T. Hermann, E. Westhof (1998) RNA as a drug target: chemical, modelling, and evolutionary tools, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 66-73.

Y. Hori, E.V. Bichenkova, A.N. Wilton, M.N. El-Attug, S. Sadat-Ebrahimi, T. Tanaka, Y. Kikuchi, M. Araki, Y. Sugiura, K.T. Douglas (2001) Synthetic inhibitors of the processing of pretransfer RNA by the ribonuclease P ribozyme: enzyme inhibitors which act by binding to substrate, Biochemistry 40: 603-608.

J. Hsieh, A.J. Andrews, C.A. Fierke (2004) Roles of protein subunits in RNA-protein complexes: lessons from ribonuclease P, Biopolymers 73: 79-89.

N. Jarrous (2002) Human ribonuclease P: subunits, function and intranuclear localization, RNA 8: 1-7.

K. Jayaraman, K. McParland, P. Miller, P.O.P. Ts'o (1981) Selective inhibition of *Escherichia coli* protein synthesis and growth by nonionic oligonucleotides complementary to the 3' end of 16S rRNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1537-1541.

K.K. Jensen, H. Ørum, P.E. Nielsen, B. Norden (1997) Kinetics for hybridization of Peptide Nucleic Acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore Technique, Biochemistry 36: 5072-5077.

K. Kaihatsu, B.A. Janowski, D.R. Corey (2004) Recognition of chromosomal DNA by PNAs, Chem. Biol. 11: 749-758.

D. Kalavrizioti, A. Vourekas, A. Tekos, A. Tsagla, C. Stathopoulos, D. Drainas (2003) Kinetics of inhibition of ribonuclease P activity by peptidyltransferase inhibitors, Mol. Biol. Rep. 30: 9-14.

L.A. Kirsebom, S.G. Svärd (1994) Base pairing between *Escherichia coli* RNase P RNA and its substrate, EMBO J. 13: 4870-4876.

L.A. Kirsebom, J. Ciesolka (2005) Pb²⁺-induced cleavage of RNA, in Handbook of RNA Biochemistry, eds. R.K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, E. Westhof, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

S.N. Kochetkov, E.E. Rusakova, V.L. Tunitskaya (1998) Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism, FEBS Lett. 440: 264–267.

K. Kobayashi, S.D. Ehrlich, A. Albertini, G. Amati, K.K. Andersen, M. Arnaud, K. Asai, S. Ashikaga, S. Aymerich, P. Bessieres et al. (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 4678-4683.

F.A. Kolb, H.M. Engdahl, J.G. Slagter-Jäger, B. Ehresmann, C. Ehresmann, E. Westhof, E.G.H. Wagner, P. Romby (2000a) Progression of a loop-loop complex to a four-way junction is crucial for the activity of a regulatory antisense-RNA, EMBO J. 19: 5905-5915.

F.A. Kolb, C. Malmgren, E. Westhof, C. Ehresmann, B. Ehresmann, E.G.H. Wagner, P. Romby (2000b) An unusual structure formed by antisense-target RNA binding involves an extended kissing complex with a four-way junction and a side-by-side helical alignment, RNA 6: 311-324.

A.A. Koshkin, S.K. Singh, P. Nielsen, V.K. Raywanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C.E. Olsen, J. Wengel (1998) LNA (locked nucleic acids): synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine, uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition, Tetrahedron 54: 3607-3630.

J. Kurreck, E. Wyszko, C. Gillen, V.A. Erdmann (2002) Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids, Nucleic Acids Res. 30: 1911-1918.

J. Kurreck (2003) Antisense technologies: Improvement through novel chemical modifications, Eur. J. Biochem. 270: 1628-1644.

J.C. Kurz, C.A. Fierke (2000) Ribonuclease P: a ribonucleoprotein enzyme, Curr. Opin. Chem. Biol. 4: 553-558.

P.A. Lampert (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria, J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement 92: 46S-54S.

A. Loria, T. Pan (1996) Domain structure of the ribozyme from eubacterial ribonuclease P, RNA 2: 551-563.

H.J. Larsen, T. Bentin, P.E. Nielsen (1999) Antisense properties of peptide nucleic acid, Biochim. Biophys. Acta 1489: 159-166.

N.P. Lawrence, S. Altman (1986) Site-directed mutagenesis of M1 RNA, the RNA subunit of *Escherichia coli* ribonuclease P. The effects of an addition and small deletions on catalytic function, J. Mol. Biol. 191: 163-175.

C. Marwick (1998) First antisense drug will treat CMV retinitis, JAMA 280: 871.

E. Massé, N. Majdalani, S. Gottesman (2003) Regulatory roles for small RNAs in bacteria, Curr. Opin. Microbiol. 6: 120-124.

C. Massire, L. Jaeger, E. Westhof (1998) Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis, J. Mol. Biol. 279: 773-793.

D.H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker, D.H. Turner (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameter improves prediction of RNA secondary structure, J. Mol. Biol. 288: 911-940.

N.E. Mikkelsen, M. Brännvall, A. Virtanen, L.A. Kirsebom (1999) Inhibition of RNase P RNA cleavage by aminoglycosides, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6155-6160.

J.F. Milligan, O.C. Uhlenbeck (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase, Methods Enzymol. 180: 51-62.

N. Nekhotiaeva, S.K. Awasthi, P.E. Nielsen, L. Good (2004) Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids, Mol. Ther. 10: 652-659.

- K.E. Nielsen, J. Rasmussen, R. Kumar, J. Wengel, J.P. Jacobsen, M. Petersen (2004) NMR studies of fully modified locked nucleic acid (LNA) hybrids: solution structure of an LNA:RNA hybrid and characterization of an LNA:DNA hybrid, *Bioconjug. Chem.* 15: 449-457.
- P.E. Nielsen (1999) Peptide nucleic acids as therapeutic agents, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 353-357.
- P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, *Science* 254: 1497-1500.
- C.J. Nulf, D. Corey (2004) Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs), *Nucleic Acids Res.* 32: 3792-3798.
- S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi, T. Imanishi (1998) Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methylenerybonucleosides, *Tetrahedron Lett.* 39: 5401-5404.
- J.B. Opalinska, A.M. Gewirtz (2002) Nucleic acid therapeutics: basic principles and recent applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 503-514.
- K.M. Overbye, J.F. Barrett (2005) Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov. Today* 10: 45-51.
- T. Pan, L.A. Loria, K. Zhong (1995) Probing of tertiary interactions in RNA: 2'-hydroxyl-base contacts between the RNase P RNA and pre-tRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12510-12514.
- E. Papadimou, S. Georgiou, D. Tsambaos, D. Drinas (1998) Inhibition of ribonuclease P activity by retinoids, *J. Biol. Chem.* 273: 24375-24378.
- J.E. Patterson (2001) Antibiotic utilization, is there an effect on antimicrobial resistance? *Chest* 119: 426S-430S.

D. Payne, A. Tomasz (2004) Antimicrobials, the challenge of antibiotic resistant bacterial pathogens: the medical need, the market and prospects for new antimicrobial agents, *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 435-438.

Perseptive Biosystems Herstellervorschrift, Practical PNA, peptide nucleic acids (PNA): expanding the role of synthetic DNA Analogs

M. Petersen, K. Bodensgaard, J. Wengel, J.P. Jacobsen (2002) Locked Nucleic Acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA:RNA hybrids, *J. Am. Chem. Soc.* 124: 5974-5982.

M. Petersen, J. Wengel (2003) LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics, *Trends Biotechnol.* 21: 74-81.

I.D. Pokrovskaya, V.V. Gurevich (1994) *In vitro* transcription: preparative RNA yields in analytical scale reactions, *Anal. Biochem.* 220: 420-423.

M. Pooga, U. Soomets, M. Hällbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J.X. Hao, X.J. Xu, Z. Wiesenfeld-Halin, T. Hökfelt, T. Bartfai, Ü. Langel (1998) Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission *in vivo*, *Nat. Biotechnol.* 16: 857-861.

A.M. Pyle, J.A. McSwiggen, T.R. Cech (1990) Direct measurement of oligonucleotide substrate binding to wild-type and mutant ribozymes from *Tetrahymena*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8178-8191.

E. Rapaport, A. Levina, V. Metelev, P.C. Zamecnik (1996) Antimycobacterial activities of antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioates in drug-resistant strains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 709-713.

H. Repke, C. Liebmann (1987) Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme, Lizenzausgabe für VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Kap. 7.7.1: 97-98.

S. Schubert, J. Kurreck (2004) Ribozyme- and deoxyribozyme- strategies for medical applications, *Current Drug Targets*, 5: 667-681.

M. Sekiguchi, S. Iida (1967) Mutants of *Escherichia coli* permeable to actinomycin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 2316-2320.

K. Senda, Y. Arakawa, K. Nakashima, H. Ito, S. Ichiyama, K. Shimokata, N. Kato, M. Ohta (1996) Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems, 40: 349-353.

S.M. Sharkady, J.M. Nolan (2001) Bacterial ribonuclease P holoenzyme crosslinking analysis reveals protein interaction sites on the RNA subunit, *Nucleic Acids Res.* 29: 3848-3856.

S.K. Singh, J. Wengel (1998) Universality of LNA-mediated high-affinity nucleic acid recognition, *Chem. Commun.* 1247-1248.

C. Stathopoulos, A. Tsagla, A. Tekos, D. Drainas (2000) Effect of peptidyltransferase inhibitors on ribonuclease P activity from *Dictyostelium discoideum*, *Mol. Biol. Rep.* 27: 107-111.

B.A. Sullenger, E. Gilboa (2002) Emerging clinical applications of RNA, *Nature* 418: 252-258.

S.G. Svärd, J.G. Mattsson, K.E. Johansson, L.A. Kirsebom (1994) Cloning and characterisation of the RNase P RNA genes from two porcine mycoplasmas, *Mol. Microbiol.* 11: 849-859.

S.G. Svärd, U. Kagardt, L.A. Kirsebom (1996) Phylogenetic comparative mutational analysis of the base-pairing between RNase P RNA and its substrate, *RNA* 2: 463-472.

A. Tekos, C. Stathopoulos, D. Tsambaos, D. Drainas (2004) RNase P: a promising molecular target for the development of new drugs, *Curr. Med. Chem.* 11: 2979-2989.

J.I. Tomizawa, T. Itoh (1981) Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6096-6100.

H.Y. Tsai, B. Masquida, R. Biswas, E. Westhof, V. Gopalan (2003) Molecular modeling of the three-dimensional structure of the bacterial RNase P holoenzyme, *J. Mol. Biol.* 325: 661-675.

M. Vaara, M. Porro (1996) Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1801-1805.

B. Vester, J. Wengel (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA, *Biochemistry* 43: 13233-13241.

A. Vioque (1989) Protein synthesis inhibitors and catalytic RNA: Effect of puromycin on tRNA precursor processing by the RNA component of *Escherichia coli* RNase P, *FEBS Lett.* 246: 137-139.

E.G. Wagner, K. Flardh (2002) Antisense RNAs everywhere? *Trends Genet.* 18: 223-223.

C. Wahlestedt, P. Salmi, L. Good, J. Kela, T. Johnsson, T. Hökfelt, C. Broberger, F. Porreca (2000) Potent and non-toxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5633-5638.

C. Walsh (2003) Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology* 1: 65-70.

F.M. Walsh, S.G.B. Amyes (2004) Microbiology and drug resistance mechanism of fully resistant pathogens, *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 439-444.

J.M. Warnecke, R. Held, S. Busch, R.K. Hartmann (1999) Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalysed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*, *J. Mol. Biol.* 290: 433-445.

L.M. Weigel, D.B. Clewell, S.R. Gill, N.C. Clark, L.K. McDougal, S.E. Flannagan, J.F. Kolonay, J. Shetty, G.E. Killgore, F.C. Tenover (2003) Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*, *Science* 302: 1569-1571.

D.G. White, K. Maneewannakul, E. v. Hofe, M. Zillman, W. Eisenberg, A.K. Field, S.B. Levy (1997) Inhibition of the multiple antibiotic resistance (mar) Operon in *Escherichia coli* by antisense DNA analogs, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2699-2704.

D.K. Willkomm, H. Gruegelsiepe, O. Goudinakis, R. Kretschmer-Kazemi Far, R. Bald, V.A. Erdmann, R.K. Hartmann (2003) Evaluation of bacterial RNase P RNA as a drug target, *ChemBioChem.* 4: 1041-1048.

D.N. Wilson, K.H. Nierhaus (2003) Das Ribosom unter der Lupe, *Angew. Chem.* 115: 2586-3610.

S. Xiao, F. Scott, C.A. Fierke, D.R. Engelke (2002) Eukaryotic ribonuclease P: a plurality of ribonucleoprotein enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 71: 165-189.

P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson (1978), Inhibition of Rous sarcoma virus replication and transformation by a specific oligonucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 285-288.

M. Zasloff (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415: 389-395.

H.I. Zgurskaya, H. Nikaido (2000) Multidrug resistance mechanism: drug efflux across two membranes, *Molecular Microbiology* 37: 219-225.

7 Anhang

A Geräte, Chemikalien, Enzyme und Puffer

Geräte:

Agarose-Kammern	Biorad, Mini Sub Cell
Dokumentationsanlage	Cybertech, CS1 mit Mitsubishi Video Copy Processor; Biostep, GelSystem MINI
Geltrockner	Biorad, Model 483 SLAB Dryer
Handmonitor	Berthold, LB 1210 B
Heizblöcke	Techne, Dri-Block DB-3D; Biometra, TB1
Imagerkassetten	Fuji Film, Bas cassette 4043, Rego, 35,6x43,2cm
Magnetrührer	Heidolph, MR 2002
Mikroanalysen-Filtersystem	Millipore
Netzgeräte	Pharmacia, EPS 3500; Bio Rad, Power Supply 160/1.6 (Power Pac 3000); Apelex, PS 9009T
PAA-Gelkammern	Eigenbau durch die Werkstatt der Vorklinik der Universität-Lübeck
PCR-Gerät	Biometra, T _{Gradient} Thermocycler
pH-Meter	WTW, pH Level 1
Phosphoimager	Raytest, Bio-Imaging Analyzer BAS 1000 (Fujifilm); FLA 3000, (Fujifilm)
Pipetten	Gilson-Pipetman P2, P20, P100; eppendorf research, 200µl, 1000µl
Quarzküvetten	Hellma 104-QS, 105.202, 115B-QS, 105
Schüttler	IKA, Vibrax-VXR; Eppendorf, Thermomixer 5436, Thermomixer comfort
Spektralphotometer	Hewlett Packard, Photometer 8453; Varian, Cary 50 Conc; Thermo Spectronic, Biomate 3
Software	Aida Image Analyzer v.3.42, CorelDraw, Corel PHOTO-PAINT; GraFit 3.0; PCBAS 2.09; Microsoft Office; WinSpectral (Szintillationszähler)
Szintillationszähler	Perkin Elmer, Wallac WINSPECTRAL α/β 1414 Liquid Scintillation Counter; Packard, Tricarb 2000CA
Zentrifugen	Heraeus, Biofuge pico, biofuge fresco; Sigma, Typ 112; Eppendorf, centrifuge 5810R, minispin plus Stratagene, PicoFuge

Weitere verwendete Chemikalien:

Acrylamid M-Bis (50 % Stammlösung 24/ 1)	Gerbu
Agar Agar	Serva
Agarose	Roth
Ampicillin	Gerbu
Ammoniumacetat	Fluka
Ammoniumperoxidsulfat	Roth
Blei(II)-acetat-3-hydrat	Roth
BlueSlick	Serva

Borsäure	Roth
Bromphenolblau (BPB)	Merck
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Boehringer
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Ethanol \geq 99,8 %	Roth
Ethidiumbromid	Serva
Glycerin	Gerbu
Glykogen	Roche
Harnstoff	Gerbu
Hefeextrakt (SELECT Yeast Extract)	Gerbu
Isopropanol	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Natriumacetat	Merck
Nukleosidtriphosphate (NTPs)	Boehringer
Pepton 140 (SELECT Peptone 140)	Roth
Phenol	Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin (TEMED)	Serva
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Gerbu
Xylencyanolblau (XCB)	Serva

Alle weiteren Chemikalien sind von den Firmen Merck, Sigma, Gerbu und Life Technologies und besitzen, wenn nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad 'pro analysis'.

Radioisotope:

[γ - ³² P]-ATP	Hartmann Analytic
[5'- ³² P]-pCp	Hartmann Analytic

Größenstandards für DNA:

1kb DNA ladder	Gibco BRL, LifeTechnologies
----------------	-----------------------------

Enzyme:

Ribonuklease T ₁	Gibco BRL
T4-Polynukleotid-Kinase	Gibco BRL
T4-RNA-Ligase	MBI Fermentas
T7-RNA-Polymerase	MBI Fermentas

Restriktionsenzyme :

BamHI	New England Biolabs
BsaAI	New England Biolabs
Clal	Gibco BRL
DraI	New England Biolabs
EheI	New England Biolabs
NcoI	MBI Fermentas
StyI	New England Biolabs
XbaI	MBI Fermentas

Puffer:

Elektrophoresepuffer wurden mit destilliertem Wasser, andere Puffer und Lösungen mit bidestilliertem H₂O angesetzt (autoklaviert und sterilfiltriert).

Agar(-Amp):

- 15 g/l (w/v) LB-Medium
- autoklavieren 20 min/ 120°C
- (- bei ~55°C 100 mg/ l Ampicillin)
- in sterile Petrischalen gießen

DNA-Probenpuffer (6 x):

- 30,0 % (v/v) Glycerin
- 0,25 % XCB
- 0,25 % BPB

Gelelutionspuffer:

Elution nach Präparativer T7 Transkription: 200 mM Tris/HCl, pH 7, 1 mM EDTA, pH 8
 Elution nach radioaktiven Markierungen: 1 M Natriumacetat, pH 4,9

Inhibitions-puffer:

- 100 M Ammoniumacetat
- 100 mM Magnesiumacetat
- 50 mM HEPES, pH 7,0

Kinase-Puffer (10 x):

- 500 mM Tris/ HCl pH 7,6
- 100 mM Magnesiumchlorid
- 50 mM DTT
- 1 mM Spermidin
- 1 mM EDTA

LB-Medium:

- 10 g (w/v) Natriumchlorid
- 5 g (w/v) Hefeextrakt
- 10 g (w/v) Pepton 140
- ad 1 l aqua dest., pH 7,5 mit NaOH
- autoklavieren 20 min/ 120°C
- bei ~55 °C 100 µg/ ml Ampicillin

Puffer für Sephadex-Säulen:

- 1 x Inhibitions-puffer
- 0,1 % SDS
- 0,05 % NP40

RNA-Probenpuffer (5 x):

- 2,3 M Harnstoff
- 1 x TBE
- 66,0 % (v/v) Formamid
- 0,05 % (w/v) BPB
- 0,05 % (w/v) XCB

RNA-Probenpuffer/EDTA:

- RNA-Probenpuffer (5 x)
- 120 mM EDTA, pH 7

RNase T1 -Puffer:

- 20 mM Natriumcitrat/ HCl
- 0,2 mM EDTA
- 1,4 M Harnstoff, pH 5,0

SOC-Medium:

- 2,0 % Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 10,0 mM Natriumchlorid
- 2,5 mM Kaliumchlorid
- 10,0 mM Magnesiumsulfat
- 10,0 mM Magnesiumchlorid
- 20,0 mM Glukose

TBE (5 x):

- 445 mM Tris, pH 8,3
- 445 mM Borsäure
- 10 mM EDTA

T4-RNA-Ligase-Puffer (10 x):

- 500 mM HEPES NaOH, pH 8,0
- 100 mM Magnesiumchlorid
- 100 mM DTT

T7-Transkriptionspuffer (10 x):

- 400,0 mM Tris/ HCl, pH 8,0
- 200,0 mM Magnesiumchlorid
- 10,0 mM Spermidin
- 0,1 % Triton®X-100

T7-Transkriptionspuffer (5 x):

- 200 mM Tris/ HCl, pH 7,9
- 30 mM Magnesiumchlorid
- 50 mM DTT
- 50 mM Natriumchlorid
- 10 mM Spermidin

Z-Puffer:

- 60 mM Dinatriumhydrogenphosphat
- 40 mM Natriumdihydrogenphosphat
- 10 mM Kaliumchlorid
- 1 mM Magnesiumphosphat
- 0,27 % β-Mercaptoethanol

DNA-Oligonukleotide

DNA Eco5': 5'-ACTGTCCTTTACCCGGGTTTCAGT

DNA Eco3': 5'-CAAGCAGCCTACCAGCTACCTTG

DNA-14mer: 5'-CAAGCAGCCTACCC

Bezugsquelle: Invitrogen (Karlsruhe), wurden in entsalzter Qualität gekauft und in der Regel vor Gebrauch gelgereinigt.

RNA-Oligonukleotide

Eco5': 5'-ACUGUCCUUUACCCGGGUUCAGU

Eco3': 5'-CAAGCAGCCUACCAGCUACCUUG

Mhyo5': 5'-CCUAUUUUUUUUACCAAAUUUAGG

Mhyo3': 5'-GGGCUCCCUUACCGGAUACCC

Eco3' AA: 5'-CAAGCAGCCUAAAAGCUACCUUG

Eco3' UU: 5'-CAAGCAGCCUAUUAGCUACCUUG

RNA Mhyo5': 5'-CCUAUUUUUUUUACCAAAUUUAGG

RNA-15mer: 5'-CAAGCAGCCUACCAG

RNA-13mer: 5'-CAAGCAGCCUACC

RNA-12mer: 5'-GCAGCCUACCAG

RNA-11mer: 5'-GCAGCCUACCC

RNA-27mer: 5'-UCGCUCACUGGCUCAAGCAGCCUACCC

RNA-14mer: 5'-CAAGCAGCCUACCC

RNA-14mer (allo): 5'-CUAGCGACCUACCC

RNA-14mer (thermus): 5'-AAGCGGCCCAUCCC

Bezugsquelle: HPLC-gereinigte RNA-Oligonukleotide wurden entweder von IBA (Göttingen), von CureVac GmbH (Tübingen) oder Rolf Bald, FU-Berlin bezogen, die RNA-Oligonukleotide wurden in der Regel vor Gebrauch auf einem PAA-Gel aufgereinigt.

PNA-Oligomere

PNA-Oligonukleotide hatten die folgenden Sequenzen:

PNA-14mer: 5'-caagcagcctaccc

PNA-G-Petid: NH₂-KFFKFFKFFK-G-caagcagcctaccc

PNA-AEEA-Petid: NH₂-KFFKFFKFFK-AEEA-caagcagcctaccc

scPNA-G-Petid, (sc = scrambled): NH₂-KFFKFFKFFK-G-cgcacactacgac

scPNA-AEEA-Petid: NH₂-KFFKFFKFFK-AEEA-cgcacactacgac

PNA-Peptid 1900: NH₂-KFFKFFKFFK-AEEA-catagctgtttc (Good 2001)

AEEA = eg1= 8-amino-3,6-dioxaoctansäure, G = Glycin

Bezugsquelle: Ole Brandt, DKFZ Heidelberg, synthetisiert wie in Brandt (2003) und nach einer Qualitätsprüfung mittels MALDI-TOF Massenspektrometer eingesetzt.

LNA-Oligonukleotide

LNA-14mer: 5'-CAAGCAGCCUACCC

Bezugsquelle: Rolf Bald, FU-Berlin, das LNA-Oligonukleotid lag HPLC gereinigt vor.

Verwendete Plasmide, als Transkriptionstemplat linearisiert, sowie Restriktionsenzyme für die Linearisierung

pAB12	<i>Allochromatium vinosum</i> -RNase P RNA, linearisiert mit Clal
pDW66	<i>B. subtilis</i> -RNase P RNA, linearisiert mit Dral (Warnecke 1999)
pDW 98	<i>E. coli</i> -RNase P RNA, linearisiert mit BsaAI (Busch 2000)
pHyoP	<i>M. hyopneumoniae</i> -RNase P RNA, linearisiert mit Xbal (Svärd 1994))
pSBpt3'hh	ptRNA ^{Gly} von <i>Thermus thermophilus</i> mit 3' Hammerhead, linearisiert mit BamHI, (Busch 2000)
pSP64M1HH	<i>E. coli</i> -RNase P RNA mit 3' Hammerhead linearisiert mit BamHI (Heide 1999)
pT7M1HB8	<i>Thermus thermophilus</i> -RNase P RNA, linearisiert mit Ehel (Feltens 2003)
pUCKprnpB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -RNase P RNA, linearisiert mit Styl, (Gruegelsiepe 2003)
pUCParnpB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -RNase P RNA, linearisiert mit Ncol, (Gruegelsiepe 2003)

B Lebenslauf

Name: Heike Grügelsiepe
Geburtsdatum: 29.08.1973
Geburtsort: Nienburg a.d. Weser

Schulbildung:

1980 – 1984 Grundschule Neukirchen

1984 – 1993 Freiherr-vom-Stein Gymnasium, Oldenburg i.H.

Juni 1993 Abitur

Studium:

Oktober 1993 Biotechnologie-Studium TU-Berlin

September 1997-
Januar 1998 Studienarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie und
Mikrobiologie der FU-Berlin

2000 Diplomarbeit am Institut für Technischen Umweltschutz, TU-Berlin

Februar 2001 Dipl.-Ing. Biotechnologie

Januar – Juni 2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technischen
Umweltschutz, TU-Berlin

Seit August 2001 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R.K. Hartmann,
Institut für Biochemie, Lübeck

Mai 2003 Umzug der Arbeitsgruppe an das Institut für Pharmazeutische
Chemie, Philips-Universität Marburg.

C Eigene Publikationen

D.K. Willkomm, H. Grügelsiepe, R.K. Hartmann (2003) Neue Wege zur Antibiotikatherapie, *BIOforum* 9: 518-519.

D.K. Willkomm, H. Gruegelsiepe, O. Goudinakis, R. Kretschmer-Kazemir Far, R. Bald, V.A. Erdmann, R.K. Hartmann (2003) Evaluation of bacterial RNase P RNA as a drug target, *ChemBioChem* 4: 1041-1048.

H. Gruegelsiepe, D.K. Willkomm, O. Goudinakis, R.K. Hartmann (2003) Antisense inhibition of *Escherichia coli* RNase P RNA: mechanistic aspects, *ChemBioChem* 4: 1049-1056.

H. Gruegelsiepe, A. Schön, L.A. Kirsebom, R.K. Hartmann (2005) Enzymatic RNA synthesis using bacteriophage T7 RNA polymerase, in *Handbook of RNA Biochemistry*, eds. R.K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, E. Westhof, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

H. Gruegelsiepe, O. Brandt, R. Bald, V.A. Erdmann, R.K. Hartmann, *In vitro* and *in vivo* antisense inhibition of bacterial RNase P by LNA, PNA, and PNA-peptide oligonucleotides, in *Vorbereitung*

D Danksagung

Hier möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. R.K. Hartmann für die gute wissenschaftliche Betreuung, die Diskussionen und die fachliche Unterstützung bedanken, und dafür dass er sich immer Zeit genommen, wenn es nötig war.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Dr. Dagmar Willkomm, die vor allem zu Beginn immer ein offenes Ohr für die großen und kleinen Probleme rund um die RNA hatte und für die anregenden Labor- und Schreibtischdiskussionen. Außerdem ein großes Danke für die Hilfe bei der zermürenden Jagd nach Fehlern im Manuskript.

Bei meinen alten Kollegen aus Lübeck und den Kollegen aus Marburg möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken und dass man die Dinge teilen konnte, die diese Zeit auch ausgemacht haben.

Ole Brandt möchte ich für die Synthese der PNA-Peptid-Konjugate danken.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei Olaf bedanken für die moralische Unterstützung, tausende von Autobahnkilometern, Formatierungshilfe,....

E Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„Antisense-Inhibition der bakteriellen RNase P“

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

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)