Aus dem Institut für Molekulare Medizin
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Georg Sczakiel

Small interfering RNA (siRNA): Zelluläre Einschleusung und Wirkmechanismen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
– Dr. rer. nat. –
der Universität zu Lübeck
– Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät –

vorgelegt von
Anke Detzer
aus Greifswald

Lübeck, 2010

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von November 2007 bis Juni 2010 am Institut für Molekulare Medizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) unter der Betreuung von Prof. Dr. Georg Sczakiel angefertigt.

Erstgutachter : Prof. Dr. Georg Sczakiel
Zweitgutachter : Prof. Dr. Norbert Tautz

Datum der mündlichen Prüfung : 28.10.2010
Prüfungsvorsitzender : Prof. Dr. Thomas Peters
Zum Druck genehmigt : 28.10.2010

gez. Prof. Dr. Jürgen Prestin

– Vorsitzender der MINT-Sektionen –

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich versichere, dass ich nicht vorher oder gleichzeitig anderenorts einen Zulassungsantrag gestellt und mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen habe.

Lübeck, den 16.06.2010 Anke Detzer

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Inhibition der Genexpression mit Hilfe von Nukleinsäure-Wirkstoffen 2

1.1.1 *Antisense* Oligonukleotid-vermittelte Gensuppression 4

1.1.2 RNA-Interferenz-vermittelte Gensuppression 7

1.2 Zelluläre Einschleusung von siRNA-Wirkstoffen 10

1.2.1 Ausgewählte Formen der Einschleusung von siRNA-Wirkstoffen 11

1.2.2 Endozytose 13

1.2.3 Phosphorothioat-stimulierte Einschleusung von siRNA-Wirkstoffen 15

1.3 Bioverfügbarkeit von siRNA-Wirkstoffen 17

1.3.1 Intrazelluläre Freisetzung von Protein-Toxinen 18

1.3.2 Intrazelluläre Freisetzung von Viren 19

1.3.3 Polypeptid-abgeleitete Transport- und Sortierungsignale 20

1.4 Funktionelle Zugänglichkeit der RNA-Interferenz-Maschinerie 21

1.4.1 Post-translationelle Modifikation der RNA-Interferenz-Maschinerie 22

1.4.2 Intrazellulärer Wirkort der RNA-Interferenz 23

1.5 Aufgabenstellung 24

2 Materialien **27**

2.1 Allgemeines 27

2.2 Geräte 28

2.3 Chemikalien 29

2.4 Gebrauchsmaterialien 31

2.5 Kits 31

2.6 Lösungen und Puffer 32

2.7 Zellkultur 35

2.7.1 Grundmedien und Zusätze 35

2.7.2 Zelllinien 35

2.8 Enzyme, Proteine und Größenmarker 35

2.9 Antikörper 36

2.10 Nukleinsäuren 36

2.10.1 Plasmide 36

2.10.2 Chemisch synthetisierte Nukleinsäuren 36

2.11 Programme 40

3 Methoden **41**

3.1 Mikrobiologische Methoden 41

3.1.1 Herstellung von Glyzerinkulturen von *E.coli* Bakterien 41
3.1.2 Gewinnung von Plasmid-DNA 41
3.2 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren 41
3.2.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung 41
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese 42
3.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 42
3.2.4 Färbung von Nukleinsäuren in Agarose- und Polyacrylamid-Gelen 43
3.2.5 Elektrotransfer von Nukleinsäuren 44
3.2.6 Isolation von Nukleinsäuren mittels Phenol-Chloroform-Extraktion 44
3.2.7 Fällung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Ethanol 45
3.2.8 Reverse Transkription 45
3.2.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion 45
3.2.10 Hybridisierung von einzelsträngiger RNA 45
3.2.11 Bestimmung der Stabilität von siRNA und siRNA-Peptid-Konjugaten . . . 46
3.2.12 Radioaktive 5'-Endmarkierung einzelsträngiger RNA 46
3.2.13 Autoradiographie 46
3.2.14 Computergestützte Analyse der Sekundärstruktur der Ago2-mRNA 46
3.3 Methoden im Umgang mit Proteinen 47
3.3.1 Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung 47
3.3.2 Fällung von Proteinen mit Hilfe von Trichloressigsäure 47
3.3.3 Western-Analyse 48
3.3.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen und auf PVDF-Membranen 50
3.3.5 Luciferase-Aktivitätstest 50
3.4 Zellbiologische Methoden 51
3.4.1 Kultivierung von Säugerzellen 51
3.4.2 Kryokonservierung von Säugerzellen 51
3.4.3 Induktion von Zellstress 51
3.4.4 Bestimmung der Zellviabilität 52
3.4.5 Transfektion von Säugerzellen 52
3.4.6 Elektroporation von Säugerzellen 52
3.4.7 Phosphorothioat-stimulierte Einschleusung von siRNA 53
3.4.8 Quantifizierung der biologischen Wirksamkeit von siRNA, miRNA und asON 53
3.4.9 Quantifizierung der physikalischen Aufnahme von siRNA 54
3.4.10 Zellfraktionierung 54
3.4.11 Fluoreszenzmikroskopie 55

4 Ergebnisse **59**
4.1 Bioverfügbarkeit von siRNA nach deren Phosphorothioat-stimulierter Einschleusung 59
4.1.1 Vorarbeiten 59
4.1.2 Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung mit Hilfe von Ilimaquinon 60
4.1.3 Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung mit Hilfe von Signalpeptiden 62
4.1.4 Fazit – erster Teil 74
4.2 Bedeutung von Ago2 für die Effizienz der RNA-Interferenz 75

4.2.1 Entwurf und Charakterisierung Ago2-gerichteter *antisense* Oligonukleotide 75
4.2.2 Einfluss der Ago2-Inhibition auf die siRNA- und miRNA-vermittelte RNA-Interferenz . . . 86
4.2.3 Fazit – zweiter Teil . . . 88
4.3 Funktionelle Zugänglichkeit von Ago2 unter zellulären Stressbedingungen . . . 89
4.3.1 Einfluss von Zellstress auf die Lokalisation und Funktion von Ago2 . . . 89
4.3.2 Einfluss von Zellstress auf die Effizienz der RNA-Interferenz . . . 96
4.3.3 Charakterisierung der Phosphorothioat-vermittelten Zellstress-Induktion . . . 101
4.3.4 Fazit – dritter Teil . . . 105

5 Diskussion 107
5.1 Limitierende Faktoren auf dem Weg zur therapeutischen Einführung von siRNA-Wirkstoffen . . . 107
5.2 Einfluss der siRNA-Bioverfügbarkeit auf die Effizienz der RNA-Interferenz . . . 109
5.2.1 Verbesserung der siRNA-Bioverfügbarkeit mit Hilfe von Ilimaquinon . . . 109
5.2.2 Verbesserung der siRNA-Bioverfügbarkeit mit Hilfe von Signalpeptiden . . . 110
5.3 Einfluss der funktionellen Ago2-Zugänglichkeit auf die Effizienz der RNA-Interferenz 113
5.3.1 Genfunktionsanalyse von Ago2 unter Ausschluss des RNAi-Mechanismus . 113
5.3.2 Funktionelle Inaktivierung von Ago2 unter Zellstressbedingungen . . . 116

6 Zusammenfassung 125

7 Literaturverzeichnis 127

A Anhang 147
A.1 Abkürzungsverzeichnis . . . 147
A.2 Lebenslauf . . . 151
A.3 Publikationsliste . . . 153
A.4 Danksagung . . . 155

1 Einleitung

Während des Prozesses der Genexpression wird die in Form von doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeicherte genetische Information durch Transkription und Translation in Proteine umgewandelt. Die entscheidende Brücke zwischen der genetischen Information und der Proteinbiosynthese bildet dabei die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) (Abbildung 1.1).

Obwohl jede Zelle eines komplexen Organismus dieselbe genetische Ausstattung aufweist, entstehen im Verlauf der Differenzierung unterschiedliche Zellen, Gewebe und Organe. Um die Expression eines zell- und gewebetypischen Phänotyps sowie sämtliche zelluläre Funktionen an die verschiedenen Zustände der Zelle anzupassen, ist die Möglichkeit, die Expression spezifischer Gene entsprechend zu regulieren, eine essentielle Voraussetzung.

Änderungen der Genexpression spielen aber auch beim Zustandekommen pathobiochemischer Vorgänge wie der Reaktion von Zellen auf Stress, auf toxische Verbindungen, Infektionen oder bei malignen Transformationen eine entscheidende Rolle. Deshalb wurden in der modernen Medizin eine Vielzahl von Therapiekonzepten entwickelt, um die Expression krankheitsrelevanter Gene zu korrigieren. Dabei bildet der Einsatz von Nukleinsäure-Wirkstoffen eine besonders vielversprechende Strategie, da Nukleinsäure-Wirkstoffe durch die Ausbildung von Watson-Crick Basenpaarungen mit ihren Zielsequenzen innerhalb eines Zielgens oder einer Ziel-mRNA eine besonders hohe Spezifität der Gensuppression gewährleisten können.

In den folgenden Abschnitten sollen die verschiedenen Klassen von Nukleinsäure-Wirkstoffen eingeführt und die Wirkmechanismen der in dieser Arbeit verwendeten Nukleinsäure-Wirkstoffe sowie deren Anwendungsmöglichkeit in der molekularbiologischen Forschung vorgestellt werden (Abschnitt 1.1). Innerhalb der verschiedenen Klassen von Nukleinsäure-Wirkstoffen wird der Klasse der *small interfering* RNA (siRNA)-Wirkstoffe derzeit das größte therapeutische Potential zugesprochen. Die wichtigsten auf dem Weg zur therapeutischen Einführung von siRNA-Wirkstoffen zu überwindenden Hürden sind die effiziente, zelluläre siRNA-Einschleusung sowie deren anschlie-

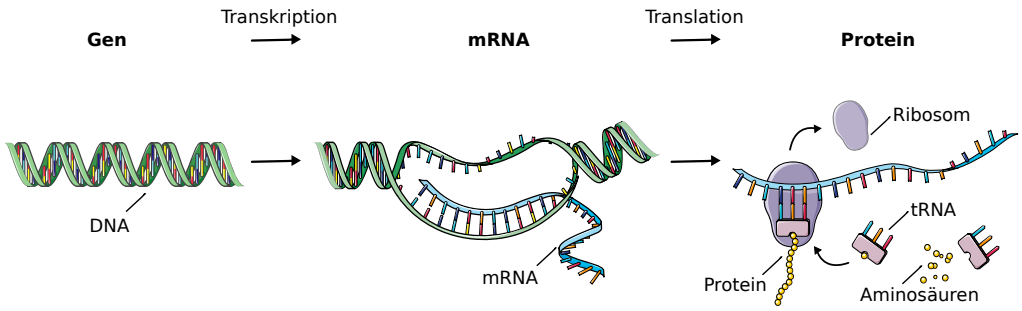


Abbildung 1.1: Der natürliche Fluss der Genexpression. Die Information eines Gens innerhalb der DNA wird zunächst durch Transkription auf die mRNA übertragen. Diese wird mit Hilfe der Transfer-RNA (tRNA) an den Ribosomen in ein Protein übersetzt. Dieser Prozess wird als Translation bezeichnet.

ßende intrazelluläre Bioverfügbarkeit. Diese beiden Aspekte werden in den Abschnitten 1.2 und 1.3 analysiert. Abschließend soll in ein sehr junges Arbeitsgebiet eingeführt werden, das zeigt, dass die von den siRNA-Wirkstoffen genutzte RNA-Interferenz (RNAi)-Maschinerie selbst einer zellulären Regulation unterliegt, die Einfluss auf die funktionelle Zugänglichkeit der RNAi-Maschinerie hat (Abschnitt 1.4).

1.1 Inhibition der Genexpression mit Hilfe von Nukleinsäure-Wirkstoffen

Die spezifische Inhibition der Expression eines Zielgens ist sowohl für funktionelle Untersuchungen als auch für therapeutische Anwendungen von großer Bedeutung. Diesbezüglich stellen Nukleinsäure-Wirkstoffe besonders vielversprechende molekulare Werkzeuge dar, da sie ihre Zielsequenz mit hoher Spezifität erkennen können und deren Expression über verschiedene, sehr wirksame Mechanismen inhibieren können. Die Inhibition der Genexpression mit Hilfe von Nukleinsäure-Wirkstoffen kann auf der Ebene des Genoms (Anti-Gen), auf der Ebene der mRNA (Anti-mRNA) und auf der Ebene des Proteins (Anti-Protein) erfolgen. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Inhibition der Genexpression auf der mRNA-Ebene. Der Vollständigkeit halber sind in Tabelle 1.1 die verschiedenen Klassen von oligomeren Nukleinsäure-Wirkstoffen, ihre zellulären Regulationsebenen sowie Referenzen zu entsprechenden Übersichtsartikeln aufgeführt.

Oligomerer Nukleinsäure-Wirkstoff	Regulationsebene	Referenz
Triple helix forming Oligonukleotid (TFO)	Anti-Gen	[1]
Ribozym	Anti-mRNA	[2]
Desoxyribozym	Anti-mRNA	[3]
Antisense Oligonukleotid (asON)	Anti-mRNA	[4]
Small interfering RNA (siRNA)	Anti-mRNA	[5]
Micro RNA (miRNA)	Anti-mRNA	[6]
Decoy Oligonukleotid[1]	Anti-Protein	[7]
Aptamer[1]	Anti-Protein	[8]

[1] Diese Nukleinsäure-Wirkstoffe vermitteln ihre Spezifität nicht über die Ausbildung von Watson-Crick Basenpaarungen, sondern über oft noch spezifischere Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff und dem Ziel-Protein über diverse chemische Interaktionen.

Tabelle 1.1: Klassen der oligomeren Nukleinsäure-Wirkstoffe.

Die Entdeckung, dass die natürliche Genexpression auf der Ebene der mRNA durch synthetische Oligonukleotide beeinflusst werden kann, geht aus einer Studie von Paterson *et al.* hervor, die 1977 als erste Arbeitsgruppe einzelsträngige DNA verwendeten, um in einem zellfreien System die Translation einer komplementären RNA zu inhibieren [9]. Im darauf folgenden Jahr zeigten Zamecnik und Stephenson, dass ein zum RNA-Genom des Rous-Sarcoma-Virus komplementäres DNA-Oligonukleotid von 13 Nukleotiden (nt) Länge die Virus-Replikation in Zellkultur inhibieren kann [10]. Aus diesem Grund gelten Zamecnik und Stephenson als die Ersten, die das therapeutische Potential dieser als *antisense* (as)-Nukleinsäuren bezeichneten molekularen Werkzeuge erkannten.

Kurze Zeit später wurde die bis dahin geltende Ansicht, dass RNA ausschließlich eine notwendige Zwischenstufe zwischen der genetischen Information und einem Protein darstellt dahingehend revolutioniert, dass Altmann und Cech zeigten, dass RNA neben ihrem Protein-kodierenden Potential auch katalytische Aktivität aufweisen kann [11, 12]. Für diese Entdeckung wurden die beiden Wissenschaftler 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt. Diese als Ribozyme bezeichneten katalytisch-aktiven RNAs und die bereits eingeführten *antisense* Oligonukleotide (asON) wurden in zahlreichen Studien eingesetzt, um die Expression eines Genproduktes spezifisch auf der Ebene der mRNA zu inhibieren. Aus den entstehenden *loss-of-function* Phänotypen konnte die Bedeutung des Zielgens abgeleitet werden. Aufgrund dieser Erfolge in Laboranalysen wurden klinische Studien initiiert, in denen die Expression krankheitsrelevanter Gene inhibiert werden sollte. Dabei erwiesen sich die Oligonukleotide in der Regel als gut verträglich, jedoch blieb deren therapeutischer Effekt hinter den Erwartungen zurück.

Neuen Aufschwung gewann das Arbeitsgebiet der Nukleinsäure-Forschung im Jahre 1998 durch die Entdeckung des natürlichen Mechanismus der RNAi durch Mello und Fire, die erstmalig zeigten, dass die Expression eines Zielgens im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* sequenzspezifisch durch die Einführung sequenzhomologer doppelsträngiger RNA (dsRNA) inhibiert werden kann [13]. Für diese Entdeckung wurden die beiden Wissenschaftler 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Historisch gesehen liegt die Entdeckung der ersten endogen-kodierten regulatorischen RNA, die den Mechanismus der RNAi ausnutzt, sogar noch vor dessen Entdeckung. Denn bereits 1993 zeigten Lee *et al.*, dass das Gen lin-4 eine kleine RNA kodiert, die mehrere komplementäre Sequenzen in der 3' untranslatierten Region (3'-UTR) der lin-14 mRNA besitzt und die Proteinmenge von lin-14 reguliert, ohne das mRNA-Niveau zu verändern [14]. Kurze Zeit nach der Entdeckung der RNAi beschrieben dann zeitgleich mehrere Arbeitsgruppen, dass der Mechanismus der RNAi von verschiedensten endogen-kodierten regulatorischen RNAs genutzt wird [15–18], die aufgrund ihrer Kürze unter dem Oberbegriff der *micro* RNAs (miRNAs) zusammengefasst wurden.

Zunächst konnte der Mechanismus der RNAi nur in niederen Eukaryoten für die spezifische Inhibition von Zielgenen ausgenutzt werden, da die Einführung langer dsRNA in Säugerzellen unweigerlich zur Auslösung einer Immunantwort führt. Die Hoffnung auf eine therapeutische Anwendung der RNAi in Säugerzellen erfüllte sich durch die wegweisende Entdeckung, dass synthetisch generierte siRNA-Duplexe von 19-23 nt Länge die sequenzspezifische Inhibition der Expression eines Zielgens in Säugerzellen ermöglichen, ohne dabei eine Immunantwort auszulösen [19, 20]. Seitdem hat sich die RNAi innerhalb weniger Jahre zu einem molekularbiologischen Grundwerkzeug für funktionelle Genomanalysen sowie für die Identifikation von krankheitsrelevanten Genen entwickelt. Gemessen an der Anzahl der seit ihrer Entdeckung erschienenen Publikationen ist die RNAi eines der dynamischsten Arbeitsgebiete in der Biologie.

Im Folgenden werden die Mechanismen der in dieser Arbeit verwendeten Nukleinsäure-Wirkstoffe asON, siRNA und miRNA genauer vorgestellt. Sowohl die asON-vermittelte Gensuppression (Abschnitt 1.1.1) als auch die von siRNAs und miRNAs genutzte RNAi-vermittelte Gensuppression (Abschnitt 1.1.2) unterbrechen den natürlichen Fluss der Genexpression auf der mRNA-Ebene.

1.1.1 *Antisense* Oligonukleotid-vermittelte Gensuppression

Ein asON ist ein einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid von ca. 20 nt Länge, das komplementär zu seiner Ziel-mRNA ist. Die Hybridisierung des asON an seine Ziel-mRNA führt über verschiedene Mechanismen zu einer sequenzspezifischen Inhibition der Translation dieser mRNA (Abbildung 1.2). Der natürliche Fluss der Genexpression von der Transkription, über die Prozessierung der mRNA bis hin zu deren Translation, kann durch asONs sowohl im Zytosol als auch bereits im Zellkern unterbrochen werden. Dabei ist zu beachten, dass asONs im natürlichen Organismus nicht vorkommen und deshalb exogen in die Zelle eingebracht werden müssen.

Wird ein asON in das Zytosol eingebracht, führt die Hybrisierung mit seiner Ziel-mRNA zur Aktivierung der RNase H. Die RNase H ist eine zelluläre Endoribonuklease, die normalerweise an der Entfernung von RNA-Primern bei der DNA-Replikation beteiligt ist. Mitglieder der RNase H-Familie existieren in nahezu allen Organismen, vom Archaebakterium über Prokaryoten bis hin zu Eukaryoten. Die RNase H erkennt Hybride aus einer einzelsträngigen DNA und einer einzelsträngigen RNA und spaltet die RNA-Komponente einer solchen Heteroduplex. Diese enzymatische

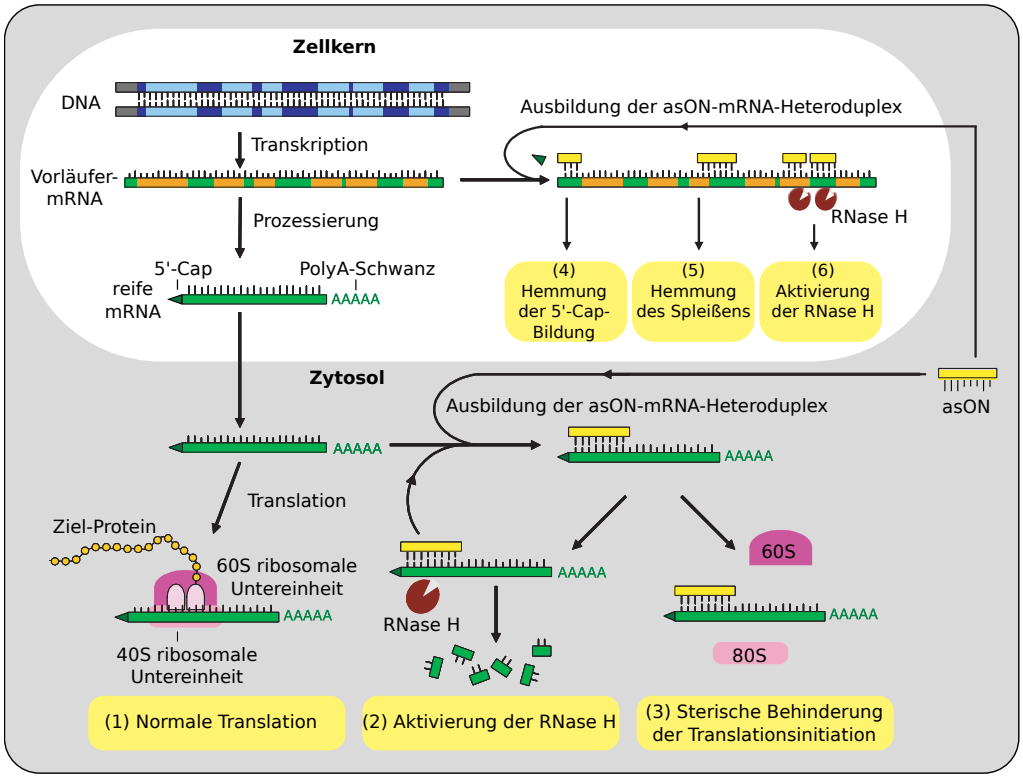


Abbildung 1.2: Wirkmechanismen der asON-vermittelten Gensuppression. (1) In Abwesenheit eines asON findet normale Gen- sowie Proteinexpresssion statt. Wird ein asON in die Zelle eingebracht, kann es im Zytosol mit seiner Ziel-mRNA hybridisieren. Die Ausbildung der asON/mRNA-Heteroduplex induziert entweder die Aktivierung RNase H (2) und somit den selektiven Abbau der gebundenen mRNA, oder führt zu einer sterischen Beeinträchtigung beim Zusammenbau der ribosomalen Untereinheiten (3). Alternativ kann ein asON in den Zellkern gelangen und dort die Reifung der Vorläufer-mRNA durch Hemmung der 5'-Cap-Bildung (4), durch Hemmung des mRNA-Spleißens (5) oder durch die Aktivierung der RNase H (6) beeinträchtigen. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach Chan *et al.* [4].

Eigenschaft nutzen synthetische asONs um die sequenzspezifische Degradation ihrer Ziel-mRNA zu induzieren. Weiterhin kann die Bindung eines asON an seine Ziel-mRNA die Ausbildung translationkompetenter Komplexe sterisch beeinträchtigen.

Wird ein asON in den Zellkern eingebracht, kann es die Reifung der Vorläufer-mRNA durch Hemmung der Ausbildung der 5'-Cap-Struktur, durch Inhibition des mRNA-Spleißens sowie ebenfalls durch Aktivierung der RNase H beeinträchtigen. Genauso wie die sequenzspezifische Degradation bzw. die Inhibition der Translationsinitiation führen auch diese Mechanismen zur Reduktion der Menge des normalerweise von der Ziel-mRNA translatierten Proteins. Obwohl sowohl in nukleären als auch in zytosolischen Extrakten von Säugerzellen RNase H-Aktivität nachgewiesen wurde [21, 22], wird nach bisherigem Erkenntnisstand davon ausgegangen, dass die asON-vermittelte RNase H-abhängige Spaltung einer Ziel-mRNA überwiegend im Zellkern stattfindet.

Die Effektivität mit der ein asON seine Ziel-mRNA erkennt, ist stark von thermodynamischen Parametern sowie von der Zugänglichkeit der lokalen Zielregion der Ziel-mRNA abhängig [23, 24]. Neben der experimentellen Strukturbestimmung kann die Zugänglichkeit einer Ziel-mRNA mit Hilfe von computergestützten Analysen untersucht werden und die Sequenz des asON aus als zugänglich vorhergesagten Bereichen der Ziel-mRNA abgeleitet werden [4, 25]. Im Speziellen gilt, dass die Zielsequenz eines asON innerhalb eines Sequenzabschnittes liegen sollte, der Segmente von mehr als 10 konsekutiv ungepaarten Nukleotiden aufweist, die nicht an intramolekularen Wechselwirkungen beteiligt und möglichst strukturlos sind [23].

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Effektivität eines asON ist dessen Stabilität. Unmodifizierte asONs werden in biologischen Flüssigkeiten, wie z.B. Blut, innerhalb kurzer Zeit von Nukleasen abgebaut. Um ihre Wirkung am Zielort entfalten zu können, müssen asONs deshalb durch chemische Modifikationen davor geschützt werden. Die chemischen Modifikationen von Oligonukleotiden wurden in den letzten Jahren stetig weiterentwickelt, so dass sie chronologisch in drei Generationen unterteilt werden können (Abbildung 1.3).

Die erste Generation von modifizierten asONs weist in ihrem Rückgrat eine Phosphorothioat (PS)-Modifikation auf. Die Einführung dieser Modifikation erhöht deren Resistenz gegenüber nukleolytischer Degradation und verbessert deren Bioverfügbarkeit. PS-modifizierte asONs behalten die Fähigkeit nach Bindung an ihre Ziel-mRNA die RNase H zu induzieren, weisen aber aufgrund der Verringerung der Schmelztemperatur des DNA-RNA-Hybrides um ca. $0,5°C$ pro Nukleotid [26] im Vergleich zu unmodifizierten asONs eine geringere Affinität zu ihrer Ziel-mRNA auf. Ausserdem interagieren PS-modifizierte asONs mit der Zelloberfläche und binden an verschiedene Proteine [27]. Dadurch werden zwar die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert, da die PS-modifizierten asON länger im Blutstrom verbleiben, es entstehen aber auch unspezifische Nebenwirkungen. Dennoch sind PS-modizierte asONs noch immer die in der Forschung am häufigsten verwendeten asONs und auch der bisher einzige klinisch-angewandte asON-Wirkstoff Vitravene® (Fomivirsen, Isis/Ciba Vision) trägt diese Modifikation [28].

Die zweite Generation von modifizierten asONs trägt Substituenten an der 2'-OH-Gruppe der Ribose. Die am weitesten verbreitete Modifikation ist die 2'-O-Methyl (OMe)-Modifikation [29]. OMe-modifizierte asONs sind weniger toxisch als die Phosphorothioate und besitzen eine verstärkte Bindungsaffinität zu ihrer Ziel-mRNA. Durch die funktionelle Gruppe an der Ribose werden sie jedoch von der RNase H nicht mehr als Substrat erkannt [30]. Um diese Einschränkung der asON-vermittelten Gensuppression auf RNase H-unabhängige Mechanismen zu umgehen, wurden so

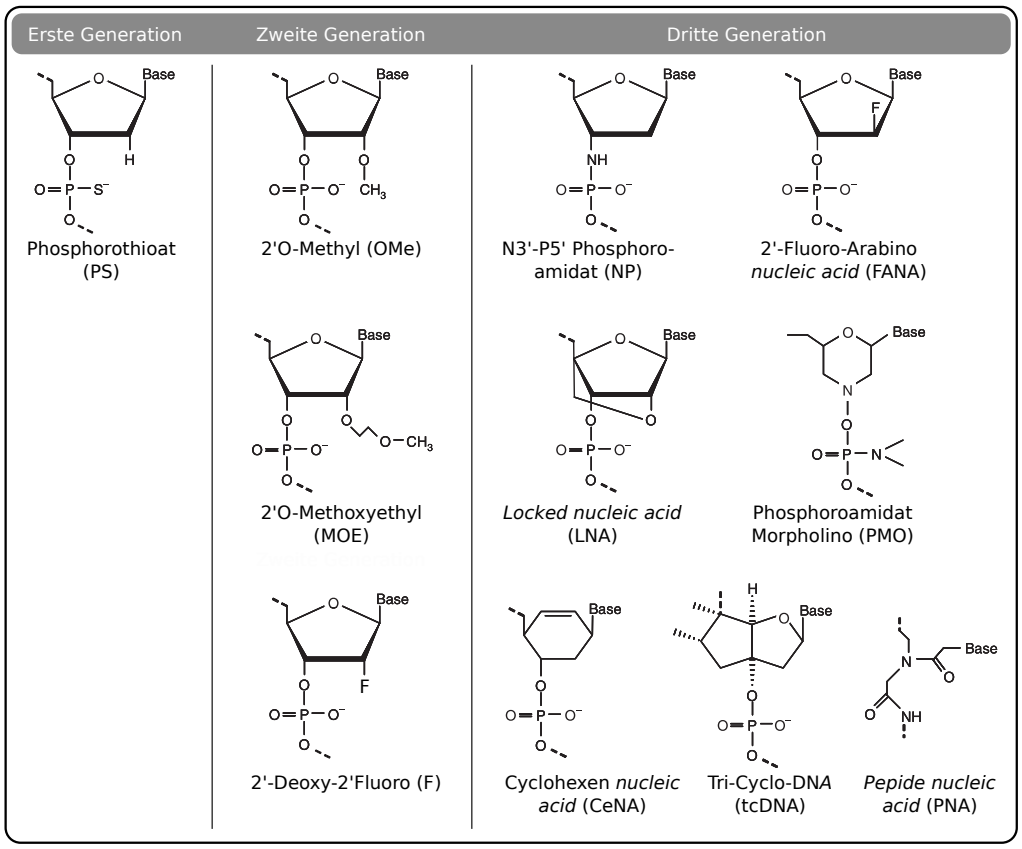


Abbildung 1.3: Chemische Modifikationen von Oligonukleotiden. Diese können in 3 Generationen unterteilt werden. Die erste Genration weist ein modifiziertes Rückgrat auf. Die zweite Genration trägt Substituenten an der 2'OH-Gruppe der Ribose. Die dritte Gruppe zeigt Modifikationen an der Position des Zucker-Ringes. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach Chan *et al.* [4].

genannte Gapmere entwickelt. Diese weisen einen zentralen Bereich von ca. 10 PS-modifizierten Nukleotiden auf, der am 3'- und 5'-Ende durch jeweils 4 – 5 OMe-modifizierte Nukleotide flankiert wird. Während die flankierenden Bereiche die Nuklease-Resistenz des asON erhöhen, ermöglicht der zentrale Bereich weiterhin die RNase H-abhängige mRNA-Spaltung.

Die dritte Generation von modifizierten asONs zeigt Modifikationen an der Position des Zuckers-Ringes. Darunter sind *peptide nucleic acids* (PNAs), *locked nucleic acids* (LNAs) und Phosphoroamidat Morpholino Oligomere (PMOs) die am besten untersuchten asONs der dritten Generation [27]. PNAs weisen anstelle eines Phosphodiester-Rückgrates ein Pseudopeptid-Rückgrat auf. Diese nicht-geladenen Nukleotid-Analoga können sowohl komplementäre DNA als auch RNA mit einer verbesserten Spezifität und Affinität binden und werden in biologischen Flüssigkeiten weder von Nukleasen noch von Peptidasen erkannt. Jedoch werden sie auch nicht als RNase H-Substrat erkannt, so dass PNAs ihre Ziel-mRNA nur durch die sterische Beeinträchtigung der Translationmaschinerie inhibieren können. Die gleichen Eigenschaften gelten auch für die PMOs, deren Ribose-Ring durch einen Morpholino-Ring und deren Phosphodiester-Rückgrat durch ein ungeladenes Phosphodiamidat-Rückgrat ersetzt wurden. In LNAs ist das 2'-Sauerstoffatom mit dem 4'-

Kohlenstoffatom durch eine Methylenbrücke verknüpft. Die dadurch konformationell-eingefrorenen Nukleotid-Analoga zeichnen sich durch eine sehr große Hybridisierungsaffinität gegenüber RNA und DNA sowie durch hohe Nukleaseresistenzen aus. Als Gapmere ermöglichen sie auch die RNase H-abhängige Spaltung ihrer Ziel-mRNA.

Neben der Anwendung von asON-Wirkstoffen zur therapeutischen Gensuppression, gewinnen asONs im Zuge der Entdeckung und Aufklärung des Mechanismus der RNAi auch als molekularbiologisches Werkzeug wieder an Interesse. Denn ähnlich wie die RNAi unterbrechen sie den natürlichen Fluss der Genexpression auf der mRNA-Ebene, nutzen dafür aber einen von der RNAi unabhängigen Mechanismus, der hauptsächlich über die Aktivierung der RNase H verläuft. Deshalb können asONs für den *knock down* von potentiell an der RNAi beteiligten Proteinen verwendet werden, so dass anhand der entstehenden Phänotypen zum einen die Funktion und zum anderen das Ausmaß der Beteiligung dieser Proteine an der Effizienz der RNAi untersucht werden kann, ohne dabei sequenzunabhängig mit dem Mechanismus der RNAi zu interferieren.

1.1.2 RNA-Interferenz-vermittelte Gensuppression

Die RNAi ist ein post-transkriptionell ansetzender genregulatorischer Prozess, der sowohl in Pilzen und Pflanzen als auch in Säugetieren existiert. In all diesen Organismen wird lange dsRNA als Auslöser für die sequenzspezifische Degradation einer homologen mRNA-Sequenz verwendet. Dieser Mechanismus ermöglicht die sequenzspezifische Inhibition prinzipiell aller Gene des Genoms, wodurch er wichtige Funktionen im Bereich der Entwicklung, der Proliferation, der Hämatopoese und der Apoptose einnimmt [31–36]. Mechanistisch lässt sich die RNAi in die siRNA- und die miRNA-vermittelte RNAi unterteilen (Abbildung 1.4).

Die siRNA-vermittelte RNAi beginnt mit der Spaltung langer dsRNA durch den Dicer-Komplex [37]. Der Dicer-Komplex enthält neben dem RNase Typ III Enzym Dicer auch noch die Endonuklease Ago2, das TAR RNA-bindende Protein (TRBP) und/oder den Protein-Kinase R *activator* (PACT) [38]. Die aus der Spaltung resultierenden Fragmente von 19 – 23 nt Länge werden als siRNA bezeichnet. Sie tragen am 3'-Ende beider Stränge einen Überhang von 2 nt und am 5'-Ende eine Phosphatgruppe [39]. Als Dicer-Substrate können sowohl lineare dsRNA als auch *short hairpin* RNA (shRNA) dienen [40]. Alternativ kann synthetische siRNA exogen in die Zelle eingebracht werden. Die siRNA wird als Doppelstrang in den RNA *induced silencing complex* (RISC) eingebaut, dessen katalytische Komponente Ago2 bildet [41, 42]. Der *sense* (oder *passenger*) Strang der siRNA wird durch Ago2 gespalten und aus dem RISC entfernt [43, 44]. Der nun aktivierte, mit dem *antisense* (oder *guide*) Strang der siRNA beladene RISC bindet die Ziel-mRNA. Bei perfekter Komplementarität zwischen *antisense* Strang der siRNA und der Ziel-mRNA induziert Ago2 die endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA. Die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt spezifisch zwischen dem 10. und 11. nt gemessen vom 5'-Ende der gebundenen *antisense* RNA [45]. Die Inhibition der Genexpression über die sequenzspezifische Spaltung einer Ziel-mRNA gilt als besonders effizient, da die Ago2-vermittelte Spaltung der Ziel-mRNA zu einer direkten nukleolytischen Degradation der Ziel-mRNA und der damit verbundenen Freisetzung des RISC führt. Der *antisense* Strang verbleibt dabei im RISC, so dass dieser eine weitere Ziel-mRNA binden und deren Spaltung katalysieren kann [46].

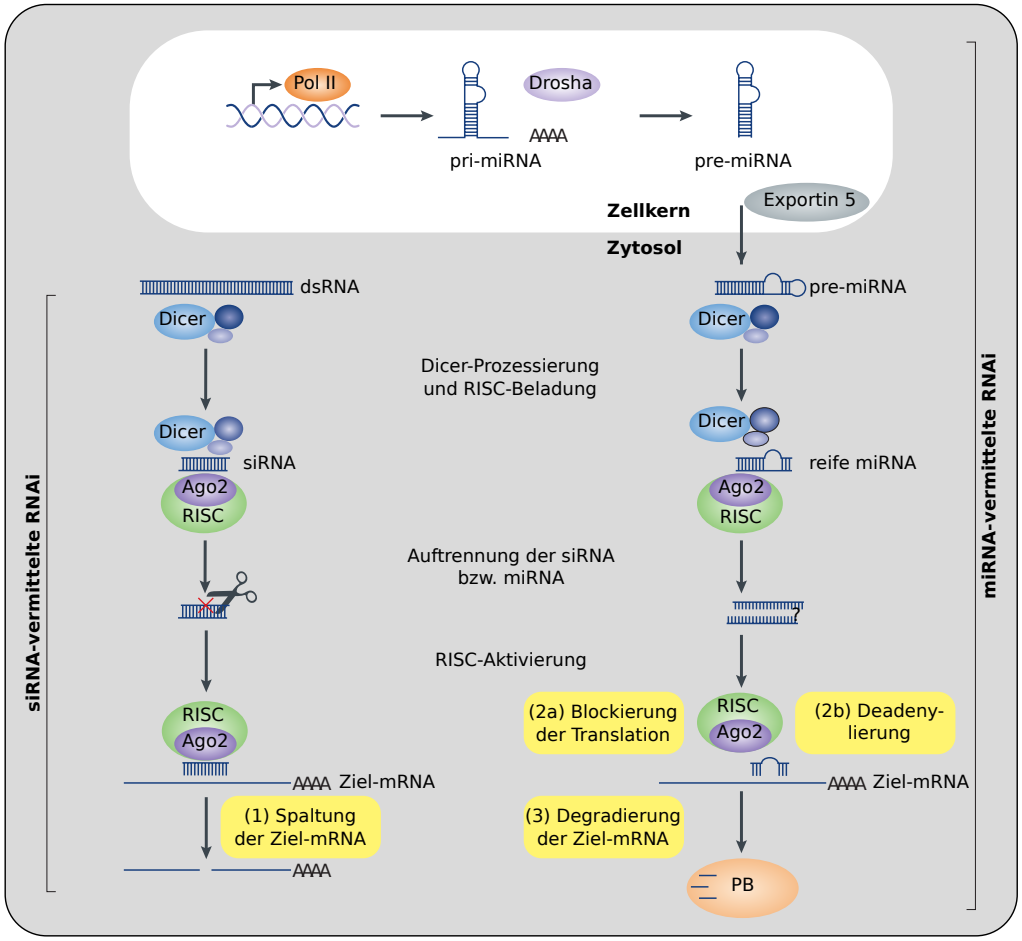


Abbildung 1.4: Wirkmechanismen der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi. Die zu ihrer Ziel-mRNA vollständig komplementären siRNAs induzieren die direkte sequenzspezifische Spaltung der Ziel-mRNA (1). Dagegen sind miRNAs nur partiell komplementär zu ihrer Ziel-mRNA, so dass die Ziel-mRNA vor der direkten Ago2-vermittelten Spaltung bewahrt wird. Es wird darüber spekuliert, dass miRNAs stattdessen die Ausbildung translationkompetenter Komplexe blockieren (2a) oder die Deadenylierung des PolyA-Schwanzes der Ziel-mRNA stimulieren (2b). In beiden Fällen schließt sich die sequenz-unabhängige Degradation der Ziel-mRNA in den *processing bodies* (PBs) an (3). Weitere Erläuterungen befinden sich im Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach Fougerolles *et al.* [47].

Die miRNA-vermittelte RNAi beginnt mit der Transkription endogen kodierter, primärer miRNA (pri-miRNA) durch die RNA-Polymerase II (Pol II). Die pri-miRNA wird durch das RNase Typ III Enzym Drosha zur so genannten *precursor* miRNA (pre-miRNA) prozessiert. Die pre-miRNA wird anschließend in einem RanGTP-abhängigen Prozess durch Exportin 5 in das Zytosol transportiert und auf den Dicer-Komplex übertragen [48, 49]. Dies führt zur abschließenden Prozessierung der pre-miRNA zur reifen miRNA. Die reife, doppelsträngige miRNA weist häufig interne, ungepaarte Bereiche auf, so dass sie von Ago2 nicht als Substrat erkannt wird. Die Auftrennung des *sense* und des *antisense* Stranges der miRNA erfolgt durch eine bisher nicht identifizierte Helikase [50, 51]. Der *antisense* Strang wird daraufhin in den RISC geladen, was zur RISC-Aktivierung und Bindung der Ziel-mRNA führt. Die Erkennungssequenz des *antisense* Stranges der miRNA liegt in der Regel im 3'-UTR der Ziel-mRNA und ist nur partiell komplementär zum *antisense*

Strang der miRNA. Sowohl in Laborversuchen als auch mit Hilfe computergestützter Analysen wurde gezeigt, dass eine perfekte Komplementarität von nur 6 – 7 nt im 5'-Bereich des *antisense* Stranges der miRNA zur Erkennung der Ziel-mRNA führt. Dieser als *seed* bezeichnete Bereich beginnt am 2. und endet am 7. bzw. 8. nt gemessen vom 5'-Ende *antisense* Stranges der miRNA [52, 53]. Die Mechanismen, die zur miRNA-vermittelten Translationsinhibition einer Ziel-mRNA führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Es wird jedoch über die Inhibition der Ausbildung translationkompetenter Komplexe sowie über die Entfernung des PolyA-Schwanzes (Deadenylierung) spekuliert. In beiden Fällen wird die Ziel-mRNA zu so genanten *processing bodies* (PBs) transportiert und dort gespeichert oder sequenz-unabhängig degradiert [54–56].

Der endogene Weg der RNAi kann für therapeutische Zwecke durch zweierlei Strategien ausgenutzt werden. Die erste Strategie beinhaltet die Expression von shRNAs oder miRNAs mit Hilfe von viralen Vektoren und kann mit einer einzigen Applikation einen Langzeiteffekt auslösen. Allerdings stellt die Einschleusung von RNA-kodierenden Sequenzen einen sehr aufwendigen und mit hohen Risiken verbundenen gentherapeutischen Ansatz dar. Trotz der wohl überlegten Auswahl der für den Gentransfer verwendeten Vektoren kam es bei Probanden innerhalb klinischer Studien in der Vergangenheit zu fatalen Immunantworten bis hin zum septischen Schock [57] oder zu Insertionsmutagenesen, die zu Leukämien führten [58]. Deshalb erscheint die zweite Strategie, die zelluläre Einschleusung synthetischer siRNAs, der weitaus attraktivere Ansatz zu sein. Die intrazellulär als Dicer-Produkt erkannten siRNAs umgehen die frühen Stadien der RNAi und können direkt in den RISC geladen werden. Damit werden mögliche Interferenzen mit den genregulatorischen Prozessen der endogen-kodierten miRNAs umgangen. Hinzu kommt, dass siRNAs durch ihre vollständige Komplementarität zur Ziel-mRNA eine weitaus größere Spezifität als die endogen vorkommenden miRNAs aufweisen. Dies macht siRNAs zu einer Klasse von Nukleinsäure-Wirkstoffen mit einem großen Potential zur therapeutischen Anwendung. Die drei wichtigsten Parameter für den Entwurf und die Auswahl potentieller siRNA-Therapeutika sind die Effizienz der Ziel-mRNA-Inhibition, die Nukleaseresistenz der siRNA sowie die Spezifität der siRNA für ihre Ziel-mRNA. Die Möglichkeit, durch Einführung chemischer Modifikationen, diese drei Parameter optimieren zu können [59], stellt einen weiteren ausschlaggebenden Vorteil synthetischer siRNAs gegenüber der endogenen Promotor-getriebenen Expression von shRNAs und miRNAs dar.

Die Effizienz einer siRNA wird durch die siRNA-Konzentration, die zur effizienten Inhibition der Ziel-RNA benötigt wird, sowie durch die Dauer des RNAi-Effektes charakterisiert. Die siRNA-Effizienz wird darüber hinaus durch die strukturelle Zugänglichkeit der Ziel-mRNA bestimmt. Der aktivierte, mit dem *antisense* Strang einer siRNA beladene RISC spaltet strukturell zugängliche Ziel-mRNA-Bereiche mit einer größeren Effizienz als mRNA-Bereiche, die aufgrund ihrer Sekundärstruktur weniger gut zugänglich sind [60, 61]. Dies ist vergleichbar zu asONs (Abschnitt 1.1.1), so dass die für den computergestützten Entwurf von asONs entwickelten Algorithmen den Kriterien potenter siRNAs angepasst werden konnten [62, 63]. Weiterhin sollte die Zielregion einer siRNA auch nicht innerhalb bekannter Proteinbindungsstellen einer mRNA liegen, da die Bindung regulatorischer Proteine die Interaktion einer siRNA mit ihrer Ziel-mRNA blockieren könnte [64]. Auch die Nukleotidzusammensetzung einer siRNA beeinflusst ihre Effizienz und sollte, wenn möglich, nicht mehr als 50 % Guanosine bzw. Cytosine aufweisen [63, 65]. Ausserdem wird die siRNA-Effizienz durch die Effektivität der RISC-Beladung beeinflusst, wofür die Thermostabilität der 5'-Enden des siRNA-Doppelstranges entscheidend ist. Der Strang, dessen 5'-Ende eine geringere

Thermostabilität aufweist, wird als *antisense* Strang in den RISC geladen [66, 67]. Die Thermostabilität am 5'-Ende des *antisense* Stranges im Vergleich zu der des *sense* Stranges bestimmt die Wahrscheinlichkeit, mit der die *antisense* RNA als spaltungsaktiver Strang in den RISC eingebaut wird und sollte deshalb beim Entwurf einer siRNA berücksichtig werden [67]. Darüber hinaus kann die Beladung des RISC mit dem *sense* Strang durch Blockierung der 5'-Phosphorylierung des *sense* Stranges verhindert werden. Eine größere Anzahl *antisense* RNA-beladener RISC erhöht die siRNA-Effizienz und verringert unspezifische, durch die *sense* RNA induzierte Effekte [63, 66, 68].

Unmodifizierte siRNAs werden im humanen Plasma innerhalb weniger Minuten degradiert [69, 70]. Für die Verbesserung der Nukleaseresistenz einer siRNA können vergleichbare chemische Modifikationen wie für asONs verwendet werden (Abschnitt 1.1.1). Allerdings gilt es zu beachten, dass die eingeführten chemischen Modifikationen die Beladung der siRNA in den RISC nicht unterbinden dürfen. Deshalb verbleibt der zentrale Bereich einer siRNA in der Regel unmodifiziert, wobei chemische Modifikationen in den flankierenden Bereichen die Nukleaseresistenz der siRNA verbessern. Beispielsweise führt das Einführen von PS-Internukleotid-Verknüpfungen an den 3'-Ende der siRNA zu einer verbesserten Exonuklease-Resistenz, jedoch erhöht sich mit der Anzahl der eingeführten PS-Internukleotidverknüpfungen die Zytotoxizität der siRNA [71, 72] aufgrund der bereits beschriebenen unspezifischen Interaktion von Phosphorotioaten mit Polyanionbindenden Proteinen. Die Endonuklease-Resistenz einer siRNA kann durch das Einführen einzelner 2'-Ribose-Modifikationen, wie z.B. der OMe-Modifikation, verbessert werden [71, 73]. Weiterhin wurde auch gezeigt, dass das Einführen von LNA-Modifikationen in den 3'-Überhang von einem oder beiden siRNA-Strängen die *in vivo* Halbwertszeit einer siRNA steigern kann [74].

Die hohe Spezifität der siRNA-vermittelten RNAi konnte durch die Inhibition von Allelen gezeigt werden, die einen Einzelnukleotid-Polymorphismus aufweisen [75]. Dennoch können siRNAs auch mit mRNAs interferieren, die nur teilweise Homologien zu deren Ziel-mRNAs aufweisen, wie z.B. über die *seed*-Regionen von miRNA-regulierten mRNAs. Dieses Phänomen wird als *off-target* Effekt bezeichnet. Diese unspezifischen Effekte können durch detaillierte Proteomik-Analysen bei der Auswahl einer siRNA-Sequenz, durch Verkürzung der siRNA sowie durch Einführen chemischer Modifikationen im *antisense* Strang der siRNA aufgehoben werden. Weiterhin gilt es zu vermeiden, dass durch die siRNA-Einschleusung das angeborene Immunsystem aktiviert wird. Beispielsweise zeigten Robins *et al.*, dass durch eine einzelne OMe-Modifikation im *sense* Strang der siRNA die Aktivierung von *Toll-like* Rezeptoren sowie die Stimulation einer Typ I Interferon-Antwort unterdrückt werden konnten, ohne dabei die Inhibtion der Ziel-mRNA signifikant zu beeinflussen [76].

1.2 Zelluläre Einschleusung von siRNA-Wirkstoffen

Eine zentrale Herausforderung aller intrazellulär-wirkenden Nukleinsäure-Wirkstoffe ist deren effizienter Transport an den Wirkort. Herkömmliche niedermolekulare Wirkstoffe werden nach den Lipinski-Regeln entworfen, so dass sie meist sehr lipophil sind und ein Molekulargewicht von weniger als 500 Da aufweisen [77]. Dies ermöglicht ihnen durch die Zellmembran zu diffundieren und ihren intrazellulären Wirkort barrierefrei zu erreichen. Im Gegensatz dazu sind siRNAs nicht nur weitaus größer ($\geq$ 10 kDa), sie weisen aufgrund ihres Phosphat-Rückgrats auch eine Vielzahl anionischer Ladungen auf, die sie zu einem extrem geladenen und hydrophilen Molekül machen.

Deshalb sind siRNAs nicht membrangängig, so dass die Entwicklung effizienter Einschleusungsstrategien von zentraler Bedeutung für deren wirkungsvolle Anwendung ist.

In diesem Abschnitt sollen zunächst ausgewählte Formen der siRNA-Einschleusung vorgestellt werden (Abschnitt 1.2.1). Diese nutzen, mit Ausnahme der physikalischen Methoden Elektroporation und Mikroinjektion, verschiedene Schritte der natürlichen endozytotischen Aufnahmewege, die in Abschnitt 1.2.2 näher erläutert werden sollen. Im Anschluss soll die in dieser Arbeit untersuchte, neuartige Form der zellulären siRNA-Einschleusung vorgestellt werden, die auf der Stimulation der Caveolin-abhängigen Endozytose durch PS-modifizierte Oligonukleotide (PS-ONs) basiert (Abschnitt 1.2.3).

1.2.1 Ausgewählte Formen der Einschleusung von siRNA-Wirkstoffen

Damit chemisch synthetisierte siRNAs für die Inhibitionen der Expression eines Zielgens den natürlichen Mechanismus der RNAi nutzen können, müssen die siRNAs erfolgreich in die Zielzelle eingeschleust werden. Daher wurden in den vergangenen Jahren vielfältige Methoden zur zellulären siRNA-Einschleusung entwickelt, von denen eine Auswahl in Abbildung 1.5 dargestellt ist.

Die Spontanaufnahme von nicht-komplexierter und deshalb als 'nackt' bezeichneter siRNA erfolgt in einigen Geweben, wie dem Auge, der Lunge und dem zentralen Nervensystem [47]. Deshalb fokussierte sich die Entwicklung der ersten potentiellen siRNA-basierten Therapeutika auf die lokale Injektion von siRNAs in diese Gewebe. Ein Beispiel ist die intravitreale Injektion von *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-gerichteter siRNA zur Unterdrückung der Neovaskularisieung

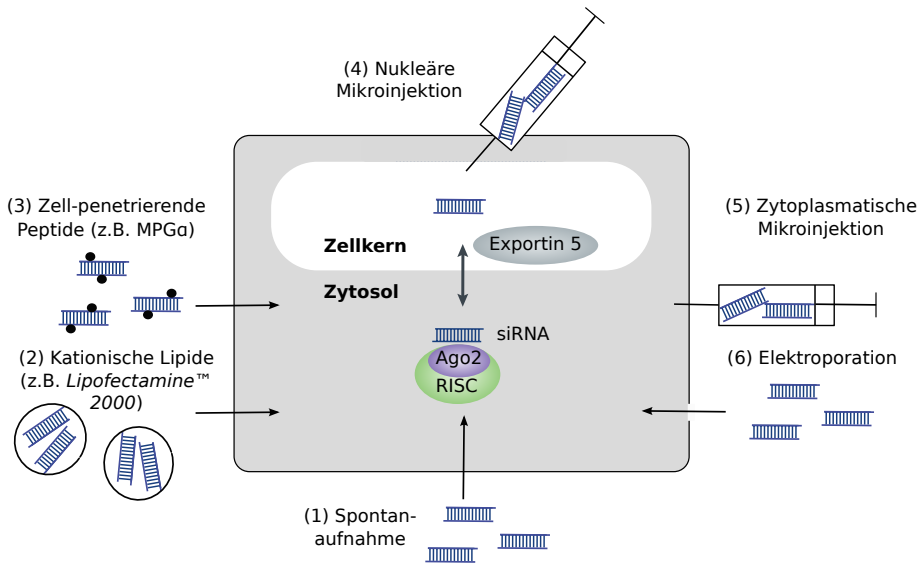


Abbildung 1.5: Ausgewählte Verfahren zur zellulären Einschleusung synthetischer siRNAs. Um den natürlichen Mechanismus der RNAi nutzen zu können, müssen die siRNAs in das Zytosol ihrer Zielzelle transportiert werden, wo sie dann in den RISC geladen werden können. Die Spontanaufnahme von siRNA (1) sowie die siRNA-Transfektion mit Hilfe von kationischen Lipiden (2) oder Zell-penetrierenden Peptiden (3) induzieren die endozytotische siRNA-Einschleusung in die Säugerzelle. Die physikalischen siRNA-Einschleusungsverfahren Mikroinjektion (4 und 5) und Elektroporation (6) sind dagegen unabhängig von zellulären Organellen. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

bei der altersabhängigen Makuladegeneration [78, 79]. Es ist bisher nicht verstanden, warum einige Zelltypen, und andere nicht, siRNAs spontan in ihr Zytosol internalisieren. Insgesamt handelt es sich bei der siRNA-Spontanaufnahme zwar um ein sehr einfaches und kostengünstiges, leider aber auch um ein sehr ineffizientes Verfahren zur siRNA-Einschleusung [80].

Kationische Lipide können durch elektrostatische Wechselwirkungen mit siRNAs ungeladene, amorphe Komplexe ausbilden, die als Lipoplexe bezeichnet werden. Diese ermöglichen die endozytotische siRNA-Einschleusung und schützen die siRNAs vor dem Angriff zellulärer Nukleasen. Die meisten kommerziell erhältlichen Lipid-basierten Transfektionsreagenzien, z.B. *Lipofectamine™ 2000*, setzen sich aus verschiedenen kationischen Lipiden und so genannten Helferlipiden, wie dem Cholesterol, zusammen [81, 82]. Die Transfektionseffizienz dieser Lipoplexe wird durch die Proportionen der Einzelkomponenten, die Struktur der Kopfgruppe der kationischen Lipide, das Ladungsverhältnis der kationischen Lipide zu ihren Helferlipiden, sowie durch die Größe der Lipoplexe bestimmt [83, 84]. Die zelluläre siRNA-Einschleusung mit Hilfe kationischer Lipide ist in Zellkulturversuchen mit einer sehr hohen Transfektionseffizienz verbunden, im Hinblick auf *in vivo* Anwendungen ist sie aber einer Vielzahl vom Problemen ausgesetzt. Zum einen stellen die elektrostatischen Interaktionen zwischen siRNAs und kationischen Lipiden einen relativ unkontrollierten Prozess dar, der zur Ausbildung von sehr großen und sehr instabilen siRNA/Lipid-Komplexen führen kann [85]. Zum anderen interagieren kationische Lipide mit Serumproteinen, Lipoproteinen, Heparin und Glykosaminoglykanen in der extrazellulären Matrix, was zur Aggregation oder Freisetzung der siRNAs führt, bevor sie ihre Zielzellen erreichen [86]. Um dies zu verhindern, wurden Lipoplexe entwickelt, die mit Polyethylenglykol umhüllt sind. Dies verbessert zwar die Zirkulationsdauer sowie die Stabilität der Komplexe, ist jedoch auch mit einer Einschränkung der Transfektionseffienz verbunden [87]. Trotz erster Erfolge der Lipoplex-vermittelten siRNA-Einschleusung in Mäusen [88], Primaten [89] und Meerschweinen [90] muss an der Sicherheit und Stabilität dieser Methodik weiterhin gearbeitet werden. Ausserdem zeigten sich einige Zelltypen, wie Lymphozyten, resistent gegenüber der Lipoplex-vermittelten siRNA-Einschleusung [47].

Zellpenetrierende Peptide sind kurze, ca. 30 Aminosäuren lange Peptide, die in der Lage sind die Zellmembran Rezeptor-unabhängig zu durchdringen. Sie können durch kovalente Konjugation oder durch Komplexierung zur zellulären Einschleusung von siRNA verwendet werden [91, 92]. Der genaue Mechanismus ihrer Aufnahme ist bisher nicht vollständig verstanden, jedoch ist die Endozytose der vorherrschende Weg, der für die stark kationischen Peptide beobachtet wurde [93, 94]. In zahlreichen *in vitro* Studien wurde das Potential derartiger Peptide, wie zum Beispiel MPG [95], Penetratin [96] und Cholesteryl-Oligo-D-Argenin [97], zur zellulären Einschleusung nicht-kovalent gebundener siRNAs bereits getestet. Im Hinblick auf *in vivo* Anwendungen muss aber auch hier noch an der Effizienz der zellulären Einschleusung sowie der Stabilität der gebildeten siRNA/Peptid-Komplexe gearbeitet werden.

Die Mikroinjektion ermöglicht das gezielte Einschleusen von siRNAs in den Zellkern oder das Zytosol mit Hilfe von feinsten Glaskanülen [98, 99]. Im Gegensatz zur siRNA-Spontanaufnahme bzw. zur siRNA-Transfektion mit Hilfe von kationischen Lipiden oder zellpenetrierenden Peptiden hat dieses Einschlesungsverfahren den Vorteil, dass es unabhängig von zellulären Organellen ist und die Einschleusung einer definierten Anzahl von siRNA-Molekülen in das Zytosol oder den Zellkern ermöglicht. Dies macht die Mikroinjektion zu einem für Forschungszwecke sehr gut geeigneten Verfahren. Beispielsweise ermöglichte die nukleäre Mikroinjektion Fluoreszenz-markierter siRNAs

die Beobachtung, dass siRNA aktiv, mit Hilfe von Exportin 5, aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert werden kann. Jedoch ist diese Methode nur sehr schwer auf eine Anwendung im Gewebe bzw. Organismus übertragbar.

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch Anlegen eines pulsartigen elektrischen Feldes permeabilisiert [100], so dass die siRNAs das Zytosol der Zelle durch einfache Diffusion erreichen können. Die Elektroporation ist ein sehr effizientes siRNA-Einschleusungsverfahren und ebenfalls unabhängig von zellulären Organellen. Die Elektroporation ermöglicht zwar das Einschleusen von siRNAs in Zellen und Geweben [101, 102], jedoch ist die Anwendung auf die dem elektrischen Feld ausgesetzten Bereiche eingeschränkt. Weiterhin muss die Stärke des angelegten elektrischen Feldes genauestens an den Zelltyp oder das Gewebe angepasst werden, da dieses Einschleusungsverfahren ansonsten mit einer erheblichen Zytotoxizität verbunden ist.

Weitere in Abbildung 1.5 nicht aufgeführte und eher aufwendige siRNA-Einschleusungsverfahren beinhalten die Konjugation von siRNA an Antikörper [103, 104], Aptamere [105] oder Lipide [106, 107] sowie die Komplexierung von siRNA mit kationischen Polymeren, wie Polyethylenimin [108, 109] oder Atelokollagen [110]. Auch diese Verfahren nutzen hauptsächlich die natürlichen endozytotischen Aufnahmewege von Säugerzellen um siRNAs erfolgreich in die Zielzellen einzuschleusen.

1.2.2 Endozytose

Die endozytotischen Wege, die zur Internalisierung von Makromolekülen genutzt werden, müssen bekannt sein um die zelluläre Einschleusung von siRNA untersuchen und verbessern zu können und werden deshalb im Folgenden vorgestellt. Allgemein wird der Transfer von Makromolekülen über die Zellmembran in membranumhüllte Vesikel als Endozytose bezeichnet. In Säugetierzellen erfolgt die Endozytose durch multiple Mechanismen, die in zwei Hauptkategorien unterteilt werden können, die Phagozytose und die Pinozytose (Abbildung 1.6).

Die Phagozytose dient der Aufnahme großer Partikel, wie z.B. Pathogene und wird deshalb auch als *cell eating* bezeichnet. Im Anschluss an die Internalisierung werden die Partikel zum Lysosom transportiert und dort degradiert. In Säugetieren ist die Phagozytose auf spezialisierte Zelltypen, wie Makrophagen, Monozyten und Neutrophile beschränkt.

Die Pinozytose wird wiederum in die vier Grundmechanismen Makropinozytose, Clathrin-abhängige Endozytose, Caveolin-abhängige Endozytose sowie Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose unterteilt. Die Pinozytose dient der Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Partikeln aus dem Extrazellularraum und wird deshalb auch als *cell drinking* bezeichnet [111].

Die Makropinozytose ist wie die Phagozytose von einer Aktin-vermittelten Umordnung der Plasmamembran abhängig, die eine Membranausstülpung nach sich zieht. Diese Membranausstülpung fusioniert im Anschluss mit sich selbst oder mit nahe gelegenen Membranbereichen. In Abhängigkeit vom Zelltyp stellt die Makropinozytose einen konstitutiven oder stimulierten Prozess dar. Die aus der Fusion entstehenden Vesikel werden als Makropinosomen bezeichnet und schließen große Volumina der Extrazellularflüssigkeit ein [112]. Dies nutzen beispielsweise dendritschen Zellen um Antigene aus der Zellumgebung aufzunehmen [113]. Makropinosomen können entweder mit den Lysosomen oder den frühen Endosomen fusionieren [114, 115]. Im Vergleich zu den nachfolgend beschriebenen endozytotischen Aufnahmewegen sind die Vesikel, die durch die Phagozytose und

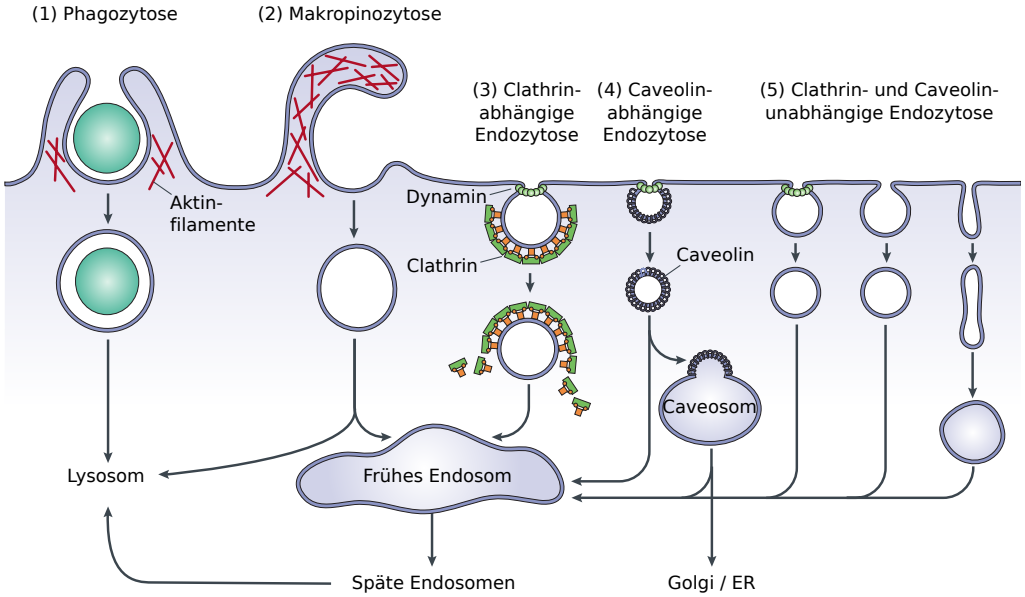


Abbildung 1.6: Eintrittspforten von Säugetierzellen. Große Partikel werden über die Phagozytose (1) aufgenommen, kleinere gelöste Partikel und Flüssigkeiten dagegen über die Pinozytose. Die Pinozytose unterteilt sich in die 4 Grundmechanismen Makropinozytose (2), Clathrin-abhängige Endozytose (3), Caveolin-abhängige Endozytose (4) sowie Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (5), die sich bezüglich ihrer Vesikelgröße, ihren Cargos sowie dem Mechanismus der Vesikelbildung unterscheiden. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach Mayor und Pagano [115].

die Makropinozytose gebildet werden, viel größer und können Durchmesser von > 1 μm aufweisen [111].

Die Clathrin-abhängige Endozytose ist der am besten verstandenste Endozytoseweg und wird in den meisten Zelltypen hauptsächlich für die Aufnahme extrazellulärer Liganden und Membrankomponenten genutzt. Damit nimmt dieser Aufnahmeweg wichtige Funktionen innerhalb der Zell-Zell-Kommunikation, der Entwicklung, der Zellmigration, der Aufnahme von Nährstoffen sowie verschiedener Signaltransduktionen ein [111, 116]. Der erste Schritt dieses Aufnahmeweges umfasst die Bindung des Cargos an spezifische Zelloberflächenrezeptoren. Die Komplexe aus Cargo und Rezeptor werden dann mit Hilfe intrazellulärer Adapterproteine, z.B. AP2, in den als *coated pits* bezeichneten Membraneinstülpungen aufkonzentriert. Diese entstehen in Folge der Ausbildung eines polygonalen Gitters durch Assoziation der Adaptorproteine mit dem zytosolischen Hüllprotein Clathrin [117]. Im Anschluss ermöglicht die GTPase Dynamin das Ein- bzw. Abschnüren der Membraneinstülpung, was zur Ausbildung Clathrin-umhüllter Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 120 nm führt [111]. Im Zellinneren verlieren diese Vesikel ihre Clathrinhülle wieder und fusionieren im Anschluss mit den frühen Endosomen. Diese führen das Cargo über die späten Endosomen in die Lysosomen. Durch die Absenkung des pH-Wertes in den späten Endosomen erfolgt dabei die Freisetzung des Cargos von den gebundenen Rezeptoren, die dann über rückführende Vesikel zurück zur Zelloberfläche gelangen können [114, 118].

Caveolae sind flaschenartige Membraneinstülpungen, die in vielen Zellarten, jedoch besonders gehäuft in Endothelzellen nachzuweisen sind. Im Gegensatz zu Clathrin-umhüllten Vesikeln weisen Caveolae keine offensichtliche Hülle auf, stellen aber Mikrodomänen innerhalb der Plasma-

membran dar, die sich durch einen hohen Anteil an Sphingolipiden und Cholesterol auszeichnen und durch die Assoziation mit Caveolin stabilisiert werden [119, 120]. In Säugetieren gibt es 3 Isoformen des Caveolins, wobei Caveolin 1 und 3 für die Ausbildung der Caveolae essentiell sind, wohingegen der *knock out* (KO) von Caveolin 2 keinen entscheidenen Einfluss auf die Entstehung dieser Membranstrukturen zeigte. Aufgrund der Phänotypen von Caveolin-KO-Mäusen werden der Caveolin-abhängigen Endozytose Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Plasmamembran-Homöostase, der Transzytose von Serum-Komponenten sowie bei der Signaltransduktion zugesagt [121–124]. Ein weiterer Unterschied zur sehr schnellen Clathrin-abhängigen Endozytose ist, dass Caveolae nur sehr langsam mit einer Halbwertszeit von > 20 min, aber ebenso Dynamin-abhängig ins Zytosol abgeschnürt werden. Dieser Vorgang kann jedoch durch die Cargo-Moleküle stimuliert werden, wie es zum Beispiel für das Simian Virus 40 (SV40) bereits gezeigt wurde [125]. Die durch das Abschnüren der Caveolae entstehenden Caveosomen weisen einen Durchmesser von ca. 60 nm sowie einen neutralen pH-Wert auf [111, 126]. Sie können entweder mit den frühen Endosomen fusionieren oder aber ihr Cargo weiter zum Golgi-Apparat und/oder zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportieren [120, 127].

Neben der Clathrin- und der Caveolin-abhängigen Endozytose werden eine Vielzahl zellulärer Cargos auch über endozytotische Wege eingeschleust, die unabhängig von Clathrin und Caveolin sind. Diese Prozesse sind jedoch sehr divers und lassen sich nur schwer funktionell charaktrisieren, da die meisten bekannten Marker der Clathrin- und Caveolin-abhängigen Endozytose auch in Abwesenheit dieser Proteine aufgenommen werden. Eine gemeinsame Eigenschaft dieser Aufnahmewege ist das Auftreten von sehr Cholesterol-reichen Mikrodomänen, so genannter *lipid rafts*, mit einem Durchmesser von ca. 50 nm [128]. Es wurde zunächst angenommen, dass Dynamin innerhalb aller endozytotischen Wege für das Abschnüren von Vesikeln an der Plasmamembran benötigt wird. Es zeigte sich aber, dass es innerhalb der Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytose auch Wege gibt, die Dynamin-unabhängig sind. Weiterhin wurden auch verschiedenen Mitgliedern der ADP *ribosylation factor* (Arf)-Proteinfamilie sowie den Rho-Unterfamilien der kleinen GTPasen Funktionen innerhalb dieser Endozytosewege zugesprochen. Eines der derzeit gültigen Klassifizierungs-Systeme der Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytose basiert deshalb auf der Dynamin-, Arf6- und RhoA-Abhängigkeit der zellulären Internalisierung [115].

1.2.3 Phosphorothioat-stimulierte Einschleusung von siRNA-Wirkstoffen

Die erst kürzlich entdeckte und in dieser Arbeit untersuchte PS-stimulierte siRNA-Einschleusung stellt eine Besonderheit dar, weil sie im Gegensatz zu den meisten siRNA-Einschleusungsverfahren über die Caveolin-abhängige Endozytose erfolgt [129]. In Abbildung 1.7 ist das derzeitige Modell der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung schematisch dargestellt. Durch die einfache Koinkubation von siRNAs und PS-ONs wird die siRNA-Aufnahme im Vergleich zur siRNA-Spontanaufnahme bis zum Tausendfachen verbessert. Die Ausprägung der Stimulation der siRNA-Aufnahme ist sowohl von der Länge als auch von der Konzentration der PS-ONs abhängig, jedoch weitgehend unabhängig von deren Sequenz. Die siRNA wird in Caveolae internalisiert und daraufhin in nichtsauren Kompartimenten, den Caveosomen, zum ER transportiert. Die beschriebenen Charakteristika der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung basieren auf fluoresenzmikroskopischen Untersu-

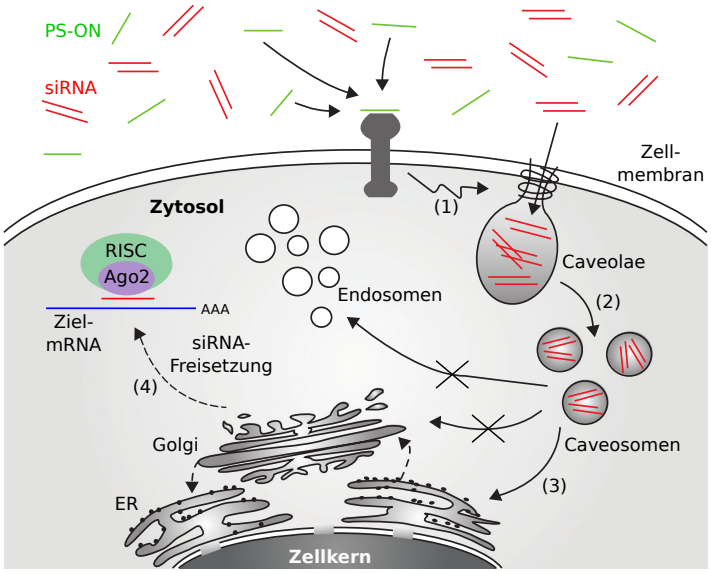


Abbildung 1.7: Modell der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung. Im Anschluss an die Stimulation eines bisher nicht identifizierten Zelloberflächenmoleküls durch PS-ONs (1) werden siRNAs über die Caveolae (2) in den Caveosomen (3) zum ER transportiert. Aus dem ER werden geringe siRNA-Mengen in das Zytosol entlassen (4), so dass diese siRNAs die Ago2-abhängige Spaltung ihrer Ziel-mRNA induzieren können. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text. Die Abbildung wurde verändert nach Mescalchin *et al.* [132].

chungen mit Hilfe von Modell-Cargos der Caveolin-abhängigen Endozytose [130] sowie funktionellen Studien mit Aktivatoren und Inhibitoren der endozytotischen Aufnahmewege. So bewirkte die Koinkubation mit Okadainsäure, einem Aktivator der Caveolin-abhängigen Endozytose, eine zusätzliche Stimulation der siRNA-Aufnahme. Im Gegensatz dazu blieb die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung von Inhibitoren der Clathrin-abhängigen Endozytose unbeeinflusst [129, 131]. Es ist wahrscheinlich, dass die siRNA-Einschleusung durch die PS-vermittelte Aktivierung eines bisher nicht bekannten Rezeptors in der Zellmembran erfolgt, da die gleichzeitige Internalisierung von siRNAs und PS-ONs sowie die Komplexbildung dieser beiden Komponenten ausgeschlossen werden konnte [129, 131].

Die Tatsache, dass durch die PS-Stimulation die Caveolin-abhängige siRNA-Einschleusung induziert wird, macht diese Methode zu einer vielversprechenden Alternative zu bestehenden siRNA-Einschleusungsverfahren, da sie die endo-lysosomalen Kompartimente und damit die rasche Degradation der siRNA-Wirkstoffe umgeht. Interessanter Weise entdeckten Wang *et al.* dass einige bakterielle Gene in ihrem DNA-Rückgrat PS-Modifikationen aufweisen [133, 134]. Dies impliziert, dass die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung auf der natürlichen Fähigkeit PS-modifizierter bakterieller DNA zur Stimulation zellulärer Einschleusung basieren könnte. Diese Hypothese ist konform mit der Beobachtung, dass keine anderen Nukleinsäuren, wie z.B. einzelsträngige RNA, doppelsträngige DNA oder zirkuläre und lineare Plasmid-DNA in der Lage sind, die zelluläre siRNA-Einschleusung zu stimulieren [129].

Das Überwinden einer der größten Hürden auf dem Weg zur therapeutischen Anwendung von siRNA-Wirkstoffen, die effiziente zelluläre Einschleusung, kann mit diesem neuen und sehr vielversprechenden siRNA-Einschleusungsverfahren überwunden werden. Jedoch ist die biologische Wirk-

samkeit der überraschend großen Menge eingeschleuster siRNA-Moleküle (bis zu 60.000 siRNA-Moleküle pro Zelle) limitiert durch die intrazelluläre siRNA-Freisetzung aus dem ER. Diese muss erfolgen um eine Wechselwirkung mit der RNAi-Maschinerie sowie der Ziel-mRNA zu ermöglichen. Deshalb stellt die intrazelluläre siRNA-Freisetzung und die damit verbundene Bioverfügbarkeit der siRNA eine wichtige zu überwindende Hürde dar um die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung auch *in vivo* in präklinischen oder therapeutischen Ansätzen anzuwenden. Dass es sich dabei um ein generelles Problem der bestehenden siRNA-Einschleusungsverfahren handelt, wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

1.3 Bioverfügbarkeit von siRNA-Wirkstoffen

Die Forschung der letzten Jahre fokussierte sich im Hinblick auf die therapeutische Einführung von siRNA-Wirkstoffen vor allem auf die Entwicklung effizienter siRNA-Einschleusungsverfahren. In Anbetracht der in klinischen Studien für die effiziente Inhibition eines Zielgens notwendigen Wirkstoff-Konzentrationen ist jedoch davon auszugehen, dass die Bioverfügbarkeit der erfolgreich internalisierten siRNA-Moleküle die Effizienz dieser Nukleinsäure-Wirkstoffe entscheidend limitiert. Diese Vermutung wird durch Analysen bestätigt, die auf dem quantitativen Nachweis der für die halbmaximale Inhibition einer Ziel-mRNA (IC_{50}) notwendigen siRNA-Moleküle pro Zelle basieren. Diese Analysen weisen darauf hin, dass die Bioverfügbarkeit einer siRNA nachhaltig durch das gewählte Einschleusungsverfahren beeinflusst wird (Tabelle 1.2).

Einschleusungsverfahren	siRNA-Moleküle pro Zelle am IC_{50}	Referenz
PS-stimuliert	$\sim$ 10,000	[131]
MPGα-vermittelt	$\sim$ 10,000	[135]
Elektroporation	$\sim$ 400	[132]
Lipofectamine™ 2000	$\sim$ 300	[131, 135]
Nukleäre Mikroinjektion	$\sim$ 300	[135]
Zytosolische Mikroinjektion	$\sim$ 12	[136]

Tabelle 1.2: Anzahl der für die halbmaximale Inhibition einer Ziel-mRNA (IC_{50}) notwendigen siRNA-Moleküle pro Zelle in Abhängigkeit von dem gewählten siRNA-Einschleusungsverfahren.

Die direkte Mikroinjektion der siRNA in das Zytosol einer Säugerzelle gewährt ihre vollständige Bioverfügbarkeit und führt zu einer überraschend geringen Anzahl von nur 12 siRNA-Molekülen pro Zelle, die bereits zur halbmaximalen Inhibition der Ziel-mRNA führen. Sowohl die Mikroinjektion als auch die Elektroporation und siRNA-Transfektion mit Hilfe *Lipofectamine™ 2000* haben sich jedoch als entweder nicht praktikabel für *in vivo* Anwendungen oder als besonders toxische Einschleusungsverfahren erwiesen. Deshalb ist die Entwicklung von Strategien für die intrazelluläre siRNA-Freisetzung von enormer Bedeutung und soll in dieser Arbeit am Beispiel der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung untersucht werden.

Im Folgenden werden zunächst die von ausgewählten Protein-Toxinen und Viren für ihre intrazelluläre Freisetzung genutzten Strategien vorgestellt (Abschnitt 1.3.1 und 1.3.2). Diese haben Mittel und Wege gefunden die endozytotischen Wege von Säugerzellen zu ihren Gunsten auszunutzen. Eine ähnliche Strategie ist auch für siRNA denkbar und beinhaltet die Konjugation natürlicher Polypeptid-abgeleiteter Transport- und Sortierungssignale an siRNA. Dieses völlig neuartige Konzept des intrazellulären siRNA-Transportes soll in Abschnitt 1.3.3 vorgestellt werden.

1.3.1 Intrazelluläre Freisetzung von Protein-Toxinen

Eine Vielzahl von Protein-Toxinen, sowohl bakteriellen als auch pflanzlichen Ursprungs, nutzen verschiedene Schritte der in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen endozytotischen Transportwege um Zugang zu ihren Zielzellen zu erlangen [137–140]. Dabei ist allen Toxinen unabhängig von ihrem zellulären Target gemein, dass sie, ähnlich wie die siRNAs, das Zytosol erreichen müssen um ihre Wirkung zu entfalten. Dabei nutzen sie im Wesentlichen zwei Wege.

Der erste Weg führt zur direkten Freisetzung des Toxins aus den Endosomen in das Zytosol der Zielzelle. Dieser Weg wird zum Beispiel vom Diphtheria-Toxin genutzt, wobei die Ansäuerung des endosomalen Lumens eine konformationelle Änderung des Toxin-Moleküls bewirkt. Dies führt zur Exposition hydrophober Bereiche der Transport-Untereinheit des Toxins sowie zur spontanen Insertion dieser in die endosomale Membran. Durch die dabei entstehenden kationen-selektiven Poren (18 – 22 Å) wird die enzymatisch-aktive Untereinheit des Toxins schließlich in das Zytosol entlassen [141, 142]. Zur Gruppe der Toxine, die durch die Absenkung des endosomalen pH-Wertes das Zytosol erreichen, gehören neben dem Diphtheria-Toxin auch das Anthrax- und das Botulinum-Toxin [139]. Alle drei Toxine weisen ein konserviertes Motiv (TQIENLKEKG) auf, dass die transmembrane Translokation der enzymatisch-aktiven Untereinheit des Toxins durch Wechselwirkung mit dem *cytosolic translocation factor* (CTF)-Komplex ermöglicht [143]. Interessanter Weise zeigten die Studien von Ratts *et al.*, dass dieses Signalpeptid auch unabhängig von der Ansäuerung des endosomalen Lumens die transmembrane Translokation und damit bereits eine frühere intrazelluläre Freisetzung der Toxine ermöglichen kann [143].

Der zweite Weg umfasst den Transport des Toxins von der Zelloberfläche über die Endosomen und den Golgi-Apparat in das ER. Die Translokation der enzymatisch-aktiven Untereinheit des Toxins in das Zytosol erfolgt dann über den Sec61p-Kanal, der normalerweise von der Säugerzelle für die kotranslationelle Translokation von Peptiden in das ER oder für den Abtransport von missgefalteten Proteinen aus dem ER verwendet wird [138, 144–146]. Zur Gruppe der Toxine, die über diesen Weg das Zytosol erreichen, gehören das Ricin-Toxin, das Cholera-Toxin und das Shiga-Toxin [139]. Diese Toxine wählen diesen Transportweg, weil sie durch zelluläre Proteasen aktiviert werden mit denen sie auf diesem Weg in Kontakt kommen. Weiterhin ist die ER-Membran aufgrund ihres niedrigen Cholesterolgehaltes möglicherweise durchlässiger als die Plasmamembran oder die endosomale Membran. Es wird sogar spekuliert, dass aufgrund dieser Eigenschaft die intrazelluläre Freisetzung von Nukleotiden aus dem ER in das Zytosol möglich wäre [138]. Der wichtigste Grund, warum Toxine den Weg über den Golgi-Apparat in das ER wählen, ist jedoch, dass sich im ER eine Vielzahl von Chaperonen und Translokatoren befinden, die den Transport der enzymatisch-aktiven Toxin-Untereinheit vom ER in das Zytosol ermöglichen [147–150]. Auch für diesen Transportweg wurden Signalpeptide identifiziert, die die transmembranen Translokationen

der Toxine auf dem Weg von der Zellmembran bis hin zum ER ermöglichen. So trägt zum Beispiel das Cholera-Toxin ein C-terminales KDEL-Motiv, das durch so genannte KDEL-Rezeptoren im Golgi-Apparat erkannt wird und damit den retrograden Transport des Toxins in das ER ermöglicht [151, 152].

Da für verschiedene Protein-Toxine bereits gezeigt wurde, dass sie prinzipiell zum Transport von Oligonukleotiden befähigt sind [153–157], könnte die Übertragung der von ihnen genutzten Transportstrategien auf siRNA-basierte Therapeutika zur Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung beitragen.

1.3.2 Intrazelluläre Freisetzung von Viren

Als intrazelluläre Parasiten nutzen Viren die wirtszelleigenen Maschinerien für die Synthese ihres Genoms und anderer viraler Komponenten. Dabei haben sie eine Vielzahl eleganter Strategien entwickelt um ihr Genom sowie assoziierte Proteine an spezifische Orte innerhalb der Wirtszelle zu transportieren. Neben der direkten Fusion mit der Plasmamembran nutzen viele Viren ebenso verschiedene Schritte der endozytotischen Transportwege (Abschnitt 1.2.2) ihrer Zielzellen [158–160]. Deshalb sind Viren, genauso wie die in Abschnitt 1.3.1 beschriebenen Protein-Toxine, nützliche Modellsysteme für die Charakterisierung endozytotischer Aufnahmewege und intrazellulärer Sortierungsvorgänge. Ausserdem kann dieses Wissen im Hinblick auf die Entwicklung von Strategien zur verbesserten intrazellulären siRNA-Freisetzung genutzt werden.

Als Beispiel für die Clathrin-abhängige Endozytose ist das Influenza A-Virus zu nennen [159–161]. Im Zuge der Clathrin-abhängigen Internalisierung muss das Virus seine Freisetzung aus den Endosomen induzieren um nicht in den Lysosomen degradiert zu werden. Da es sich bei dem Influenza A-Virus um ein umhülltes RNA-Virus handelt, erfolgt die Freisetzung in das Zytosol durch Fusion mit endosomalen Membranen. Ausgelöst durch den niedrigen pH-Wert in den späten Endosomen ändert das Hämagglutinin (HA)-Protein seine Konformation, was zur Exposition von Fusionspeptiden führt. Diese inserieren in die endosomale Membran und induzieren die Kontaktbildung der viralen und der endosomalen Membran sowie deren anschließende Fusion [162]. Viele der in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Strategien zur zellulären Einschleusung siRNA-basierter Therapeutika nutzen die Clathrin-abhängige Endozytose. Jedoch können die internaliserten siRNAs häufig nicht oder nur teilweise aus dem endosomalen Kompartiment entlassen werden, so dass das HA-Fusionspeptid zur Umgehung dieser Problematik beitragen könnte.

Als Beispiel für die Caveolin-abhängige Endozytose, die von weitaus weniger Viren genutz wird, ist das SV40 zu nennen [159–161]. Die Caveolin-abhängige Endozytose führt das Virus zum glatten ER. Da es sich bei dem SV40-Virus um ein nicht-umhülltes DNA-Virus handelt, muss das Virus sein Genom in das Zytosol entlassen und anschließend für die Replikation in den Zellkern transportieren. Dies ermöglichen die viralen Kapsid-Proteine VP2 und VP3, die durch Oligomerisation Poren in der ER-Membran bilden, durch die das virale Genom in das Zytosol entlassen werden kann. Im Anschluss wird das virale Genom durch den Kernporenkomplex in den Zellkern transportiert, wo es die wirtszelleigene Replikationsmaschinerie für die eigene Vervielfältigung ausnutzt. Das SV40-Virus ist im Hinblick auf die Entwicklung von Strategien zur intrazellulären Freisetzung siRNA-basierter Therapeutika von Interesse, weil es durch seine Caveolin-abhängige Internalisierung die endo-lysosomalen Kompartimente umgeht. Weiterhin trägt es in dem für sei-

ne Replikation notwendigen großen T-Antigen ein Kernlokalisation-Signal (PKKKRKV), das den gezielten Transport von Proteinen, aber auch von Oligonukleotiden in den Zellkern ermöglichen kann [163, 164].

1.3.3 Polypeptid-abgeleitete Transport- und Sortierungsignale

In den Abschnitten 1.3.1 und 1.3.2 wurden beispielhaft Strategien aufgezeigt, wie Protein-Toxine und Viren ihre intrazelluläre Freisetzung ermöglichen und dabei hauptsächlich die natürlichen Transport- und Sortierungsstrategien von Säugerzellen ausnutzen. In diesem Abschnitt soll nun ein neuartiges und in dieser Arbeit getestetes Konzept zur Induktion der intrazellulären Freisetzung von siRNA vorgestellt werden. Dies macht sich die Konjugation der siRNA an Polypeptid-abgeleitete Transport- und Sortierungssignale von Säugerzellen, Toxinen und Viren zunutze (Abbildung 1.8). Das Konzept der Konjugation von Signalpeptiden an Makromoleküle wurde bereits anhand des Transportes von Fluorophoren zu spezifischen Organellen erfolgreich in lebenden Zellen demonstriert [165]. Die Übertragung dieser in der „Protein-Welt“ etablierten Signalpeptide auf siRNA, d.h. auf die „Nukleinsäure-Welt“, ist bisher nicht erprobt. Im positiven Fall könnte sie zur Überwindung intrazellulärer Barrieren beitragen und somit in Kombination mit einer effizienten Strategie zur zellulären siRNA-Einschleusung einen wichtigen Schritt zur Etablierung siRNA-basierter Therapeutika bedeuten.

Bei der Auswahl der Signalpeptide ist zu beachten, dass kurze Peptidsequenzen gegenüber langen Peptidketten zu bevorzugen sind, da diese häufig Sekundär- und Tertiär-Strukturen ausbilden und somit die Zugänglichkeit der siRNA für den RISC einschränken könnten. In dieser Arbeit wird das in Abbildung 1.8 dargestellte Konzept der induzierten siRNA-Freisetzung am Beispiel der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung (Abschnitt 1.2.3) unter Verwendung der im Folgenden vorgestellten Signalepeptide getestet.

Das Tetrapeptid KDEL dient als Rückgewinnungssignal für ER-spezifische Proteine, wie die Protein-Disulfid-Isomerase und das ER-Chaperon Calretikulin. Diese Proteine tragen das KDEL-Signalpeptid an ihrem C-Terminus und werden dadurch von KDEL-Rezeptoren im Golgi-Apparat erkannt. Dies induziert ihren retrograden Transport in das ER, was sie vor dem Eintritt in nachfolgende sekretorische und lysosomale Vesikel bewahrt [151]. Wie bereits in Abschnitt 1.3.1 erwähnt,

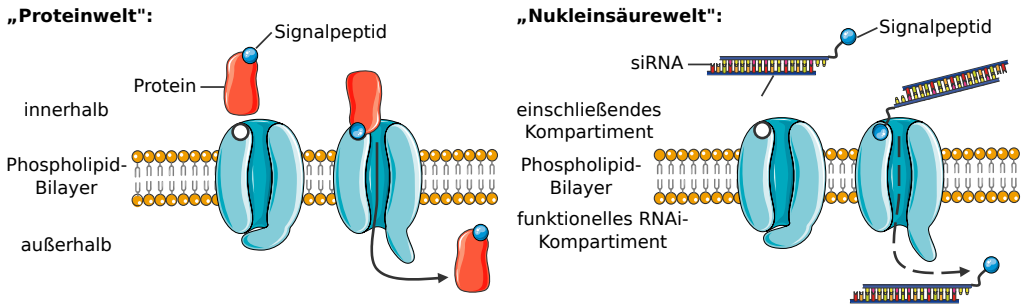


Abbildung 1.8: Signalpeptide steuern die transmembrane Translokation von Polypeptiden (links). Das Konzept der kovalenten Konjugation dieser Polypeptid-abgeleiteten Transport- und Sortierungssignale an siRNA, um deren intrazelluläre Freisetzung zu verstärken ist im rechten Teil der Abbildung dargestellt. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

nutzen auch verschiedene Protein-Toxine dieses Signalpeptid für ihren retrograden Transport in das ER. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass die Übertragung des KDEL-Signalpeptides auf Nicht-ER-Proteine, deren Akkumulation im ER zur Folge hat [166]. In Bezug auf die intrazelluläre siRNA-Freisetzung erscheinen der niedrige Cholesterol-Gehalt der ER-Membran sowie die Tatsache, dass am ER die Translation potentieller Ziel-mRNAs stattfindet, von Interesse. Weiterhin könnte das Pendeln der KDEL-Rezeptoren zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER den siRNAs eine mögliche Austrittspforte bieten.

Das Tripeptid SKL wird als *peroxisomal targeting signal 1* (PTS1) bezeichnet und ist am C-Terminus der meisten peroxisomalen Matrixproteine zu finden. Es bewirkt ihre Erkennung durch PST1-Rezeptoren im Zytosol. Diese binden das Signalpeptid, bewirken die peroxisomale Internalisierung des Proteins und pendeln daraufhin zurück ins Zytosol. Auch für dieses Signalpeptid gibt es Evidenzen, dass es von Viren genutzt wird und auf nicht-peroxisomale Proteine übertragbar ist [167]. Für die intrazelluläre Freisetzung von siRNA könnte das Pendeln der PTS1-Rezeptoren zwischen den Peroxisomen und dem Zytosol eine mögliche Austrittspforte bieten.

Das von Ratts *et al.* [143] identifizierte Signalpeptid TQIENLKEKG ist unter mehreren bakteriellen Protein-Toxinen, wie z.B. dem Diphtheria-, dem Anthrax- und dem Botulinum-Toxin konserviert. Es ermöglicht durch Wechselwirkung mit dem CTF-Komplex die Translokation der enzymatisch-aktiven Toxin-Untereinheit aus frühen endozytotischen Vesikeln in das Zytosol. Damit wird die natürliche Route neusynthetisierter Proteine vom ER über den Golgi-Apparat bis hin zu den sekretorischen und lysosomalen Vesikeln umgangen. Weiterhin wurde von Ratts *et al.* gezeigt, dass dieses Signalpeptid auch unabhängig von der Ansäuerung des endosomalen Lumens die transmembrane Translokation und damit bereits eine frühere intrazelluläre Freisetzung der Toxine ermöglichen kann [143]. Deshalb wurde dieses Peptid für die Konjugation an siRNA ausgewählt, da es möglicherweise eine direkte Freisetzung der internalisierten siRNA aus den zellulären Aufnahme-Vesikeln induzieren könnte.

Das *nuclear localization signal* (NLS) PKKKRKV des großen T-Antigens des SV40-Virus wird durch die NLS-Rezeptoren Importin α und β gebunden, die das Protein in einem ATP-abhängigen Prozess zum Kernporenkomplex dirigieren und somit den Transport in den Zellkern ermöglichen. Es wurde bereits gezeigt, dass dieses Signalpeptid den gezielten Transport von Proteinen, aber auch von Oligonukleotiden, in den Zellkern ermöglicht [163, 164]. In Bezug auf die intrazelluläre Freisetzung von siRNA ist deren nukleärer Import von Interesse, da gezeigt wurde, dass siRNA in einem Exportin 5-abhängigen Prozess aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert werden kann [168].

1.4 Funktionelle Zugänglichkeit der RNA-Interferenz-Maschinerie

Verschiedenste experimentelle Analysen sowie computergestützte Algorithmen führen zu der Annahme, dass bis zu 30 % der humanen Gene unter der Kontrolle von miRNAs stehen [169, 170]. Damit sind sie an der Regulation von entscheidenden zellulären Prozessen, wie der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und dem programmierten Zelltod beteiligt [31, 32, 171, 172]. Weiterhin wird miRNAs eine essentielle Rolle bei der Entstehung humaner Er-

krankungen, wie zum Beispiel Krebs, zugesprochen [33]. Aufgrund dieser zentralen Rolle innerhalb der Regulation der Genexpression ist davon auszugehen, dass die RNAi-Maschinerie unter bestimmten zellulären Bedingungen selbst einer entsprechenden Regulation unterliegt. Diese Annahme bildet die Grundlage eines sehr jungen Arbeitsgebietes, dass sich mit den post-translationellen Modifikationen der RNAi-Maschinerie und deren Einfluss auf die Stabilität, Lokalisation und Funktion der RNAi-assoziierten Proteine beschäftigt.

In diesem Abschnitt sollen die bisher bekannten post-translationellen Modifikationen der RNAi-Maschinerie vorgestellt werden (Abschnitt 1.4.1). Daraus geht hervor, dass die Einführung post-translationeller Modifikationen einen erheblichen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung der RNAi-assozierten Proteine hat, so dass in Abschnitt 1.4.2 das derzeitige Bild zum intrazellulären Wirkort der RNAi erläutert werden soll.

1.4.1 Post-translationelle Modifikation der RNA-Interferenz-Maschinerie

Die erste Erwähnung einer post-translationellen Modifikation der RNAi-Maschinerie stammt aus dem Jahr 2008. Mit Hilfe einer Proteomik-Analyse wiesen Qi *et al.* eine direkte Interaktion zwischen dem humanen Ago2 und der Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase nach. Dies führt zur Hydroxylierung des Ago2 an Prolin-700, die das Protein stabilisiert und für die Effizienz der siRNA-vermittelten Gensuppression eine entscheidende Rolle spielt. Abgesehen von der Ago2-Funktion beeinflusst diese post-translationelle Modifikation auch die Ago2-Lokalisation und führt zu einer Akkumulation des Ago2-Proteins in den PBs [173]. Im selben Jahr endeckten Zeng *et al.* eine weitere post-translationelle Modifikation, die die PB-Lokalisation von Ago2 beeinflusst. Dabei handelt es sich um die Phosphorylierung des Proteins an Serin-387 vermittelt durch den p38/*mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg [174]. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit zeigten Adams *et al.*, dass die Ago2-Stabilität durch den *epidermal growth factor receptor* (EGFR)/MAPK-Signalweg reguliert wird. Die Überexpression von EGFR führte dabei zu einer Erhöhung der zellulären Ago2-Menge, die wiederum mit einer verstärkten miRNA-Aktivität in malignen Brustkrebszellen korreliert war [175].

Eine Studie von Paroo *et al.* zeigte, dass neben Ago2, dem Schlüsselenzym des RISC, auch noch weitere RNAi-assozierte Proteine durch post-translationelle Modifikationen beeinflusst werden. Diese Studie beschreibt die Phosphorylierung von TRBP an vier Serin-Resten (Ser-142, -152, -283, -286) durch die *extracellular signal-regulated kinase* (Erk) [176] . Erk ist ebenso Teil des MAPK-Netzwerkes und stellt eine wichtige Determinante der zellulären Proliferation, der Zelldifferenzierung sowie des Zellüberlebens dar [177]. Die Phosphorylierung von TRBP führt zur Stabilisierung des Dicer-Komplexes und resultiert in einer verstärkten miRNA-Biogenese. Die Verstärkung der miRNA-Biogenese bezieht sich dabei vor allem auf miRNAs, die am Wachstum der Zellen sowie an der Zellproliferation beteiligt sind. Ob die Phosphorylierung von TRBP auch mit einer verbesserten biologischen miRNA-Wirksamkeit einher geht oder die intrazelluläre Lokalisation des Dicer-Komplexes beeinflusst, ist jedoch nicht geklärt.

Arbeiten aus dem *Mus musculus* und dem *Drosophila* System zeigen, dass die Regulation der RNAi-Maschinerie nicht auf das humane System beschränkt ist. Auch in diesen Organismen wurden post-translationelle Modifikationen RNAi-assoziierter Proteine identifiziert, die einen Einfluss

auf die zelluläre Lokalisation und Stabilität der betreffenden Proteine zeigten. Als Beispiel seien die Arginin-Methylierung der Proteine Mili und Miwi2 im Maussystem und der Proteine Piwi, Aub und Ago3 im Fliegen-System genannt [178–180]. Diese Proteine gehören einer Unterklasse der Argonaute-Proteine an und sind an der Regulation von Piwi *interacting* RNAs (piRNAs) beteiligt, die ähnlich wie miRNAs in diesen Organismen endogen kodiert werden und wichtig für die genetische Stabilität sind [181]. Auch in diesem Fall beeinflusst die Methylierung dieser Proteine deren intrazelluläre Lokalisation und Stabilität. Weiterhin wurden putative Hydoxylierungsstellen sowohl in den *Mus musculus* als auch den *Drosophila* Ago-Proteinen identifiziert [182].

All diesen post-translationellen Modifikationen der RNAi-Maschinerie ist gemein, dass sie durch bestimmte zelluläre Bedingungen, wie definierte Entwicklungsstadien oder veränderte Proliferationseigenschaften stimuliert werden können. Dies impliziert die Existenz zellulärer Mechanismen, die die Effizienz der RNAi regulieren um die natürliche Genexpression an die zellulären Gegebenheiten anzupassen.

1.4.2 Intrazellulärer Wirkort der RNA-Interferenz

Zum intrazellulären Wirkort des aktiven RISC werden in der Literatur mindestens zwei Thesen diskutiert. Die erste beschreibt die Lokalisation des RISC am Ort der mRNA-Translation im Zytosol und wird durch die Koaufreinigung von Ago2 mit dem 80S Translationskomplex sowie den ribosomalen Proteinen L3 und L11 gestützt [183]. Weiterhin wird sie dadurch bekräftigt, dass sich translations-inaktive mRNAs in *Drosophila melanogaster* als resistent gegenüber der RNAi-vermittelten Gensuppression erwiesen [184]. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass eine Entkopplung der RNAi von der Translation möglich ist [185]. Die zweite These beschreibt die Assoziation des RISC mit mRNA-Zerfallszentren, wie den PBs, und wird durch die Kolokalisation von Ago2 mit Markerproteinen der mRNA-Zerfallszentren, wie GW182 und Dcp 1/2, anhand fluoreszenzmikroskopischer Analysen belegt. Jedoch ist diese Lokalisation unabhängig von der Anwesenheit von siRNA bzw. miRNA sowie deren Ziel-mRNAs [186].

Beide Thesen vereint, dass sie den intrazellulären Wirkort der RNAi an der subzellulären Lokalisation des Ago2-Proteins ausmachen. In Abschnitt 1.1.2 wurde bereits erwähnt, dass es sich hierbei um das Schlüsselprotein des RISC handelt, das eine intrinsische Endonukleaseaktivität aufweist, die die Spaltung der Ziel-mRNA ermöglicht. Das Ago2-Protein, urprünglich als *eukaryotic translation initiation factor 2C* (EIF2C2) bezeichnet, gehört zur Familie der Argonaute-Proteine, von denen im Menschen bisher 8 Mitglieder identifiziert wurden. Diese gehören entweder zur Ago-Unterfamilie (Ago1-4) oder zur Piwi-Unterfamilie (HIWI1, HIWI2, HIWI3 und HILI), deren Expression auf die Keimbahn geschränkt ist. Die Ago-Proteine werden dagegen ubiquitär exprimiert und weisen untereinander sehr große Sequenzhomologien auf (mRNA-Ebene $\leq$ 75 %, Protein-Ebene $\leq$ 84 %) [187–189]. Trotz alledem ist die Endonukleaseaktivität auf Ago2 beschränkt, was dieses Protein zur Schlüsselkomponente des aktiven RISC macht. Weiterhin werden Ago2 Funktionen innerhalb der miRNA-Biogenese zugesprochen [190]. Es ist jedoch nicht bekannt, welchen quantitativen Beitrag Ago2 an der Effektivität der RNAi leistet sowie ob Ago2 in seiner Funktion durch andere RISC-Komponenten ersetzt werden kann. Weiterhin ist bisher nicht beschrieben, ob die intrazelluläre Lokalisation von Ago2 mit der Aktivität des RISC korreliert ist.

Die Lokalisation des Ago2-Proteins wird in der Literatur als hauptsächlich zytosolisch bezeich-

net, wobei auch die nukleäre Lokalisation von Ago2 bereits beschrieben wurde [191–194]. Innerhalb des Zytosol assoziiert Ago2 mit zwei transienten Strukturen, den Stressgranulen (SGs) und den PBs. [54, 186, 195, 196]. Die PBs wurden bereits als mRNA-Zerfallszentren beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass die miRNA-vermittelte Translationsinibition einer Ziel-mRNA in deren Akkumulation und anschließender Degradation in den PBs resultiert (Abschnitt 1.1.2). Weiterhin scheint die PB-Lokalisation von Ago2 durch post-translationelle Modifikation und den daran beteiligten Signalkaskaden streng reguliert zu sein. Welche Funktion die SGs innerhalb der RNAi-vermittelten Gensuppression einnehmen ist dagegen noch weitgehend unerforscht. Die SGs bestehen vor allem aus blockierten Translationsinitiationskomplexen, die sowohl mRNAs, kleine ribosomale Untereinheiten als auch eine Vielzahl von Translationsinitiationsfaktoren, wie eIF3, eIF4E und eIF4G enthalten [197, 198]. SGs und PBs teilen einige ihrer Proteinkomponenten, wie das 5'-Cap bindende Protein eIF4E und den Translationsrepressor RAP-55. Jedoch sind nicht alle SG-Kompomenten auch in den PBs und umgekehrt zu finden. SGs und PBs erscheinen deshalb sowohl funktionell als auch räumlich verknüpft zu sein [197, 199]. Die Akkumulation von Ago2 in SGs kann durch oxidativen oder translationellen Stress stimuliert werden [195, 196, 200]. Weiterhin scheint sie abhängig von der Präsenz reifer miRNA zu sein, da in Dicer-KO-Mäusen nach Induktion von translationellem Stress keine SGs beobachtet werden konnten [195]. Ausserdem zeigten Pare *et al.*, dass die Rekrutierung von Ago2 zu PBs und SGs *heat shock protein 90* (Hsp90)-abhängig ist [196].

Diese Beobachtungen implizieren eine Verknüpfung der RNAi mit der Induktion von Zellstress sowie eine Abhängigkeit der dynamischen Verteilung des Ago2-Proteins von den Zuständen der Zelle. Die Lokalisation der RNAi-Maschinerie und ihrer Komponenten wird somit nicht nur durch verschiedenste post-translationelle Modifikationen, sondern auch durch Einflüsse der zellulären Umgebung reguliert. Die subzelluläre Lokalisation des aktiven RISC unterliegt weiterhin intensiver experimenteller Erforschung, scheint aber auf definierte Bereiche der Zelle beschränkt. Deshalb stellt die funktionelle Zugänglichkeit der RNAi-Maschinerie einen neuen Parameter dar, der für die Einführung siRNA-basierter Therapeutika von entscheidender Bedeutung sein könnte. Denn selbst bei effizienter siRNA-Einschleusung (Abschnitt 1.2) und Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung (Abschnitt 1.3) kann das vollständige Potential der RNAi nur ausgenutzt werden, wenn die RNAi-Maschinerie sich an ihrem aktiven Wirkort befindet und somit für die erfolgreich eingeschleusten siRNAs zugänglich ist.

1.5 Aufgabenstellung

Aus den hier beschriebenen biologischen und technischen Hürden auf dem Weg zur therapeutischen Einführung von siRNA-Wirkstoffen wird die Wichtigkeit der effektiven zellulären Einschleusung sowie der inhibitorischen Effizienz von siRNA-Wirkstoffen einsichtig. Während die effektive zelluläre siRNA-Einschleusung vor allem durch die intrazelluläre siRNA-Freisetzung limitiert wird, können die Faktoren, die die inhibitorische Effizienz von siRNA-Wirkstoffen limitieren, sowohl auf der Seite der siRNA-Wirkstoffe als auch auf der Seite der von ihnen genutzten RNAi-Maschinerie liegen. Daher widmet sich diese Arbeit der im Folgenden beschriebenen 3 Aspekte.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden 2 Konzepte erprobt, um die intrazelluläre Freisetzung von siRNA nach deren erfolgreicher zellulärer Einschleusung zu induzieren. Das erste beruht auf der

Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung durch das transiente Auflösen des Zielkompartimentes, das die siRNA intrazellulär einschließt. Das zweite macht sich die Konjugation der siRNA an Polypeptid-abgeleitete Signalpeptide zur Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung zunutze. Als Modellsystem wurde die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung gewählt, weil diese die zelluläre Einschleusung großer siRNA-Mengen in intakter Form ermöglicht, die siRNA-Wirksamkeit jedoch durch die schwache intrazelluläre siRNA-Freisetzung limitiert wird. Die Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung und die damit verbundene Erhöhung der siRNA-Wirksamkeit ist von besonderem Interesse, weil im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung von siRNA-Wirkstoffen *in vivo* die Minimierung der Wirkstoff-Konzentrationen und somit die Optimierung der zellulären siRNA-Einschleusung von essentieller Bedeutung ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden asON-Werkzeuge entworfen, die eine sequenzspezifische Inhibition der RNAi-Maschinerie ermöglichen, ohne dabei sequenzunabhängig mit dem Mechanismus der RNAi zu interferieren. Dieses Konzept ist von besonderem Interesse, weil dadurch das Ausmaß der Beteiligung einzelner RNAi-Komponenten an der siRNA-vermittelten Gensuppression quantitativ analysiert werden kann. Um dieses Konzept zu erproben, wurde die asON-vermittelte Inhibition von Ago2 als Modellsystem gewählt, weil die Schlüsselfunktion von Ago2 innerhalb der RNAi bereits charakterisiert ist und somit direkt in *knock down* Phänotypen übersetzt werden kann. Weiterhin wurde analysiert, ob sich der quantitative Beitrag von Ago2 an der siRNA-vermittelten RNAi von dem der miRNA-vermittelten RNAi unterscheidet.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit der RNAi-vermittelten Gensuppression als Funktion der Ago2-Lokalisation untersucht. Es wurde analysiert, ob die Ago2-Lokalisation durch Zellstressbedingungen, wie sie z.B. durch viele Formen der siRNA-Einschleusung erzeugt werden, beeinflusst wird und ob dies die Effektivität von siRNA-Wirkstoffen limitiert. Die Identifikation der im Bezug auf die RNAi als funktionell bezeichneten Kompartimente ist von besonderem Interesse um ein gezieltes Ansteuern dieser Kompartimente für siRNA-Wirkstoffe zu ermöglichen und somit das volle Potential der RNAi-vermittelten Gensuppression ausnutzen zu können.

2 Materialien

2.1 Allgemeines

Im Folgenden sind die Firmensitze der Lieferanten aufgeführt und werden im weiteren Verlauf nicht mehr angegeben, um Mehrfachnennungen zu vermeiden:

abcam (Cambridge, UK), accelrys® (San Diego, CA, USA), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), anthos Mikrosysteme GmbH (Krefeld, Deutschland), Applied Biosystems (Freiburg, Deutschland), Ascenion GmbH (München, Deutschland), Axis-Shield (Oslo, Norwegen), B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland), Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Biomers (Ulm, Deutschland), Biometra (Göttingen, Deutschland), Biorad (München, Deutschland), Biotec-Fischer (Reiskirchen, Deutschland), Biosciences (St. Louis, MO, USA), Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland), Boskamp GmbH (Hohenlockstedt, Deutschland), Brand (Wertheim, Deutschland), Brandt (Ludwigshafen, Deutschland), Calbiochem (Darmstadt, Deutschland), Canon (Krefeld, Deutschland), Cambrex, (East Rutherford, NJ, USA), Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA), Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), DakoCytomation (Hamburg, Deutschland), DSMZ (Braunschweig, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Erithacus Software (Surrey, UK), Eurogentec (Köln, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschalnd), Fluka (Buchs, Deutschland), Forma Scientific (Marietta, OH, USA), GE Healthcare (München, Deutschland), Gibco (Karlsruhe, Deutschland), Gilson (Bad Camberg, Deutschland), Greiner (Frickenhausen, Deutschland), Hartmann (Braunschweig, Deutschland), Heidolph (Schwalbach, Deutschland), Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland), Hettich (Tuttlingen, Deutschland), Hoefer (San Francisco, CA, USA), IBA (Göttingen, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK), Jahnke & Kunkel (Staufen, Deutschland), Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland), Kodak (Rochester NY, USA), Linearis (Bettingen a.M., Deutschland), LKB (Bromma, Schweden), Lonza (Verviers, Belgien), Merck (Darmstadt, Deutschland), Millipore (Schwalbach, Deutschland), Nunc (Rochester, NY, USA), PAA (Pasching, Österreich), Peqlab (Erlangen, Deutschland), Perkin-Elmer (Boston, MA, USA), Phase (Lübeck, Deutschland), Pierce (Rockford, IL, USA), Promega (Mannheim, Deutschland), Qiagen (Hilden Deutschland), ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland), Roche (Basel, Schweiz), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Sartorius (Göttingen, Deutschland), ScalTec (Göttingen, Deutschland), Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland), Schmidt + Haench & Co. (Berlin, Deutschland), Schott (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhof, Deutschland), Sörk-Tronik (Medingen, Deutschland), Technoclone (Dorking, UK), Thermo Labsystems (Helsinki, Finnland), Werner Hassa GmbH (Lübeck, Deutschland), Whatman (Dassel, Deutschland), Wheaton Science Products (Millville, USA), Zeiss (Jena, Deutschland), zell-kontakt (Nörten-Hardenberg, Deutschland).

2.2 Geräte

Name	Hersteller
Blotapparatur Hoefer® SemiPhor™	Amersham Pharmacia Biotech
CO_2 Water Jacketed Inkubator	Forma Scientific
Elektroporationsapparatur Gene Amp II	Biorad
Feinwaage	Sartorius
Feinwaage ALJ 220-5 DNM	Kern
Fluoreszenz-/Lumineszenz-Messgerät anthos lucy 3	anthos Mikrosysteme GmbH
Fluoreszenz-/Lumineszenz-Messgerät Fluoroskan Ascent FL	Thermo Labsystems
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Flüssigszintillationszähler Wallac 1409	Perkin-Elmer
Geldokumentationsanlage Variocam	Phase
Gelkammer für Polyacrylamid-Gele (42 cm × 39 cm)	Biometra
Gelkammer für Polyacrylamid-Gele (10 cm × 10,5 cm)	Hoefer
Gelkammer für Agarose-Gele Sub-Cell® GT	BioRad
Geltrocknungsanlage Phero-Temp	Biotec-Fischer
Glashomogenisator	Wheaton Science Products
Heizblock Techne DRI-Block® DB 2D	Werner Hassa GmbH
Laborzentrifuge 1K15	Sigma-Aldrich
Laborzentrifuge Microfuge® R	Beckman Coulter
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikrowelle	Bosch
Netzgerät Electrophoresis Power Supply - EPS 600/3500	Amersham Pharmacia Biotech
Netzgerät Power Pac 300	BioRad
PCR-Block UNO II	Biometra
pH-Meter Lab 850	Schott
PhosphorImager Typhoon™ 8600	Amersham Pharmacia Biotech
Pipettierhilfe Pipetman	Gilson, Bad Camberg
qPCR-Apparatur GeneAmp 5700	Applied Biosystems
Refraktometer nach Abbe	Schmidt+Haench & Co.
Reinstwassersystem Millipore	Millipore System
Rotor SW50.1	Beckman Coulter
Scanner CanoScan N670U	Canon
Schüttler IKA Vibrax-VXR	Jahnke & Kunkel
Spektralphotometer DU® 640	Beckmann Coulter
Spektrophotometer Nanodrop	Peqlab
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus Instruments
Storage Phosphor Screen	Amersham Pharmacia Biotech
Ultrazentrifuge Optima L-70	Beckman Coulter
Thermomixer 5436	Eppendorf
Vakuum-Pumpe	Werner Hassa GmbH

Vortexer MixoMat	Boskamp GmbH
Waage SBA 41	ScalTec
Wasserbad W22	Sörk-Tronik
Wipper Duomax 1030	Heidolph
Zellcounter Gen S System 2	Beckman Coulter
Zentrifuge Rotixa/RP	Hettich
Zentrifuge Universal 32	Hettich

2.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten, sofern es nicht anders angegeben ist, den Reinheitsgrad *pro analysi*.

Name	Hersteller
Agarose	Cambrex
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1)	Roth
Bactotrypton	Becton Dickinson
Borsäure	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma-Aldrich
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Entwicklerlösung	Kodak
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (EtBr)	Gibco
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Serva
Fibronektin	Calbiochem
Ficoll® 400	Fluka
Fixierlösung	Kodak
Fluoresceindiacetat (FDA)	Invitrogen
Formamid	Roth
Glyzerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Harnstoff	Roth
Hefextrakt	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342 Farbstoff	Invitrogen
Ilimaquinon (IQ)	Sigma-Aldrich
Isoamylalkohol	Merck

Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumacetat (CH_3COONa)	Merck
Natriumarsenit ($NaAsO_2$)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Nonidet P40 (NP40)	LKB
Optiprep™ Iodixanol-Lösung	Axis-Shield
Paraformaldehyd	Fluka
Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid (PMSF)	Roth
Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V	Roth
Roti Phenol pH 4,5	Roth
Rotiphorese® Gel30 (37.5:1)	Roth
Rotiphorese® Gel40 (19:1)	Roth
Saccharose	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
SYBR® Gold	Invitrogen
Stains-All	Sigma-Aldrich
Szintillationslösung	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Trypanblau	Invitrogen
Xylencyanol (XC)	Sigma-Aldrich
α, α, α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris)	Merck
[γ-^{32}P]-ATP (6000 Ci/mmol)	Hartmann

2.4 Gebrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Blottpapier GB003 (3 mm)	Whatman
Einmalinjektionskanülen (21G)	B. Braun Melsungen AG
Einmalküvetten (1,5 ml)	Brand
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner
Einmalreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Einmalröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner
Einmalspitzen (10 μl, 200 μl, 1000 μl)	Sarstedt
Einmalspritzen (1ml)	Becton Dickinson
Einmalgelfiltrationssäulen NAP/Nick/G-25	GE Healthcare
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Biorad
Gewebekulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2, 182 cm^2)	Greiner
Gewebekulturplatten (6, 12, 24, 96 well)	Greiner
Gewebekulturplatten für die Fluoreszenzmikroskopie (*Imaging Plate*, 24 well)	zell-kontakt
Hyperfilm™ ECL	Amersham Pharmacia Biotech
Immobilon-P- / PVDF-Membran (0,45 μm)	Millipore
Kammer-Objekträger (8 Kammern)	Nunc
Kryo-Röhrchen	Greiner
Neubauer Zählkammer	Brandt
Nylonmembran Hybond™ N+	Amersham Pharmacia Biotech
Petrischalen (∅ 10 cm)	Sarstedt
Polyallomer Zentrifugenröhrchen (13 × 51 mm)	Beckman Coulter

2.5 Kits

Name	Hersteller
Dual-Luciferase® Reporter Assay	Promega
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
ECL™ Western Blotting Reagent	Pierce
Non-Interfering™ Protein Assay	Biosciences
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with Rox	Invitrogen
qPCR™ Core Kit for SYBR® Green I	Eurogentec
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Silver Stain Kit	Biorad

2.6 Lösungen und Puffer

Für das Ansetzen aller Lösungen und Puffer wurde hochreines Milli-Q-Wasser (Millipore) verwendet, das mit Hilfe einer Ionenaustauschkartusche aufbereitet wurde und somit der Qualität *aqua bidestillata* entsprach.

Name	Bestandteile
Aufschlusspuffer (1×)	1 % (v/v) NP40 in 1× PBS
Blockierungspuffer I (1×)	10 % (w/v) Milchpulver in 1× TBST
Blockierungspuffer II (1×)	5 % (w/v) Milchpulver in 1× TBST
Blockierungspuffer III (1×)	3 % (w/v) BSA 0,2 % (v/v) Triton-X-100 in 1× PBS
Coomassie-Entfärbelösung für SDS-Gele (1×)	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung für PVDF-Membranen (1×)	40 % (v/v) Methanol 1 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung für SDS-Gele (1×)	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Commassie brillant blue R-250
Coomassie-Färbelösung für PVDF-Membranen (1×)	40 % (v/v) Methanol 1 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Commassie brillant blue R-250
Elektrophoresepuffer für Agarosegele (1×)	1× TAE-Puffer (pH 8,5)
Elektrophoresepuffer für PAA-Gele (1×)	1× TBE-Puffer (pH 8,8)
Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE (1×)	25 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,2 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Ethidiumbromid-Färbelösung (1×)	0,5 μg/ml EtBr in 1× TAE-Puffer
Fixierlösung (1×)	3,7 % (w/v) Paraformaldehyd in 1× PBS

Gradientenpuffer (1×)	60 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,25 M Saccharose 0,14 M NaCl 3 mM EDTA 2 mM DTT
Homogeniserungspuffer (1×)	20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,25 M Saccharose 0,14 M NaCl 1 mM EDTA 2 mM DTT
Hybridisierungspuffer-Puffer für miRNA (5×)	30 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,1 M KCl 2 mM $MgCl_2$
Hybridisierungspuffer-Puffer für siRNA (10×)	0,2 M Tris-HCl (pH 7,4) 1 M NaCl
Kern-Waschpuffer (1×)	2 mM KH_2PO_4 (pH 6,55) 0,15 M NaCl 1 mM EGTA 5 mM $MgCl_2$
Ladepuffer für Agarosegele (6×)	25 % (w/v) Ficoll® 400 0,1 % (w/v) BPB 0,05 % (w/v) XC in 1× TAE-Puffer (pH 8,5)
Ladepuffer für denaturierende PAA-Gele (2×)	7,0 M Harnstoff 0,1 % (w/v) BPB 0,1 % (w/v) XC in 1× TBE (pH 8,8)
Ladepuffer für native PAA-Gele (2×)	40 % (w/v) Saccharose 0,1 % (w/v) BPB in 1× TBE (pH 8,8)
Ladepuffer für SDS-PAGE (2×)	0,1 M Tris-HCl (pH 6,8) 4 % (w/v) SDS 20 % (w/v) Glycerin 20 mM DTT 0,05 % (w/v) BPB
LB-Medium (1×, pH 7,4)	1 % (w/v) Bactotrypton 1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefextrakt

Lyse-Puffer (1×)	2 mM KH_2PO_4 (pH 6,55) 0,15 M NaCl 1 mM EGTA 5 mM $MgCl_2$ 0,3 % (v/v) Triton-X 100
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)-Puffer (1×, pH 7,4)	0,14 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4
RNase-Puffer (10×)	0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) 0,1 M $MgCl_2$
Sammelgelpuffer (8×)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
Stains-All-Färbelösung (1×)	15 mM Tris-HCl (pH 8,8) 0,005 % (w/v) Stains-All 5 % (v/v) Formamid 25 % (v/v) Isopropanol
Stopppuffer (1×)	100 mM Glycin in 1× PBS
SYBR® Gold-Färbelösung (1×)	0,1 Vol% SYBR® Gold in 1× TAE-Puffer
Tris-gepufferte Saline mit Tween 20 (TBST)-Puffer (1×)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,1 M NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer (1×)	Elektrophoresepuffer (1×) 15 % (v/v) Methanol
Trenngelpuffer (4×)	1,5 M Tris (pH 8,8)
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50×, pH 8,5)	2 M Essigsäure 50 mM EDTA
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10×, pH 8,8)	0,9 M Borsäure 20 mM EDTA
Tris-EDTA (TE)-Puffer (1×)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA
Waschpuffer I (1×)	0,1 % (v/v) Tween 20 in 1× PBS
Waschpuffer II (1×)	0,2 % (w/v) BSA in 1× PBS

2.7 Zellkultur

2.7.1 Grundmedien und Zusätze

Name	Hersteller
Wachstumszusatz für Endothelzellen (ECGS, 10 mg)	Technoclone
Fibronektin-Lösung (50 μg/ml)	Calbiochem
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco
Heparin-Gebrauchslösung (25000 U/ml)	Ratiopharm
Medium 199	Lonza
OptiMEM-Medium	Gibco
Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung (10×)	Linearis

2.7.2 Zelllinien

Name	Ursprung	Vollmedium	Herkunft / Referenz
ECV-304	humanes Harnblasen-Karzinom	Medium 199 10 % (v/v) FKS	DSMZ
ECV-GL3	polyklonale Kultur von ECV-304, stabil transfiziert mit dem Plasmid pGJ3-Luci	Medium 199 10 % (v/v) FKS	Veldhoen *et al.* [135]
Huvec	humanes Nabelschnurendothel	Medium 199 20 % (v/v) FKS 50 μg/ml ECGS 5 U/ml Heparin	Technoclone

2.8 Enzyme, Proteine und Größenmarker

Name	Hersteller
Autokriner Motilitätsfaktor (AMF)	Sigma-Aldrich
Choleratoxin-B-Untereinheit (CTxB)	Sigma-Aldrich
Gene Ruler™ DNA Ladder 1 kb Plus	Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder High Range	Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder Low Range	Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder Ultra Low Range	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
RiboLock (40 U/μl)	Fermentas
RNase A/T1 Mix (2 mg/ml RNase A, 5000 U/ml RNase T1)	Fermentas
Superscript® II RNase H^- Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Invitrogen
T4 Polynukleotidkinase (10 U/μl)	Fermentas

2.9 Antikörper

Name	Hersteller
Anti-Ago2 (11A9) (monoklonaler Ratten-IgG)	Ascenion
Anti-Dcp1A (monoklonaler Kaninchen-IgG)	Jens Lykke-Andersen
Anti-GAPDH (polyklonaler Kaninchen-IgG)	abcam
Anti-Hsp70 (monoklonaler Maus-IgG)	abcam
Anti-Hsp90 (polyklonaler Ziegen-IgG)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Kaninchen-Alexa488 (polyklonaler Ziegen-IgG)	Invitrogen
Anti-Kaninchen-HRP (polyklonaler Ziegen-IgG)	DakoCytomation
Anti-Lamin A/C (monoklonaler Kaninchen-IgG)	Cell Signalling Technology
Anti-Maus-HRP (polyklonaler Ziegen-IgG)	DakoCytomation
Anti-Ratte-Alexa555 (polyklonaler Ziegen-IgG)	Invitrogen
Anti-Ratte-HRP (polyklonaler Ziegen-IgG)	Jackson ImmunoResearch
Anti-TIA1 (polyklonaler Ziegen-IgG)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ziege-Alexa488 (polyklonaler Kaninchen-IgG)	Invitrogen
Anti-Ziege-HRP (polyklonaler Kaninchen-IgG)	DakoCytomation
Anti-β-Aktin (polyklonaler Kaninchen-IgG)	abcam

2.10 Nukleinsäuren

2.10.1 Plasmide

RL-hmga2_m7 [201]: Das Plasmid RL-hmga2_m7 kodiert das *Renilla* Luciferase-Reportergen, dessen mRNA eine mutierte 3´-UTR des *high mobility group AT-hook 2* (hmga2)-Gens trägt. Dieses Konstrukt beinhaltet 7 Bindungsstellen für die mutierte *let7A* (mlet7A) miRNA, die im natürlichen Organismus nicht existiert und somit eine unbeeinflusste Analyse von miRNA-induzierten Phänotypen zulässt.

pGL3-Control (Promega): Das Plasmid pGL3-Control kodiert das Firefly Luciferase-Gen, dessen Expression in dieser Arbeit zur Kontrolle der Transfektionseffizienz verwendet wurde.

2.10.2 Chemisch synthetisierte Nukleinsäuren

Die hier aufgeführten Nukleinsäuren wurden von den Firmen Biomers oder IBA synthetisiert und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt. Deren Reinheit, Konzentration und Integrität wurde durch UV-Spektroskopie (Abschnitt 3.2.1) sowie unter denaturierenden Bedingungen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.2.3) kontrolliert. DNA-Nukleotide sind in Großbuchstaben und RNA-Nukleotide in Kleinbuchstaben angegeben. Phosphorothioat (PS)-modifizierte Internukleotid-Verknüpfungen sind durch einen Stern gekennzeichnet, *locked nucleic acid* (LNA)- und 2'-O-Methyl (OMe)-Modifikationen sind einfach bzw. doppelt unterstrichen. Der Peptidanteil in siRNA-Peptid-Konjugaten ist in eckigen Klammern im Einbuchstabencode für Aminosäuren angegeben.

Oligodesoxyribonukleotide (asON und PS-ON)

Name[1]	Sequenz (5´- 3´)
asAgo2 ISIS136764	C*T*G*C*T*G*G*A*A*T*G*T*T*T*C*C*A*C*T*T
asAgo2 140/20	A*A*T*T*T*G*A*T*T*G*T*T*C*T*C*C*C*G*G*A
asAgo2 1295/19	T*A*T*T*C*C*T*G*C*C*C*C*C*G*T*A*G*A*G
asAgo2 2269/20	G*G*T*A*G*A*A*G*T*C*G*A*A*C*T*C*G*G*T*G
asAgo2 2953/20	T*T*A*A*A*A*A*C*A*A*G*T*A*A*A*T*T*G*A*A
asAgo2 2966/20	G*A*G*A*A*T*C*A*T*G*T*A*T*T*A*A*A*A*A*C
asAgo2 2978/20	A*T*C*A*A*T*T*T*C*A*T*A*G*A*G*A*A*T*C*A
asAgo2 3022/24	G*T*T*T*T*G*T*G*T*T*G*C*T*T*T*C*A*C*T*C*T*C*A*G
asAgo2 3024/24	G*T*G*T*T*T*T*G*T*G*T*T*G*C*T*T*T*C*A*C*T*C*T*C
asAgo2 3024/24mut	G*T*G*T*T*C*C*G*T*G*T*T*A*A*T*T*T*C*A*A*G*C*T*C
asAgo2 3024/24inv	C*T*C*T*C*A*C*T*T*T*C*G*T*T*G*T*G*T*T*T*T*G*T*G
asAgo2 3024/24$^{\text{PS-LNA}}$	GTGTT*T*T*G*T*G*T*T*G*C*T*T*T*C*A*CTCTC
asAgo2 3024/24mut$^{\text{PS-LNA}}$	GTGTT*C*C*G*T*G*T*T*A*A*T*T*T*C*A*AGCTC
asAgo2 3024/24$^{\text{PS-OMe}}$	G*T*G*T*T*T*T*T*G*T*G*T*T*G*C*T*T*T*C*A*C*T*C*T*C
asAgo2 3024/24mut$^{\text{PS-OMe}}$	G*T*G*T*T*C*C*G*T*G*T*T*A*A*T*T*T*C*A*A*G*C*T*C
asAgo2 3024/24^{OMe}	GTGTTTTGTGTTGCTTTCACTCTC
asAgo2 3024/24mut^{OMe}	GTGTTCCGTGTTAATTTCAAGCTC
asAgo2 3024/22	G*T*T*T*T*G*T*G*T*T*G*C*T*T*T*C*A*C*T*C*T*C
asAgo2 3025/21	G*T*T*T*T*G*T*G*T*T*G*C*T*T*T*C*A*C*T*C*T
asAgo2 3327/25	G*A*C*T*G*T*C*A*G*T*A*T*A*T*T*G*T*C*T*T*T*T*T*T
asAgo2 3330/22	G*A*C*T*G*T*C*A*G*T*A*T*A*T*T*G*T*C*T*T*T*T
asAgo2 3340/20	G*A*T*G*A*T*T*A*G*A*C*T*G*T*C*A*G*T*A*T
asKtrl I	T*A*C*C*G*C*T*C*T*T*T*T*G*A*C*T*T*T*T*A
asKtrl II	G*G*T*G*T*C*A*A*C*A*G*A*A*C*T*G*G*G
asKtrl III	C*T*G*A*C*T*T*G*A*T*G*G*T*C*C*A*T*G
asKtrl IV	G*T*G*A*C*C*T*T*C*T*G*G*A*C*C*T*T*G
PS-ON TM6-12	$(T*C*G*T*G*T)_{12}$

[1] Aus der Nomenklatur der Ago2-gerichteten asONs (asAgo2) leiten sich deren Zielsequenzen innerhalb der Ago2-mRNA wir folgt ab: „asAgo2 erste Position der Zielsequenz / Länge des asON“.

Oligoribonukleotide (miRNA, siRNA und siRNA-Peptid-Konjugate)

Name	Sequenz (5´- 3´)		Ziel-mRNA
mlet7A	*sense*	acuauacaaucuacuggcguucc	*Renilla* Luciferase [202]
	antisense	ugcguuaguagguuguauaguuu	
mlet7A-Alexa488	*sense*	acuauacaaucuacuggcguucc–(Alexa488)	*Renilla* Luciferase [202]
	antisense	ugcguuaguagguuguauaguuu	

siAgo2	*sense* *antisense*	gcacggaaguccaucugaauu uucagauggacuuccgugcuu	Ago2 [42]
siLAM	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT uguucuucuggaaguccagTT	Lamin A/C [203]
siLAM-Alexa488	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT–(Alexa488) uguucuucuggaaguccagTT	Lamin A/C [203]
siLAM-Alexa555	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT–(Alexa555) uguucuucuggaaguccagTT	Lamin A/C [203]
siLAM-asER	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT uguucuucuggaaguccagTT–[KDEL]	Lamin A/C [203]
siLAM-asNLS	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT uguucuucuggaaguccagTT–[PKKKRKV]	Lamin A/C [203]
siLAM-asPTS1	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT uguucuucuggaaguccagTT–[SKL]	Lamin A/C [203]
siLAM-asTOX	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT uguucuucuggaaguccagTT–[TQIENLKEKG]	Lamin A/C [203]
siLAM-asTOX-Alexa555	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT–(Alexa555) uguucuucuggaaguccagTT–[TQIENLKEKG]	Lamin A/C [203]
siLAM-mut	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT uguucuucuccaaguccagTT	nicht vorhanden [204]
siLAM-mut-sTOX	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT–[TQIENLKEKG] uguucuucuccaaguccagTT	nicht vorhanden [204]
siLAM-sTOX	*sense* *antisense*	cuggacuuccagaagaacaTT–[TQIENLKEKG] uguucuucuggaaguccagTT	Lamin A/C [203]
siscr3	*sense* *antisense*	cggacgcacuggucugaccggTT ccggucagaccagugcguccgTT	nicht vorhanden [205]

Zielsequenzen der verwendeten asON, siRNA und miRNA

In Abbildung 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten asON-, siRNA- und miRNA-Systeme sowie deren Zielsequenzen aufgeführt. Als Kontroll-RNA für die verwendeten siRNAs siLAM und siAgo2 sowie für die miRNA mlet7A wurde die siscr3 verwendet, die in keiner der untersuchten mRNAs eine Zielsequenz aufweist. Als Kontroll-ON für die verwendeten asONs wurden das asKtrl I sowie in späteren Versuchen das asAgo2 3024/24mut (jeweils in der Chemie des potenten asAgo2 3024/24) verwendet, die beide keine Zielsequenz innerhalb der Ago2-mRNA aufweisen. Sowohl Ago2 als auch Lamin A/C werden endogen kodiert, wohingegen es sich bei dem mlet7A-regulierten RL-hmga2_m7-System um ein artifizielles miRNA-System handelt. Deshalb wurde als Transfektionskontrolle für das Plasmid RL-hmga2_m7 das Plasmid pGL3-Control verwendet.

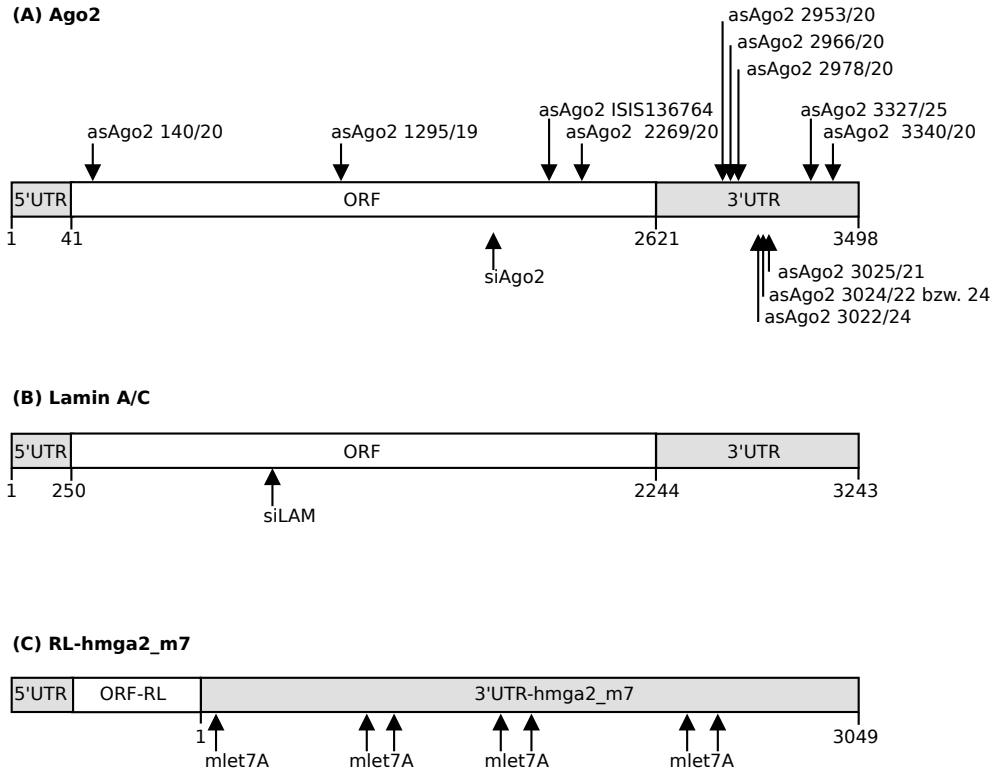


Abbildung 2.1: Zielsequenzen der in dieser Arbeit verwendeten asONs, siRNAs und miRNA. (A) Die Zielsequenz der siAgo2 liegt an Position 1425-1443 der endogenen Ago2-mRNA. Die Zielsequenzen der Ago2-gerichteten asONs (asAgo2) leiten sich aus Nomenklatur der asONs wie folgt ab: „asAgo2 erste Position der Zielsequenz / Länge des asON“. Die Zielsequenz des von der Firma *ISIS Pharmaceuticals* entworfenen asAgo2 ISIS136764 [206] liegt an Position 2218 – 2237 der endogenen Ago2-mRNA. (B) Die Zielsequenz der siLAM liegt an Position 877 – 859 der endogenen Lamin A/C-mRNA. (C) Die Zielsequenz der mlet7A liegt innerhalb des Plasmid-kodierten *Renilla* Luciferase (RL) Reportergens, dessen mRNA eine mutierte 3'-UTR des *high mobility group AT-hook 2* (hmga2)-Gens trägt. Diese 3'-UTR weist 7 Bindungsstellen für die mlet7A auf (Position 21 – 27, 1106 – 1112, 1258 – 1264, 1647 – 1653, 1696 – 1702, 2554 – 2560, 2574 – 2580).

Primerpaare

Primerpaar	Sequenz (5´- 3´)		Amplikonlänge (bp)
Ago2	*forward*	TGGTTTGGCTTCCATCAGTCC	86
	revers	CCTTGTAAAACGCTGTTGCTGAC	
GAPDH	*forward*	AACAGCGACACCCACTCCTC	237
	revers	GGAGGGGAGATTCAGTGTGGT	
Lamin A/C	*forward*	AATGATCGCTTGGCGGTCTA	61
	revers	GCCCTGCGTTCTCCGTTT	
U6	*forward*	CGCTTCGGCAGCACATATAC	92
	revers	GGAACGCTTCACGAATTTC	
β-Glukoronidase	*forward*	TTTGGAATTTTGCCGATTTCAT	78
	revers	GCCGAGTGAAGATCCCCTTT	

2.11 Programme

Name	Hersteller
AxioVision 4.5	Zeiss
GeneAmp® 5700 SDS	Applied Biosystems
GraFit 5	Erithacus Software
Image Quant 5.2	Amersham Pharmacia Biotech
mfold 2.3	accelrys®
Primer Express 2.0	Applied Biosystems

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

Die verwendeten transformierten *E.coli* Bakterienstämme wurden von Dr. Alessandra Mescalchin (XL1 blue/pGL3-Control, DH5α/RL-hmga2 m7) vom Institut für Molekulare Medizin für die Isolation der in Abschnitt 2.10.1 beschriebenen Plasmide zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Herstellung von Glyzerinkulturen von *E.coli* Bakterien

Für die Langzeitlagerung von transformierten *E.coli* Bakterienstämmen wurden Glyzerinkulturen angelegt. Dazu wurden 500 μl einer Bakterienlösung (OD_{600nm} = 0,6) mit 500 μl einer sterilen 50 %igen (v/v) Glyzerin-Lösung gemischt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.1.2 Gewinnung von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden 3 ml LB-Medium mit 20 μl einer Glyzerinkultur transformierter *E.coli*-Bakterien (Abschnitt 3.1.1) inokuliert und für 16 h in einem Schüttelinkubator (37°C, 200 U/min) kultiviert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit dem *GenElute Plasmid Miniprep Kit* nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurde wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben bestimmt.

3.2 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

3.2.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte mittels photometrischer Bestimmung der Absorption bei 260 nm an dem Spektrophotometer *NanoDrop* mit einem Messvolumen von 1 μl. Zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration c wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz herangezogen:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \tag{3.1}$$

mit A = Absorption der Lösung, ε = Extinktionskoeffizient und d = Schichtdicke. Für kurze Oligonukleotide mit bekannter Sequenz wurde der Extinktionskoeffizient als Summe der molaren Absorptionskoeffizienten der einzelnen Basen berechnet und in die Formel eingesetzt. Für Nukleinsäuren mit unbekannter Sequenz wurde näherungsweise folgende Relation verwendet:

- 1 OD_{260nm} = 50 μg/ml DNA (ds),
- 1 OD_{260nm} = 33 μg/ml Oligonukleotide (ss) bzw.
- 1 OD_{260nm} = 40 μg/ml RNA (ds und ss).

Für die Abschätzung der Nukleinsäurereinheit wurde der Quotient der bei 260nm und 280nm gemessenen Absorption (A260 nm / A280 nm) verwendet, da bei 280 nm das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Befand sich der Quotient für RNA im Bereich 1,9 – 2,1 bzw. für DNA im Bereich von 1,8 – 2,0 wurden diese als ausreichend rein betrachtet.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für die Analyse von langkettigen Nukleinsäuren, wie z.B. PCR-Produkten verwendet. Die verwendeten Gele hatten eine Größe von 150 bzw. 105 x 100 x 5 mm. Die Agarose-Konzentration wurde unter Verwendung von 1× TAE-Puffer (Abschnitt 2.6) an die Länge der aufzutrennenden Nukleinsäuren angepasst (Tabelle 3.1). Die Proben wurden in 6× Ladepuffer für Agarose-Gele (Abschnitt 2.6) 1 : 6 verdünnt. Als Laufpuffer diente 1× TAE-Puffer. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Gelkammer bei 10 V/cm für 30 – 60 min unter Verwendung eines adäquaten Größenmarkers (Abschnitt 2.8). Zur Visualisierung der nach Größe und Struktur aufgetrennten Nukleinsäuren wurde eine der in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Methoden ausgewählt.

Agarosekonzentration (%)	Nukleinsäurelänge (bp)
0,5	1.000 – 30.000
0,7	800 – 12.000
1,0	500 – 10.000
1,2	400 – 7.000
1,5	200 – 3.000
2,0	50 – 2.000

Tabelle 3.1: Agarosekonzentrationen für die Agarose-Gelelektrophorese.

3.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde für die Analyse von kurzkettigen Nukleinsäuren, wie siRNA, miRNA, asON und Primern verwendet. Alle für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendeten Stammlösungen wurden mit Hilfe eines Filters mit einer Porengröße von 0,45 μm steril filtriert und unter Wasserstrahl-Vakuum entgast. Als Laufpuffer diente 1× TBE-Puffer (Abschnitt 2.6). Die verwendeten Gele hatten eine Größe von 110 x 120 x 1 mm. Zur Visualisierung der nach Größe und/oder Struktur aufgetrennten Nukleinsäuren wurde eine der in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Methoden ausgewählt.

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse von doppelsträngigen Nukleinsäuren erfolgte mittels nativer PAGE. Je nach Länge der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurde die Konzentration der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1, v/v) unter Verwendung von 1× TBE-Puffer angepasst (Tabelle 3.2) und durch Zugabe von 0,1 % (w/v) APS sowie 0,1 % (v/v) TEMED zum Polymerisieren gebracht. Die Proben wurden in 2× Ladepuffer für native PAA-Gele (Abschnitt 2.6) 1 : 2 verdünnt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelkammer bei 12,5 V/cm für 2 – 4 h unter Verwendung eines

adäquaten Größenmarkers (Abschnitt 2.8). Um ein Aufschmelzen der doppelsträngigen Nukleinsäuren durch zu hohe Temperaturen zu verhindern, fanden Vorlauf und Lauf des Gels bei einer Temperatur von ca. 4°C statt.

Acrylamidkonzentration (%)	Nukleinsäurelänge (bp)
3,5	100 – 2.000
5,0	75 – 500
8,0	50 – 400
12,0	35 – 250
15,0	20 – 150
20,0	5 – 100

Tabelle 3.2: Acrylamidkonzentrationen für die native PAGE.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse von einzelsträngigen Nukleinsäuren, unabhängig von ihrer Sekundärstruktur, erfolgte mittels denaturierender PAGE. Je nach Länge der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurde die Konzentration einer Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1, v/v) unter Verwendung von 1× TBE-Puffer angepasst (Tabelle 3.3), auf 8 M Harnstoff eingestellt und durch Zugabe von 0,1 % (w/v) APS sowie 0,1 % (v/v) TEMED zum Polymerisieren gebracht. Die Proben wurden in 2× Ladepuffer für denaturierende PAA-Gele (Abschnitt 2.6) 1 : 2 verdünnt und vor dem Gelauftrag für 5 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelkammer bei 25 V/cm für 45 – 90 min unter Verwendung eines adäquaten Größenmarkers (Abschnitt 2.8). Um denaturierende Bedingungen zu gewährleisten, fanden Vorlauf und Lauf des Gels bei einer Temperatur von ca. 50°C statt.

Acrylamidkonzentration (%)	Nukleinsäurelänge (nt)
4,0	100 – 500
5,0	70 – 300
6,0	45 – 70
8,0	35 – 45
10,0	25 – 35
20,0	8 – 25

Tabelle 3.3: Acrylamidkonzentrationen für die denaturierende PAGE.

3.2.4 Färbung von Nukleinsäuren in Agarose- und Polyacrylamid-Gelen

Ethidiumbromid-Färbung

Die Visualisierung von Nukleinsäuren in Agarose- bzw. Polyacrylamid-Gelen mit Hilfe von Ethidiumbromid erfolgte durch Schwenken des Gels in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (Abschnitt 2.6) für ca. 30 min. Im Anschluss wurde das Gel zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert.

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt für DNA und RNA bei ca. 10 ng pro Bande.

Stains-All Färbung

Mit Hilfe von *Stains-All* können Nukleinsäuren und Proteine in Polyacrylamid-Gelen durch Anlagerung eines blauen Farbstoffes visualisiert werden. Dazu wurde das Gel für ca. 1 h in der *Stains-All* Färbelösung (Abschnitt 2.6) inkubiert und im Anschluss fotografiert. Bei Verwendung dieser Färbe-Methode erfolgte der Gellauf ohne Farbstoffe im Probenpuffer. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt für DNA und RNA bei ca. 10 ng pro Bande.

SYBR® Gold Färbung

Die Visualisierung von Nukleinsäuren in Agarose- bzw. Polyacrylamid-Gelen mit Hilfe von *SYBR® Gold* erfolgte durch Inkubation des Gels in einer *SYBR® Gold* Färbelösung (Abschnitt 2.6) für ca. 30 min. Komplexe aus Nukleinsäuren und *SYBR® Gold* fluoreszieren bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm. Deshalb wurde das Gel im PhosphorImager *Typhoon™ 8600* mit dieser Wellenlänge angeregt, die emittierte Fluoreszenz detektiert und mit Hilfe des Programms *Image Quant 5.2* ausgewertet. Bei Verwendung dieser Färbe-Methode erfolgte der Gellauf ohne Farbstoffe im Probenpuffer. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt für DNA und RNA liegt bei ca. 1 ng pro Bande.

3.2.5 Elektrotransfer von Nukleinsäuren

Der Transfer von Nukleinsäuren von einem Polyacrylamid-Gel auf eine *Hybond™ N+* Nylonmembran erfolgte im „Semidry-Verfahren“. Dabei wurde das Gel auf einer in H_20 aktivierten Nylonmembran platziert und zwischen jeweils drei Lagen mit 0,5× TBE-Puffer (Abschnitt 2.6) getränktem Blottpapier in der folgenden Anordnung gelagert:

(-) Anode
3 Lagen Blottpapier
Nativ-PAA-Gel
Nylonmembran
3 Lagen Blottpapier
(+) Kathode

Der Transfer erfolgte in einer horizontalen Blottaparatur für 10 min bei 3,3 mA/cm^2. Die Nylonmembran wurde daraufhin 10 min bei 90°C getrocknet und in Folie eingeschweißt.

3.2.6 Isolation von Nukleinsäuren mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde in dieser Arbeit verwendet um nach dem Zellaufschluss Proteine und DNA quantitativ von der zellulären Gesamt-RNA abzutrennen. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt um einer Degradation der RNA durch zelluläre Ribonukleasen vorzubeugen. Das für die Extraktion verwendete Gesamtzelllysat wurde mit einem gleichen Volumen

Phenol (pH 4,5 – 5) versetzt, gut durchmischt und für 30 min bei 20.000 × g bis zum Erreichen der Phasentrennung zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde quantitativ abgenommen, zweimalig mit einem gleichen Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1, (v/v)) extrahiert und für 5 min bei 20.000 × g bis zum Erreichen der Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die darin gelöste zelluläre RNA, wie unter Abschnitt 3.2.7 beschrieben, gefällt.

3.2.7 Fällung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Ethanol

In Gegenwart monovalenter Kationen und bei leicht saurem pH-Wert bildet RNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert werden kann. Dazu wurde eine wässrige RNA-Lösung mit dem 2,75-fachem Volumen 100 %igen (v/v) Ethanol sowie dem 0,1-fachem Volumen einer 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt. Dieses Gemisch wurde für 30 min bei −80°C aufbewahrt und im Anschluss die RNA durch Zentrifugation (30 min, 20.000 × g) pelletiert. Die präzipitierte RNA wurde mit 70 %igen (v/v) Ethanol gewaschen um Salze zu entfernen. Nach Trocknung bei Raumtemperatur konnte das RNA-Pellet in dem gewünschten Volumen H_20 oder 1× Hybridisierungspuffer (Abschnitt 2.6) gelöst werden.

3.2.8 Reverse Transkription

Die durch Phenol/Chloroform-Extraktion (Abschnitt 3.2.6) gewonnene zelluläre Gesamt-RNA wurde mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 400 ng RNA sowie entweder die *SuperScriptTM II RNase H-* Reverse Transkriptase oder das *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* nach den Angaben des jeweiligen Herstellers unter Verwendung von *random* Hexamer-Primern eingesetzt. Die aus der Reaktion hervorgegangene cDNA-Lösung wurde 1:10 mit H_20 verdünnt und zum quantitativen Nachweis in die in Abschnitt 3.2.9 beschriebenen quantitative Polymeraseketten-Reaktion (qPCR) eingesetzt.

3.2.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde entweder mit dem *SYBR-Green PCR Core Kit* oder mit dem *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix* (Abschnitt 2.5) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Dabei wurden jeweils 5 μl einer cDNA-Lösung (Abschnitt 3.2.8) pro Reaktion eingesetzt. Die Analyse der cDNA-Proben erfolgte in Doppelbestimmung mit den in Abschnitt 2.10.2 angegebenen spezifischen Primern. Amplifikation und Detektion fanden in der qPCR-Apparatur *GeneAmp 5700* statt und die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms *GeneAmp® SDS*. Alle Proben wurden auf die entsprechenden mRNA-Mengen der *House keeping* Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder β-Glukoronidase (GUSB) normalisiert.

3.2.10 Hybridisierung von einzelsträngiger RNA

Für die Hybridisierung von siRNA und miRNA (Abschnitt 2.10.2) wurden äquimolare Mengen der komplementären *sense* und *antisense* Einzelstränge in 1× Hybridisierungspuffer für siRNA bzw. miRNA (Abschnitt 2.6) für 3 min bei 95°C denaturiert und im Anschluss für 1 h bei 37°C

inkubiert. Die Überprüfung der vollständigen Hybridisierung der Einzelstränge erfolgte mittels nativer PAGE (Abschnitt 3.2.3).

3.2.11 Bestimmung der Stabilität von siRNA und siRNA-Peptid-Konjugaten

Für die Untersuchung der Nukleaseresistenz von siRNA und siRNA-Peptid-Konjugaten wurden diese in einer Endkonzentration von 0,5 μM für 0 – 48 h bei 37°C entweder in einem zytosolischen S100-Extrakt (Abschnitt 3.4.10) oder in Serum-haltigem Vollmedium für ECV-304 Zellen (Abschnitt 2.7.2) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden dem Ansatz Aliquots (Probenvolumen = 10μl) entnommen, diese mittels Flüssig-Stickstoff eingefroren und bei −80°C gelagert wurden. Im Anschluss wurden die Proben 1:10 in 1× Hybridisierungspuffer für siRNA (Abschnitt 2.6) verdünnt, mit dem gleichen Volumen 2× Ladepuffer für native PAA-Gele versetzt (Abschnitt 2.6) und mittels nativer PAGE (Abschnitt 3.2.3) analysiert. Die Visualisierung der Nukleinsäuren im Nativ-PAA-Gel erfolgte durch SYBR® Gold Färbung (Abschnitt 3.2.4).

3.2.12 Radioaktive 5'-Endmarkierung einzelsträngiger RNA

Für die Herstellung radioaktiv-markierter RNA-Sonden erfolgte eine ^{32}P-5'-Markierung des RNA-Einzelstranges durch die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK), die den Transfer des γ-Phosphats des [γ^{32}P]-ATP auf das 5'-OH Ende des Nukleinsäurestranges katalysiert. Es wurden 16 pmol sense RNA (Abschnitt 2.10.2) mit 16 pmol [γ^{32}P]-ATP in 1× PNK-Puffer durch 10 U T4-PNK für 30 min bei 37°C phosphoryliert. Die Abtrennung von freiem [γ^{32}P]-ATP erfolgte mittels Ausschlusschromatographie auf einer *Sephadex™ G-50* Säule. Die radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurden in 400 μl H_2O eluiert. Die Effizienz der radioaktiven Markierung wurde mittels Flüssigszintillationsmessung von 1 μl des Reaktionsansatzes im β-Counter bestimmt.

3.2.13 Autoradiographie

Unter Autoradiographie versteht man die bildhafte Sichtbarmachung von radioaktiven Isotopen mit Hilfe eines Strahlungsdetektors. Dazu wurden PAA-Gele oder Nylonmembranen je nach Anwendung 5 min bis 24 h auf einer [^{32}P]-sensitiven Bildplatte (*Storage Phosphor Screen*) exponiert. Diese wurde anschließend im PhosphorImager *Typhoon™ 8600* ausgelesen und mit dem Programm *ImageQuant* ausgewertet.

3.2.14 Computergestützte Analyse der Sekundärstruktur der Ago2-mRNA

Die computergestützte Analyse der Sekundärstruktur der Ago2-mRNA (NM_012154.3) mit Hilfe des Programms *mfold 2.3* erfolgte nach Patzel *et al.* [207] und wurde als Grundlage für die Auswahl potenter Antisense-Oligonukleotide zur Suppression der Ago2-Genexpression verwendet. Die Strukturvorhersage der Ago2-mRNA erfolgte in Fenstergrößen von 1400 nt, wobei diese sukzessive mit einer Schrittweite von 100 nt entlang der mRNA-Sequenz verschoben wurden. Für jede Fenstergröße wurden die 10 energieärmsten Sekundärstrukturen bestimmt und diese auf ungepaarte Bereiche mit einer Länge von mehr als 10 nt untersucht. Sequenzen für die ungepaarte Bereiche

dieser Größe vorhergesagt wurden und in möglichst allen Strukturvorhersagen konserviert waren, wurden als zugänglich definiert. Um bereits an diesem Punkt Interferenzen mit anderen Proteinen der Ago-Familie auszuschließen, wurden die als zugänglich definierten Regionen durch einen Sequenzvergleich mittels *NPS@: Network Protein Sequence Analysis*[1] auf Sequenz-Homologien zu den mRNAs von Ago1, Ago3 und Ago4 untersucht. Aus den als zugänglich definierten Regionen, die in den Strukturvorhersagen der Ago2-mRNA möglichst stark konserviert waren und gleichzeitig möglichst wenige Homologien zu den mRNAs von Ago1, Ago3 und Ago4 aufwiesen, wurden komplementäre Oligonukleotide mit einer Länge von 19 – 25 nt abgeleitet (Abschnitt 2.10.2). Dabei wurden, neben der Sequenzhomologie, die publizierten Regeln bezüglich der Schmelztemperatur, dem GC-Gehalt sowie dem Potential zur Ausbildung von Selbststrukturen [24, 208, 209] berücksichtigt und mit Hilfe des Programms *Primer Express 2.0* analysiert. Weiterhin wurde die Spezifität der Ago2-gerichteten asONs durch einen Sequenzabgleich mit dem humanen Transkriptom mittels *Nucleotide BLAST*[2] gewährleistet.

3.3 Methoden im Umgang mit Proteinen

3.3.1 Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels photometrischer Bestimmung der Absorption bei 480 nm an dem Spektrophotometer *DU® 640* unter Verwendung des *Non-Interfering™ Protein-Assay* nach den Angaben des Herstellers. Dieser Assay beruht auf der Präzipitation und Immobilisation der Proteine im Reaktionsgefäß und der damit verbundenen Abtrennung von interferierenden Reagenzien wie DTT oder SDS. Die abschließende photometrische Messung der Absorption bei 480 nm basiert auf der spezifischen Bindung von Kupfer-Ionen an das Peptid-Rückgrat der Proteine, wobei die ungebundenen Kupfer-Ionen mit Hilfe einer chemischen Farbreaktion detektiert werden. Die Konzentration ungebundener Kupfer-Ionen sowie die damit verbundene Intensität des Farbumschlages sind somit umgekehrt proportional zur Proteinkonzentration. Der Assay wurde auf eine Standardreihe von 0 – 50 μg BSA normiert und wies eine Nachweisgrenze von 500 ng Protein auf.

3.3.2 Fällung von Proteinen mit Hilfe von Trichloressigsäure

Die Fällung von Proteinen mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) stellt eine sehr effiziente, quantitative Präzipitationsmethode dar, die in dieser Arbeit zur Konzentrierung einer Probe vor der SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.3) verwendet wurde. Die Proteine einer wässrigen Lösung wurden mit TCA in einer Endkonzentration von 20 % (w/v) versetzt und für 30 min bei 4°C präzipitiert. Im Anschluss an einen Zentrifugationsschritt (20 min, 20.000 × g, 4°C) wurde das Proteinpellet in 1× PBS-Puffer (Abschnitt 2.6) resuspendiert und anschließend mit dem gleichen Volumen 2× Ladepuffer für SDS-PAGE (Abschnitt 2.6) versetzt.

[1] http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html
[2] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

3.3.3 Western-Analyse

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Western-Analyse von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [210]. Die verwendeten Gele hatten eine Größe von 85 x 100 x 0,75 mm und setzten sich aus einem 5 %igem (v/v) Sammelgel und einem 8 %igem (v/v) Trenngel (Tabelle 3.4) zusammen. Die Proben wurden in 2× Ladepuffer für SDS-PAGE (Abschnitt 2.6) 1 : 2 verdünnt und vor dem Probenauftrag 5 min bei 95°C denaturiert. Als Laufpuffer diente 1× Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE (Abschnitt 2.6). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelkammer bei 15 V/cm für 90 min unter Verwendung eines adäquaten Größenmarkers (Abschnitt 2.8). Um konstante denaturierende Bedingungen zu gewährleisten, fanden Vorlauf und Lauf des Gels bei einer Temperatur von ca. 50°C statt. Zur Visualisierung der nach Größe aufgetrennten Proteine wurde eine der in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Methoden ausgewählt. Alternativ erfolgte, wie im Folgenden beschrieben, der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mit anschließender spezifischer Immundetektion.

Substanz	Sammelgel	Trenngel
H_2O	1,4 ml	2,3 ml
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1, (v/v))	0,33 ml	1,3 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	-	1,3 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,25 ml	-
10% (w/v) SDS	20 μl	50 μl
10% (w/v) APS	20 μl	50 μl
TEMED	2 μl	5 μl

Tabelle 3.4: Sammel- und Trenngel-Zusammensetzung für die SDS-PAGE.

Elektrotransfer von Proteinen

Der Transfer von Proteinen von einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte im „Semidry-Verfahren“. Dabei wurde das Gel auf einer in 100 %igem Methanol aktivierten und anschließend in 1× Transferpuffer (Abschnitt 2.6) äquilibrierten PVDF-Membran platziert und zwischen jeweils drei Lagen mit 1× Transferpuffer getränktem Blottpapier in der folgenden Anordnung geblottet:

(-) Anode
3 Lagen Blottpapier
SDS-PAA-Gel
PVDF-Membran
3 Lagen Blottpapier
(+) Kathode

Der Transfer erfolgte in einer horizontalen Blotapparatur für 90 min bei 0,8 mA/cm^2. Zur Visualisierung der nach Größe aufgetrennten Proteine wurde eine der in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen

Methoden ausgewählt. Alternativ erfolgte, wie im Folgenden beschrieben, die Immundetektion ausgewählter Proteine anhand spezifischer Antikörper-Bindung.

Immundetektion

Der quantitative Protein-Nachweis erfolgte auf einer PVDF-Membran, auf der mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.3) der Größe nach aufgetrennte Proteine immobilisiert wurden, unter Verwendung von antigenspezifischen Primär- und enzymgekoppelten Sekundär-Antikörpern (Abschnitt 2.9) in den in Tabelle 3.5 aufgelisteten Verdünnungen. Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurde die PVDF-Membran für 1h in Blockierungspuffer (Abschnitt 2.6) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit spezifischer Primär-Antikörperlösung über Nacht bei 4°C. Um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu lösen, wurde diese anschließend dreimalig für 5 min in 1× TBST-Puffer (Abschnitt 2.6) gewaschen. Die Detektion der gebundenen Primär-Antikörper erfolgte durch Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach weiteren fünf Waschschritten in 1× TBST-Puffer erfolgte der indirekte Proteinnachweis über eine von der Meerrettich-Peroxidase katalysierte Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung des Kits *ECL™ Western Blotting Reagent* gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei wird die Lumineszenz nach Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form durch Exposition der PVDF-Membran auf einem Hyperfilm nachgewiesen. Zur Quantifizierung der Bandenintensitäten im Western Blot wurde das Programm *Image Quant 5.2* verwendet. Alle Proben wurden auf die entsprechenden Protein-Mengen des *House keeping* Gens β-Aktin normalisiert.

Antikörper	Verdünnung in Blockierungspuffer II
Anti-Ago2 (polyklonaler Kaninchen-IgG)	1:1000
Anti-Ago2 (11A9)* (monoklonaler Ratten-IgG)	1:50
Anti-GAPDH (polyklonaler Kaninchen-IgG)	1:1000
Anti-Hsp70 (monoklonaler Maus-IgG)	1:1000
Anti-Hsp90 (polyklonaler Ziegen-IgG)	1:200
Anti-Kaninchen-HRP (polyklonaler Ziegen-IgG)	1:2000
Anti-Lamin A/C (monoklonaler Kaninchen-IgG)	1:1000
Anti-Maus-HRP (polyklonaler Ziegen-IgG)	1:1000
Anti-Ratte-HRP (polyklonaler Ziegen-IgG)	1:5000
Anti-Ziegen-HRP (polyklonaler Kaninchen-IgG)	1:2000
Anti-β-Aktin (polyklonaler Kaninchen-IgG)	1:5000

* Dieser Antikörper wurde in Blockierungspuffer I verdünnt.

Tabelle 3.5: Primär- und Sekundär-Antikörper-Verdünnungen für die Immundetektion.

3.3.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen und auf PVDF-Membranen

Coomassie-Färbung

Die Visualisierung von Proteinen in SDS-PAA-Gelen bzw. auf PVDF-Membranen mit Hilfe von Coomassie erfolgte durch Inkubation des Gels bzw. der Membran in einer Coomassie-Färbelösung (Abschnitt 2.6) für ca. 1 – 2 h. Zur Verminderung des Hintergrundes wurde das Gel bzw. die Membran in Coomassie-Entfärbelösung (Abschnitt 2.6) bis zum Erreichen eines optimalen Signal-/Hintergrund-Verhältnisses entfärbt und im Anschluss fotografiert. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 100 ng Protein pro Bande.

Silbernitrat-Färbung

Die Visualisierung von sehr geringen Protein-Mengen in SDS-PAA-Gelen erfolgte mit Hilfe von Silbernitrat unter Verwendung des Kits *Silver Stain* nach den Angaben des Herstellers. Diese Färbemethode beruht auf dem Prinzip der Anlagerung von Silberionen (Ag^+) an Proteine und anschließender Reduktion der Ag^+-Ionen zu elementaren Silber mit Hilfe von Formaldehyd. Die Proteine werden aufgrund der Silberpräzipitation schwarz eingefärbt. Beim Erreichen eines optimalen Signal-/Hintergrund-Verhältnisses wurde diese Reaktion durch Zugabe von 5 %iger (v/v) Essigsäure abgestoppt und das Gel im Anschluss fotografiert. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 1 ng Protein pro Bande.

3.3.5 Luciferase-Aktivitätstest

Der Nachweis der Luciferase-Aktivität von Säugerzellen, die entweder konstitutiv die Firefly Luciferase exprimieren (ECV-GL3, Abschnitt 2.7.2) oder mit Firefly Luciferase- und/oder *Renilla* Luciferase-kodierenden Plasmiden kotransfiziert (Abschnitt 2.10.1 und 3.4.5) wurden, erfolgte mit Hilfe des *Dual-Luciferase® Reporter Assay* nach den Angaben des Herstellers. Dieser Assay nutzt die Tatsache, dass die Firefly Luciferase und die *Renilla* Luciferase unterschiedliche Substrate spalten, so dass eine selektive Unterscheidung ihrer Biolumineszenz-Reaktionen möglich ist. Während die Firefly Luciferase in einer ATP-abhängigen Reaktion Luciferin in Oxoluciferin umsetzt, wandelt die *Renilla* Luciferase in einer O_2-abhängigen Reaktion Coelenterazin in Coelenteramid um. Beide Reaktionen führen zur Freisetzung von Licht. Diese in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessene Lumineszenz ist proportional zur Enzymaktivität. Die verwendeten Säugerzellen wurden mit dem vom Hersteller bereitgestellten *Passive Lysis Buffer* lysiert, so dass beide Luciferasen quantitativ freigesetzt wurden. Das Lysat wurde durch Zentrifugation (1 min, 20.000 × g) von unlöslichen zellulären Bestandteilen abgetrennt und auf eine weiße 96 well Gewebekulturplatte überführt. Im Anschluss erfolgte durch sukzessive Zugabe der jeweiligen Substrate die Messung der Firefly bzw. *Renilla* Luciferase-Aktivität am Lumineszenzmessgerät *anthos lucy 3* über einen Zeitraum von 10 s pro Probe.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von Säugerzellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Abschnitt 2.7.2) handelt es sich um humane Adhäsionszellen, die als „Monolayer“ wachsen. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Kulturbedingungen (Abschnitt 2.7.2) im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Gemäß ihrer Verdopplungszeiten wurden die Zellen alle 3 – 4 Tage mit Hilfe von Trypsin/EDTA geerntet und im Verhältnis 1 : 5 bis 1 : 10 mit Vollmedium verdünnt oder für die Verwendung in Zellkulturexperimenten in definierten Zellzahlen ausgebracht. Die Zellen wurden ca. alle 6 Monate mittels eines PCR-basierten Nachweises auf mögliche Mykoplasmemkontaminationen untersucht.

3.4.2 Kryokonservierung von Säugerzellen

Für die Langzeitlagerung von Säugerzellen wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen aus der exponentiellen Phase einer Kultur mittels Trypsin/EDTA-Behandlung geerntet und mit 10 % (v/v) DMSO-haltigem Vollmedium (Abschnitt 2.7.2) auf eine Zelldichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Aliquots von 500 μl - 2 ml wurden in Kryoröhrchen überführt und zunächst in einem Isopropanol-Bad mit einer Temperaturabnahme von ca. 1°C/min auf −80°C gekühlt. Anschließend erfolgte die Lagerung in einem mit Flüssig-Stickstoff gefüllten Tank bis zur Rekultivierung der Zellen.

3.4.3 Induktion von Zellstress

Für die Induktion von oxidativem Zellstress wurde einer Kultur von ECV-304 Zellen (Abschnitt 2.7.2) Natriumarsenit in einer Endkonzentration von 250 μM zugesetzt und diese für 90 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Behandlung von Zellen mit Natriumarsenit wird in der Literatur vor allem phänotypologisch beschrieben. So führt sie zum Beispiel zur Aktivierung verschiedener Mitglieder der Familie der *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), zur verstärkten Bildung von *Reactive Oxygen Species* (ROS) und zur Induktion der oxidativen Degradation zellulärer Lipide [211–213]. Der genaue Wirkmechanismus dieser Substanz ist jedoch weitgehend unerforscht. Die Induktion eines Hitzeschocks erfolgte durch die Inkubation von ECV-304 Zellen in einem auf 42°C erwärmten Brutschrank für 16 h. Der erfolgreich induzierte Hitzschock konnte durch den Nachweis der Überexpression der Hitzeschock-Proteine Hsp70 und Hsp90 mittels Western-Analyse (Abschnitt 3.3.3) kontrolliert werden. Ein transienter Temperaturschift auf 42°C (Hitzeschock) sowie die Behandlung von Zellen mit Natriumarsenit stellen in der Literatur etablierte Methoden zur Induktion von TIA1-positiven Stressgranulen [198] dar. In dieser Arbeit wurde eine weitere Methode zur Induktion von Zellstress und der damit verbundenen Ausbildung von TIA1-positiven Stressgranulen etabliert. Diese stellt die LF2000-vermittelte Transfektion (Abschnitt 3.4.5) von ECV-304 Zellen mit 100 nM Phosphorothioat-modifizierten asONs (Abschnitt 2.10.2) dar. Für die Induktion von translationellem Stress wurde einer Kultur von ECV-GL3-Zellen (Abschnitt 2.7.2) 20μg/ml Cycloheximid zugesetzt und diese über einen Zeitraum von 2 – 48 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Cycloheximid ist ein spezifischer Inhibitor der eukaryotischen Proteinbiosynthese. Dieses vom Bakterium *Streptomyces griseus* produzierte Agenz, interferiert

mit der mRNA-Translation durch Blockade der translationellen Elongation [214]. Für diese Experimente wurde die konstitutiv Firefly Luciferase-exprimierende Zelllinie ECV-GL3 verwendet, um die Wirksamkeit des translationellen Blocks anhand der Abnahme der Firefly Luciferase-Aktivität (Abschnitt 3.3.5) zu kontrollieren.

3.4.4 Bestimmung der Zellviabilität

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte über den Nachweis von Stoffwechselaktivität mit Hilfe von Fluoresceindiacetat (FDA). FDA ist ein nicht fluoreszierender, unpolarer Stoff, der Zellmembranen durchdringt und intrazellulär durch unspezifische Esterasen zu Fluorescein umgesetzt wird. Die Fluoreszenzintensität des so gebildeten Farbstoffs (gemessen in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)) ist hierbei über einen relativ großen Bereich linear korreliert mit der Lebendzellzahl [215] und kann daher zur Abschätzung der Zytotoxizität einer bestimmten Substanz oder Behandlung verwendet werden. Die Messung wurde in einer weißen 96 well Gewebekulturplatte durchgeführt. Darin wurde eine Zellsuspension von 10.000 Zellen in 50 μl kaltem 1× PBS-Puffer (Abschnitt 2.6) mit 50 μl einer kalten 20 μM FDA-Lösung überschichtet. Um ein vorzeitiges Starten der Reaktion zu verhindern, wurde die Gewebekulturplatte bis zum Start der Messung auf Eis inkubiert. Bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm wurde die relative Fluoreszenz pro well im Fluoreszenz-Messgerät *Ascent FL* bei 25°C über eine Messdauer von 200 ms integriert. Die Signale wurden über einen Zeitraum von 20 min einmal pro Minute aufgezeichnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung im linearen Bereich der daraus hervorgehenden Kurve wurde als Maß für die Vitalität der Zellen verwendet.

3.4.5 Transfektion von Säugerzellen

Für ein Transfektionsexperiment wurden die verwendeten Säugerzellen (Abschnitt 2.7.2) entsprechend ihrer Verdopplungszeit so ausgesät und für 16 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert, dass sie zum Transfektionsbeginn eine Konfluenz von 80 – 90 % aufwiesen. Standardmäßig erfolgte die Transfektion mit 10 μg/ml *Lipofectamine™ 2000* (LF2000) gemäß den Angaben der Herstellers. Sowohl das Transfektionsreagenz LF2000 als auch die zu transfizierenden Nukleinsäuren (Abschnitt 2.10) wurden in OptiMEM-Medium verdünnt, nach 5 min Präinkubation bei Raumtemperatur zu gleichen Teilen gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Zellen zweimalig mit 1× PBS-Puffer (Abschnitt 2.6) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Transfektionsgemisch versetzt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Transfektionsgemisch verworfen, die Zellen mit Vollmedium (Abschnitt 2.7.2) überschichtet und für weitere 20 h im Inkubator bei 37°C inkubiert.

3.4.6 Elektroporation von Säugerzellen

Für ein Elektroporationsexperiment wurden 5×10^5 – 1×10^6 Säugerzellen (Abschnitt 2.7.2) dreimal mit kaltem 1× PBS-Puffer (Abschnitt 2.6) gewaschen, mit den in 200 μl 1× PBS-Puffer verdünnten Nukleinsäuren (Abschnitt 2.10.2) gemischt und in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte in der Elektroporationsapparatur *Gene Amp II* mit einem Puls von 180 V Spannung und einer Kapazität von 950 μF (τ = 50

– 60 ms). Der Zelldebris konnte als viskose, schaumige Phase entfernt werden. Die intakten Zellen wurden in eine 12 well Gewebekulturplatte überführt und in 1 ml Vollmedium (Abschnitt 2.7.2) für 24 h im Inkubator bei 37°C inkubiert.

3.4.7 Phosphorothioat-stimulierte Einschleusung von siRNA

Für die Phosphorothioat (PS)-stimulierte Einschleusung von siRNA (Abschnitt 2.10.2) wurden die verwendeten Säugerzellen (Abschnitt 2.7.2) entsprechend ihrer Verdopplungszeit so ausgesät und für 16 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert, dass sie zum Beginn des Aufnahmeexperimentes eine Konfluenz von 60 – 70 % aufwiesen. Sowohl das für die Stimulation der siRNA-Aufnahme verwendete PS-modifizierte Oligonukleotid (PS-ON) TM6-12 (Abschnitt 2.10.2) als auch die siRNA wurden in OptiMEM-Medium verdünnt. Die Zellen wurden zweimalig mit 1× PBS-Puffer (Abschnitt 2.6) gewaschen und im Anschluss mit dem PS-ON/siRNA-Gemisch für 24 h im Inkubator bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die Inkubationslösung verworfen, die Zellen mit Vollmedium (Abschnitt 2.7.2) überschichtet und für weitere 16 h im Inkubator bei 37°C kultiviert.

3.4.8 Quantifizierung der biologischen Wirksamkeit von siRNA, miRNA und asON

Für den Nachweis der biologischen Wirksamkeit von siRNA, miRNA oder asON (Abschnitt 2.10.2) wurden diese mittels LF2000-vermittelter Transfektion (Abschnitt 3.4.5), Elektroporation (Abschnitt 3.4.6) oder PS-Stimulation (Abschnitt 3.4.7) in die verwendeten Säugerzellen (Abschnitt 2.7.2) eingeschleust. Nach einer definierten Zeitspanne von 24 – 120 h wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Behandlung geerntet, durch Zentrifugation (3 min, 800 × g) pelletiert und in 200 μl Aufschlusspuffer (Abschnitt 2.6) für 10 min auf Eis lysiert. Es folgte die Isolation der zellulären Gesamt-RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Abschnitt 3.2.6) mit anschließender reverser Transkription (Abschnitt 3.2.8). Die daraus resultierende cDNA diente dem quantitativen Nachweis der Suppression der targetierten mRNA mittels qPCR (Abschnitt 3.2.9). Für den Nachweis der Suppression des Ziel-Proteins wurden das Zellpellet nach der Zellernte mit 15 μl 1× PBS-Puffer resuspendiert, mit dem gleichen Volumen 1× Ladepuffer für SDS-PAGE (Abschnitt 2.6) versetzt, für 5 min bei 95°C lysiert und das Gesamtzelllysat in die Western-Analyse (Abschnitt 3.3.3) eingesetzt. Der Nachweis der Luciferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des *Dual Luciferase Assay* (Abschnitt 3.3.5). Als Vergleichswert für die biologische Wirksamkeit einer siRNA, miRNA oder eines asON wurde der jeweilige IC_{50}-Wert bestimmt. Dieser beschreibt Konzentration eines Inhibitors, die zur halbmaximalen Inhibition der gemessenen Reaktion, also hier der Expression eines Zielgens, führt. Dazu wurden die Säugerzellen, wie oben beschrieben, mit verschiedenen Konzentrationen an wirksamer und Kontroll-siRNA (bzw. miRNA oder asON) behandelt. Die prozentuale Expression des Ziel-Gens (mRNA- oder Protein-Ebene) bezogen auf den jeweiligen Wert der Kontroll-RNA (bzw. Kontroll-DNA für wirksame asONs) wurde zur Berechnung des IC_{50}-Wertes mit Hilfe des Programms *GraFit 5* verwendet.

3.4.9 Quantifizierung der physikalischen Aufnahme von siRNA

Der Nachweis der physikalischen Aufnahme von siRNA (Abschnitt 2.10.2) basierte auf der Detektion des entsprechenden *antisense* Stranges der siRNA in einem Gesamt-RNA-Extrakt durch Hybridisierung mit einer γ^{32}P-markierten Sonde (Abschnitt 3.2.12). Dabei wurde der Nachweis des *antisense* Stranges einer siRNA gewählt um die zusätzliche Detektion der Target-mRNA auszuschließen [80]. Es wurde 1 μg der durch Phenol-Chloroform-Extraktion (Abschnitt 3.2.6) gewonnenen Gesamt-RNA in 5μl 1× Hybridisierungspuffer für siRNA (Abschnitt 2.6) mit 40 fmol des korrespondierenden ^{32}P-markierten *sense* Stranges der siRNA für 10 min bei 95°C und 1 h bei 37°C hybridisiert. Anschließend erfolgte eine RNase-Behandlung, die dem unspezifischem Verdau freier einzelsträngiger RNA diente. Der Hybridisierungsansatz wurde dabei für 10 min bei 30°C mit 40 ng RNase A und 0,1 U RNase T1 inkubiert. Daraufhin erfolgte die elektrophoretische Auftrennung des Ansatzes auf einem 20 %igen (v/v) nativen PAA-Gel (Abschnitt 3.2.3). Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden auf eine Nylonmembran transferiert (Abschnitt 3.2.5) und diese autoradiographisch (Abschnitt 3.2.13) ausgewertet. Zur Quantifizierung des radioaktiven Hybridisierungsproduktes mit Hilfe des Programms *Image Quant 5.2* diente eine in jedem Experiment mitgeführte Standardreihe von 100 amol - 10 fmol siRNA-Doppelstrang.

3.4.10 Zellfraktionierung

Herstellung eines zytosolischen S100-Extraktes

Für die Herstellung eines zytosolischen S100-Extraktes wurden 2 × 10^7 ECV-304 Zellen durch Trypsin/EDTA-Behandlung geerntet und durch Zentrifugation (3 min, 800 × g) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200 μl 1× PBS-Puffer (Abschnitt 2.6) resuspendiert und durch 15 Hübe eines Glashomogenisator sowie zehnmaliges Aspirieren durch eine 21G-Einmalspritze lysiert. Im Anschluss erfolgte die Abtrennung des Zytosols von den unlöslichen Zellbestandteilen durch Ultrazentrifugation (45 min, 100.000 × g, 4°C). Der Überstand wurde als zytosolischer S100-Extrakt bezeichnet [216] und im Weiteren beispielsweise für die Bestimmung der zytosolischen Stabilität von siRNA und siRNA-Peptid-Konjugaten (Abschnitt 3.2.11) verwendet.

Auftrennung eines Gesamtzelllysates in Zytosol- und Kern-Fraktion

Für die Auftrennung eines Gesamtzelllysates in Zytosol- und Kern-Fraktion wurden 1 × 10^6 ECV-304 Zellen mittels Trypsin/EDTA-Behandlung geerntet und durch Zentrifugation (3 min, 800 x g) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200 μl Lyse-Puffer (Abschnitt 2.6) für 5 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wurden die Zellkerne durch Zentrifugation (5 min, 800 × g, 4°C) pelletiert, der Überstand (= Zytosol) abgenommen und mittels Flüssig-Stickstoff eingefroren. Das Pellet (= Zellkerne) wurde durch viermaliges Waschen mit 200 μl Kern-Waschpuffer (Abschnitt 2.6) von Rückständen der zytosolischen Fraktion gereinigt. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand quantitativ abgenommen. Die präparierten Zellkerne wurden in 200 μl Lysepuffer resuspendiert und mikroskopisch auf Reinheit und Integrität überprüft. Die Lyse der Zellkerne erfolgte durch 3 Frier/Tau-Zyklen, d.h. durch abwechselndes Einfrieren mittels Flüssig-Stickstoff und Auftauen in einem auf 25°C erwärmten Thermoblock. Für die Analyse von zytosolischen bzw. nukleären RNAs wurde eine RNA-Isolation mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (Abschnitt 3.2.6) mit anschlie-

ßender Ethanol-Fällung (Abschnitt 3.2.7) an die Fraktionierung angeschlossen. Für die Analyse von zytosolischen bzw. nukleären Proteinen wurde eine Fällreaktion mit Hilfe von Trichloressigsäure (Abschnitt 3.3.2) an die Fraktionierung angeschlossen. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Fraktionierung erfolgte auf mRNA-Ebene der quantitative Nachweis der beta-Glukoronidase-mRNA (Zytosol) bzw. der U6 RNA (Kern) mittels RTqPCR (Abschnitt 3.2.8 und 3.2.9). Auf Proteinebene wurde die Kontrolle über den Nachweis von GAPDH (Zytosol) bzw. Lamin A/C (Kern) mittels Western-Analyse (Abschnitt 3.3.3) geführt.

Organellenfraktionierung mit Hilfe von Dichte-Gradientenzentrifugation

Die Dichte-Gradientenzentrifugation fand in dieser Arbeit Anwendung zur der Untersuchung der subzellulären Lokalisation und Komplexbildung von endogenem Ago2. Als Gradientenmedium wurde Optiprep™ , eine gebrauchsfertige Lösung aus 60 % (w/v) Iodixanol (5,5'-[(2-hydroxy-1-3-propanediyl)-bis(acetylamino)] bis[N,N'- bis(2,3-dihydroxypropyl-2,4,6-triiodo-1,3-benzenecarboxamide]) in Wasser, verwendet. Für ein Fraktionierungsexperiment wurden 5 × 10^6 Säugerzellen durch Trypsin/EDTA Behandlung geerntet, zweimalig mit 1× PBS-Puffer gewaschen und in 500 μl 1× Homogenisierungspuffer (Abschnitt 2.6) resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch 15 Hübe eines Glashomogenisator und zehnmaliges Aspirieren der Zellsuspension durch eine 21G-Einmalspritze. Die nichtlysierten Zellen sowie die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (1000 × g, 4°C) abgetrennt. Der erhaltene postnukleäre Überstand (PNS) wurde auf einen kontinuierlichen Dichte-Gradienten (10-25 % (w/v) Iodixanol in 1× Gradientenpuffer (Abschnitt 2.6)) geschichtet und für 18 h in dem Schwingrotor *SW50.1* ultrazentrifugiert (48.000 × g, 4°C). Nach Ablauf der Zentrifugation erfolgte das tropfenweise Ablassen des Gradienten in 250 - 300 μl Fraktionen durch Punktieren des Zentrifugationsröhrchens. Die Kontinuität des Gradienten wurde durch Refraktometrie kontrolliert. Die Isolation des Proteingehaltes der Gradientenfraktionen erfolgte mit Hilfe der TCA-Fällung der Proteine (Abschnitt 3.3.2). Die extrahierten Proteine dienten dem Nachweis der Verteilung von Ago2 auf die verschiedenen Gradientenfraktionen mittels Western-Analyse (Abschnitt 3.3.3).

3.4.11 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte an dem inversen, semikonfokalen Fluoreszenzmikroskop *Axiovert 200M*, das mit einem ApoTome ausgerüstet ist und über folgende Objektive verfügt:

- Phasenkontrastobjektiv *A-Plan 10×/0,25 Ph1*,
- Phasenkontrastobjektiv *A-Plan 40×/0,50 Ph2 (LD = Long Distance)*,
- Fluoreszenzobjektiv *Plan-Neofluar 40 ×/0,75 M27 (EC = Enhanced Contrast)*,
- Ölimmersionsobjektiv *Plan-Apochromat 63×/1,40 Oil M27*.

Die Beleuchtung erfolgte über eine *HBO 100* Beleuchtungseinrichtung mit einer *Osram HBO 103W/2* Quecksilberdampflampe. Die Aufnahme und Digitalisierung der Bilder erfolgte mittels einer *Axiocam MRm* Kamera (CCD Basisauflösung: 1388 × 1040 = 1,4 Megapixel, spektrale Empfindlichkeit: ca. 350 nm – 1000 nm). Es standen die in Tabelle 3.6 aufgeführten Filtersätze für

die Fluoreszenzaufnahmen zur Verfügung. Die Steuerung sowie die Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe des Programms *AxioVision 4.5*.

Filternummer	Anregung	Strahlenleiter	Emmission
38HE (Grün-Filter)	BP 470/40 (HE)	FT 495 (HE)	BP 525/50 (HE)
43HE (Rot-Filter)	BP 550/25 (HE)	FT 570 (HE)	BP 605/70 (HE)
49 (Blau-Filter)	G 365	FT 395	BP 445/50

Tabelle 3.6: Filtersätze für die Fluoreszenzmikroskopie.

Färben der Zellkerne

Mit PBS gewaschene, fixierte oder lebende Säugerzellen wurden mit einer Lösung von Hoechst 33342 Farbstoff (2 μg/ml) in 1× PBS-Puffer (Abschnitt 2.6) überschichtet und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff dringt durch die Zellmembran in die Zelle und bindet doppelsträngige DNA in der kleinen Furche (*minor groove*). Der DNA-gebundene Farbstoff induziert eine Fluoreszenz (Anregung: 355 nm, Emmision: 465 nm), mit der die Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop detektierbar sind.

Immunfluoreszenzfärbung

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen erfolgte über deren Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von antigenspezifischen Primär- und fluorophorgekoppelten Sekundär-Antikörpern (Abschnitt 2.9) in den in Tabelle 3.7 aufgelisteten Verdünnungen.

Antikörper	Verdünnung in Blockierungspuffer III
Anti-Ago2(11A9) (monoklonaler Ratten-IgG)	1:10
Anti-Dcp1A (monoklonaler Kaninchen-IgG)	1:200
Anti-Kaninchen-Alexa488 (polyklonaler Ziegen-IgG)	1:400
Anti-Ratte-Alexa555 (polyklonaler Ziegen-IgG)	1:400
Anti-TIA1 (polyklonaler Ziegen-IgG)	1:200
Anti-Ziegen-Alexa488 (polyklonaler Kaninchen-IgG)	1:400

Tabelle 3.7: Primär- und Sekundär-Antikörper-Verdünnungen für die Immunfluoreszenzfärbung.

Die verwendeten Säugerzellen wurden zweimalig mit 1× PBS-Puffer gewaschen und anschließend für 15 min in 1× Fixierlösung (Abschnitt 2.6) inkubiert. Dies diente der Aufrechterhaltung der Zellstruktur sowie der Fixierung der Antigene, so dass ein Auswaschen nach Permeabilisierung der Zellen verhindert wurde. Die quervernetzende Wirkung des in der Fixierlösung enthaltenen Paraformaldehyds wurde durch Zugabe von 1× Stopppuffer (Abschnitt 2.6) gestoppt. Die fixierten Zellen wurden für 15 min in 1× Blockierungspuffer III (Abschnitt 2.6) inkubiert. Dieser Schritt führt gleichzeitig zur Permeabilsierung der Zellen und zum Absättigen freier Bindungsstellen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit spezifischer Primär-Antikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu lösen, wurden die Zellen für jeweils 5 min in Waschpuffer I und II (Abschnitt 2.6) gewaschen. Die Detektion der gebundenen Primär-Antikörper

erfolgte durch Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschritten in 1× PBS-Puffer erfolgte die Kern- bzw. DNA-Färbung mittels Hoechst 33342 Farbstoff sowie der Nachweis der immungefärbten Proteine mittels semikonfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Markerproteinen des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Retikulums

Zur Visualisierung des Golgi-Apparates sowie des endoplasmatischen Retikulums (ER) wurden 1×10^4 ECV-304 Zellen auf einem Fibronektin-beschichteten 8-Kammer-Objektträger ausgebracht und für 16 h im Inkubator bei 37°C kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen fünfmal mit OptiMEM-Medium gewaschen und mit 0,5 μg/ml FITC-markiertem CTxB bzw. 10 μg/ml Cy3-markiertem AMF in 200 μl OptiMEM-Medium für 1 h im Inkubator bei 37°C inkubiert. CTxB wird über die Caveolin-abhängige Endozytose in den Golgi-Apparat transportiert, AMF ebenso Caveolin-abhängig in das ER, so dass diese beiden Proteine als Organellenmarker für den Golgi-Apparat bzw. das ER verwendet werden konnten [127, 217, 218]. Im Anschluss wurden die Zellen fünfmal mit OptiMEM-Medium gewaschen, um extrazellulär anhaftende Proteine zu entfernen. Es folgte die Kern- bzw. DNA- Färbung mittels Hoechst 33342 Farbstoff und die Visualisierung des Golgi-Apparates bzw. des ERs mittels semikonfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Verteilung von siRNA und miRNA

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation fluoreszenzmarkierter siRNA oder miRNA (Abschnitt 2.10.2) wurden die verwendeten Säugerzellen entweder auf einem Fibronektin-beschichteten 8-Kammer-Objektträger oder auf einer für die Fluoreszenzmikrokopie geeigneten 24 well Gewebekulturplatte (*Imaging Plate*) ausgebracht und für 16 h im Inkubator bei 37°C kultiviert. Die zelluläre Einschleusung der fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren erfolgte entweder durch die LF2000-vermittelte Transfektion (Abschnitt 3.4.5) oder durch Stimulation der zellulären Aufnahme mit Hilfe von PS-ONs (Abschnitt 3.4.7). Im Anschluss wurden die Zellen fünfmal mit OptiMEM-Medium gewaschen, um extrazellulär anhaftende siRNAs bzw. miRNAs zu entfernen. Es folgte die Kern- bzw. DNA-Färbung mittels Hoechst 33342 Farbstoff und die Analyse der intrazellulären siRNA- bzw. miRNA-Lokalisation mittels semikonfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Verteilung von Ago2

Für die Analyse der intrazellulären Lokalisation von endogen exprimiertem Ago2 wurden die verwendeten Säugerzellen auf einer für die Fluoreszenzmikroskopie geeigneten 24 well Gewebekulturplatte (*Imaging Plate*) ausgebracht und für 16 h im Inkubator bei 37°C kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen entweder für weitere 24 h in Vollmedium (Abschnitt 2.7.2) inkubiert, oder wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, verschiedenen Zellstress-induzierenden Behandlungen ausgesetzt um den Einfluss von Zellstress auf die Lokalisation von endogenem Ago2 zu untersuchen. Die Visualisierung des Ago2-Proteins erfolgte mit Hilfe der in Abschnitt 3.4.11 beschriebenen Immunfluoreszenzfärbung, wobei die subzelluläre Lokalisation von Ago2 mit spezifischen Markern der Stressgranulen (TIA1) und der *processing bodies* (Dcp1A) korreliert wurde. Die Kern- bzw.

DNA- Färbung erfolgte mittels Hoechst 33342 Farbstoff und die Analyse der intrazellulären Ago2-Lokalisation mittels semikonfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

4 Ergebnisse

4.1 Bioverfügbarkeit von siRNA nach deren Phosphorothioat-stimulierter Einschleusung

4.1.1 Vorarbeiten

Die Phosphorothioat (PS)-Stimulation der Einschleusung von siRNA-Wirkstoffen in Säugerzellen stellt ein neues und mechanistisch alternatives Verfahren dar. Sie ermöglicht die zelluläre Einschleusung von siRNAs in einer besonders simplen Art und Weise, nämlich durch die einfache Koinkubation von PS-modifizierten Oligonukleotiden (PS-ON) mit unmodifizierten siRNAs. Es wird weder eine Konjugation noch eine Komplexierung der einzuschleusenden siRNAs benötigt (Abschnitt 1.2.3). In Vorarbeiten von Dr. Marita Overhoff [131] und Maria Rompf [130] wurde dieses siRNA-Einschleusungsverfahren bereits wie folgt charakterisiert:

- Säugerzellen können „nackte“ siRNAs in geringem Maße spontan einschleusen.
- Die PS-Stimulation verstärkt die Spontanaufnahme „nackter“ siRNAs bis zum Tausendfachen.
- Das Ausmaß der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung ist abhängig von der Länge und der Konzentration des PS-ON.
- Die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung erfolgt sowohl in verschiedenen immortalisierten als auch in primären Zellen.
- Die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung erfolgt über die Caveolin-abhängige Endozytose.
- Die PS-Stimulation führt zur Akkumulation intakter siRNA-Moleküle im endoplasmatischen Retikulum (ER).
- Die Menge der intrazellulär nachweisbaren siRNA-Moleküle korreliert nicht mit dem Ausmaß der siRNA-vermittelten Spaltung der Ziel-mRNA.

Diese Vorarbeiten führten zu der Annahme, dass der limitierende Schritt der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung in der intrazellulären siRNA-Freisetzung liegt. Die siRNA-Wirkstoffe müssen aus dem sie einschließenden Kompartiment in das Zytosol entlassen werden und daraufhin mit der RNA-Interferenz (RNAi)-Maschinerie in Interaktion treten, um die Spaltung einer Ziel-mRNA effektiv induzieren zu können. Die intrazelluläre siRNA-Freisetzung limitiert nahezu alle bisher erprobten siRNA-Einschleusungsverfahren (Abschnitt 1.3), so dass das Überwinden dieser intrazellulären Barriere von zentraler Bedeutung ist. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde überprüft, ob durch Induktion der intrazellulären Freisetzung die siRNA-vermittelte Spaltung einer

Ziel-mRNA im Anschluss an die PS-stimulierte zelluläre siRNA-Einschleusung gesteigert werden kann. Dies wurde an zwei 2 Konzepten erprobt. Das erste beinhaltet das transiente Auflösen des siRNA-einschließenden Kompartimentes, dem ER, das zweite die Induktion der transmembranen siRNA-Translokation mit Hilfe von kovalent konjugierten Signalpeptiden.

4.1.2 Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung mit Hilfe von Ilimaquinon

Zunächst wurden Bedingungen identifiziert, die das transiente Auflösen des perinukleären Endomembransystems, das den Golgi-Apparat und das ER einschließt, ermöglichen. Als Induktor wurde Ilimaquinon (IQ) ausgewählt, ein Metabolit des marinen Schwammes *Hippospongia metachromica*, der den Proteintransport zwischen den *cis*- und *trans*-Golgi-Stapeln blockiert [219]. IQ führt in niedrigen Konzentrationen zum Auflösen des Golgi-Apparates und in höheren Konzentrationen ebenfalls zum Zusammenbruch des ERs [220, 221]. In einem Vorexperiment wurde die minimale IQ-Konzentration ermittelt, die zum transienten Auflösen des ERs führt. Um im Anschluss die siRNA-Wirksamkeit mit dem Auflösen des ERs korrelieren zu können, wurde als Kontrolle die minimale IQ-Konzentration bestimmt, die zum Auflösen des Golgi-Apparates unter Erhalt des ERs benötigt wird. Dafür wurden in ECV-304 Zellen, wie in Abschnitt 3.4.11 beschrieben, der Golgi-Apparat bzw. das ER mit Hilfe von Fluorophor-markiertem CTxB bzw. AMF angefärbt. Dabei handelt es sich um Markerproteine des Golgi-Apparates bzw. des ERs, die ebenfalls durch die Caveolin-abhängige Endozytose in Säugerzellen eingeschleust werden [127, 217, 218]. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 – 15 μM IQ in Vollmedium für 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse wie unter Abschnitt 3.4.11 beschrieben. Aus diesem Experiment konnte abgeleitet werden, dass bereits eine Konzentration von 4 μM IQ zum Auflösen des Golgi-Apparates (Abbildung 4.1) führt und eine minimale Konzentration von 15 μM IQ für das Auflösen des ERs (Abbildung 4.2) benötigt wird.

Es wurde nun untersucht, ob das transiente Auflösen des ERs mit der gesteigerten siRNA-Wirksamkeit, d.h. der Spaltung der Ziel-mRNA, korreliert ist. Dafür wurden ECV-304 Zellen, wie in Abschnitt 3.4.7 beschrieben, mit 1 μM PS-ON und 1 μM siRNA für 24 h bei 37°C inkubiert. Soweit nicht anders angegeben, wurde in dieser Arbeit als wirksame siRNA die Lamin A/C-gerichtete siLAM und als Kontroll-siRNA die siscr3 verwendet, die keine endogene Ziel-mRNA aufweist. Beide siRNAs sind gut charakterisierte und in der Literatur etablierte Modell-siRNAs (Abbildung 2.1 und [203, 205]). Im Anschluss an die siRNA-Einschleusung wurden die ECV-304 Zellen mit 4 bzw. 15 μM IQ für 1 h bei 37°C inkubiert um das transiente Auflösen des Golgi-Apparates bzw. des ERs zu induzieren. Nach weiteren 16 h folgte die Quantifizierung der siLAM-Wirksamkeit über den Nachweis der Lamin A/C-mRNA-Mengen im Gesamt-RNA-Extrakt mittels RT-qPCR (Abschnitt 3.4.8). Weiterhin wurde das transiente Auflösen des Golgi-Apparates bzw. des ERs fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, geht das transiente Auflösen des ERs mit einer gesteigerten siLAM-Wirksamkeit einher. Dies ist nicht der Fall bei der transienten Auflösung des Golgi-Apparates und bestätigt damit die in den Vorarbeiten beschriebene Akkumulation potentiell intakter siLAM-Moleküle im ER. Dieses Experiment zeigt, dass durch Induktion der intrazellulären siLAM-Freisetzung die siLAM-Wirksamkeit gesteigert werden kann.

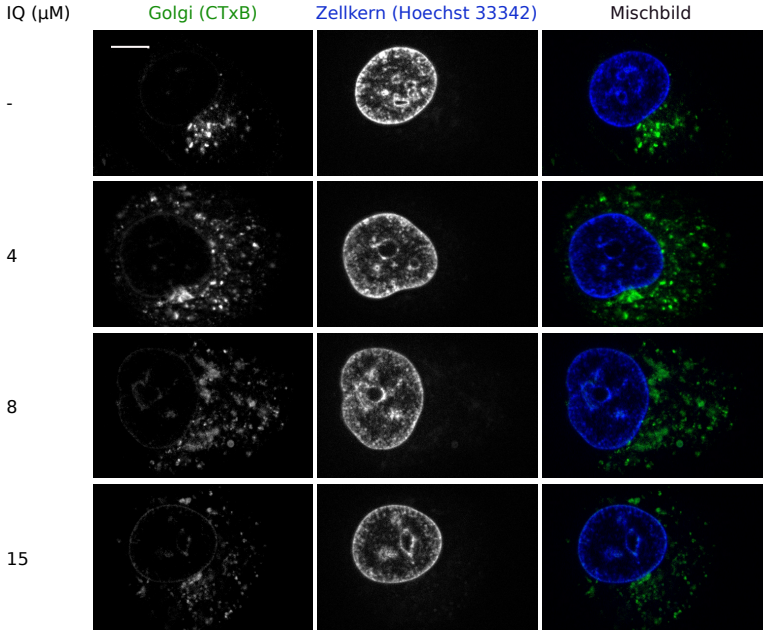


Abbildung 4.1: IQ induziert das Auflösen des Golgi-Apparates. ECV-304 Zellen wurden mit 0,5 μg/ml FITC-markiertem CTxB (grün, Golgi-Marker) in OptiMEM-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 – 15 μM IQ in Vollmedium für 1 h bei 37°C inkubiert. In allen Ansätzen wurden die Zellkerne (blau) mittels Hoechst 33342-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am inversen, semikonfokalen Mikroskop *Axiovert 200 M*. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt von $\geq$ 30 analysierten Zellen. Der weiße Balken oben links $\widehat{=}$ 10μM.

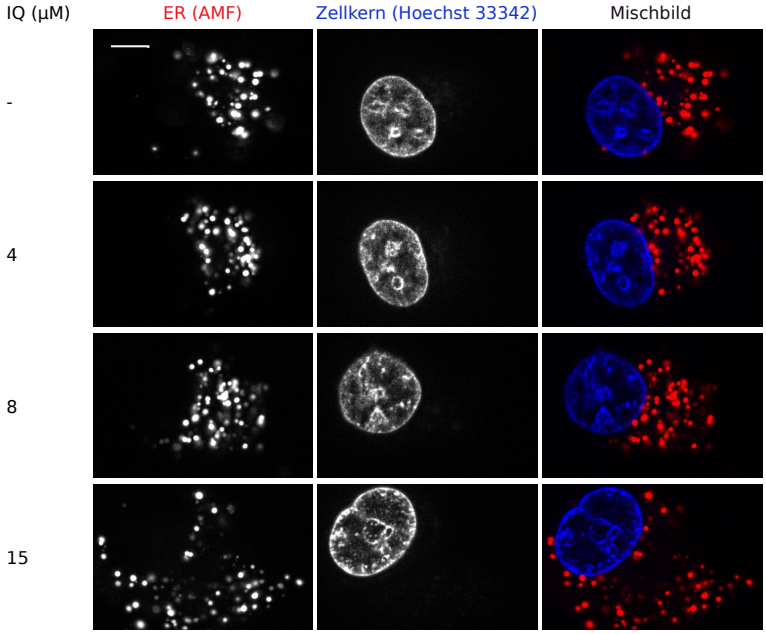


Abbildung 4.2: IQ induziert das Auflösen des ERs. ECV-304 Zellen wurden mit 10 μg/ml Cy3-markiertem AMF (rot, ER-Marker) in OptiMEM-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 – 15 μM IQ in Vollmedium für 1 h bei 37°C inkubiert. In allen Ansätzen wurden die Zellkerne (blau) mittels Hoechst 33342-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am inversen, semikonfokalen Mikroskop *Axiovert 200 M*. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt von $\geq$ 30 analysierten Zellen. Der weiße Balken oben links $\widehat{=}$ 10 μM.

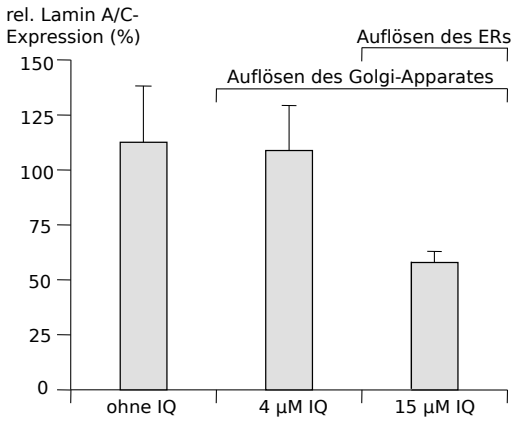


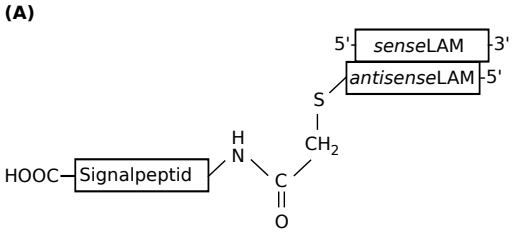
Abbildung 4.3: Das IQ-vermittelte Auflösen des ERs korreliert mit der verbesserten biologischen siLAM-Wirksamkeit. Im Anschluss an die Inkubation mit 1 μM PS-ON und 1 μM siLAM bzw. siscr3 in OptiMEM-Medium für 24 h bei 37°C wurden ECV-304 Zellen mit 4 bzw. 15 μM IQ in Vollmedium für 1 h bei 37°C inkubiert, um das transiente Auflösen des Golgi-Apparates bzw. des ERs zu induzieren. Die biologische siLAM-Wirksamkeit, die sich in der Inhibition der Lamin A/C-Expression ausdrückt, wurde weitere 16 h später mittels RT-qPCR bestimmt. Die Lamin A/C-Expression in siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Die Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung mit Hilfe von IQ kann jedoch aufgrund der hohen Zytotoxizität (Daten nicht gezeigt) nicht auf eine *in vivo* Anwendung übertragen werden. Deshalb wurde im Folgenden ein Konzept erprobt, dass die intrazelluläre siRNA-Freisetzung mit Hilfe von natürlichen, Polypeptid-abgeleiteten Signalpeptiden ermöglichen soll.

4.1.3 Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung mit Hilfe von Signalpeptiden

Das Konzept der Übertragung von Polypeptid-abgeleiteten Transport- und Sortierungssignalen auf siRNA, um deren intrazelluläre Freisetzung zu fördern, wurde bereits in Abschnitt 1.3.3 vorgestellt. Für alle vier der in dieser Arbeit getesteten Transport- und Sortierungssignale ist bekannt, dass sie im Kontext von Polypeptiden durch intrazelluläre Rezeptoren oder andere Interaktionspartner erkannt werden. Als Signalpeptide induzieren sie dadurch die transmembrane Translokation dieser natürlich vorkommenden Polypeptide, in deren Tertiärstruktur sie an exponierter Stelle vorliegen (Abschnitt 1.3.3). In Abbildung 4.4 sind die Struktur sowie die Namen der in dieser Arbeit getesteten siLAM-Peptid-Konjugate schematisch dargestellt.

Die Synthese der siLAM-Peptid-Konjugate erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Michael J. Gait (Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) und beinhaltete die kovalente Konjugation des N-terminalen Endes des Signalpeptides an das 3'-Ende des *antisense* Stranges der siLAM (Abbildung 4.4, Details in [204]). Die Konjugation der Signalpetide erfolgte an das 3'-Endes des *antisense* Stranges der siLAM, weil die Thermostabilität des 5'-Endes entscheidend für die Beladung des *antisense* Stranges in den *RNA induced silencing complex* (RISC) ist und somit nicht verändert werden sollte. Weiterhin wird über das 5'-Ende des *antisense* Stranges die Spaltstelle der Ziel-mRNA definiert (Abschnitt 1.1.2).



(B)

Signalpeptid	Name des siLAM-Peptid-Konjugats
KDEL	siLAM-asER
PKKKRKV	siLAM-asNLS
SKL	siLAM-asPTS1
TQIENLKKEKG	siLAM-asTOX

Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten siLAM-Peptid-Konjugate. (A) Dargestellt ist die Struktur der kovalenten Verknüpfung zwischen der siLAM und einem Signalpeptid. (B) Aufgeführt sind die Sequenzen der verwendeten Signalpeptide sowie die Namen der entsprechenden siLAM-Peptid-Konjugate.

Biologische Wirksamkeit der siLAM-Peptid-Konjugate im Vergleich zur unkonjugierten siLAM

Es wurde zunächst untersucht, ob die Konjugation der Signalpeptide die biologische siLAM-Wirksamkeit beeinflusst. Als biologische Wirksamkeit wurde in dieser Arbeit das Ausmaß der siLAM-vermittelten Inhibition der Lamin A/C-Expression im Anschluss an deren PS-stimulierte zelluläre Einschleusung bezeichnet. Für diese Analyse wurden ECV-304 Zellen, wie in Abschnitt 3.4.7 beschrieben, mit 1 μM PS-ON und 1 μM siLAM-Peptid-Konjugat, siLAM oder siscr3 für 24 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Inkubationslösung durch Vollmedium ersetzt und nach weiteren 16 h die Menge der Lamin A/C-mRNA im Gesamt-RNA-Extrakt quantifiziert (Abschnitt 3.4.8). Diese Analyse zeigte, dass bis auf das siLAM-asPTS1-Konjugat alle siLAM-Peptid-Konjugate eine verbesserte biologische Wirksamkeit gegenüber der unkonjugierten siLAM aufwiesen. Dieser Effekt war für das siLAM-asTOX-Konjugat mit einer Hemmung der Lamin A/C-Expression auf ca. 58 % der Ausgangsexpression am stärksten ausgeprägt. Im Vergleich dazu vermittelte die unkonjugierte siLAM bei der selben Konzentration eine kaum messbare Inhibition der Lamin A/C-Expression (Abbildung 4.5). Aus diesem Grund wurde das siLAM-asTOX-Konjugat als Leitsubstanz ausgewählt und dessen biologische Wirksamkeit genauer charakterisiert.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der biologischen Wirksamkeit zu überprüfen, wurden ECV-304 Zellen mit 1 μM PS-ON und einer Konzentrationsreihe von 30 nM – 1,5 μM siLAM-asTOX, siLAM oder siscr3 für 24 h bei 37°C inkubiert (Abschnitt 3.4.7). Im Anschluss wurde die Inkubationslösung durch Vollmedium ersetzt und nach einer weiteren Inkubationszeit von 16 h bei 37°C die siLAM-Wirksamkeit anhand der Inhibition der Lamin A/C-Expression mittels RT-qPCR quantifiziert (Abschnitt 3.4.8). Diese Analyse bestätigte den initial beobachteten Effekt der verbesserten biologischen Wirksamkeit der siLAM-asTOX gegenüber der unkonjugierten siLAM und zeigte dessen Konzentrationsabhängigkeit. (Abbildung 4.6 (A)).

In einem analogen Experiment wurde untersucht, ob die verbesserte biologische Wirksamkeit der siLAM-asTOX gegenüber der unkonjugierten siLAM auf die Zelllinie ECV-304 beschränkt ist oder auch in primären Huvec-Zellen beobachtet werden kann. Wie in Abbildung 4.6 (B) dargestellt, konnte bei einer Konzentration von 1,5 μM siLAM-asTOX eine ca. 55 %ige Inhibition der Lamin A/C-Expression auf der mRNA-Ebene beobachtet werden. Die selbe Konzentration unkonjugierter siLAM führte dagegen zu keiner nachweisbaren Inhibition der Lamin A/C-Expression. Dies impliziert, dass die verbesserte biologische Wirksamkeit der siLAM-asTOX nach deren PS-

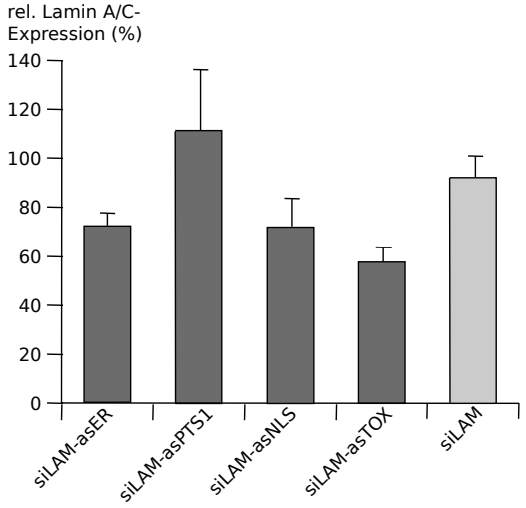


Abbildung 4.5: Die Konjugation ausgewählter Signalpeptide verbessert die biologische siLAM-Wirksamkeit im Anschluss an deren PS-stimulierte zelluläre Einschleusung. ECV-304 Zellen wurden mit 1 μM siLAM, siscr3 oder 4 verschiedenen siLAM-Peptid-Konjugaten in Anwesenheit von 1 μM PS-ON für 24 h in OptiMEM-Medium inkubiert. Im Anschluss wurde die Inkubationslösung gegen Vollmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 16 h inkubiert. Der Nachweis der siLAM-Wirksamkeit, die sich in der Inhibition der Lamin A/C-Expression ausdrückt, erfolgte mittels RT-qPCR. Die Lamin A/C-Expression in siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

stimulierter zellulärer Einschleusung nicht auf die Zelllinie ECV-304 beschränkt ist, sondern für verschiedene Zellarten von Bedeutung sein könnte.

Zusammenfassend bestätigten diese Analysen das Konzept, dass durch die Konjugation von Polypeptid-abgeleiteten Signalpeptiden die biologische siLAM-Wirksamkeit gesteigert werden kann. Am Beispiel des siLAM-asTOX-Konjugates konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig ist und auch auf andere Zellarten, wie die primären Huvec-Zellen übertragen werden kann. Die biologische Wirksamkeit einer siRNA setzt sich jedoch aus einer Vielzahl von Faktoren zusammen, wie z.B. der intrinsischen siRNA-Effizienz, der siRNA-Stabilität, der zellulären siRNA-Einschleusung und der siRNA-Spezifität (Abschnitt 1.1.2). Im Folgenden wurde deshalb am Beispiel der siLAM-asTOX-Konjugates untersucht, an welchem Punkt von der zellulären Einschleusung bis hin zur Spaltung der Ziel-mRNA sich die gesteigerte biologische Wirksamkeit gegenüber der unkonjugierten siLAM ergibt.

Intrinsische Wirksamkeit von siLAM versus siLAM-asTOX

Im Fall der PS-stimulierten siLAM-Einschleusung können intrazellulär ca. 15.000 siLAM-Moleküle pro Zelle nachgewiesen werden, die die Lamin A/C-Expression jedoch nur maginal inhibieren [129]. Im Gegensatz dazu führt die *Lipofectamine*^{TM} *2000* (LF2000)-vermittelte siLAM-Transfektion bereits bei ca. 300 intrazellulär nachweisbaren siLAM-Molekülen pro Zelle zu einer 50 %igen Suppression der Lamin A/C-Expression [131, 135], so dass angenommen werden kann, dass die intrazelluläre siRNA-Freisetzung bei diesem siRNA-Einschleusungsverfahren sehr effizient erfolgt. Dies macht die LF2000-vermittelte siRNA-Transfektion zu einem siRNA-Einschleusungsverfahren anhand dessen die Wirksamkeit der siLAM-asTOX im Vergleich zu der unkonjugierten siLAM unabhängig

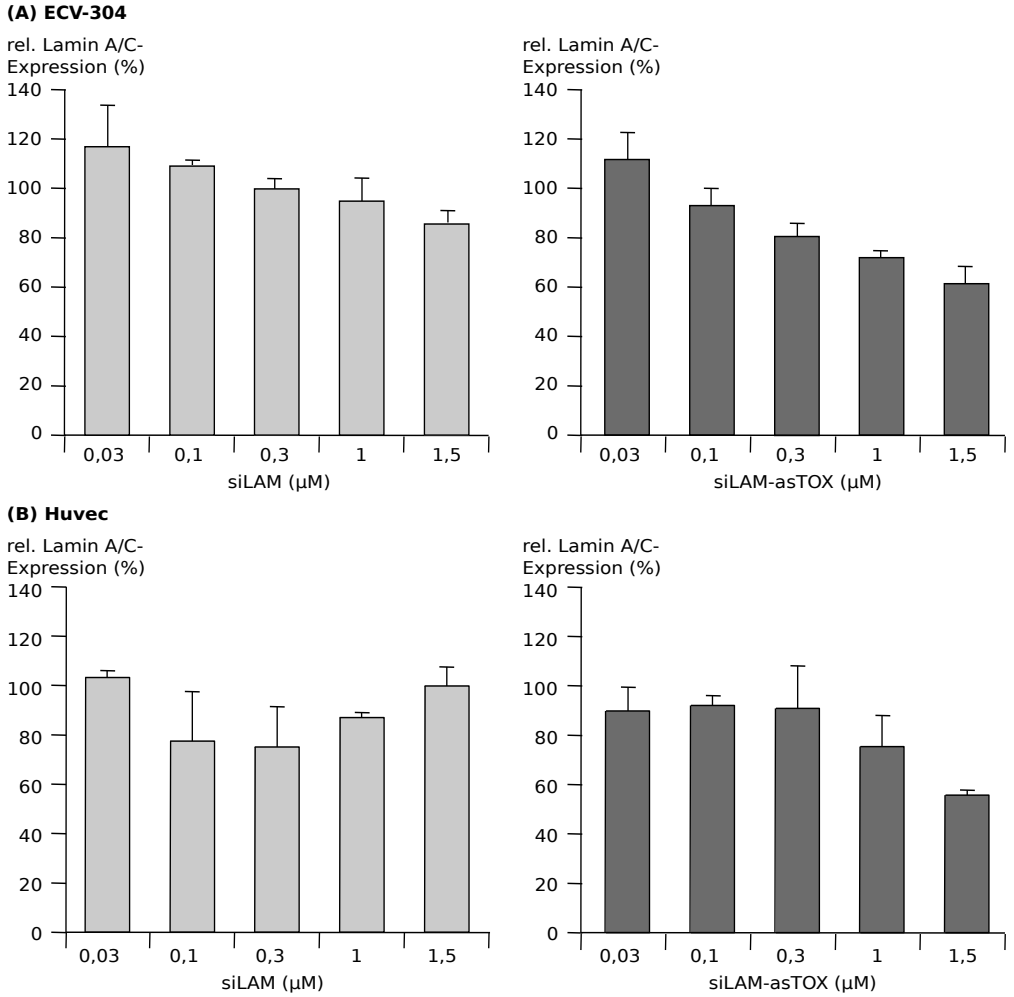


Abbildung 4.6: Die verbesserte biologische Wirksamkeit der siLAM-asTOX gegenüber der unkonjugierten siLAM ist konzentrationsabhängig und sowohl in den immortalen ECV-304 Zellen als auch in den primären Huvec Zellen nachweisbar. (A) ECV-304 Zellen bzw. (B) Huvec Zellen wurden mit den angegeben Konzentrationen an siLAM (links) oder siLAM-asTOX (rechts) bzw. siscr3 in Anwesenheit von 1 μM PS-ON für 24 h in OptiMEM-Medium inkubiert. Die Inkubationslösung wurde dann gegen Vollmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 16 h inkubiert. Der Nachweis der siRNA-Wirksamkeit, die sich in der Inhibition der Lamin A/C-Expression ausdrückt, erfolgte mittels RT-qPCR. Die Lamin A/C-Expression in siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

von der Hürde der intrazellulären siRNA-Freisetzung untersucht werden kann. Die daraus hervorgehende Effektivität der siLAM-asTOX- bzw. siLAM-vermittelten Lamin A/C-Suppression, die alle intrinsischen Eigenschaften der beiden siRNAs berücksichtigt, aber unabhängig von der Hürde der intrazellulären Freisetzung ist, wurde in dieser Arbeit als intrinsische siRNA-Wirksamkeit bezeichnet.

Es wurde untersucht, ob durch die Konjugation der TOX-Peptides die intrinische siLAM-Wirksamkeit beeinflusst wird. Dafür wurden ECV-304 Zellen mit einer Konzentrationsreihe von 1 pM – 1 nM siLAM-asTOX, siLAM bzw. siscr3 LF2000-vermittelt transfiziert (Abschnitt 3.4.5). Nach 4 h wurde der Transfektionsmix verworfen und gegen Vollmedium ausgetauscht. Nach einer

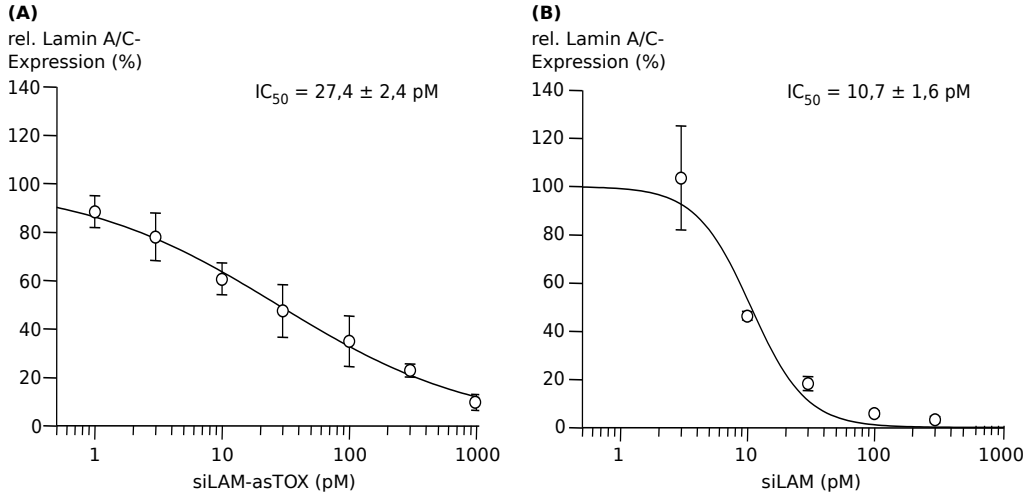


Abbildung 4.7: Die Konjugation des TOX-Signalpeptides reduziert die intrinsische siLAM-Wirksamkeit ca. 2,5-fach. ECV-304 Zellen wurden mit den angegeben Konzentrationen an (A) siLAM-asTOX oder (B) siLAM bzw. siscr3 LF2000-vermittelt transfiziert. Nach 24 h erfolgte der Nachweis der intrinsischen siLAM-asTOX- bzw. siLAM-Wirksamkeit, die sich in der Inhibition der Lamin A/C-Expression ausdrückt, mittels RT-qPCR. Die Lamin A/C-Expression in siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Berechnung der IC_{50}-Werte der siLAM-asTOX bzw. der unkonjugierten siLAM erfolgte mit Hilfe des Programms *GraFit 5* unter Verwendung einer hyperbolischen Gleichung. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

weiteren Inkubationszeit von 20 h erfolgte die Quantifizierung der siLAM-asTOX- bzw. siLAM-Wirksamkeit über den Nachweis der Lamin A/C-mRNA-Mengen im Gesamt-RNA-Extrakt mittels RT-qPCR (Abschnitt 3.4.8). Als Vergleichswert für die intrinsiche siRNA-Wirksamkeit wurde diejenige siLAM-asTOX- bzw. siLAM-Konzentration bestimmt, die für die halbmaximale Inhibition der Lamin A/C-mRNA benötigt wurde. Dieser Wert wird als IC_{50} bezeichnet. Die Abbildung 4.7 zeigt, dass durch die Konjugation des TOX-Signalpeptides an die siLAM der IC_{50}-Wert ca. 2,5-fach erhöht wird. Jedoch handelt es sich bei dem siLAM-asTOX-Konjugat immer noch um eine sehr potente siRNA mit einem IC_{50}-Wert im zweistelligen picomolaren Bereich. In Anbetracht der 2,5-fach verringerten intrinsischen Wirksamkeit der siLAM-asTOX gewinnt jedoch die verbesserte biologische Wirksamkeit dieses Konjugates gegenüber der unkonjugierten siLAM weiter an Bedeutung.

Abhängigkeit der Wirksamkeit des siLAM-TOX-Konjugates von der Position des Signalpeptides

Nach bisherigem Erkenntnisstand wird angenommen, dass die siRNA als Doppelstrang in den RISC geladen wird. Dort wird der *sense* Strang der siRNA von Ago2 gespalten und daraufhin aus dem RISC entlassen. Die intrazelluläre siRNA-Freisetzung muss zeitlich gesehen vor der RISC-Beladung erfolgen, da angenommen wird, dass dieser Prozess im Zytosol der Zelle stattfindet (Abschnitt 1.1.2). Deshalb sollte es für die TOX-Peptid-vermittelte intrazelluläre siLAM-Freisetzung nicht relevant sein, ob das TOX-Peptid an den *antisense* oder den *sense* Strang der siLAM konjugiert wurde. Um dies zu kontrollieren, wurde ein weiteres siRNA-Peptid-Konjugat synthetisiert, dass das TOX-Peptid am 3'-Ende des *sense* Stranges der siLAM trägt. Wie bereits in den beiden

vorangegangenen Abschnitten beschrieben, wurde die intrinsiche Wirksamkeit der siLAM-sTOX mittels LF2000-vermittelter Transfektion (Abschnitt 3.4.5) und die biologische Wirksamkeit der siLAM-sTOX mittels PS-vermittelter zellulärer Einschleusung (Abschnitt 3.4.7) bestimmt. Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, zeigte diese Analyse keine Unterschiede sowohl in der intrinsischen als auch in der biologischen Wirksamkeit der siLAM-sTOX im Vergleich zur siLAM-asTOX (Abbildung 4.7 (A) und 4.6 (A)). Dies zeigt, dass beide Stränge einer siRNA an ihrem 3'-Ende, z.B. durch Konjugation eines Signalpeptides modizifiert werden können und ist konform mit dem Modell, dass die siRNA während aller relevanten intrazellulären Translokationsschritte in doppelsträngiger Form verbleibt, bis sie letztlich in den RISC geladen wird. Für die weiteren vergleichenden Analysen wurde, soweit nicht anders angegeben, die siLAM-asTOX verwendet.

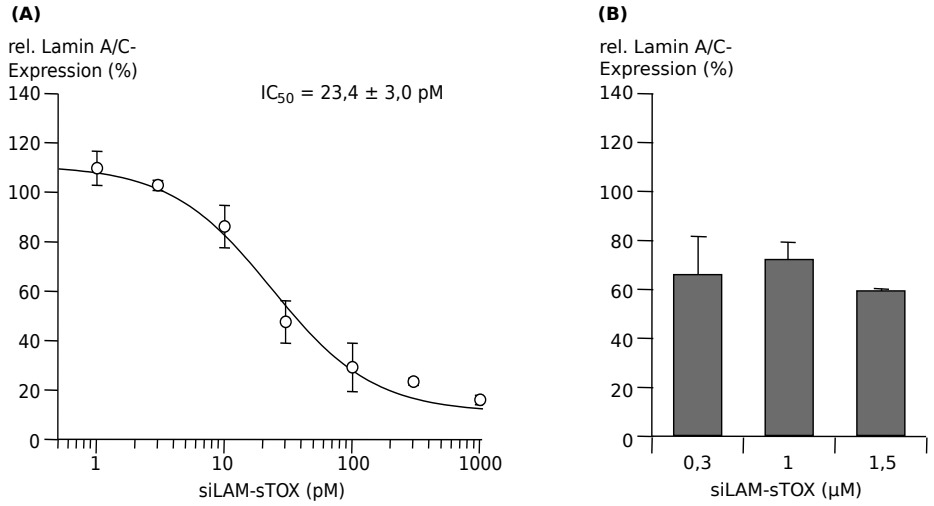


Abbildung 4.8: Die Konjugation des TOX-Peptides an das 3'-Ende des *sense* Stranges der siLAM erhält die intrinsische und biologische Wirksamkeit des siLAM-TOX-Konjugates (vgl. Abbildung 4.7 (A) und 4.6 (A)). (A) Die intrinsische Wirksamkeit der siLAM-sTOX wurde durch die LF2000-vermittelte Transfektion von ECV-304 Zellen mit den angegebenen Konzentrationen siLAM-sTOX bzw. siscr3 bestimmt. Die Analyse der Lamin A/C-Expression erfolgte nach 24 h mittels RT-qPCR. Die Berechnung des IC_{50}-Wertes der siLAM-sTOX erfolgte mit Hilfe des Programms *GraFit 5* unter Verwendung einer 4-Parameter-Gleichung. (B) Die biologische Wirksamkeit der siLAM-sTOX wurde durch Inkubation von ECV-304 Zellen mit den angegebenen Konzentrationen siLAM-sTOX bzw. siscr3 in Anwesenheit von 1 μM PS-ON bestimmt. Die Inhibition der Lamin A/C-Expression, wurde nach 40 h mittels RT-qPCR bestimmt. Sowohl in (A) als in (B) wurde die Lamin A/C-Expression von siscr3-behandelten Zellen auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Zytosolische und Serum-Stabilität von siLAM versus siLAM-asTOX

Die Stabilität einer siRNA stellt einen entscheidenden Faktor für die biologische siRNA-Wirksamkeit dar, da siRNAs als für den Organismus „fremde“ Nukleinsäuren dem ständigen Angriff von Nukleasen unterliegen. Um die Expression eines Ziel-Gens erfolgreich inhibieren zu können, müssen sie ihren Wirkort jedoch in intakter Form erreichen.

Für die Bestimmung der Stabilität der siLAM-asTOX im Vergleich zur unkonjugierten siLAM wurden diese, wie unter Abschnitt 3.2.11 beschrieben, für 0 – 48 h in einem zytosolischen S100-Extrakt oder in Serum-haltigen Vollmedium inkubiert. Im Anschluss wurde gelelektrophoretisch ausgewertet, wie viel der eingesetzten siLAM-asTOX bzw. siLAM noch intakt vorlag. Nach Inku-

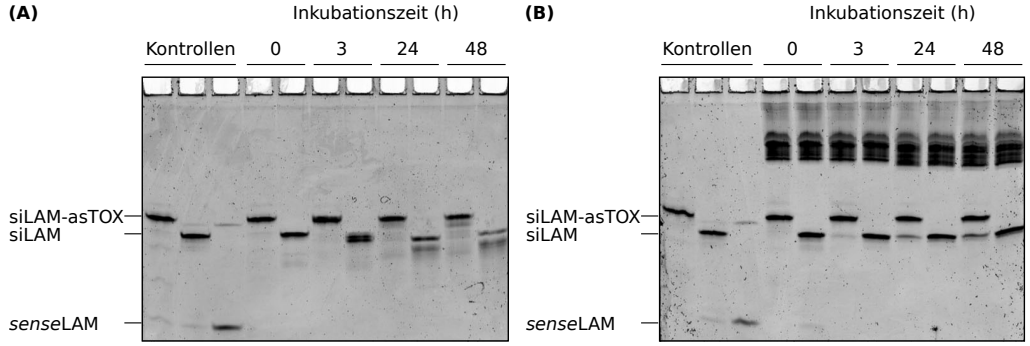
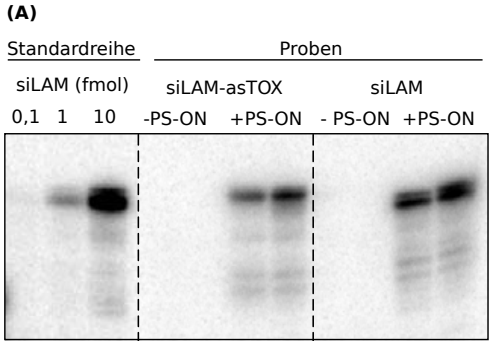


Abbildung 4.9: Die Konjugation des TOX-Peptides an die siLAM erhöht deren Serumstabilität und hat keinen Einfluss auf deren zytosolische Stabilität. Beide siRNAs (Endkonzentration = 0,5 μM) wurden in (A) 10 % (v/v) FKS-haltigem Medium 199 oder (B) zytosolischem S100-Extrakt bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mittels Flüssig-Stickstoff eingefroren und bei −80°C gelagert. Im Anschluss wurden die Proben auf einem 20 %igen (v/v) Nativ-PAA-Gel aufgetrennt und die RNA mit Hilfe von *SYBR® Gold* visualisiert. Die jeweiligen Bandenintensitäten wurden mit Hilfe des Programms *Image Quant 5.2* quantifiziert, um den Anteil der intakt vorliegenden siLAM-asTOX bzw. siLAM zu bestimmen (Details im Text). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Einfachbestimmung durchgeführt wurde.

bation in Gegenwart von Serum wurde nach 48 h eine Degradation der TOX-konjugierten siLAM von ca. 10 % beobachtet. Die unkonjugierte siLAM erwies sich dagegen mit einer Degradation von ca. 40 % als instabiler (Abbildung 4.9 (A)). Während der Inkubation in zytosolischem S100-Extrakt wurde für keine der verwendeten siRNAs eine messbare Degradation im Zeitraum von 48 h detektiert (Abbildung 4.9 (B)). Im Gegensatz dazu wurden die Einzelstränge der siLAM innerhalb von 30 min vollständig degradiert (Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigte sich, dass der Peptid-Anteil der siLAM-asTOX über den beobachteten Zeitraum teilweise abgespalten wurde, der siLAM-Anteil sowie die unkonjugierte siLAM jedoch über den gesamten Zeitraum nahezu vollständig intakt blieben. Da die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung in Serum-freien OptiMEM-Medium durchgeführt wird (Abschnitt 3.4.7), kann angenommen werden, dass eine Degradation der unkonjugierten bzw. der TOX-konjugierten siLAM über einen experimentell relevanten Zeitraum von 48 h nicht stattfindet und damit für die unterschiedlichen biologischen Wirksamkeiten dieser beiden siRNAs nicht verantwortlich sein kann. Im Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung ist die erhöhte Serumstabilität des siRNA-Peptid-Konjugates besonders vielversprechend.

Effektivität der zellulären Einschleusung von siLAM versus siLAM-asTOX

Die Effektivität der zellulären siRNA-Einschleusung stellt einen weiteren, limitierenden Faktor für die biologische Wirksamkeit einer siRNA dar. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob nach der PS-stimulierten Einschleusung die intrazelluläre Menge an siLAM-asTOX und siLAM variiert und damit die verbesserte biologische Wirksamkeit der siLAM-asTOX erklärt werden kann. Dafür wurden ECV-304 Zellen, wie in Abschnitt 3.4.7 beschrieben, mit 1 μM siLAM-asTOX oder siLAM in An- bzw. Abwesenheit von 1 μM PS-ON für 24 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Inkubationslösung durch Vollmedium ersetzt und nach einer weiteren Inkubationszeit von 16 h erfolgte durch ein Nukleaseschutz-Experiment die Quantifizierung der Menge internalisierter siLAM-asTOX- bzw. siLAM-Moleküle pro Zelle (Abschnitt 3.4.9). Die Nachweisgrenze



(B)

Inkubationsbedingung	Anzahl internalisierter siRNA-Moleküle pro Zelle
siLAM-asTOX	ca. 40 ± 6 *
siLAM-asTOX + PS-ON	14.300 ± 1300
siLAM	ca. 40 ± 6 *
siLAM + PS-ON	15.300 ± 3100

* entspricht der Nachweisgrenze

Abbildung 4.10: Die Konjugation des TOX-Peptides an die siLAM hat keinen Einfluss auf das Ausmaß der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung. (A) ECV-304 Zellen wurden mit 1 μM siLAM-asTOX oder siLAM in An- bzw. Abwesenheit von 1 μM PS-ON für 24 h in OptiMEM inkubiert. Nach weiteren 16 h Inkubation in Vollmedium wurden die Zellen lysiert und ein Gesamt-RNA-Extrakt hergestellt. In diesem Extrakt wurden die eingeschleusten siLAM-asTOX bzw. siLAM-Moleküle durch Hybridisierung mit einer ^{32}P-markierten senseLAM-Sonde detektiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung des Hybridisierungsproduktes erfolgte auf einem 20 %igen (v/v) Nativ-PAA-Gel. (B) Durch Mitführen einer siLAM-Standardreihe erfolgte unter Verwendung des Programms *Image Quant 5.2* die Quantifizierung der internalisierten siRNA-Moleküle pro Zelle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

dieser Methode liegt bei 40 siRNA-Molekülen pro Zelle [80]. Die zelluläre Einschleusung von siLAM-asTOX und siLAM ohne PS-Stimulation lag im Bereich dieser Nachweisgrenze. Wie in Abbildung 4.10 dargestellt, führte die PS-Stimulation zu einer vergleichbaren Menge internalisierter siLAM-asTOX bzw. siLAM in einem Bereich von ca. 15.000 siRNA-Molekülen pro Zelle. Dieses Experiment unterstreicht noch einmal das Ausmaß der PS-vermittelten Stimulation der siRNA-Spontanaufnahme. Weiterhin zeigt diese Analyse, dass durch die Konjugation des TOX-Peptides die siLAM-Einschleusung nicht weiter gesteigert wird und somit die verbesserte biologische Wirksamkeit der siLAM-asTOX gegenüber der unkonjugierten siLAM aus einem Schritt resultieren muss, der nach der zellulären Einschleusung liegt.

Spezifität von siLAM versus siLAM-asTOX

Die Spezifität einer siRNA wird unter anderem darüber definiert, dass die siRNA die Inhibition ihrer Ziel-mRNA über den RNAi-Mechanismus und nicht über einen unspezifischen, so genannten *off target* Effekt vermittelt. Wie unter Abschnitt 1.1.2 beschrieben, ist die vollständige Komplementarität zwischen dem *antisense* Strang der siRNA und dessen Zielsequenz innerhalb der Ziel-mRNA eine essentielle Voraussetzung für die Ago2-vermittelte Spaltung der Ziel-mRNA. Diese erfolgt spezifisch zwischen dem 10. und 11. nt gemessen vom 5'-Ende des gebundenen *antisense* Stranges. Wenn das siLAM-TOX-Konjugat bzw. die unkonjugierte siLAM die Ago2-abhängige Spaltung der Lamin A/C-mRNA induzieren, sollte ihre Wirksamkeit durch Einführen von Punktmutationen am 10. und 11. nt des *antisense* Stranges der siLAM aufgehoben werden. Dies wurde getestet, indem ECV-304 Zellen entweder LF2000-vermittelt (Abschnitt 3.4.5) mit 1 nM siLAM-sTOX, siLAM-mut-sTOX, siLAM, siLAM-mut bzw. siscr3 transfiziert oder PS-vermittelt (Abschnitt 3.4.7) mit 1,5 μM siLAM-sTOX , siLAM-mut-sTOX, siLAM, siLAM-mut bzw. siscr3 behandelt wurden. Nach 24 h (LF2000-vermittelte siRNA-Transfektion) bzw. 40 h

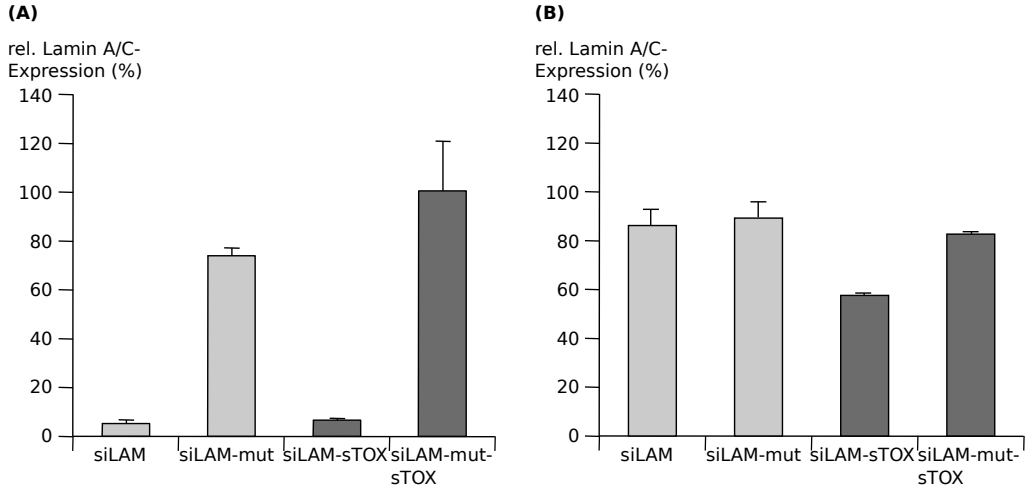


Abbildung 4.11: Die siLAM-sTOX bzw. siLAM-vermittelte Inhibition der Lamin A/C-Expression kann durch Einführen von Punktmutation am 10. und 11. nt des *antisense* Stranges der siLAM aufgehoben werden. ECV-304 Zellen wurden (A) LF2000-vermittelt mit 1 nM siLAM-sTOX, siLAM, deren mutierter Versionen bzw. siscr3 transfiziert oder (B) PS-vermittelt mit 1,5 μM siLAM-sTOX , siLAM-mut-sTOX, siLAM, deren mutierter Versionen bzw. siscr3 behandelt. Nach (A) 24 h und (B) 40 h wurde die Inhibition der Lamin A/C-Expression mittels RT-qPCR bestimmt. Die Lamin A/C-Expression in siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

(PS-vermittelte siRNA-Einschleusung) wurde der inhibitorische Effekt, d.h die Inhibition der Lamin A/C-Expression, mittels RT-qPCR quantifiziert (Abschnitt 3.4.8). Wie in Abbildung 4.11 (A) dargestellt, führte die Einführung der Punktmutationen im *antisense* Strang der siLAM zur nahezu vollständigen Aufhebung der siLAM- bzw. siLAM-sTOX-vermittelten Inhibition der Lamin A/C-Expression nach LF2000-vermittelter Transfektion. Im Anschluss an die PS-vermittelte Einschleusung wurde bereits für die nicht-mutierte, unkonjugierte siLAM keine Inhibition der Lamin A/C-Expression beobachtet. Im Gegensatz dazu führte die PS-vermittelte zelluläre Einschleusung der siLAM-sTOX wiederum zu einer ca. 50 %igen Inhibition der Lamin A/C-Expression, die durch Einführen der Punktmutationen aufgehoben wurde (Abbildung 4.11 (B)). Diese Analysen bestätigten die Annahme, dass sowohl die unkonjugierte siLAM als auch das siLAM-TOX-Konjugat die Inhibition der Lamin A/C-Expression über den RNAi-Mechanismus vermitteln.

Um eventuelle zytotoxische Effekte des siLAM-TOX-Konjugates auszuschließen, wurde im Anschluss an die PS-stimulierte Einschleusung von siLAM-sTOX, siLAM-asTOX bzw. siLAM (Abschnitt 3.4.7) die Viabilität der verwendeten ECV-304 Zellen, wie unter Abschnitt 3.4.4 beschrieben, bestimmt. Wie in Abbildung 4.12 dargestellt, zeigte keine der genannten siRNAs im Anschluss an deren PS-stimulierte zelluläre Einschleusung einen zytotoxischen Einfluss auf die Viabilität der ECV-304 Zellen. Auch in allen Kontrollansätzen wurde keine Reduktion der Zellviabilität beobachtet. Diese Analyse zeigte, dass die verbesserte biologische Wirksamkeit des siLAM-TOX-Konjugates nicht durch eine veränderte Zellviabilität zu erklären ist und unterstreicht die, im Hinblick auf *in vivo* Anwendungen wichtige, gute Verträglichkeit der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung.

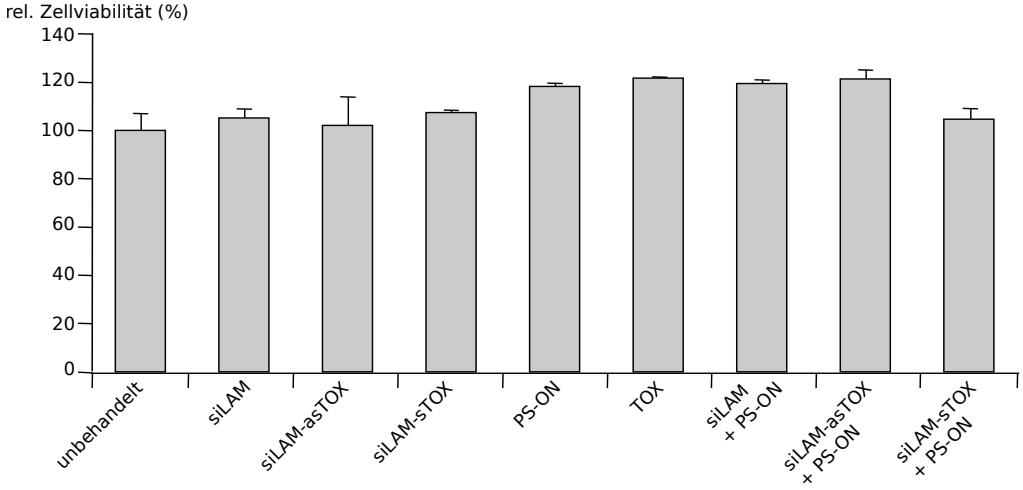


Abbildung 4.12: Die Behandlung von ECV-304 Zellen mit den siLAM-TOX-Konjugaten, der unkonjugierten siLAM und weiteren Kontrollen hat keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Die ECV-304 Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Substanzen in einer Endkonzentration von 1 μM für den Fall der Inkubation mit siLAM-asTOX, siLAM-sTOX, siLAM und/oder PS-ON bzw. 11,5 μM für den Fall der alleinigen Inkubation mit dem TOX-Peptid. Im Anschluss wurde die Zellviabilität mit Hilfe des Umsatzes von Fluoresceindiacetat (FDA) bestimmt und die Viabilität der unterschiedlich behandelten Zellen auf die Viabilität unbehandelter Zellen, die auf 100 % gesetzt wurde, normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Intrazelluläre Freisetzung von siLAM versus siLAM-asTOX

Bis zu diesem Abschnitt wurden alle beeinflussenden Faktoren der biologischen Wirksamkeit einer siRNA, von der Stabilität über die zelluläre Einschleusung bis hin zur Effektivität und Spezifität der siRNA untersucht. Aus keinem der Experimente konnte abgeleitet werden, dass die verbesserte biologische Wirksamkeit der siLAM-asTOX gegenüber der unkonjugierten siLAM aus der Verbesserung einer der genannten Faktoren resultiert. Dies unterstützt die Annahme, dass die verbesserte biologische Wirksamkeit der TOX-konjugierten siLAM auf deren verbesserte intrazelluläre Freisetzung zurückzuführen ist. Mit den folgenden Untersuchungen sollte diese Annahme experimentell belegt werden. Dazu wurden ECV-304 Zellen mit 1 μM PS-ON und 1 μM siLAM-asTOX-Alexa555 bzw. siLAM-Alexa555 in OptiMEM-Medium inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten von 45 min – 24 h nach Beginn der Inkubation erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Verteilung der Fluorophor-gekoppelten siLAM-asTOX bzw. siLAM (Abschnitt 3.4.11). Mit Hilfe des Programms *AxioVision 4.5* wurde die fluoreszierende Fläche quantifiziert, die innerhalb einer Zelle von der siLAM-asTOX-Alexa555 bzw. der siLAM-Alexa555 eingenommen wurde. Diese wurde pro Zeitpunkt über eine Anzahl von 40 Zellen gemittelt und wie in Abbildung 4.13 (A) dargestellt, gegen die Zeit aufgetragen. Diese Analyse zeigte, dass zunächst beide siRNAs vergleichbare Flächen innerhalb einer Zelle einnehmen. Im Fall der siLAM-asTOX wurde nach 2 h eine Vergrößerung der Fläche des fluoreszierenden Signals um ca. 40 μm^2 und eine anschließende Verringerung der Fläche um ca. 80 μm^2 detektiert. Die Ausdehnung des fluoreszierenden Signals nach ca. 2 h wurde als intrazelluläre Freisetzung der siLAM-asTOX interpretiert. Der anschließende Abfall des fluoreszierenden Signals könnte durch die homogene Verteilung der entlassenen siLAM-asTOX über das Zytosol der Zelle erklärt werden, die somit unter das Detektionslimit der

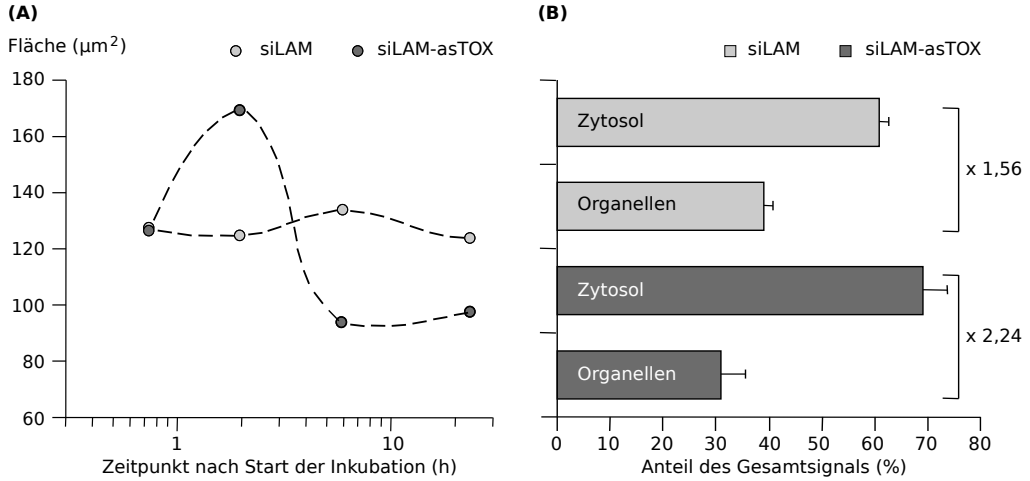


Abbildung 4.13: Der quantitative Nachweis der intrazellulären siLAM-asTOX- bzw. siLAM-Verteilung mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse und zellulärer Fraktionierung impliziert eine zeitabhängige Freisetzung der siLAM-asTOX. (A) ECV-304 Zellen wurden mit 1 μM PS-ON und 1 μM Alexa555-markierter siLAM-asTOX bzw. siLAM inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten die intrazelluläre Verteilung der siRNAs mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse bestimmt. Dabei wurden zu jedem Zeitpunkt die fluoreszierenden Flächen von 20 Zellen mit Hilfe des Programms *AxioVision 4.5* vermessen. (B) ECV-304 Zellen wurden für 2 h mit 1 μM PS-ON, 1 μM siLAM-asTOX bzw. siLAM und 3,5 nM ^{32}P-5'-endmarkierter siLAM-asTOX bzw. siLAM inkubiert. Die Verteilung der radioaktiv-markierten siLAM-asTOX bzw. siLAM auf die Zytosol- bzw. Organellen-Fraktion wurde durch Vermessung der Fraktionen im β-Counter bestimmt. Die Daten dieser Abbildung wurden freundlicher Weise von Winfried Wünsche überlassen.

verwendeten Filter fiel. Im Gegensatz dazu wurde für die unkonjugierte siLAM über den gesamten Zeitraum eine konstante, fluoreszierende Fläche detektiert, die als stabile Akkumulation der siLAM im ER interpretiert wurde.

Um die Beobachtung der intrazellulären Freisetzung der siLAM-asTOX nach 2 h mit einem unabhängigen experimentellen Ansatz zu stärken, wurden ECV-304 Zellen für 2 h mit 1 μM PS-ON, 1 μM siLAM-asTOX bzw. siLAM und 3,5 nM ^{32}P-5'-endmarkierter siLAM-asTOX bzw. siLAM (Abschnitt 3.2.12) in OptiMEM-Medium inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen intensiv gewaschen, lysiert und wie unter Abschnitt 3.4.10 beschrieben, ein zytosolischer S100-Extrakt hergestellt. Sowohl der zytosolische S100-Extrakt als auch die durch Ultrazentrifugation pelletierte Organellenfraktion wurden in Szintillationslösung im β-Counter vermessen und die Verteilung des radioaktiven Signals auf Zytosol- und Organellenfraktion bestimmt (Abbildung 4.13 (B)). Diese Analyse zeigte, dass im Vergleich zur unkonjugierten siLAM größere Mengen siLAM-asTOX in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden konnten. Dies bestärkte die Annahme, dass 2 h nach Beginn der PS-stimulierten zellulären Einschleusung eine intrazelluläre Freisetzung der siLAM-asTOX in das Zytosol der Zelle erfolgt. In der zytosolischen Fraktion konnten zwar ebenfalls große Mengen der unkonjugierten siLAM nachgewiesen werden, in Anbetracht der nicht nachweisbaren biologischen Wirksamkeit der siLAM scheint es sich hierbei jedoch um einen Artefakt zu handeln, der durch eine siRNA-Freisetzung während der Aufarbeitung der Zellen entstehen könnte. Deshalb konnte aus diesem Experiment nur ein Differentialbild abgeleitet werden, dieses jedoch bestätigt die verbesserte intrazelluläre Freisetzung der siLAM-asTOX gegenüber der unkonjugierten siLAM.

Zeitabhängigkeit der biologischen Wirksamkeit des siLAM-TOX-Konjugates

Ein großer Nachteil der in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen intrazellulären siRNA-Freisetzung mit Hilfe von Ilimaquinon war neben der hohen Toxizität auch die Reversibilität des Effektes innerhalb weniger Stunden [130]. Dies führte zwar zur transienten siRNA-Freisetzung aus dem ER, nach Reorganisation des ERs folgte jedoch die erneute Akkumulation der siRNA in diesem Kompartiment (Daten nicht gezeigt). Durch die kovalente Konjugation des TOX-Peptides an die siLAM sollte nun ermöglicht werden, dass nach PS-vermittelter Einschleusung des Konjugates eine kontinuierliche Peptid-vermittelte intrazelluläre Freisetzung erfolgen kann. Angesichts der guten zytosolischen Stabilität des Konjugates (Abbildung 4.9) erschien damit eine Inhibition der Lamin A/C-Expression über einen Zeitraum von mehreren Tagen möglich. Um die Zeitabhängigkeit des Effektes zu untersuchen, wurden ECV-304 Zellen, wie in Abschnitt 3.4.7 beschrieben, mit 1 μM PS-ON und 1,5 μM siLAM-sTOX bzw. siLAM für 24 h in OptiMEM-Medium inkubiert. Daraufhin wurde die Inkubationslösung gegen Vollmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 7 Tage kultiviert. Dabei wurde durch regelmäßiges Splitten der Zellen gewährleistet, dass die Konfluenz der Zellen nicht mehr als 70 % betrug. An den in Abbildung 4.14 angegebenen Zeitpunkten wurden die ECV-304 Zellen geerntet, lysiert und die Menge der Lamin A/C-mRNA im Gesamt-RNA-Extrakt mittels RT-qPCR quantifiziert (Abschnitt 3.4.8). Diese Analyse zeigte, dass die maximale Inhibition der Lamin A/C-mRNA an Tag 3 nach Beginn der PS-stimulierten zellulären siLAM-sTOX-Einschleusung erreicht wird und weitere 3 Tage nachzuweisen ist. In einem analogen Experiment wurde für die unkonjugierte siLAM an keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Inhibition der Lamin A/C-Expression um $\geq$ 20 % detektiert (Daten nicht gezeigt). Diese Analysen unterstreichen die Bedeutung der TOX-vermittelten siLAM-Freisetzung für deren biologische Wirksamkeit und zeigen, dass die intrazelluläre siLAM-Freisetzung über das kovalent konjugierte TOX-Signalpeptid einen bis zu einer Woche anhaltenden inhibitorischen Effekt möglich macht.

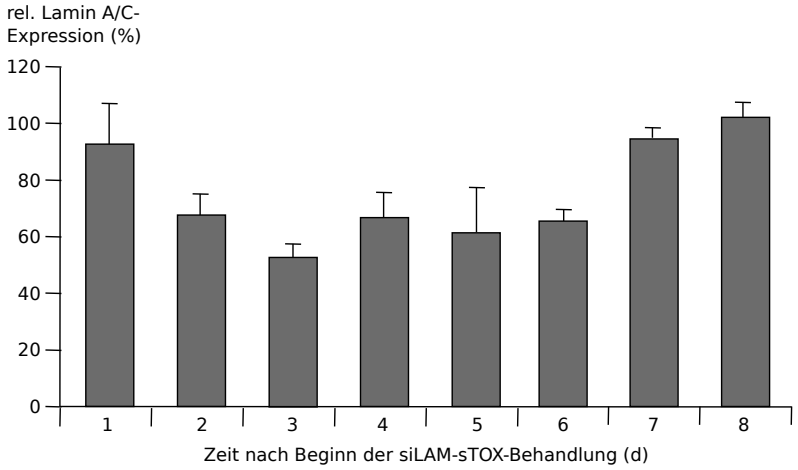


Abbildung 4.14: Das siLAM-sTOX-Konjugat vermittelt nach deren PS-stimulierter zellulärer Einschleusung eine bis zu 6 Tage anhaltende Inhibition der Lamin A/C-Expression. ECV-304 Zellen wurden mit 1,5 μM siLAM-sTOX bzw. siscr3 in Anwesenheit von 1 μM PS-ON für 24 h in OptiMEM-Medium inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in Vollmedium weiter kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Es folgte die Analyse der Lamin A/C-Expression mittels RT-qPCR. Die Lamin A/C-Expression in siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

4.1.4 Fazit – erster Teil

Die biologische Wirksamkeit einer siRNA ist eine Funktion der Charakteristika des gewählten siRNA-Einschleusungs-Verfahren sowie der intrinsischen Eigenschaften der siRNA. In diesem Teil der Arbeit wurde am Beispiel der PS-stimulierten zellulären siRNA-Einschleusung gezeigt, dass auch die intrazelluläre siRNA-Freisetzung einen wichtigen Parameter für die biologische siRNA-Wirksamkeit darstellt. Es wurden zwei Konzepte zur Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung getestet, die beide zeigten, dass die Verbesserung der intrazellulären siRNA-Bioverfügbarkeit mit einer gesteigerten biologischen siRNA-Wirksamkeit korreliert ist. Besonders vielversprechend im Hinblick auf eine Anwendung *in vivo* ist das zweite Konzept. Dies macht sich die Induktion der transmembranen Translokation der siLAM aus dem sie einschließenden Kompartiment in das Zytosol über das kovalent konjugiertes TOX-Signalpeptid zunutze. Am Beispiel des siLAM-TOX-Konjugates wurden diejenigen Faktoren untersucht, die Einfluss auf die biologische Wirksamkeit einer siRNA haben können. Diese sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Berücksichtigt man die ca. 2,5-fach reduzierte intrinsische Wirksamkeit der siLAM-asTOX (IC_{50} = 27 pM) im Vergleich zur unkonjugierten siLAM (IC_{50} = 11 pM) sowie die vergleichbare Stabilität und zelluläre Einschleusung, kann von einer ca. 10-fach verbesserten biologischen Wirksamkeit der siLAM-asTOX im Vergleich zur unkonjugierten siLAM ausgegangen werden. Die verbesserte biologische Wirksamkeit geht dabei mit der TOX-Signalpeptid-vermittelten intrazellulären Freisetzung des Konjugates einher (Abbildung 4.13). Zusammenfassend konnte geschlussfolgert werden, dass die Übertragung von Polypeptid-abgeleiteten Transport- und Sortierungssignalen auf siRNA, deren intrazelluläre Freisetzung fördern kann und dies mit einer gesteigerten biologischen Wirksamkeit korreliert ist.

Eigenschaft	siLAM	siLAM-asTOX
Serumstabilität[1]	≈ 60 % intakt	≥ 90 % intakt
Zytosolische Stabilität[2]	≥ 95 % intakt	≥ 95 % intakt
Zelluläre Einschleusung[3]	15.300 ± 3100 Moleküle/Zelle	14.300 ± 1300 Moleküle/Zelle
Intrinsische Wirksamkeit[4]	IC_{50} = 10,7 ± 1,6 pM	IC_{50} = 27,4 ± 2,4 pM
Biologische Wirksamkeit[5]	14,2 ± 1,9 % Inhibition des Zielgens bei 1,5 μM	21,4 ± 6,3 % Inhibition des Zielgens bei 0,3 μM

[1] Die Serumstabilität wurde über 48 h in 10 % FKS-haltigem Vollmedium bestimmt.
[2] Die zytosolische Stabilität wurde über 48 h in zytosolischem S100-Extrakt bestimmt.
[3] Die zelluläre Einschleusung wurde bei einer Konzentration von 1 μM PS-ON und 1 μM siRNA bestimmt.
[4] Die intrinsische Wirksamkeit wurde mittels LF2000-vermittelter siRNA-Transfektion bestimmt.
[5] Die biologische Wirksamkeit wurde mittels PS-stimulierter zellulärer siRNA-Einschleusung bestimmt.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der untersuchten Eigenschaften des siLAM-asTOX-Konjugates im Vergleich zur unkonjugierten siLAM.

4.2 Bedeutung von Ago2 für die Effizienz der RNA-Interferenz

Der Mechanismus der RNAi ist ein konservierter, post-transkriptionell ansetzender genregulatorischer Prozess, der wichtige Funktionen im Bereich der Entwicklung, der Proliferation, der Hämatopoese und der Apoptose einnimmt [31–36]. Weiterhin trägt die Ausnutzung der endogenen RNAi-Maschinerie durch synthetische siRNAs enormes therapeutisches Potential, weil diese durch die sequenzspezifische Spaltung einer Ziel-mRNA die Expression prinzipiell jedes beliebigen Zielgens inhibieren können (Abschnitt 1.1.2). Somit ist das Verständnis des Mechanismus der RNAi sowie die Kenntnis der essentiellen Komponenten der RNAi-Maschinerie von enormer Bedeutung um die natürlichen genregulatorischen Prozesse zu verstehen und effektiv für RNAi-basierte Wirkstoffe nutzen zu können. Deshalb wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ein Konzept getestet, das die quantitative Untersuchung der Bedeutung von RNAi-assoziierten Proteinen für die Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi ermöglichen soll. Bei derartigen Anaylsen ist es besonders wichtig, nicht sequenz-unspezifisch mit dem Mechanismus der RNAi zu interferieren. Deshalb sind siRNA-Wirkstoffe für diese Analysen ungeeignet, da sie durch Sättigung der RNAi-Maschinerie falsch-positive Phänotypen erzeugen können. Das in diesem Abschnitt getestete Konzept beruht auf der RNase H-abhängigen *antisense* Oligonukleotid (asON)-vermittelten Inhibition RNAi-assoziierter Proteine. Um dieses Konzept zu testen, wurde als Modell-Protein der RNAi-Maschinerie das humane Ago2-Protein ausgewählt. Ago2 ist das am besten untersuchte Mitglied der Ago-Proteinfamilie und kann als einziges der 4 humanen Ago-Proteine die endonukleolytische Spaltung einer Ziel-mRNA induzieren, obwohl auch Ago3 eine katalytische Triade (Asp-Asp-His) aufweist. Deshalb wird Ago2 in der Literatur als katalytisches Zentrum der RNAi-Maschinerie beschrieben [41, 42]. Inwieweit dessen Funktionen für die miRNA-vermittelte RNAi, die nicht über die Spaltung einer Ziel-mRNA sondern über deren Translationsinhibition erfolgt, essentiell ist und/oder durch andere Ago-Proteine bzw. andere RNAi-assoziierte Proteine ersetzt werden kann, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

4.2.1 Entwurf und Charakterisierung Ago2-gerichteter *antisense* Oligonukleotide

Gegenwärtig wird angenommen, dass die Wirksamkeit eines asON maßgeblich durch folgende Faktoren beeinflusst wird: (i) durch die chemischen Eigenschaften und die Sequenz des asON, (ii) durch die Charakteristika des untersuchten biologischen Systems, wie z.B. den metabolischen Eigenschaften der Ziel-mRNA und (iii) durch die Zugänglichkeit der Zielsequenz innerhalb der Ziel-mRNA. Während die ersten beiden Faktoren experimentell untersucht und/oder durch Einführen spezifischer chemischer Modifikationen in die asON-Sequenz moduliert werden können, ist die Zugänglichkeit der Zielsequenz des asON ein von der Ziel-mRNA vorgegebener, nicht-beeinflussbarer Faktor [23, 207, 222]. Aufgrund dessen kann der Entwurf von asONs auf zweierlei Art und Weise erfolgen. Entweder unter Berücksichtigung empirischer asON-Eigenschaften oder basierend auf der Vorhersage zugänglicher Sekundärstruktur-Bereiche der Ziel-mRNA. Die letztere Strategie wurde in dieser Arbeit beim Entwurf der Ago2-gerichteten asONs, wie unter Abschnitt 3.2.14 beschrieben, unter Verwendung des Programms *mfold 2.3* verfolgt. Dabei wird einem als zu-

gänglich vorhergesagten Sekundärstrukturelement eine statistische Wahrscheinlichkeit verliehen, indem die Konserviertheit dieses Sekundärstrukturelementes innerhalb eines „gleitenden Fensters“ von Sequenzausschnitten der Ziel-mRNA bestimmt wird. Im Speziellen musste beim Entwurf der Ago2-gericheteten asONs ebenfalls berücksichtigt werden, dass die 4 humanen Ago-Proteine auf der mRNA-Ebene eine bis zu 75 %ige Sequenzhomologie aufweisen, so dass ein Sequenzvergleich potentieller asON-Zielsequenzen mit den mRNA-Sequenzen der 3 anderen humanen Ago-Proteine mit Hilfe des *Multialignment Tools* auf dem NPS@-Server durchgeführt wurde (Abschnitt 3.2.14). Die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) der Ago2-mRNA ist als Zielsequenz für Ago2-gerichtete asONs gegenüber dem offenen Leserahmen (ORF) zu bevorzugen, da in diesem Bereich die Homologie der Ago-mRNA-Sequenzen am geringsten ausgeprägt ist. Weiterhin wurden bei der Auswahl der asON-Sequenzen die publizierten Regeln bezüglich der Stabilität und Funktionalität von asON-Wirkstoffen berücksichtigt [24, 208, 209]. In Abbildung 4.15 (A) ist beispielhaft die vorhergesagte Sekundärstruktur der Zielsequenz des asAgo2 3024/24 dargestellt. Dabei ist vor allem die Haarnadelschleife im 5'-Bereich des gebundenen asON wichtig für die Zugänglichkeit der Zielsequenz. Das 3'-Ende des asON bindet ebenfalls in einem ungepaarten Bereich der Zielsequenz, wodurch ein Fixieren des asON an der Ziel-mRNA ermöglicht wird. Die RNase H benötigt zur Vermittlung der Spaltung der RNA-Komponente eines DNA/RNA-Heteroduplexes einen vollständig gepaarten Bereich von mindestens 6 nt [223]. Die Abbildung 4.15 (B) zeigt, dass die Zielsequenz des asAgo2 3024/24, die im 3'UTR der Ago2-mRNA liegt, keine konsekutiven Homologien von $\geq$ 3 nt innerhalb der mRNA-Sequenzen der 3 anderen Ago-Proteine aufweist. Insgesamt wurden 12 asONs entworfen, von denen 3 eine Zielsequenz im ORF und 9 in der 3'-UTR der Ago2-mRNA aufwiesen (Abbildung 2.1). Als Positivkontrolle wurde das von der Firma *ISIS Pharmaceuticals* entworfene Ago2-gerichtete asON ISIS136764 verwendet [206]. Alle asONs wiesen vollständig PS-modizierte Internukleotidverknüpfungen auf um die Resistenz der asONs gegenüber zellulären Nukleasen zu gewährleisten (Abschnitt 1.1.1).

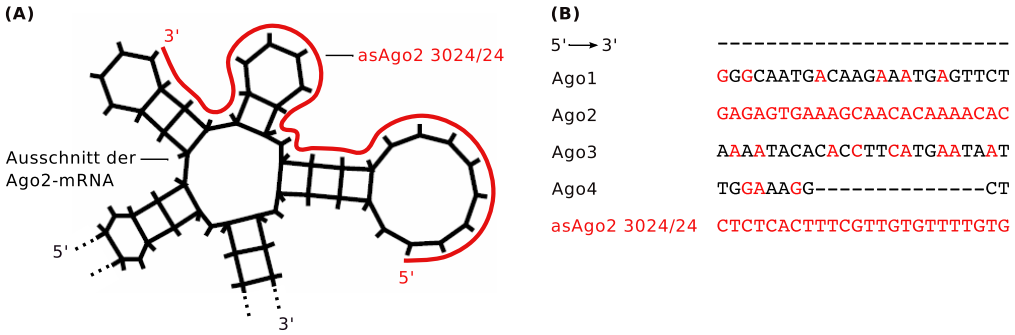


Abbildung 4.15: Der Entwurf der Ago2-gerichtetetn asONs beruht auf der Vorhersage von zugänglichen Sequenzabschnitten innerhalb der Ago2-mRNA sowie auf dem Sequenzvergleich dieser Sequenzabschnitte mit den Nukleinsäure-Sequenzen von Ago1, Ago3 und Ago4. (A) Mit Hilfe des Programms *mfold 2.3* wurde eine Vorhersage der Sekundärstruktur der Ago2-mRNA durchgeführt um zugängliche Bereiche zu identifizieren und aus ihnen komplementäre Oligonukleotide abzuleiten. Exemplarisch ist ein als zugänglich definierter Ausschnitt der Ago2-mRNA (Position 3013 – 3057) sowie die davon abgeleitete Zielsequenz des asAgo2 3024/24 (rote Linie) dargestellt. (B) Der Sequenzvergleich der 4 humanen Ago-Proteine mittels *NPS@: Network Protein Sequence Analysis* zeigte, dass die Zielsequenz des asAgo2 3024/24 innerhalb der Ago2-mRNA nur vereinzelt homologe Nukleotide (rot) zu den Nukleinsäure-Sequenzen von Ago1, Ago3 und Ago4 aufweist.

Im Folgenden wurden die entworfenen Ago2-gerichteten asONs bezüglich ihrer Wirksamkeit charakterisiert. Um diese Charakterisierung durchführen zu können, wurde zunächst der quantitative Nachweis von Ago2 auf der mRNA- und der Protein-Ebene etabliert. Anhand dieser Nachweissysteme wurden potente asONs identifiziert und bezüglich ihrer Spezifität sowie der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit ihres inhibitorischen Effektes getestet. Abschließend wurde die Bedeutung der zellulären Ago2-Menge für die siRNA- und miRNA-vermittelte RNAi quantitativ untersucht.

Quantifizierung der Ago2-mRNA und des Ago2-Proteins

Der Nachweis der Wirksamkeit der Ago2-gerichteten asONs auf mRNA-Ebene erfolgte mittels RT-qPCR (Abschnitt 3.2.8 und 3.2.9) unter Verwendung von Primern deren Spezifität gegenüber der Ago2-cDNA durch Sequenzierung des aus der PCR-Reaktion hervorgehenden Amplikons bestätigt wurde [224]. Wie in Abbildung 4.16 (A) anhand einer Standardreihe aus 6 seriellen 10-fach Verdünnungen dieses Amplikons in H_2O ($5 \times 10^1 - 5 \times 10^6$ Kopien) dargestellt, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem dekatischem Logarithmus der Kopienzahl im Reaktionsansatz und den bei einer qPCR-Reaktion bestimmten Ct-Werten. Dieser Zusammenhang gewährleistet die quantitative Analyse der Wirksamkeit der Ago2-gerichteten asONs auf der Ago2-mRNA-Ebene über die Bestimmung der Anzahl der Kopien der revers transkribierten Ago2-mRNA in einem qPCR-Reaktionsansatz.

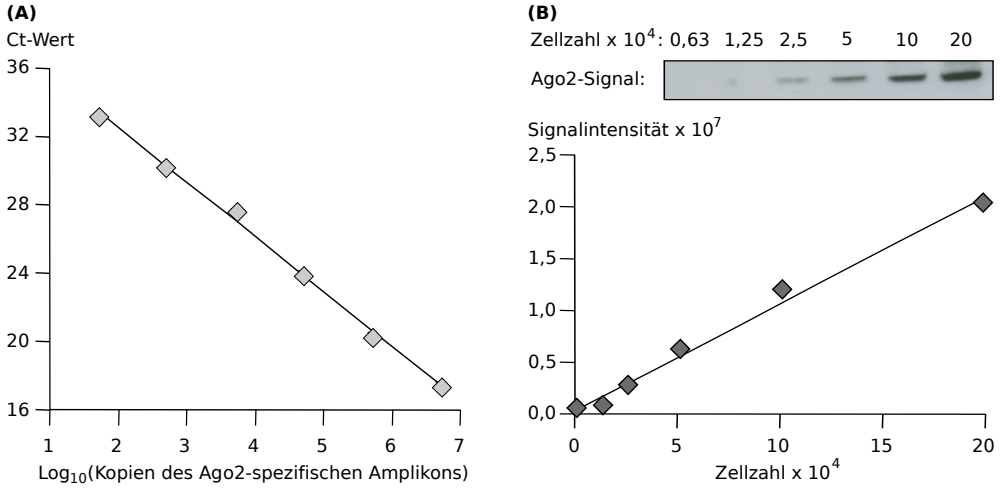


Abbildung 4.16: Ago2 kann mit Hilfe der RT-qPCR bzw. der Western-Analyse sowohl auf der mRNA-Ebene als auch auf der Protein-Ebene quantitativ nachgewiesen werden. (A) Der Nachweis der Ago2-mRNA im Gesamt-RNA-Extrakt basiert auf deren reverser Transkription und anschließender Amplifikation mittels qPCR unter Verwendung von Ago2-spezifischen Primern. Dargestellt sind die in der qPCR ermittelten Ct-Werte bezogen auf den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Kopienzahl des Ago2-spezifischen Amplikons. Durch lineare Regression wurde die Geradengleichung $y = -3,23x + 34,85$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99 erhalten. (B) Der Nachweis des Ago2-Proteins im Gesamtzelllysat basiert auf dessen Visualisierung mittels Western-Analyse unter Verwendung des Ago2-spezifischen Primär-Antikörpers Anti-Ago2 (11A9) und des passenden HRP-gekoppelten Anti-Ratte-Sekundärantikörpers. Dargestellt sind die Ago2-spezifischen Banden im Western-Blot (oben), deren Signalintensitäten mit Hilfe des Programms *Image Quant 5.2* bestimmt und gegen die eingesetzten Mengen an ECV-304 Zellen aufgetragen wurden (unten). Durch lineare Regression wurde die Geradengleichung $y = 1026,2x + 3,97 \cdot 10^6$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,98 erhalten. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, dass in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Der Nachweis der Wirksamkeit der Ago2-gerichteten asONs auf Protein-Ebene erfolgte mittels Western-Analyse (Abschnitt 3.3.3) unter Verwendung eines Antikörpers, dessen Spezifität gegenüber dem Ago2-Protein mit Hilfe von rekombinanten Ago-Proteinen bestätigt wurde [192]. Wie in Abbildung 4.16 (B) anhand einer Standardreihe aus 6 seriellen 2-fach Verdünnungen eines ECV-304-Gesamtzelllysats in Probenpuffer für SDS-PAGE ($6{,}25 \times 10^3 - 2 \times 10^5$ Zellen) dargestellt, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Zellzahl im Probenansatz und der aus der Western-Analyse hervorgehenden Antikörper-spezifischen Signalintensität. Dieser Zusammenhang gewährleistet die quantitative Analyse der Wirksamkeit der Ago2-gerichteten asONs auf der Ago2-Protein-Ebene über die Bestimmung der Ago2-Protein-Menge in einem Gesamtzelllysat.

Identifikation potenter hAgo2-gerichteter asON

Die Auswahl potenter Ago2-gerichteter asONs erfolgte zunächst nur auf der Ago2-mRNA-Ebene, weil der RT-qPCR-basierte Nachweis der Ago2-mRNA in großem Maßstab erfolgen kann und somit eine vergleichende Analyse aller asONs in einem Experiment ermöglichte. Dafür wurden ECV-304 Zellen, wie unter Abschnitt 3.4.5 beschrieben, mit den Ago2-gerichteten asONs bzw. asKtrl I in einer Konzentration von 100 nM LF2000-vermittelt transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, deren Gesamt-RNA extrahiert und die Menge der Ago2-mRNA mittels RT-qPCR quantifiziert (Abschnitt 3.4.8). Diese Analyse zeigte, dass 5 der 12 entworfenen asONs die Ago2-mRNA-Expression im Vergleich zur Ausgangsexpression um ≥ 50 % reduzierten (Abbildung 4.17).

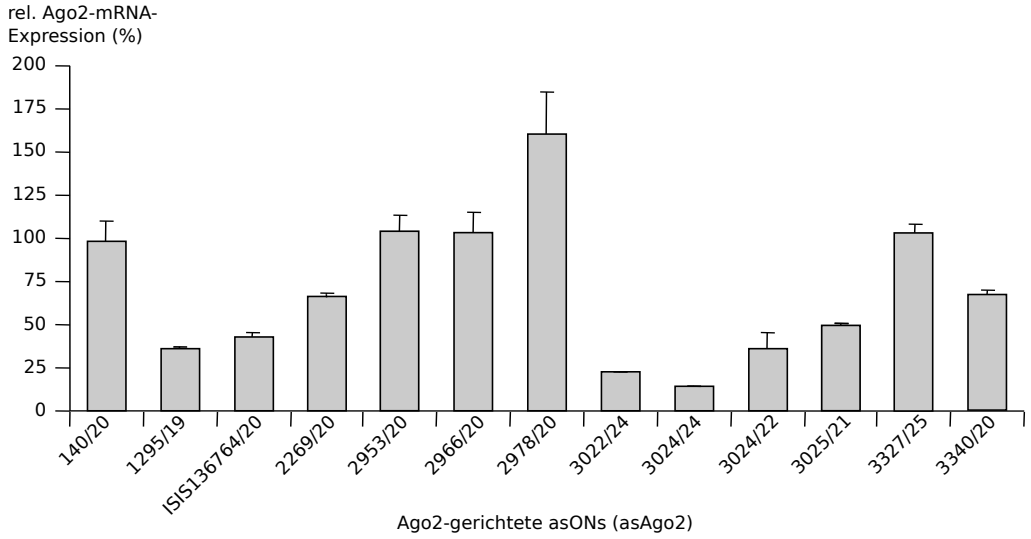


Abbildung 4.17: Von 12 entworfenen Ago2-gerichteten asONs reduzieren 5 die Ago2-mRNA-Expression im Vergleich zur Ausgangsexpression um ≥ 50 %. ECV-304 Zellen wurden LF2000-vermittelt mit den aufgeführten Ago2-gerichteten asONs bzw. dem Kontroll-ON asKtrl I in einer Konzentration von 100 nM transfiziert. Nach 24h erfolgte die Analyse der Ago2-mRNA-Expression mittels RT-qPCR. Die Ago2-Expression in asKtrl I-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Terminologie der asONs leitet sich wie folgt ab: „asAgo2 erste Position der Zielsequenz innerhalb der Ago2-mRNA / Länge des asON“. Als Positivkontrolle wurde das asAgo2 ISIS136764/20 verwendet, dessen Zielsequenz an Position 2218 der Ago2-mRNA beginnt und 20 nt lang ist. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das von Ulrike Weirauch in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Von allen gestesteten asONs zeigte das asAgo2 3024/24 die beste Wirksamkeit mit einer Reduktion der Ago2-mRNA-Menge auf ca. 15 % im Vergleich zu Zellen, die mit dem Kontrol-ON asKtrl I transfiziert wurden. Das asAgo2 3024/24 wies sogar eine bessere Wirksamkeit als die publizierte Positivkontrolle ISIS136764 auf. Deshalb wurde es als Leitsubstanz ausgewählt und im Folgenden genauer charakterisiert.

Spezifität des asAgo2 3024/24

Die in dieser Arbeit verwendeten asONs wurden mit dem Ziel entworfen, dass sie die RNaseH-abhängige Spaltung der Ago2-mRNA induzieren (Abbildung 1.2). Die Spezifität des asAgo 3024/24 wurde deshalb darüber definiert, dass das asON die Spaltung der Ago2-mRNA über einen RNase H-vermittelten Prozess und nicht über einen unspezifischen, so genannten *off target* Effekt vermittelt. Um dies zu untersuchen wurden 2 Standardkontrollen eingeführt. Zum einen wurde die Sequenz des asAgo2 3024/24 invertiert, wodurch die sequenzspezifische Bindung des asON an die Ago2-mRNA aufgehoben wird, die Basenzusammensetzung jedoch unverändert bleibt. Zum anderen wurden in die Sequenz des asAgo2 3024/24 Punktmutationen an den Position 6/7, 13/14 und 20/21 eingeführt. Wie bereits beim Entwurf der asONs beschrieben wurde, benötigt die RNase H für die endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA im Kontext des asON/mRNA-Heteroduplexes einen vollständig gepaarten Bereich von mindestens 6 nt [223]. Das Unterbrechen dieser minimal notwendigen Komplementarität durch die eingeführten Punktmutationen sollte deshalb die Induktion der RNase H-abhängigen Spaltung der Ago2-mRNA unterbinden.

Die Spezifität des asAgo2 3024/24 wurde getestet, indem ECV-304 Zellen LF2000-vermittelt mit 100 nM asAgo2 3024/24 bzw. den Kontroll-ONs 3024/24inv, 3024/24mut oder asKtrl I transfiziert wurden (Abschnitt 3.4.5). Nach 24 h wurde die Inhibition der Ago2-mRNA-Expression mittels RT-qPCR quantifiziert (Abschnitt 3.4.8). Wie in Abbildung 4.18 dargestellt, führte sowohl das Invertieren der Sequenz des asAgo2 3024/24 als auch das Einführen der Punktmutationen zur nahezu vollständigen Aufhebung der asAgo2 3024/24-vermittelten Inhibition der Ago2-Expression. Diese Analyse ist konform mit der Annahme, dass das asAgo2 3024/24 die Inhibition der Ago2-Expression über die RNase H-abhängige Spaltung der Ago2-mRNA vermittelt. Weiterhin wurde gezeigt, dass das asAgo2 3024/24 spezifisch die Spaltung der Ago2-mRNA induziert und dabei die mRNA-Mengen der anderen 3 Ago-Proteine nicht beeinflusst werden [202, 225]. In allen folgenden Analysen wurde, soweit nicht anders angegeben, das asAgo2 3024/24mut als spezifische Kontrolle für das asAgo2 3024/24 verwendet.

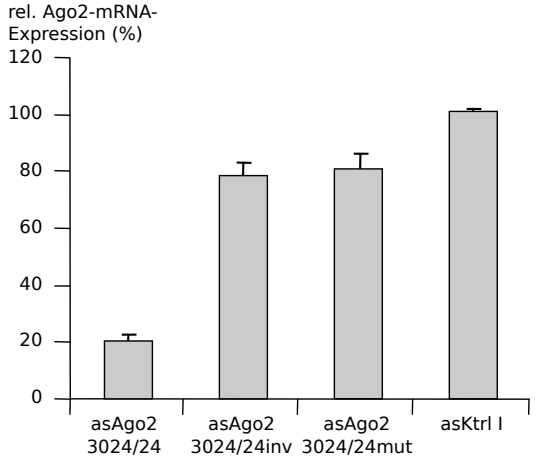


Abbildung 4.18: Die asAgo2 3024/24-vermittelte Inhibition der Ago2-Expression wird durch Invertieren der asAgo2 3024/24-Sequenz sowie durch Einführen von Punktmutationen an den Positionen 6/7, 13/14 und 20/21 aufgehoben. ECV-304 Zellen wurden LF2000-vermittelt mit 100 nM asAgo2 3024/24 bzw. den Kontroll-ONs asAgo2 3024/24inv, asAgo2 3024/24mut und asKtrl I transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Analyse der Ago2-mRNA-Expression mittels RT-qPCR. Die Ago2-mRNA-Expression in asKtrl I-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das von Ulrike Weirauch in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Konzentrationsabhängigkeit der asAgo2 3024/24-vermittelten Inhibition der Ago2-Expression

Analog zu siRNA-Wirkstoffen wird auch die Effizienz eines asON-Wirkstoffs durch die asON-Konzentration, die zur effizienten Inhibition des Ziel-Gens benötigt wird, sowie durch die Dauer des inhibitorischen Effektes charakterisiert. Weiterhin ist es im Hinblick auf die geplanten RNAi-Funktionsanalysen besonders wichtig, ebenfalls eine effiziente Reduktion der zellulären Ago2-Protein-Menge zu erzielen. Deshalb sollte die initiale Beobachtung der sehr guten Wirksamkeit des asAgo2 3024/24 konzentrations- und zeitabhängig aufgelöst werden und sowohl auf der Ago2-mRNA- und als auch auf der Ago2-Protein-Ebene untersucht werden.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Wirksamkeit des asAgo2 3024/24 zu untersuchen, wurden ECV-304 Zellen LF2000-vermittelt mit einer Konzentrationsreihe von 3 – 300 nM asAgo2 3024/24 bzw. 3024/24mut transfiziert (Abschnitt 3.4.5). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und entweder ein Gesamt-RNA-Extrakt für den Nachweis der Ago2-mRNA mittels RT-qPCR oder ein Gesamtzelllysat für den Nachweis des Ago2-Proteins mittels Western-Analyse hergestellt (Abschnitt 3.4.8). Die Analyse der asAgo2 3024/24-Wirksamkeit zeigte, dass auf der Ago2-mRNA-Ebene der halbmaximale inhibitorische Effekt in einem Konzentrationsbereich von 3 – 10 nM erzielt wird und die maximale Wirksamkeit bereits bei 30 nM erreicht wird. Jedoch konnte auf der Ago2-Proteine-Ebene keine vergleichbare Wirksamkeit des asAgo2 3024/24 beobachtet werden. Die Reduktion der Ago2-Protein-Menge im Vergleich zur Ausgangexpression betrug $\leq$ 30 % und wies nur im Bereich von 3 – 30 nM eine Konzentrationsabhängigkeit auf (Abbildung 4.19 (A)). Dagegen wurde in einem analogen Experiment für die Ago2-gerichtete siRNA siAgo2 [42] bei vergleichbarer Inhibition der Ago2-mRNA eine gute Korrelation mit dem inhibitorischen Effekt auf der Ago2-Protein-Ebene beobachtet (Abbildung 4.19 (B)).

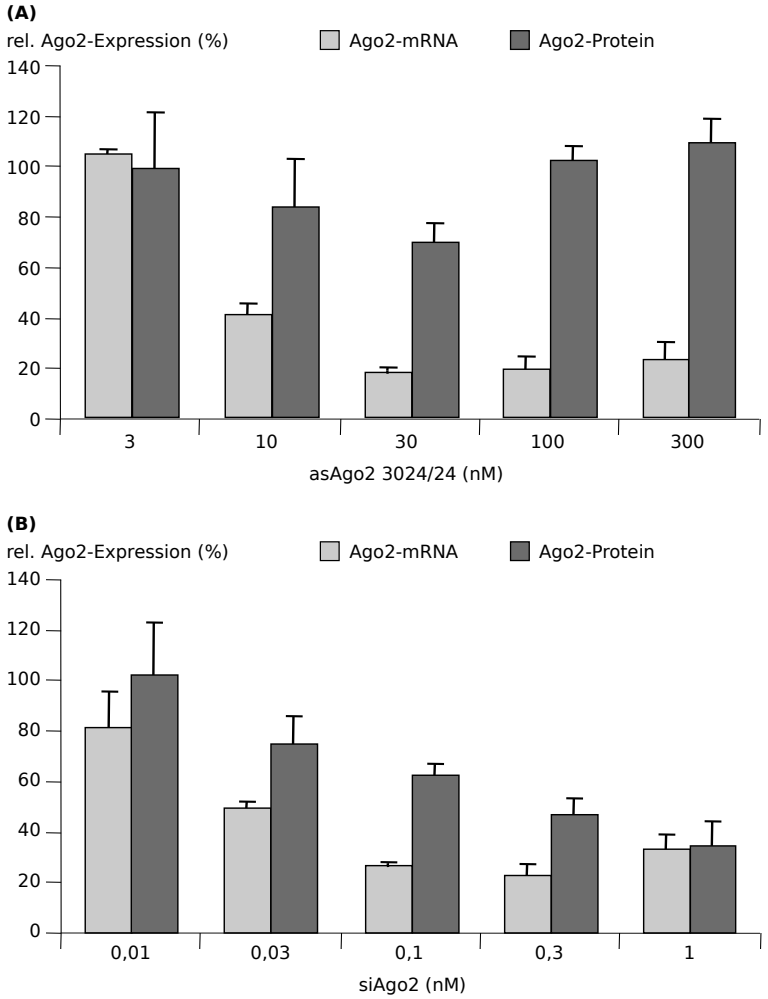


Abbildung 4.19: Der Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der asAgo2 3024/24- bzw. siAgo2-vermittelten Ago2-Inhibition weist auf eine Diskrepanz des inhibitorischen Effektes des asAgo2 3024/24 auf der Ago2-mRNA und der Ago2-Protein-Ebene hin. ECV-304 Zellen wurden LF2000-vermittelt mit den angegebenen Konzentrationen (A) asAgo2 3024/24 bzw. 3024/24mut oder (B) siAgo2 bzw. siscr3 transfiziert. Nach 24h erfolgte die Analyse der Ago2-Expression auf der Ago2-mRNA-Ebene mittels RT-qPCR und auf der Ago2-Protein-Ebene mittels Western-Analyse. Die Ago2-Expression in asAgo2 3024/24mut- bzw. siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Zeitabhängigkeit der asAgo2 3024/24-vermittelten Inhibition der Ago2-Expression

Da auch für weitere getestete Ago2-gerichtete asONs eine vergleichbare Diskrepanz zwischen dem inhibitorischem Effekt auf der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt), stellte sich die Frage, ob das Zeitfenster von der asON-Transfektion bis hin zum Nachweis der asON-vermittelten Reduktion des Ago2-Proteins zu klein gewählt wurde. Deshalb wurde die Zeitabhängigkeit der Wirksamkeit des asAgo2 3024/24 untersucht und mit derer der siAgo2 verglichen. Dafür wurden ECV-304 Zellen LF2000-vermittelt mit 100 nM asAgo2 3024/24, 3024/24mut, siAgo2 oder siscr3 transfiziert (Abschnitt 3.4.5). Nach 4 h wurde die Inkubationslösung gegen Vollmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 116 h kultiviert. Durch regelmäßi-

ges Splitten der Zellen wurde gewährleistet, dass die Konfluenz der Zellen nicht mehr als 90 % betrug. An den in Abbildung 4.20 angegebenen Zeitpunkten wurden die ECV-304 Zellen geernet und die Menge der Ago2-mRNA im Gesamt-RNA-Extrakt mittels RT-qPCR und des Ago2-Proteins im Gesamtzelllysat mittels Western-Analyse quantifiziert (Abschnitt 3.4.8). Diese Analyse zeigte, dass über den gesamten untersuchten Zeitraum nur eine asAgo2 3024/24-vermittelte Reduktion der Ago2-Protein-Menge um $\leq$ 30 % im Vergleich zur Ausgangexpression erfolgte, wohingegen die maximale Inhibition der Ago2-mRNA bereits 24 h nach Beginn der asAgo2 3024/24-Transfektion erreicht wurde und für weitere 24 h nachzuweisen war (Abbildung 4.20 (A)). Im Gegensatz dazu führte die Transfektion der siAgo2 zu einem vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf der Ago2-

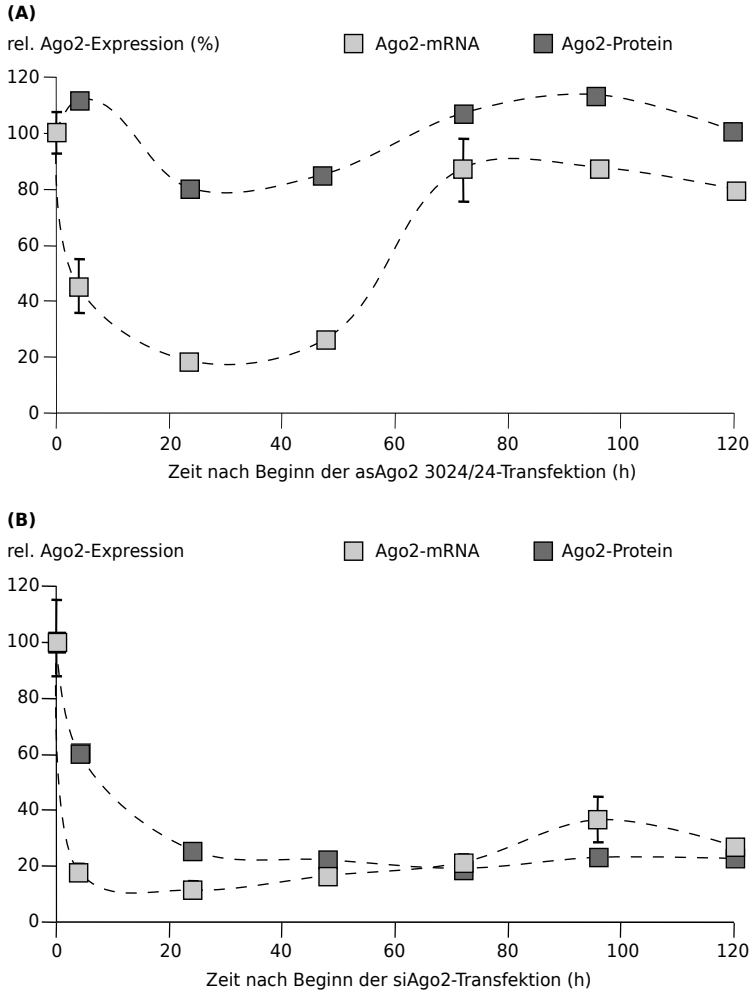


Abbildung 4.20: Der Vergleich der Zeitabhängigkeit der asAgo2 3024/24- bzw. siAgo2-vermittelten Ago2-Inhibition bestätigt die Diskrepanz des inhibitorischen Effektes des asAgo2 3024/24 auf der Ago2-mRNA und der Ago2-Protein-Ebene. ECV-304 Zellen wurden LF2000-vermittelt mit 100 nM (A) asAgo2 3024/24 bzw. 3024/24mut oder (B) siAgo2 bzw. siscr3 transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen in Vollmedium kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Es folgte die Analyse der Ago2-Expression auf der mRNA-Ebene mittels RT-qPCR und auf der Protein-Ebene mittels Western-Analyse. Die Ago2-Expression in asAgo2 3024/24mut- bzw. siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das auf der mRNA-Ebene in Doppel- und auf der Protein-Ebene in Einfachbestimmung durchgeführt wurde.

mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene (Abbildung 4.20 (B)). Diese Analyse schließt aus, dass der schwache inhibitorische Effekt des asAgo2 3024/24 auf der Ago2-Protein-Ebene durch eine sehr lange natürliche Halbwertszeit des Ago2-Proteins bedingt ist, zumal diese in der Literatur als $\leq$ 10 h beschrieben wird [226].

Intrazelluläre Verteilung der Ago2-mRNA

Da siRNAs die Spaltung ihrer Ziel-mRNA hauptsächlich im Zytosol induzieren, asONs dagegen eher im Zellkern, stellte sich die Frage, ob es im Zytosol der Zelle Ago2-mRNA-Speicher geben könnte, die für siRNA-Wirkstoffe jedoch nicht für asON-Wirkstoffe zugänglich sind. Für die Existenz derartiger mRNA-Speicher würde sprechen, dass eine Reduktion der Ago2-mRNA auf $\leq$ 15 % der natürlichen Ago2-mRNA-Menge weder asON- noch siRNA-vermittelt induziert werden konnte (Abbildung 4.19 und 4.20). Dies könnte dazu führen, dass trotz asON-vermittelter Spaltung der Ago2-mRNA die verbleibenden 15 % der natürlichen Ago2-mRNA-Menge im Zytosol vermehrt translatiert werden und somit die Ago2-Protein-Menge nahezu konstant halten. Dies würde eine strikte Regulation der Ago2-Protein-Menge implizieren, die in Anbetracht dessen, dass ein *knock out* von Ago2 in Säugetieren letal ist [41] jedoch sinnvoll erscheint. Weiterhin muss bei den in den Abbildungen 4.19 und 4.20 dargestellten Analysen berücksichtigt werden, dass die siAgo2 ihre Wirkung über die Ago2-vermittelte Spaltung der Ago2-mRNA vermittelt, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Reduktion des Ago2-Proteins aus seiner verstärkten Metabolisierung hervorgeht.

Um die beschriebenen Annahmen experimentell zu untersuchen, wurden ECV-304 Zellen mit 100 nM asAgo2 3024/24 bzw. asAgo2 3024/24mut oder mit 3 nM siAgo2 bzw. siscr3 LF2000-vermittelt transfiziert (Abschnitt 3.4.5). Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und in Zytosol- und Kern-Fraktion aufgetrennt (Abschnitt 3.4.10). Aus diesen Fraktionen wurde die Gesamt-RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion (Abschnitt 3.2.6) isoliert und anschließend mittels RT-qPCR (Abschnitt 3.2.8 und 3.2.9) bezüglich der Verteilung der Ago2-mRNA analysiert. Die erfolgreiche Abtrennung der Zytosol- und Kern-Fraktionen wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene mit Hilfe der in Abbildung 4.21 angegebenen Marker kontrolliert. Diese Analyse zeigte, dass die Ago2-mRNA zwar nahezu ausschließlich in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden kann, die Mengen der Ago2-mRNA im Zytosol von asAgo2 3024/24- sowie siAgo2-behandelten Zellen jedoch vergleichbar waren.

Somit kann die geringe Effektivität des asAgo2 3024/24 auf der Ago2-Protein-Ebene nicht durch etwaige Ago2-mRNA-Speicher im Zytosol erklärt werden. Diese Analyse zeigte auch, dass in asAgo2 3024/24mut-behandelten Zellen die ca. 2-fache Ago2-mRNA-Menge im Vergleich zu siscr3-behandelten Zellen detektiert wurde und gab damit einen ersten Hinweis darauf, dass der schwache inhibitorische Effekt des asAgo2 3024/24 durch unspezifische Nebeneffekte des PS-modifizierten asONs bedingt sein könnte.

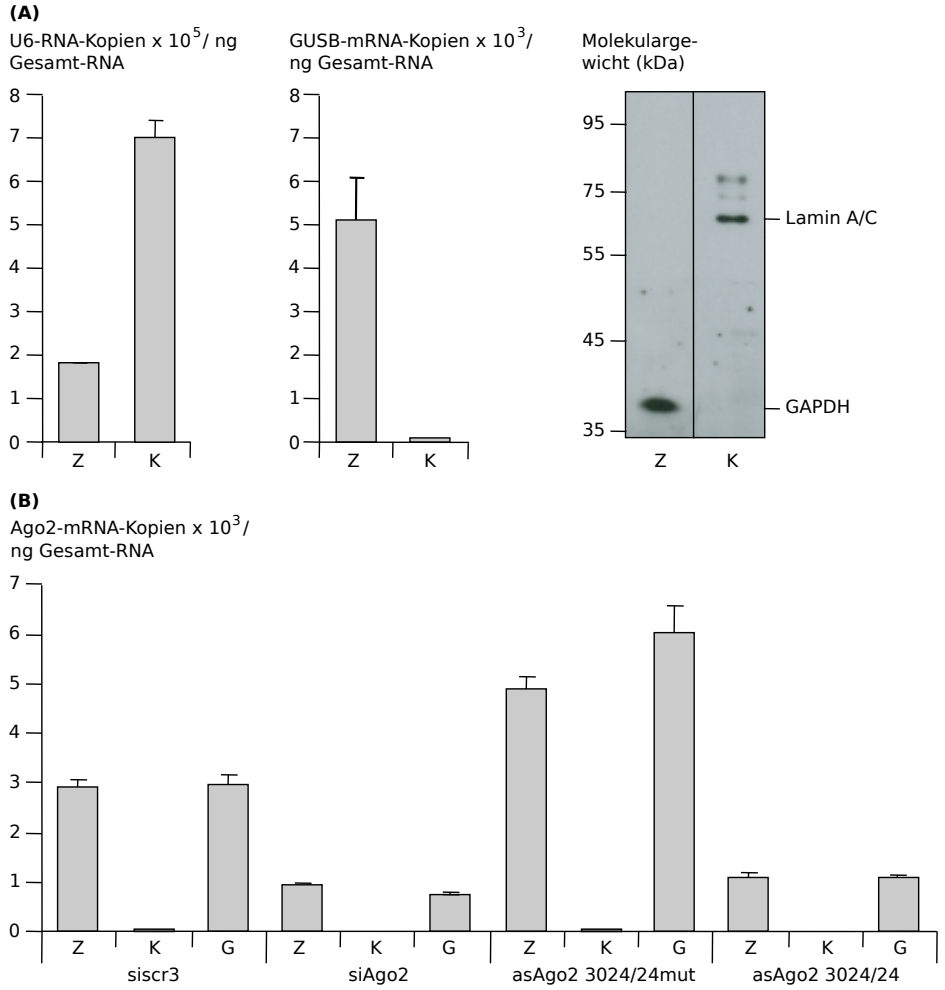


Abbildung 4.21: Der quantitative Nachweis der intrazellulären Verteilung der Ago2-mRNA mittels zellulärer Fraktionierung zeigt, dass der Hauptteil der Ago2-mRNA im Zytosol der Zelle lokalisiert ist. ECV-304-Zellen wurden LF2000-vermittelt mit 100 nM asAgo2 3024/24 bzw. 3024/24mut oder mit 3 nM siAgo2 bzw. siscr3 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und das Gesamtzelllysat (G) in Zytosol (Z)- und Kern (K)-Fraktion aufgetrennt. (A) Die erfolgreiche Trennung der Zytosol- und Kernfraktion wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR über den Nachweis der nukleären U6-RNA (links) und der zytosolischen β-Glukoronidase (GUSB)-mRNA (Mitte) geführt. Auf Protein-Ebene wurde mittels Western-Analyse das nukleäre Protein Lamin A/C bzw. das zytosolische Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen (rechts). (B) Die Verteilung der Ago2-mRNA wurde mit Hilfe von Ago2-spezifischen Primern und einer Standardreihe des Ago2-spezifischen Amplikons mittels RT-qPCR analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Steigerung der asAgo2 3024/24-Effektivität durch Einführen alternativer chemischer Modifikationen

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 erwähnt wurde, sind für PS-modifizierte asONs zahlreiche unspezifische Nebenwirkungen beschrieben, die aus der Interaktion dieser asONs mit der Zelloberfläche und verschiedenen Polyanionen-bindenden Proteinen resultieren. Um zu überprüfen, ob dadurch die schwache Hemmwirkung des asAgo2 3024/24 gegenüber dem Ago2-Protein zu erklären ist,

wurden in dessen Sequenz 2'-O-Methyl (OMe)- und *locked nucleic acid* (LNA)-Modifikationen eingeführt (Abbildung 1.3). Diese chemischen Modifikationen der 2. und 3. Generation können die unspezifischen Effekte von PS-modifizierten asONs reduzieren, führen jedoch auch dazu, dass die asONs nicht mehr als RNase H-Substrat erkannt werden. Dies wurde umgangen, indem die OMe- und LNA-Modifikationen nur in den flankierenden Bereichen (Position 1 – 5 und 20 – 24) der asAgo2 3024/24-Sequenz eingeführt. Weiterhin wurde ein asAgo2 3024/24 verwendet, dass ebenfalls an den Positionen 1 – 5 und 20 – 24 OMe-Modifikationen trägt, jedoch keine PS-modifizierten Internukleotidverknüpfungen aufweist. Diese als Gapmere bezeichneten asAgo2-gerichteten asONs wurden bezüglich ihres inhibitorischen Effektes auf der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene getestet, indem ECV-304 Zellen mit den verschieden chemisch-modifizierten Formen des asAgo2 3024/24 bzw. des 3024/24mut in einer Konzentration von 100 nM LF2000-vermittelt transfiziert wurden (Abschnitt 3.4.5). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und entweder ein Gesamt-RNA-Extrakt für den Nachweis der Ago2-mRNA mittels RT-qPCR oder ein Gesamtzelllysat für den Nachweis des Ago2-Proteins mittels Western-Analyse hergestellt (Abschnitt 3.4.8). Wie in Abbildung 4.22 dargestellt, ermöglichte nur das asAgo2 3024/24^{OMe}, das keine PS-Modifikationen aufweist, eine Reduktion des Ago2-Proteins um > 30 % im Vergleich zur Ausgangsexpression. Dabei zeigte das asAgo2 3024/24^{OMe} eine gute Korrelation des inhibitorischen Effektes auf der Ago2-mRNA und der Ago2-Protein-Ebene.

In einem analogen Experiment konnte nach LF-vermittelter Transfektion von 3 – 300 nM asAgo2 3024/24^{OMe} die Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effektes gezeigt werden, wobei auch hier bei einer Konzentration von 300 nM eine verminderte Wirksamkeit des asAgo2

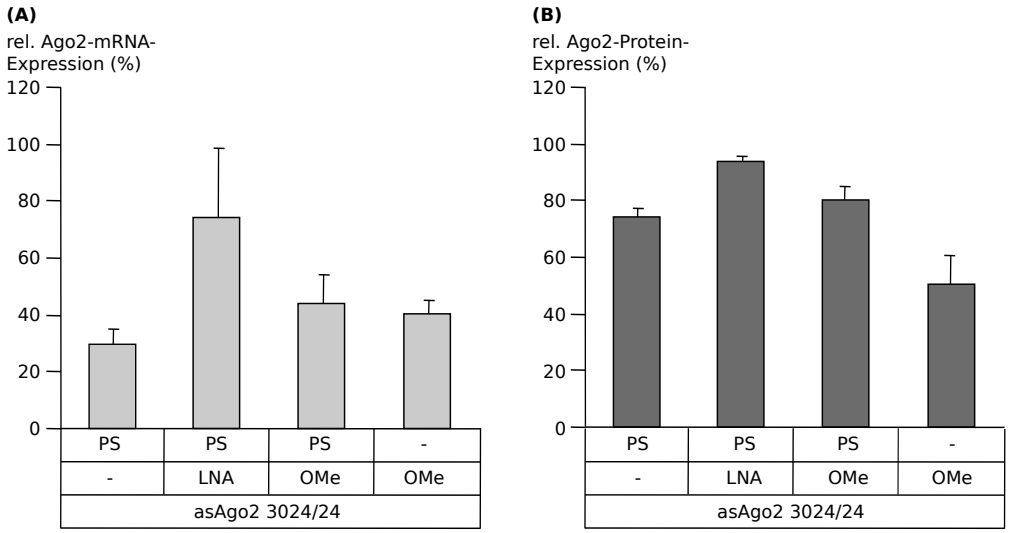


Abbildung 4.22: Das Vermeiden von PS-modifizierten Internukleotid-Verknüpfungen innerhalb der asAgo2 3024/24-Sequenz ermöglicht einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt des asONs auf der Ago2-mRNA und der Ago2-Protein-Ebene. ECV-304 Zellen wurden LF2000-vermittelt mit 100 nM asAgo2 3024/24 bzw. 3024/24mut (mit den angegebenen chemischen Modifikationen im Rückgrat (PS) bzw. am Ribose-Ring (OMe, LNA)) transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Analyse der Ago2-Expression (A) auf der mRNA-Ebene mittels RT-qPCR und (B) auf der Protein-Ebene mittels Western-Analyse. Die Ago2-Expression in asAgo2 3024/24mut-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das von Christina Engel in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

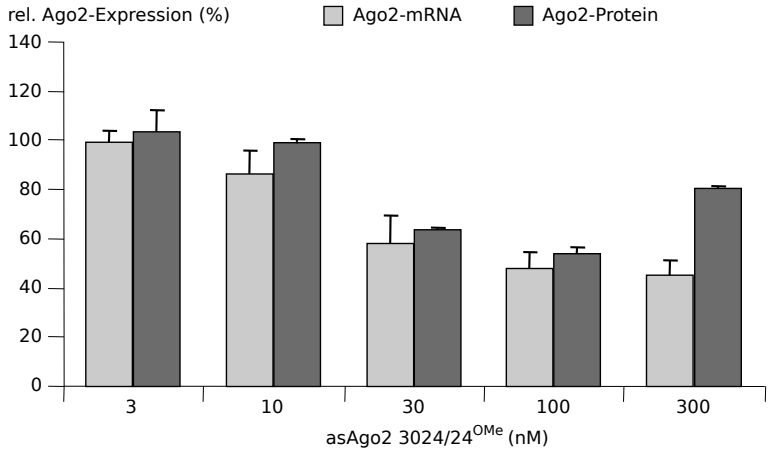


Abbildung 4.23: Die Analyse der Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effektes des $3024/24^{OMe}$ weist auf eine gute Korrelation der Reduktion der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Menge hin. ECV-304 Zellen wurden LF2000-vermittelt mit den angegebenen Konzentrationen asAgo2 $3024/24^{OMe}$ bzw. $3024/24mut^{OMe}$ transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Analyse der Ago2-Expression auf der Ago2-mRNA-Ebene mittels RT-qPCR und auf der Ago2-Protein-Ebene mittels Western-Analyse. Die Ago2-Expression in asAgo2 3024/24mut-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das von Christina Engel in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

$3024/24^{OMe}$ auf der Ago2-Protein-Ebene beobachtet wurde (Abbildung 4.23). In dem Konzentrationsbereich von 3 – 100 nM bestätigte sich jedoch die in Abbildung 4.22 bereits dargestellte gute Korrelation zwischen dem inhibitorischen Effekt auf der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene. Deshalb wurden die im Folgenden vorgestellten RNAi-Funktionsanalysen bei einer Konzentration von 100 nM durchgeführt, so dass die Spezifität der asAgo2 $3024/24^{OMe}$-vermittelten Ago2-Inhibition gewährleistet wurde.

4.2.2 Einfluss der Ago2-Inhibition auf die siRNA- und miRNA-vermittelte RNA-Interferenz

Nachdem die Effektivität des asAgo2 3024/24 auf der Ago2-Protein-Ebene durch Einführen von OMe-Modifikationen und Vermeiden von PS-Modifikationen gesteigert werden konnte, wurde nun quantifiziert, inwieweit die Inhibition der Ago2-Expression die Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi beeinflusst. Für die Analyse der siRNA-vermittelten RNAi wurde die bereits vorgestellte Lamin A/C-gerichtete siLAM (Abbildung 2.1) verwendet. Für die Analyse der miRNA-vermittelten RNAi wurde ein artifizielles System verwendet, um unspezifische Einflüsse bedingt durch die natürliche Regulation der endogen exprimierten miRNAs zu vermeiden. Das verwendete miRNA-System setzt sich aus der *Renilla* Luciferase-gerichteten miRNA mlet7A, dem *Renilla* Luciferase-kodierenden Plasmid RL-hmga2_m7 und dem Firefly Lucifease-kodierendem Plasmid pGL3-Control zusammen. Die plasmidkodierte mRNA der *Renilla* Luciferase trägt die mutierte 3'-UTR des *high mobility group AT-hock 2* (hmga2)-Gens, die 7 Zielsequenzen für die mlet7A aufweist [201, 202]. Der Nachweis der mlet7A-Wirksamkeit basiert in diesem System auf der Quantifizierung der *Renilla* Luciferase-Aktivität, die auf die Aktivität der Firefly Lucifease normiert wird um Unterschiede in der Transfektionseffizienz auszugleichen. Sowohl im siLAM- als auch im mlet7A-

System wurde die siscr3 als Kontroll-RNA verwendet. Die Konzentration der siLAM bzw. der mlet7A wurden so gewählt, dass sie im linearen und damit sensitivsten Bereich der sigmoiden Dosis-Wirkungskurve dieser beiden Nukleinsäure-Wirkstoffe lagen (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss der Ago2-Expressionsinhibition auf die RNAi-Effizienz zu untersuchen, wurden ECV-304 Zellen mit 100 nM asAgo2 3024/24^{OMe} bzw. 3024/24mut^{OMe} LF2000-vermittelt transfiziert (Abschnitt 3.4.5). Nach 24 h erfolgte ebenfalls LF2000-vermittelt die Transfektion des siRNA-Systems (50 pM siLAM) bzw. des miRNA-Systems (50 nM mlet7A, 100 ng RL-hmga2_m7, 25 ng pGL3-Control). Weitere 24 h später wurden die Zellen geerntet und die siLAM-Wirksamkeit im Gesamt-RNA-Extrakt mittels RT-qPCR bzw. die mlet7A-Wirksamkeit im Gesamtzelllysat mit Hilfe des Luciferase-Aktivitätstests nachgewiesen (Abschnitt 3.4.8). Wie in Abbildung 4.24 dargestellt, war die asAgo2 3024/24^{OMe}-vermittelte Reduktion der Ago2-Protein-Menge um ca. 50 % im Vergleich zur Ausgangexpression (Abbildung 4.22) mit der nahezu vollständigen Aufhebung der siLAM-Wirksamkeit verbunden. Im Gegensatz dazu wurde die mlet7A-Wirksamkeit nur marginal beeinflusst. Dies impliziert, dass bereits geringe Änderungen der zellulären Ago2-Protein-Menge erheblichen Einfluss auf die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen zeigen, wohingegen die Funktion von Ago2 in der miRNA-vermittelten RNAi entweder durch andere RNAi-assoziierte Proteine kompensiert werden kann oder durch die Reduktion der Ago2-Protein-Menge um $\leq$ 50 % nicht beeinflusst wird. Die Bedeutung der Quantität des Ago2-Proteins ist konsistent mit der Beobachtung, dass bereits die durch das PS-modifizierte asAgo2 3024/24-vermittelte Reduktion des Ago2-Proteins um $\leq$ 30 % die siLAM-Wirksamkeit 2-fach reduzierte (Daten nicht gezeigt).

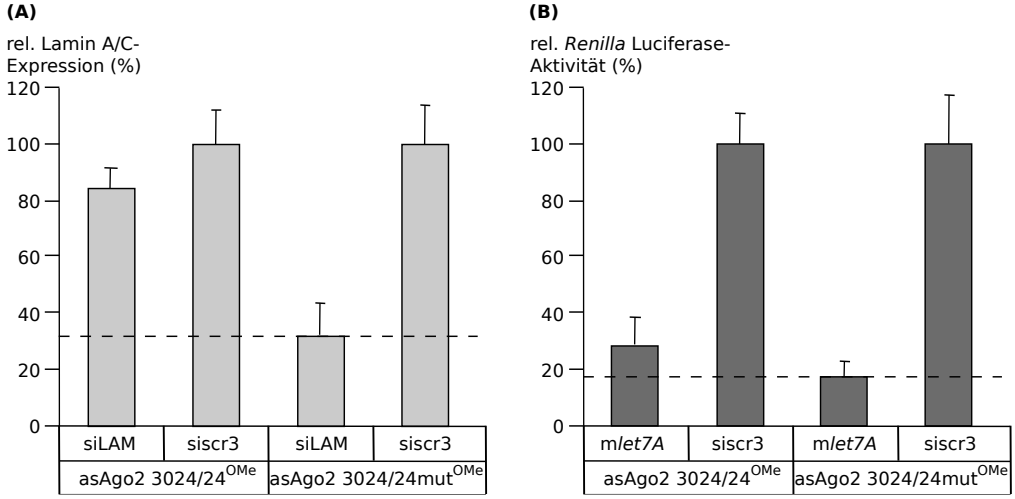


Abbildung 4.24: Die asAgo2 3024/24^{OMe}-vermittelte Ago2-Inhibition führt zum nahezu vollständigen Verlust der siRNA-vermittelten RNAi und beeinflusst die Effizienz der miRNA-vermittelte RNAi nur geringfügig. ECV-304 Zellen wurden LF2000-vermittelt mit 100 nM asAgo2 3024/24^{OMe} bzw. 3024/24mut^{OMe} und 24 h später mit (A) 50 pM siLAM bzw. siscr3 oder (B) 50 nM mlet7A bzw. siscr3, 100 ng RL-hmga2_m7 und 25 ng pGL3-Control transfiziert. Weitere 24 h später wurde die Inhibition der Lamin A/C-Expression mittels RT-qPCR und die Inhibition der *Renilla* Luciferase-Aktivität mittels Luciferase-Aktivitätstest bestimmt. Die Lamin A/C-Expression bzw. die *Renilla* Luciferase-Aktivität in siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die vollständige siLAM- bzw. mlet7A-Wirksamkeit in Abwesenheit der asAgo2 3024/24^{OMe}-vermittelten Ago2-Inhibition ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das von Christina Engel in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

4.2.3 Fazit – zweiter Teil

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden asON-Werkzeuge entworfen und getestet, anhand derer die Bedeutung der Quantität des Ago2-Proteins für die siRNA- und die miRNA-vermittelte RNAi bestimmt werden konnte. Die Charakterisierung des potenten asAgo2 3024/24 zeigte, dass dieses asON das Ago2-Protein selektiv und spezifisch inhibiert. Allerdings ist das Ausmaß der Inhibition von den eingeführten chemischen Modifikationen abhängig. Der Vergleich verschieden chemisch-modifizierter asAgo2 3024/24 zeigte, dass durch Vermeiden der PS-Chemie der inhibitorische Effekt auf das Ago2-Protein gesteigert werden konnte. Die Analyse der Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi im Anschluss an die asAgo2 3024/24^{OMe}-vermittelte Ago2-Inhibition zeigte, dass die Quantität des Ago2-Proteins die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen nachhaltig, die Effizienz von miRNA-Wirkstoffen dagegen nur marginal beeinflusst. Dies um so erstaunlicher, weil nach bisherigem Erkenntnisstand angenommen wird, dass Ago2 sowohl siRNA als auch miRNA bindet und der aktivierte RISC in beiden Systemen Ago2 enthält (Abbildung 1.4). Eine Studie von Mescalchin *et al.*, in der auch das asAgo2 3024/24 verwendet wurde, zeigte parallel zu den in diesem Teil der Arbeit vorgestellten Analysen, dass die miRNA-vermittelte RNAi vor allem von der Quantität des Ago1-Proteins abhängig ist [202]. Zusammenfassend konnte geschlussfolgert werden, dass asONs geeignete Werkzeuge darstellen um die Bedeutung ausgewählter RNAi-assoziierter Proteine für die Effektivität von siRNA- und miRNA-Wirkstoffen quantitativ zu untersuchen.

4.3 Funktionelle Zugänglichkeit von Ago2 unter zellulären Stressbedingungen

In Abschnitt 4.1 wurde die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen neben den intrinsischen Eigenschaften einer siRNA vor allem mit deren Bioverfügbarkeit korreliert. Um als Inhibitor der Expression eines Ziel-Gens wirken zu können, nutzen siRNA-Wirkstoffe die RNAi-Maschinerie, dessen Schlüsselprotein Ago2 ist. In Abschnitt 4.2 wurde gezeigt, dass bereits leichte Änderungen der zellulären Ago2-Protein-Menge die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen bedeutend einschränken. Dies impliziert, dass die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen nicht nur von ihrer eigenen Bioverfügbarkeit abhängig ist, sondern auch von dem Anteil der intrazellulären Ago2-Moleküle, die sich an dem Wirkort der RNAi befinden und somit dem RISC zur Ausführung der RNAi zur Verfügung stehen.

Der Wirkort der RNAi innerhalb des Zytosols der Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert und an der Ago2-Lokalisation gemessen (Abschnitt 1.4.2). Die intrazelluläre Lokalisation des Ago2-Proteins sowie dessen Stabilität werden, wie bereits in Abschnitt 1.4 erläutert, durch verschiedene post-translationelle Modifikationen reguliert. Diese können z.B. durch zelluläre Stressbedingungen stimuliert werden. Bisher ist nicht bekannt, inwieweit die Reorganisation der intrazellulären Verteilung des Ago2-Proteins als Antwort auf zelluläre Stressbedingungen mit der Effizienz der RNAi korreliert ist. Dies sollte im dritten Teil dieser Arbeit untersucht werden. Dabei stand die stressbedingte Akkumulation von Ago2 in so genannten Stressgranulen (SGs) im Fokus.

4.3.1 Einfluss von Zellstress auf die Lokalisation und Funktion von Ago2

Gegenwärtig wird die intrazelluläre Lokalisation von Ago2 als hauptsächlich zytosolisch mit einem geringen Anteil an nukleärem Ago2 beschrieben [191–194]. Innerhalb des Zytosols assoziiert Ago2 mit zwei transienten Strukturen, den SGs und den so genannten *processing bodies* (PBs) (Abschnitt 1.4.2). Für die PBs wurde bereits beschrieben, dass deren Ausbildung eine Konsequenz der miRNA-vermittelten RNAi ist und sie als Speicherort für Ziel-mRNAs dienen, deren Translation miRNA-vermittelt inhibiert wurde (Abschnitt 1.1.2). Die Bedeutung der SG-Lokalisation von Ago2 ist dagegen noch weitgehend unerforscht. Aktuelle Studien zeigen, dass die Akkumulation von Ago2 in SGs durch die Induktion von oxidativem und translationellem Stress stimuliert werden kann [195, 196, 200]. Da viele Arten der zellulären Einschleusung von siRNA-Wirkstoffen mit einer Form von Zellstress verbunden sind, stellte sich die Frage, ob durch die SG-Akkumulation von Ago2 dessen Metabolismus sowie dessen Funktion als Schlüsselprotein der RNAi beeinflusst werden.

Intrazelluläre Lokalisation von Ago2

Eine etablierte Methode um die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins von Interesse zu untersuchen, ist die rekombinante Expression eines Fusionskonstruktes aus dem zu untersuchenden Protein und einem fluoreszierenden Protein, wie z.B. dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Da die Überexpression von PB- und/oder SG-assoziierten Proteinen jedoch zur spontanen Ausbildung von PBs und SGs auch in Abwesenheit eines Stimulus, wie z.B. Zellstress führen kann [198], wurde in dieser Arbeit die Lokalisation des endogenen Ago2-Proteins mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Der unspezifische Effekt der spontanen Ausbildung von PBs und SGs könnte erklären, warum die Ago2-Lokalisation in einigen Studien als

nahezu ausschließlich PB- oder SG-assoziiert beschrieben wurde [186, 195, 227], wohingegen andere Studien eine sehr diffuse zytosolische Lokalisation dieses Proteins zeigten [192, 194].

Die Induktion von Zellstress erfolgte durch 3 verschiedene Behandlungen von ECV-304 Zellen (Abschnitt 3.4.3). Zum einen wurden die Zellen für 16 h einer erhöhten Inkubationstemperatur von 42°C ausgesetzt. Zum anderen wurden die Zellen für 90 min mit 250 μM Natriumarsenit in Vollmedium inkubiert. Sowohl die transiente Temperaturerhöhung als auch die Behandlung mit Natriumarsenit sind etablierte Verfahren zur Stimulation der SG-Akkumulation von Ago2 [195, 196, 200]. Als drittes wurde die LF2000-vermittelte PS-ON-Transfektion (End-Konzentration = 100 nM) von ECV-304 Zellen in die Analyse einbezogen, da Voruntersuchungen zeigten, dass die PS-Chemie die Inhibierbarkeit des Ago2-Proteins beeinflusst (Abbildung 4.22) und unspezifische Nebeneffekte von Phosphorothioaten bereits beschrieben wurden. Als PS-ON wurde das asAgo2 3024/24 mut ausgewählt, das in vorangegangen Analysen als Kontroll-ON diente und vollständig PS-modifiziert ist. Im Anschluss an die Induktion der Zellstressbedingungen wurden die ECV-304 Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung von Ago2 und dem SG-Marker-Protein TIA1 unterzogen und deren intrazelluläre Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abschnitt 3.4.11).

Wie in Abbildung 4.25 dargestellt, ist das endogene Ago2 in unbehandelten ECV-304 Zellen diffus über das Zytosol verteilt. Eine klare Umverteilung des Ago2-Proteins wurde im Anschluss an die Induktion von oxidativem Stress bedingt durch die Natriumarsenit-Behandlung der Zellen beobachtet und drückte sich in der Akkumulation von Ago2 in TIA1-positiven SGs aus. Eine vergleichbare Umverteilung des Ago2-Proteins wurde in Zellen beobachtet, die vor der Immunfluoreszenzfärbung bei 42°C inkubiert wurden. Interessanterweise wurde durch die LF2000-vermittelte Transfektion des asAgo2 3024/24mut eine vergleichbare, obgleich weniger stark ausgeprägte Akkumulation des Ago2-Proteins in SGs induziert wie durch die etablierten Zellstress-Induktoren Hitzeschock und Natriumarsenit. Weiterhin wurde auch für die LF2000-vermittelte Transfektion des potenten asAgo2 3024/24 eine vergleichbare Umverteilung des Ago2-Proteins beobachtet (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte die LF2000-vermittelte Transfektion des asAgo2 3024/24mut^{OMe}, das keine PS-modifizierten Internukleotid-Verknüpfungen und an den Positionen 1 – 5 und 20 – 24 OMe-Modifikationen aufweist, zu keiner nachweisbaren Akkumulation des Ago2-Proteins in SGs.

Da die Assoziation von Ago2 mit PBs bekannt ist, wurde im Folgenden untersucht, ob die Induktion von Zellstress durch die oben aufgeführten Behandlungen ebenfalls zur Akkumulation von Ago2 in PBs führt. Dafür wurden ECV-304 Zellen im Anschluss an die Induktion von Zellstress einer Immunfluoreszenzfärbung von Ago2 und dem PB-Marker-Protein Dcp1A unterzogen (Abschnitt 3.4.11). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass Ago2 in unbehandelten Zellen vereinzelt mit Dcp1A-positiven PBs kolokalisiert. Es wurde jedoch keine Akkumulation von Ago2 in PBs im Anschluss an die Induktion von Zellstress durch Natriumarsenit, Hitzeschock oder die LF2000-vermittelte Transfektion eines PS-ON beobachtet (Abbildung 4.26).

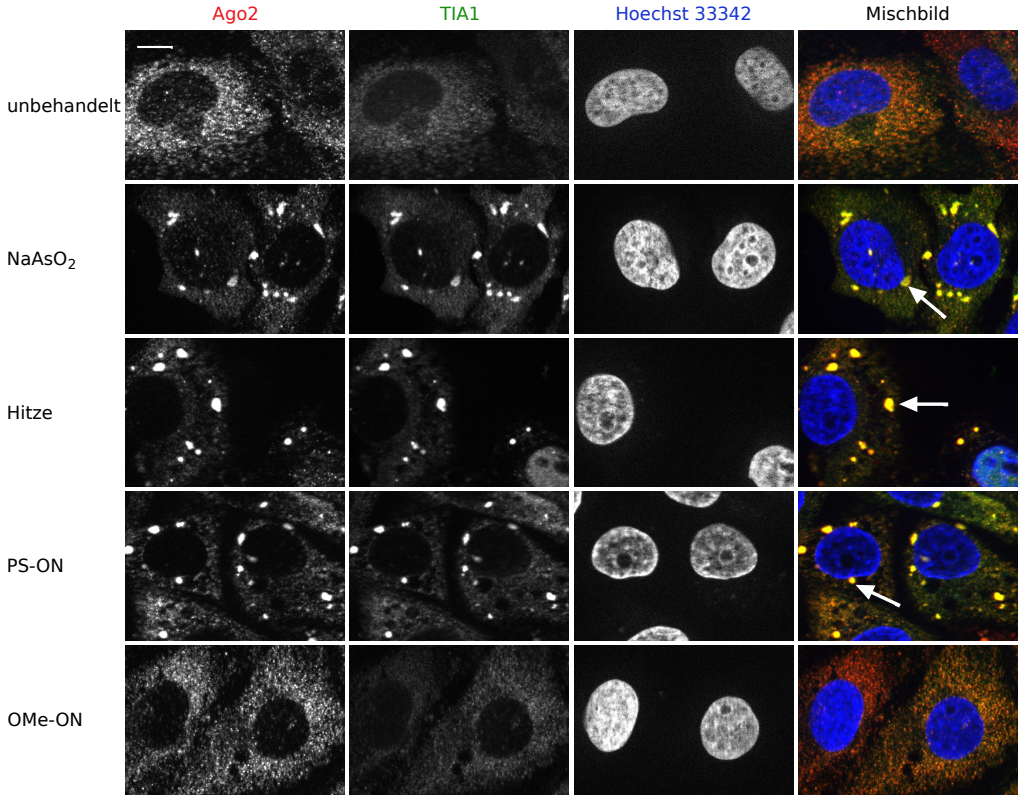


Abbildung 4.25: Verschiedene Arten von Zellstress induzieren die Akkumulation von Ago2 in Stressgranulen (SGs). Wie am linken Seitenrand der Abbildung dargestellt, wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder verschiedenen zum Teil stressinduzierenden Behandlungen unterzogen. Dies beinhaltete: (i) die Behandlung mit 250 μM Natriumarsenit ($NaAsO_2$) für 90 min, (ii) die Inkubation bei 42°C (Hitze) für 16 h oder (iii) die LF2000-vermittelte Transfektion mit dem Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotid (PS-ON) asAgo2 3024/24mut bzw. (iv) dem 2'O-Methyl-modifizierten Oligonukleotid (OMe-ON) asAgo2 3024/24mut^{OMe}. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Ago2 (rot)- und TIA1 (grün, SG-Marker)-spezifischen Antikörpern unterzogen. Weiterhin wurden in allen Ansätzen die Zellkerne (blau) mittels Hoechst 33342-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am inversen, semikonfokalen Mikroskop *Axiovert 200M*. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt von $\geq$ 30 analysierten Zellen. Die weißen Pfeile weisen exemplarisch auf SGs hin. Der weiße Balken oben links $\widehat{=}$ 10 μM.

Um die generelle Bedeutung der Stress-induzierten Umverteilung des Ago2-Proteins zu untersuchen, wurde die Lokalisation von Ago2 unter den genannten zellulären Stressbedingungen in primären Huvec-Zellen untersucht und eine vergleichbare, wenn auch weniger stark ausgeprägte Akkumulation von Ago2 in SGs beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies impliziert, dass die SG-Akkumulation von Ago2 nicht auf die Tumorzelllinie ECV-304 beschränkt ist, sondern auf einen generellen Mechanismus der Stressantwort hinweisen könnte.

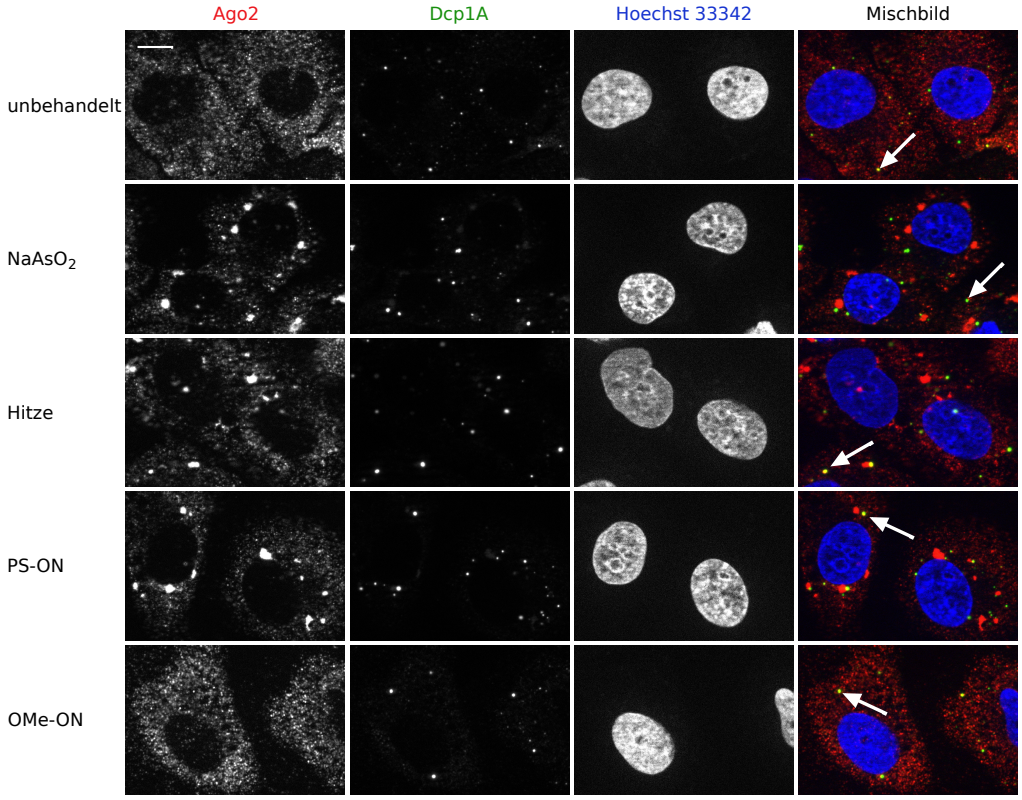


Abbildung 4.26: Die Induktion verschiedener Arten von Zellstress hat keinen Einfluss auf die Assoziation von Ago2 mit *processing bodies* (PBs). Wie am linken Seitenrand der Abbildung dargestellt, wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder verschiedenen zum Teil stressinduzierenden Behandlungen unterzogen. Dies beinhaltete: (i) die Behandlung mit 250 μM Natriumarsenit ($NaAsO_2$) für 90 min, (ii) die Inkubation bei 42°C (Hitze) für 16 h oder (iii) die LF2000-vermittelte Transfektion mit dem Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotid (PS-ON) asAgo2 3024/24mut bzw. (iv) dem 2'O-Methyl-modifizierten Oligonukleotid (OMe-ON) asAgo2 3024/24mut^{OMe}. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Ago2 (rot)- und Dcp1A (grün, PB-Marker)-spezifischen Antikörpern unterzogen. Weiterhin wurden in allen Ansätzen die Zellkerne (blau) mittels Hoechst 33342-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am inversen, semikonfokalen Mikroskop *Axiovert 200M*. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt von $\geq$ 30 analysierten Zellen. Die weißen Pfeile weisen exemplarisch auf PBs hin. Der weiße Balken oben links $\widehat{=}$ 10 μM.

Intrazelluläre Komplexbildung von Ago2

Die Zellfraktionierung mit Hilfe der Dichte-Gradientenzentrifugation stellt einen unabhängigen experimentellen Ansatz dar um die intrazelluläre Umverteilung des Ago2-Proteins zu untersuchen und gleichzeitig bietet dieses Verfahren die Möglichkeit, einzelne Subpopulationen des Ago2-Proteins nachzuweisen. Dafür wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 90 min mit 250 μM Natriumarsenit in Vollmedium inkubiert (Abschnitt 3.4.3). Im Anschluss wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 3.4.10 beschrieben, mechanisch lysiert und durch Zentrifugation von Zellkernen und nichtlysierten Zellen abgetrennt. Die postnukleären Lysate wurden durch eine 18-stündige Ultrazentrifugation in einem kontinuierlichen 10 – 25 % (w/v) Iodixanol-Dichte-Gradienten aufgetrennt. Die Gradienten wurden in 250 – 300 μl Fraktionen entlassen und die Anwesenheit von Ago2 in diesen Fraktionen durch Western-Analyse überprüft. Wie in Ab-

bildung 4.27 (A) dargestellt, wurden in unbehandelten ECV-304 Zellen 3 distinkte Ago2-positive Komplexe (Komplex I –III) detektiert. Diese Beobachtung stimmt mit bereits publizierten Analysen der Ago2-Komplexbildung überein [193, 228]. Im Gegensatz dazu wurde in Natriumarsenit-behandelten Zellen nur 1 Ago2-positiver Komplex detektiert, wohingegen Komplex I und III nicht nachgewiesen werden konnten. Aus der Abbildung 4.27 (B) wird ersichtlich, dass der Komplex II in Natriumarsenit-behandelten Zellen zu etwas kleineren Sedimentationsdichten verschoben ist. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen unabhängigen Komplex handelt, der deshalb als Komplex II* bezeichnet wurde. Aus dieser Analyse konnte geschlussfolgert werden, dass durch die Induktion von zellulären Stressbedingungen neben der intrazellulären Ago2-Lokalisation auch dessen Komplexbildung beeinflusst wird.

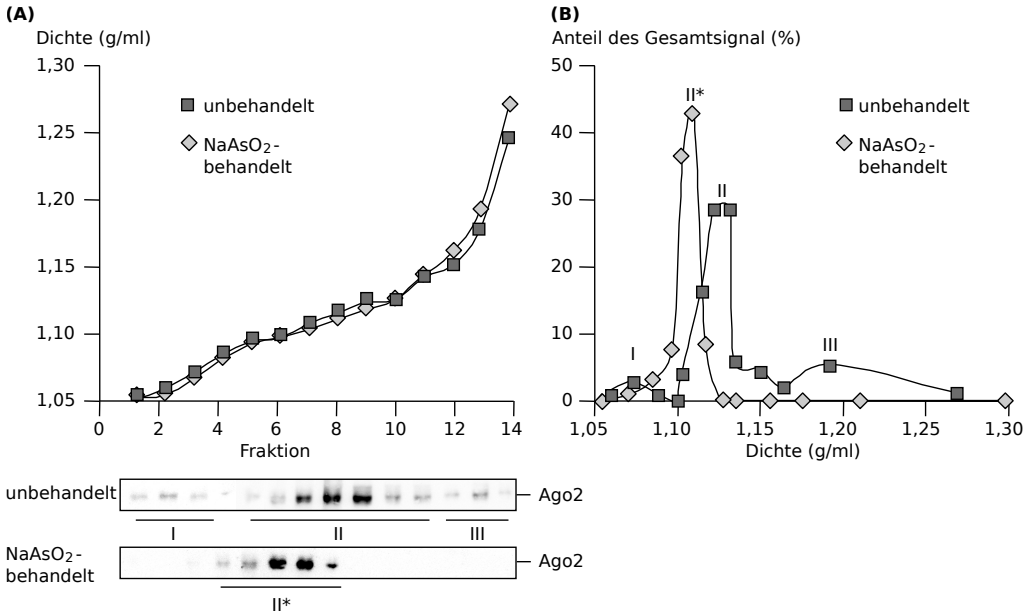


Abbildung 4.27: Die Zellfraktionierung mittels Dichte-Gradientzentrifugation bestätigt die Natriumarsenit ($NaAsO_2$)-vermittelte Umversteilung des Ago2-Proteins und weist auf eine veränderte Komplexbildung des Proteins hin. ECV-304 Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder für 90 min mit 250 μM $NaAsO_2$ in Vollmedium behandelt. (A) Die postnukleären Lysate wurden in einem 10 – 25 % (w/v) Iodixanol-Dichte-Gradienten, dessen Linearität mittels Refraktometrie kontrolliert wurde, aufgetrennt und die Gradientenfraktionen mittels Western-Analyse unter Verwendung eines Ago2-spezifischen Antikörpers analysiert. Die Quantifizierung der Ago2-spezifischen Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe des Programms *Image Quant 5.2*. Diese sind in (B) als prozentualer Anteil des Gesamtsignals über die Sedimentationsdichten der Gradientenfraktionen aufgetragen. In unbehandelten ECV-304 Zellen wurden 3 Ago2-positive Komplexe detektiert, die mit I – III gekennzeichnet sind. In $NaAsO_2$-behandelten Zellen wurde nur ein Ago2-positiver Komplex detektiert, der mit II* kennzeichnet ist. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Einfachbestimmung durchgeführt wurde.

Metabolische Stabilität von Ago2

Mit Hilfe von Ago2-gerichteten asON-Werkzeugen wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Inhibition des Ago2-Proteins von den chemischen Modifikationen des asON abhängig ist und durch das Vermeiden von PS-Modifikationen gesteigert werden kann (Abbildung 4.22). Die fluorezenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Ago2-Verteilung in Abbildung 4.25 zeigte, dass die LF2000-vermittelte Transfektion eines PS-modifizierten asON die Akkumulation von Ago2 in SGs nach sich zieht. Im Gegensatz dazu beeinflusste die LF2000-vermittelte Transfektion der selben asON-Sequenz ohne PS-modifizierte Internukleotidverknüpfungen und mit OMe-Ribose-Modifikationen die Lokalisation von Ago2 nicht. Dies führte zu der Annahme, dass die Zellstress-induzierte Akkumulation von Ago2 in SGs entweder die metabolische Stabilität des Proteins beeinflusst oder das Protein durch räumliche Abgrenzung vor dessen katabolischen Abbau schützt.

Basierend auf Pulsmarkierungs-Experimenten in HEK293-Zellen zeigten Weinmann *et al.*, dass die Halbwertszeit eines rekombinaten Ago2-Fusionsproteins bei ≤ 10 h liegt [226]. In dieser Arbeit wurde die Stabilität des Ago2-Proteins durch Einführen eines translationellen Blocks mit Hilfe von Cycloheximid bestimmt (Abschnitt 3.4.3). Diese Analysen wurden in ECV-GL3 Zellen durchgeführt, die konstitutiv die Firefly Luciferase exprimieren. Damit bieten diese Zellen die Möglichkeit, die Wirksamkeit des translationellen Blocks anhand der Abnahme der Firefly Luciferase-Aktivität zu kontrollieren. Die ECV-GL3 Zellen wurden über einen Zeitraum von 0 – 48 h mit 20 μg/ml Cycloheximid in Vollmedium inkubiert. Zu den in Abbildung 4.28 angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und das Gesamtzelllysat im Bezug auf die Firefly Lucifease-Aktivität mittels Luciferaseaktivitätstests (Abschnitt 3.3.5) sowie im Bezug auf die Ago2-Protein-Menge mittels Western-Analyse (Abschnitt 3.3.3) untersucht. Diese Analyse zeigte, dass über den gesamten beobachteten Zeitraum keine Abnahme der Ago2-Protein-Menge nachgewiesen werden konnte, wohingegen die Abnahme der Firefly Luciferase-Aktivität mit der publizierten Halbwertszeit des Proteins von ca. 3 h [229] korrelierte. Da Cycloheximid bekannt ist translationellen Stress auszulösen, wurde aus diesen Analysen abgeleitet, dass es eine Verknüpfung von Zellstressbedingungen, dem Ago2-Metabolismus und/oder der intrazellulären Ago2-Verteilung geben könnte.

Um zu untersuchen, ob Ago2 unter Zellstressbedingungen metabolisch stabilisiert oder in SGs vor dem katabolischen Abbau geschützt wird, wurde die siRNA-vermittelte Inhibierbarkeit des Ago2-Proteins unter verschiedenen Zellstressbedingungen getestet. ECV-304 Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder verschiedenen stressinduzierenden Behandlungen ausgesetzt (Abschnitt 3.4.3). Dies beinhaltete: (i) die LF2000-vermittelte Transfektion der Zellen mit dem PS-ON asAgo2 3024/24mut in einer Konzentration von 100 nM, (ii) die Behandlung der Zellen mit 20 μg/ml Cycloheximid in Vollmedium für 24 h bzw. (iii) mit 250 μM Natriumarsenit in Vollmedium für 90 min oder (iv) die Inkubation der Zellen bei 42°C für 16 h. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 nM Ago2-gerichteter siAgo2 bzw. siscr3 LF2000-vermittelt transfiziert (Abschnitt 3.4.5). Weitere 24 h später wurde die zelluläre Menge der Ago2-mRNA sowie des Ago2-Proteins mittels RT-qPCR bzw. Western-Analyse quantifiziert (Abschnitt 3.4.8). Diese Analyse zeigte, dass durch die Induktion von Zellstress die Wirksamkeit der siAgo2 auf der Ago2-mRNA-Ebene nicht beeinflusst wird. Jedoch wurde der inhibitorische Effekt der siAgo2 auf der Ago2-Protein-Ebene in allen Fällen der Stressinduktion um einen Faktor ≥ 4 reduziert (Abbildung 4.29).

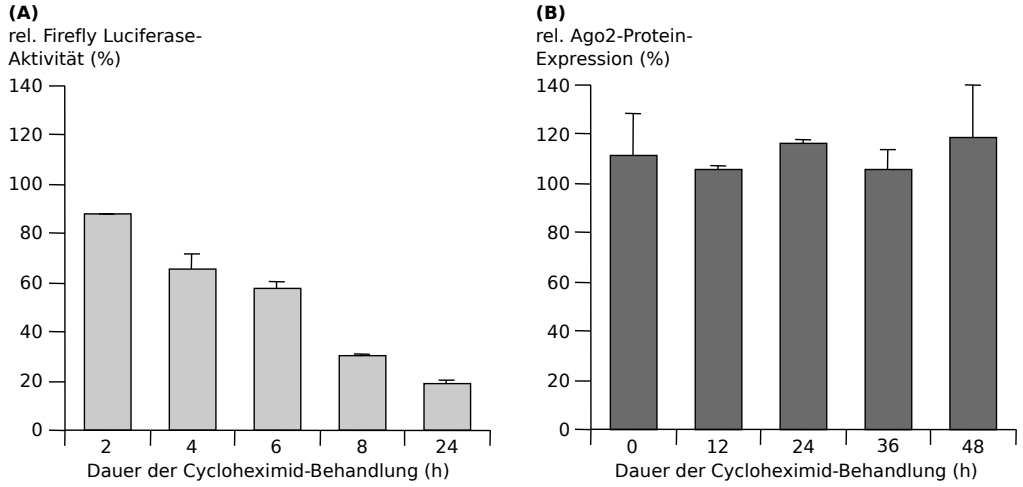


Abbildung 4.28: Die Induktion von translationellem Stress geht mit der metabolischen Stabilisierung von Ago2 einher. ECV-GL3 Zellen wurden bis zu 48 h mit 20 μg/ml Cycloheximid in Vollmedium inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Es folgte (A) die Analyse der Firefly Luciferase-Aktivität mittels Luciferaseaktivitätstest bzw. (B) die Quantifizierung der Ago2-Protein-Menge mittels Western-Analyse. Die Luciferase-Aktivität sowie die Ago2-Protein-Menge wurden auf die in die Analyse eingesetzte Zellzahl normiert und in unbehandelten Zellen auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

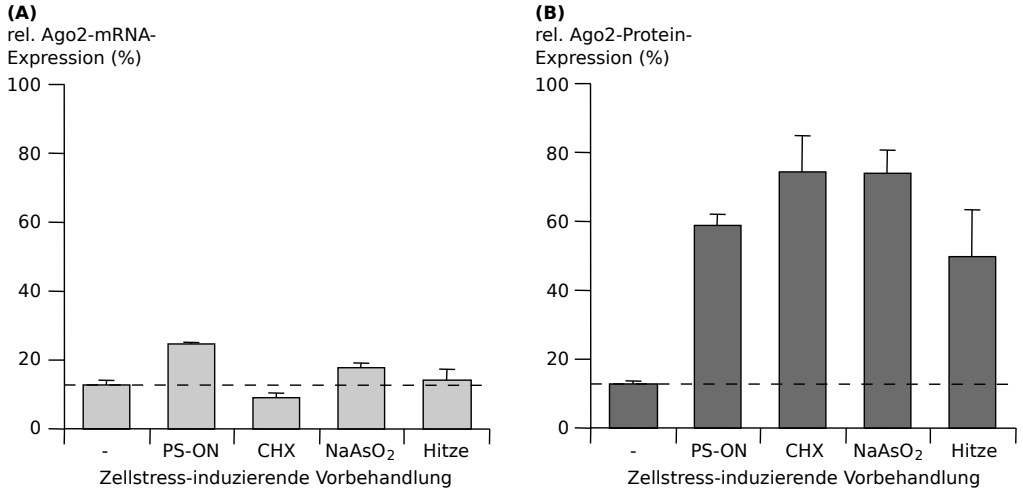


Abbildung 4.29: Die Akkumulation von Ago2 in SGs geht mit dessen Resistenz gegenüber der siRNA-vermittelten Inhibition einher. ECV-304 Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder verschiedenen Behandlungen unterzogen, für die gezeigt wurde, dass sie die SG-Akkumulation von Ago2 induzieren. Dies beinhaltete: (i) die LF2000-vermittelte Transfektion mit dem Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotid (PS-ON) asAgo2 3024/24mut, (ii) die Behandlung mit 20 μg/ml Cycloheximid (CHX) für 24 h bzw. (iii) mit 250 μM Natriumarsenit ($NaAsO_2$) für 90 min oder (iv) die Inkubation bei 42°C (Hitze) für 16 h. Im Anschluss wurden die Zellen LF2000-vermittelt mit 100 nM siAgo2 bzw. siscr3 transfiziert. Weitere 24 h später erfolgte die Analyse der Ago2-Expression (A) auf der mRNA-Ebene mittels RT-qPCR und (B) auf der Protein-Ebene mittels Western-Analyse. Die Ago2-Expression in siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Der Effekt der Ago2-Stabilisierung wird umso deutlicher, wenn man den Quotienten aus der Expression des Ago2-Proteins und der Ago2-mRNA bildet. Dieser Wert zeigt für die Cycloheximid-Behandlung der Zellen eine ca. 8-fache Stabilisierung des Ago2-Proteins an. Für die Natriumarsenit- bzw. Hitze-Behandlung der Zellen liegt dieser Quotient bei einem Wert von ca. 4 und für die LF2000-vermittelte PS-ON-Transfektion bei 2,5. Dies erinnert an die Diskrepanz der inhibitorischen Wirksamkeit des PS-modifizierten asAgo2 3024/24 auf der Ebene der Ago2-mRNA und des Ago2-Proteins (Abbildung 4.19 und 4.20). Zusammengenommen implizieren diese Analysen, dass die Induktion von Zellstress mit einer Stabilisierung des Ago2-Proteins einhergeht.

4.3.2 Einfluss von Zellstress auf die Effizienz der RNA-Interferenz

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass durch verschiedene Formen von Zellstress die Akkumulation von Ago2 in SGs stimuliert wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Umverteilung des Ago2-Proteins die Ausbildung von Ago2-positiven Komplexen beeinflusst und die Stabilität des Proteins erhöht. Es stellte sich nun die Frage, ob die Verlängerung der Ago2-Halbwertszeit bzw. die daraus resultierende Erhöhung der zellulären Ago2-Protein-Menge die Effektivität der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi beeinflusst. Dies ist von besonderem Interesse, weil anhand dieser Analysen eine Korrelation zwischen der Ago2-Lokalisation und der Ago2-Funktion als Schlüsselprotein der RNAi abgeleitet werden könnte. Im Bezug auf die SGs stellte sich die Frage, ob diese transienten Strukturen einen funktionellen Wirkort der RNAi darstellen. Als Modellsystem für die siRNA-vermittelte RNAi wurde, wie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, die siLAM-vermittelte Inhibition der Lamin A/C-Expression verwendet. Als Modellsystem für die miRNA-vermittelte RNAi diente die ebenfalls bereits beschriebene mlet7A-vermittelte Inhibition der *Renilla* Luciferase-Aktivität.

Intrazelluläre Lokalisation von siRNA- und miRNA-Wirkstoffen

Zunächst wurde untersucht, ob durch die Induktion von Zellstress die intrazelluläre Lokalisation von siRNA- bzw. miRNA-Wirkstoffen nach deren LF2000-vermittelter Transfektion beeinflusst wird. Dabei war es von Interesse, ob die siRNA- bzw. miRNA-Wirkstoffe ebenfalls in SGs akkumulieren und somit eine Kolokalisation der Wirkstoffe mit dem immunfluoreszenzgefärbten Ago2-Protein in SGs beobachtet werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder folgenden stressinduzierenden Behandlungen ausgesetzt (Abschnitt 3.4.3): (i) der Behandlung der Zellen mit 250 μM Natriumarsenit in Vollmedium für 90 min, (ii) der Inkubation der Zellen bei 42°C für 16 h, (iii) der LF2000-vermittelten Transfektion der Zellen mit dem PS-ON asAgo2 3024/24mut in einer Konzentration von 100 nM oder (iv) dem Einführen eines translationellen Blocks durch Behandeln der Zellen mit 20 μg/ml Cycloheximid in Vollmedium für 24 h. Im Anschluss wurden die Zellen mit 50 nM Alexa488-markierter siLAM bzw. mlet7A LF2000-vermittelt transfiziert (Abschnitt 3.4.5). Direkt nach Beendigung der Transfektion wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung des endogenen Ago2-Proteins unterzogen und die intrazelluläre Verteilung der Flourophor-gekoppelten siLAM bzw. mlet7A in Bezug auf die Ago2-Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abschnitt 3.4.11). Diese Untersuchung zeigte, die für die LF2000-vermittelte Transfektion typische vesikuläre Lokalisation der siRNA- bzw. miRNA-Wirkstoffe im Zytosol der Zelle. Dies ist durch die endozytotische Einschleusung

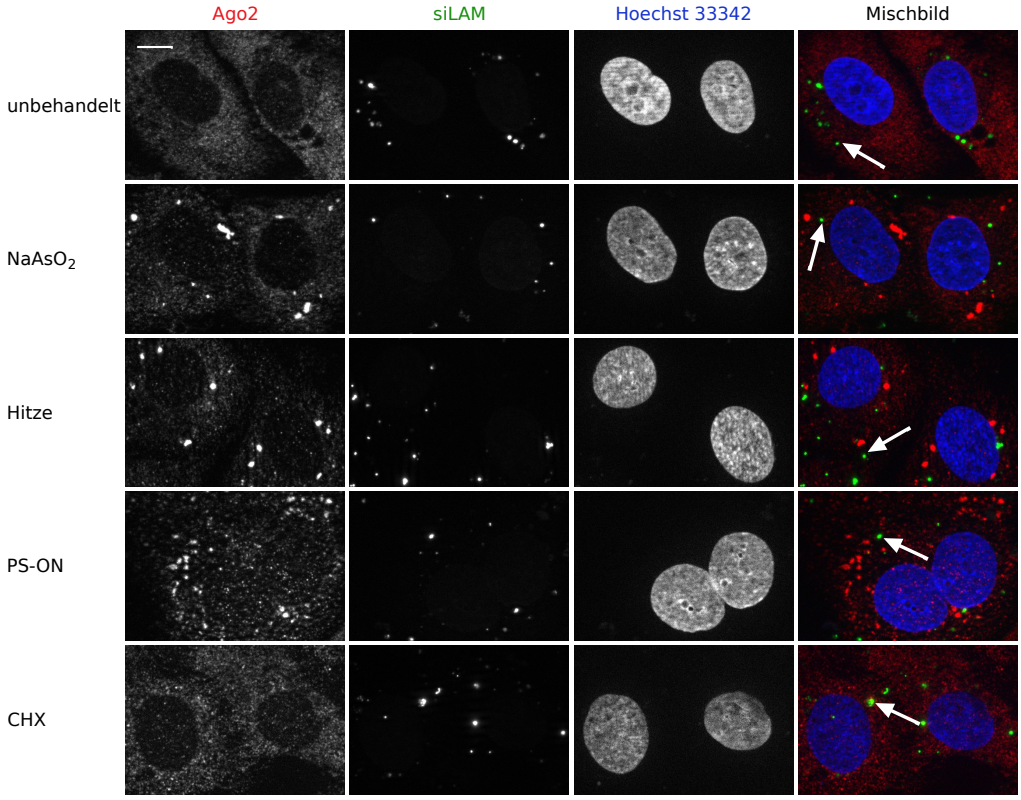


Abbildung 4.30: Die Induktion verschiedener Arten von Zellstress hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre siLAM-Lokalisation nach deren LF2000-vermittelter Transfektion. Wie am linken Seitenrand der Abbildung dargestellt, wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder verschiedenen zum Teil stressinduzierenden Behandlungen unterzogen. Dies beinhaltete: (i) die Behandlung mit 250 μM Natriumarsenit ($NaAsO_2$) für 90 min, (ii) die Inkubation bei 42°C (Hitze) für 16 h, (iii) die LF2000-vermittelte Transfektion mit dem Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotid (PS-ON) asAgo2 3024/24mut oder (iv) die Behandlung mit 20 μg/ml Cycloheximid (CHX) in Vollmedium für 24 h. Im Anschluss wurden die Zellen mit 50 nM siLAM-Alexa488 (grün) LF2000-vermittelt transfiziert. Nach Ablauf der Transfektionszeit von 4 h wurde das endogene Ago2-Protein (rot) unter Verwendung eines Ago2-spezifischen Antikörpers immunfluoreszenzgefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am inversen, semikonfokalen Mikroskop *Axiovert 200M*. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt von $\geq$ 30 analysierten Zellen. Die weißen Pfeile weisen exemplarisch auf die vesikuläre Loksalisation der siLAM hin. Der weiße Balken oben links $\widehat{=}$ 10 μM.

der Komplexe, bestehend aus dem kationischen Transfektionsreagenz und den negativ-geladenen Nukleinsäure-Wirkstoffen, sowie durch deren intrazellulären Transport in endosomalen Versikeln bedingt [135]. Nach Induktion von Zellstress durch die genannten Vorbehandlungen der ECV-304 Zellen wurde zwar wiederum die Akkumulation von Ago2 in den für SGs typischen asymmetrischen Strukturen im Zytosol beobachtet, jedoch wurde weder für die siLAM noch für die mlet7A eine Kolokalisation mit Ago2 in diesen Strukturen detektiert (Abbildung 4.30 und 4.31).

Mit diesen Analysen konnte ausgeschlossen werden, dass durch die Induktion von Zellstress eine Akkumulation der Nukleinsäure-Wirkstoffe in den SGs erfolgt und Ago2 deshalb in die SGs rekrutiert werden könnte. Weiterhin führten diese Analysen zu der Vermutung, dass bedingt durch die SG-Akkumulation von Ago2 dessen Interaktion mit den Nukleinsäure-Wirkstoffen und somit die Aktivierung des RISCs durch dessen Beladung mit dem *antisense* Strang der siLAM bzw.

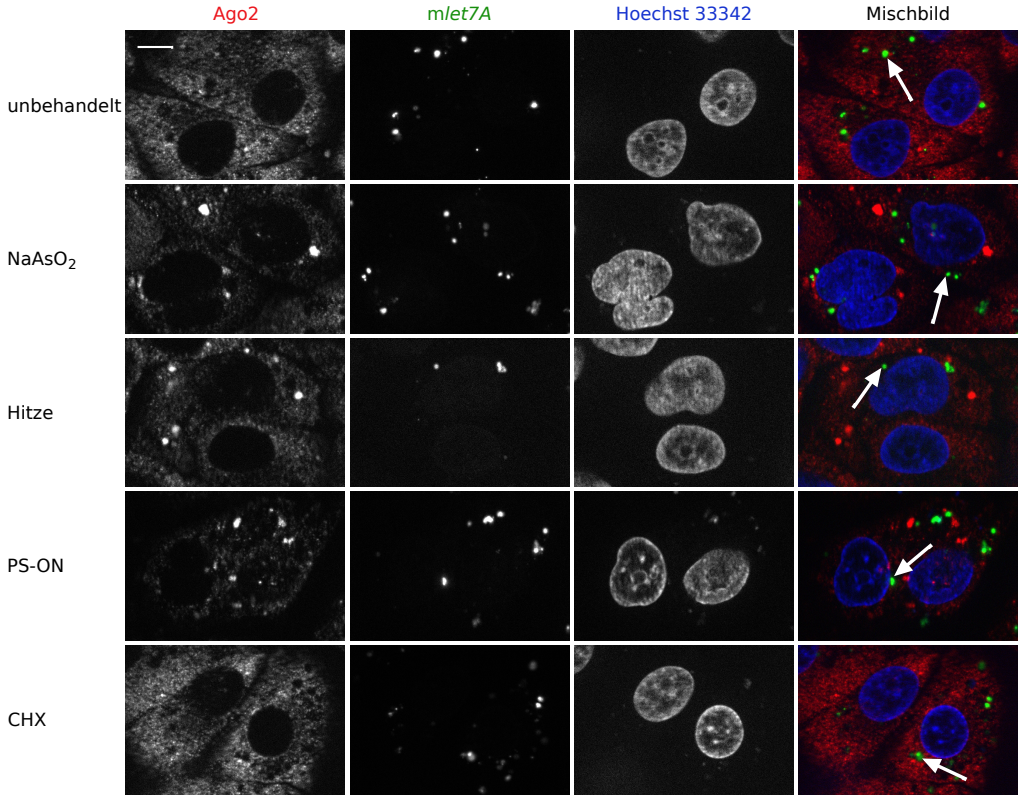


Abbildung 4.31: Die Induktion verschiedener Arten von Zellstress hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre mlet7A-Lokalisation nach deren LF2000-vermittelter Transfektion. Wie am linken Seitenrand der Abbildung dargestellt, wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder verschiedenen zum Teil stressinduzierenden Behandlungen unterzogen. Dies beinhaltete: (i) die Behandlung mit 250 μM Natriumarsenit ($NaAsO_2$) für 90 min, (ii) die Inkubation bei 42°C (Hitze) für 16 h, (iii) die LF2000-vermittelte Transfektion mit dem Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotid (PS-ON) asAgo2 3024/24mut oder (iv) die Behandlung mit 20 μg/ml Cycloheximid (CHX) in Vollmedium für 24 h. Im Anschluss wurden die Zellen mit 50 nM mlet7A-Alexa488 (grün) LF2000-vermittelt transfiziert. Nach Ablauf der Transfektionszeit von 4 h wurde das endogene Ago2-Protein (rot) unter Verwendung eines Ago2-spezifischen Antikörpers immunfluoreszenzgefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am inversen, semikonfokalen Mikroskop *Axiovert 200M*. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt von $\geq$ 30 analysierten Zellen. Die weißen Pfeile weisen exemplarisch auf die vesikuläre Loksalisation der mlet7A hin. Der weiße Balken oben links $\widehat{=}$ 10 μM.

der mlet7A unterbunden werden könnte. Da mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie jedoch nicht zwischen funktionell-aktiven und funktionell-inaktiven Ago2-Proteinen bzw. siRNA- und miRNA-Wirkstoffen unterschieden werden kann, wurde im Folgenden mit Hilfe von Funktionsanalysen deren RNAi-Aktivität unter den genannten Zellstressbedingungen untersucht.

Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelte RNAi

Um den Einfluss der Zellstress bedingten intrazellulären Umverteilung des Ago2-Proteins (Abbildung 4.25) sowie des Verlustes distinkter Ago2-positiver Komplexe (Abbildung 4.27) auf die RNAi-Effizienz zu untersuchen, wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder folgenden stressinduzierenden Behandlungen ausgesetzt (Abschnitt 3.4.3): (i) der LF2000-vermittelte Transfektion der Zellen mit dem PS-ON asAgo2 3024/24mut in einer Konzentration von 100 nM,

(ii) der Behandlung der Zellen mit 20 μg/ml Cycloheximid in Vollmedium für 24 h bzw. (iii) mit 250 μM Natriumarsenit in Vollmedium für 90 min oder (iv) der Inkubation der Zellen bei 42°C für 16 h. Im Anschluss erfolgte die LF2000-vermittelte Transfektion des siRNA-Systems (50 pM siLAM) oder des miRNA-Systems (50 nM mlet7A, 100 ng RL-hmga2_m7, 25 ng pGL3-Control). Die Konzentration der siLAM bzw. der mlet7A wurde, wie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben so gewählt, dass sie im linearen und damit sensitivsten Bereich der sigmoiden Dosis-Wirkungskurve dieser beiden Nukleinsäure-Wirkstoffe lag (Daten nicht gezeigt). Damit wurde gewährleistet, dass bereits geringe Veränderungen der funktionellen Zugänglichkeit des Ago2-Proteins in einen entsprechenden Phänotyp bezüglich der RNAi-Aktivität übersetzt werden können. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die siLAM-Wirksamkeit im Gesamt-RNA-Extrakt mittels RT-qPCR bzw. die mlet7A-Wirksamkeit im Gesamtzelllysat mit Hilfe des Luciferase-Aktivitätstests nachgewiesen (Abschnitt 3.4.8). Diese Analyse zeigte, dass die Arten von Zellstress, für die beobachtet wurde, dass sie eine SG-Akkumulation von Ago2 induzieren (Abbildung 4.25), ebenfalls eine verringerte siLAM-vermittelte Inhibition der Lamin A/C-Expression aufwiesen. Wohingegen im Fall der Cycloheximid-Behandlung kein Einfluss auf die Wirksamkeit der siLAM beobachtet wurde (Abbildung 4.32 (A)). Ein ähnliches Bild ergab die Analyse der mlet7A-Wirksamkeit, wobei hier in allen Fällen der Stressinduktion eine Verringerung der mlet7A-vermittelten Inhibition der *Renilla* Luciferase-Aktivität beobachtet wurde (Abbildung 4.32 (B)).

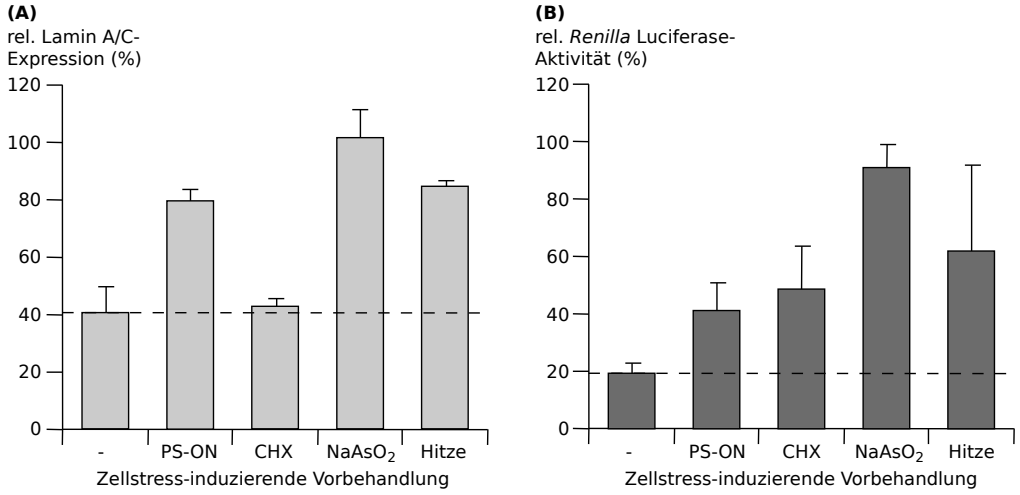


Abbildung 4.32: Die Induktion verschiedener Arten von Zellstress reduziert die Effektivität der siRNA- und miRNA-vermittelte RNAi. ECV-304 Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder verschiedenen Zellstress-induzierenden Behandlungen unterzogen. Dies beinhaltete: (i) die LF2000-vermittelte Transfektion mit dem Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotid (PS-ON) asAgo2 3024/24mut, (ii) die Behandlung mit 20 μg/ml Cycloheximid (CHX) für 24 h bzw. (iii) mit 250 μM Natriumarsenit ($NaAsO_2$) für 90 min oder (iv) die Inkubation bei 42°C (Hitze) für 16 h. Im Anschluss wurden die Zellen LF2000-vermittelt mit (A) 50 pM siLAM bzw. siscr3 oder (B) 50 nM mlet7A bzw. siscr3, 100 ng RL-hmga2_m7 und 25 ng pGL3-Control transfiziert. Weitere 24 h später wurde die Inhibition der Lamin A/C-Expression mittels RT-qPCR und die Inhibition der *Renilla* Luciferase-Aktivität mittels Luciferase-Aktivitätstest bestimmt. Die Lamin A/C-Expression bzw. die *Renilla* Luciferase-Aktivität in siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die vollständige siLAM- bzw. mlet7A-Wirksamkeit in Abwesenheit von Zellstress ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Diese Analysen bestätigten die Annahme, dass durch die SG-Akkumulation von Ago2 deren funktionelle Zugänglichkeit und damit auch die siLAM- bzw. mlet7A-vermittelte RNAi-Aktivität beeinflusst werden. Die Interpretation der Daten im Bezug auf die Induktion von translationellem Stress durch die Cycloheximid-Behandlung der Zellen ist dagegen schwierig, da gezeigt wurde, dass Cycloheximid das Auflösen von PBs und SGs induziert [198]. Gegenwärtig wird jedoch eine Verknüpfung der PBs und der miRNA-vermittelten RNAi angenommen (Abschnitt 1.1.2 und 1.4.2), so dass dies eine mögliche Erklärung für die verminderte mlet7A-Wirksamkeit im Anschluss an die Cycloheximid-Behandlung der Zellen sein könnte.

Reversibilität der Zellstress-bedingten Reduktion der RNAi-Effizienz

Nachdem sich die Annahme bestätigt hatte, dass die SG-Akkumulation von Ago2 mit einer verminderten Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi korreliert ist, stellte sich nun die Frage, ob dieser Effekt reversibel ist. Um dies zu untersuchen, wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder folgenden stressinduzierenden Behandlungen ausgesetzt (Abschnitt 3.4.3): (i) der LF2000-vermittelte Transfektion der Zellen mit dem PS-ON asAgo2 3024/24mut in einer Konzentration von 100 nM, (ii) der Behandlung der Zellen mit 20 μg/ml Cycloheximid in Vollmedium für 24 h bzw. (iii) mit 250 μM Natriumarsenit in Vollmedium für 90 min oder (iv) der Inkubation der Zellen bei 42°C für 16 h. Direkt im Anschluss sowie nach 24 h und 48 h erfolgte die LF2000-vermittelte Transfektion des siRNA-Systems (50 pM siLAM) oder des miRNA-Systems (50 nM mlet7A, 100 ng RL-hmga2_m7, 25 ng pGL3-Control). Dabei wurde durch Splitten der Zellen gewährleistet, dass die Konfluenz der Zellen zu Beginn der Transfektionen nicht mehr als 90 % betrug. Die Wirksamkeit der siLAM bzw. mlet7A wurde 24 h nach Beginn der jeweiligen Transfektion quantifiziert (Abschnitt 3.4.8).

Im Anschluss an die PS-ON-vermittelte Zellstress-Induktion wurde bereits für die nach 24 h durchgeführte siLAM- bzw. mlet7A-Transfektion eine vergleichbare Wirksamkeit wie in unbehandelten ECV-304 Zellen beobachtet (Abbildung 4.33 (A)). Im Fall der Induktion von translationellem Stress mit Hilfe von Cycloheximid wurde ebenfalls eine Reversibilität der reduzierten mlet7A-Wirksamkeit beobachtet, wohingegen für die siLAM, die zunächst unbeeinflusst erschien, im Anschluss an die Transfektion nach 24 h und 48 h eine leicht verringerte Wirksamkeit gegenüber unbehandelten Zellen detektiert wurde (Abbildung 4.33 (B)). Die Reduktion der siLAM- und mlet7A-Wirksamkeit durch die Induktion von oxidativem Stress mittels Natriumarsenit-Behandlung war ebenfalls reversibel, wobei der zunächst schwächere Effekt auf die Effektivität der siLAM-vermittelte RNAi über den beobachteten Zeitraum nur sehr langsam abnahm (Abbildung 4.33 (C)). Für die Hitzeschock-bedingte Induktion von Zellstress konnte für die nach 48 h durchgeführte Transfektion eine vergleichbare siLAM-Wirksamkeit wie in unbehandelten Zellen beobachtet werden, wohingegen die mlet7A-Wirksamkeit zwar ebenfalls über den beobachteten Zeitraum wieder zunahm aber nach 48 h immer noch 2-fach reduziert war (Abbildung 4.33 (D)). Diese Beobachtungen sind kompatibel mit der Hypothese, dass Ago2 einer dynamischen intrazellulären Umverteilung unterliegt zwischen Bereichen der Zelle, die im Bezug auf die RNAi funktionell aktiv sind und Bereichen der Zelle, in denen es für die Ausführung der RNAi nicht funktionell zugänglich ist. Weiterhin implizieren diese Beobachtungen, dass es sich bei den SGs um im Bezug auf die RNAi funktionell inaktive Bereiche der Zelle handelt.

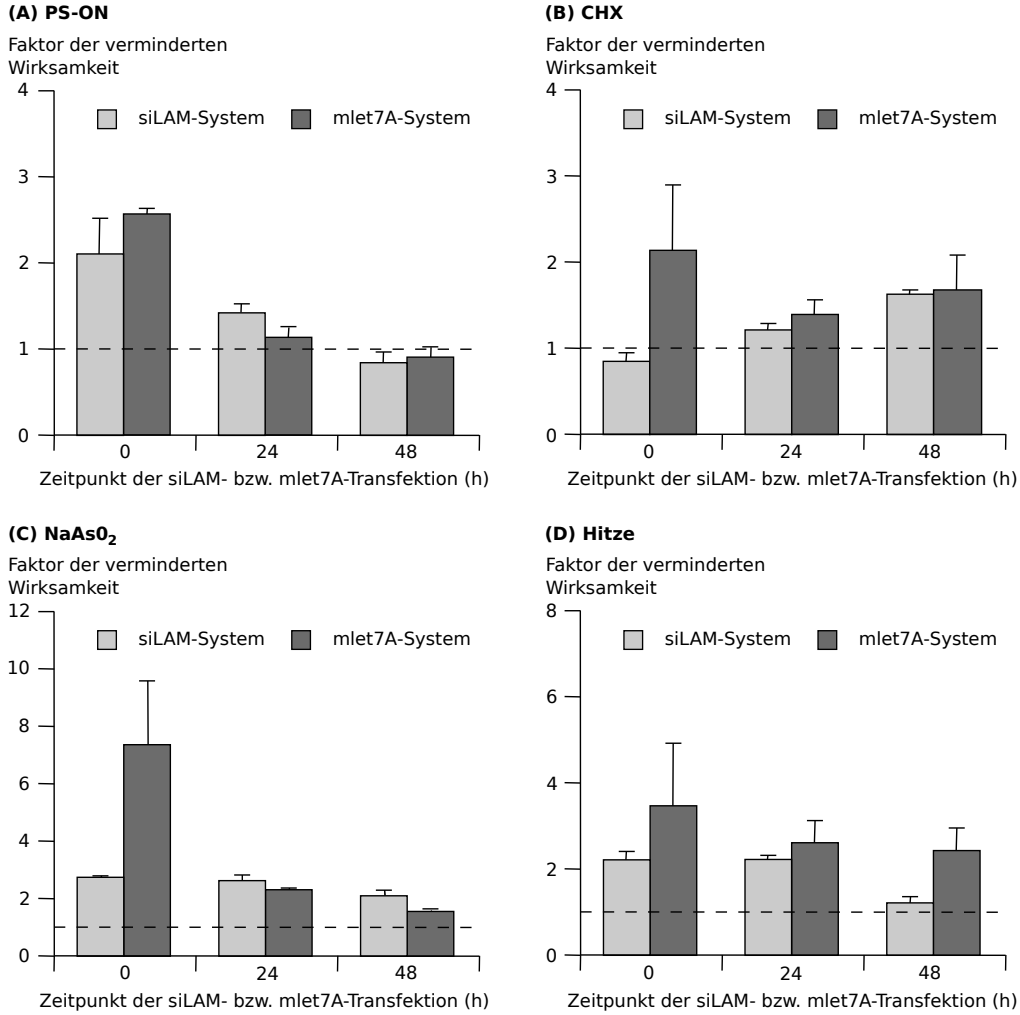


Abbildung 4.33: Die Zellstress-bedingte Reduktion der Effektivität der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi ist reversibel. ECV-304 Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder verschiedenen Zellstress-induzierenden Behandlungen unterzogen. Dies beinhaltete: (A) die LF2000-vermittelte Transfektion mit dem Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotid (PS-ON) asAgo2 3024/24mut, (B) die Behandlung mit 20 μg/ml Cycloheximid (CHX) für 24 h bzw. (C) mit 250 μM Natriumarsenit ($NaAsO_2$) für 90 min oder (D) die Inkubation bei 42°C (Hitze) für 16 h. Entweder direkt im Anschluss oder nach 24 h bzw. 48 h wurden die Zellen LF2000-vermittelt mit 50 pM siLAM bzw. siscr3 oder 50 nM mlet7A bzw. siscr3, 100 ng RL-hmga2_m7 und 25 ng pGL3-Control transfiziert. Jeweils 24 h später wurde die Inhibition der Lamin A/C-Expression mittels RT-qPCR und die Inhibition der *Renilla* Luciferase-Aktivität mittels Luciferase-Aktivitätstest bestimmt. Die Lamin A/C-Expression bzw. die *Renilla* Luciferase-Aktivität wurden auf siscr3-behandelte Zellen normiert. Die vollständige siLAM- bzw. mlet7A-Wirksamkeit in Abwesenheit von Zellstress wurde auf 1 gesetzt und ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

4.3.3 Charakterisierung der Phosphorothioat-vermittelten Zellstress-Induktion

Die Beobachtung, dass die LF2000-vermittelte Transfektion von PS-ONs die SG-Akkumulation von Ago2 induzieren kann und dies mit einer Verringerung der RNAi-Aktivität von siRNA- und miRNA-Wirkstoffen einhergeht, nimmt in dieser Arbeit eine besondere Rolle ein, da sowohl die

in Abschnitt 4.1 beschriebene PS-stimulierte siRNA-Einschleusung als auch die in Abschnitt 4.2 beschriebenen asON-Werkzeuge von dieser chemischen Modifikation Gebrauch machen. Deshalb wurde in diesem Abschnitt die PS-vermittelte Induktion von Zellstress und deren Bedeutung für die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung sowie die asON-vermittelte Ago2-Inhibition weitergehend untersucht.

Effizienz von siRNA-Wirkstoffen nach der Transfektion von PS-ONs

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die LF2000-vermittelte Transfektion des PS-modifizierten, Ago2-gerichteten asON asAgo2 3024/24 zwar eine effiziente Reduktion der Ago2-mRNA-Menge bewirkt, dies jedoch nicht mit einer vergleichbaren Reduktion der Ago2-Protein-Menge korreliert ist (Abbildung 4.19 und 4.20). Weiterhin wurde beobachtet, dass die LF2000-vermittelte Transfektion des PS-modifizierten asAgo2 3024/24mut die Akkumulutation von Ago2 in SGs induziert (Abbildung 4.25) und dies mit der verminderten Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi einher geht (Abbildung 4.32). Sowohl die LF2000-vermittelte Transfektion als auch der Einsatz von PS-modifizierten Nukleinsäure-Wirkstoffen stellen Standardmethoden innerhalb der molekularbiologischen Forschung dar. Deshalb wurde im Folgenden überprüft, ob dieses Phänomen auf die verwendeten asON-Sequenzen beschränkt ist oder ob es sich hierbei um eine generelle Eigenschaft von PS-ONs handelt. Dafür wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder mit den PS-ONs asKtrl I – IV sowie asAgo2 3024/24 bzw. 3024/24mut in einer Konzentration von 100 nM LF2000-vermittelt transfiziert (Abschnitt 3.4.5). Nach 24 h erfolgte ebenfalls LF2000-vermittelt die Transfektion von 50 pM siLAM und weitere 24 h später der Nachweis der siLAM-Wirksamkeit über die Quantifizierung der Lamin A/C-mRNA-Mengen im Gesamt-RNA-Extrakt mittels RT-qPCR (Abschnitt 3.4.8). Diese Analyse zeigte, dass von den 6 getesteten PS-ONs alle, bis auf das asKtrl I, eine $\geq$ 2-fache Reduktion der siLAM-Wirksamkeit induzierten (Abbildung 4.34). Vergleicht man dabei den Effekt des asAgo2 3024/24 mit dem seiner spezifischen Kontrolle asAgo2 3024/24mut, kann eine zusätzliche, ca. 2-fache Reduktion der siLAM-Wirksamkeit bedingt durch die sequenz-spezifische Inhibition des Ago2-Proteins abgeleitet werden. Angesichts der Beobachtung, dass das asAgo2 3024/24 die Ago2-Protein-Menge nur um $\leq$ 30 % reduziert (Abbildung 4.19 und 4.20), unterstreicht dies nochmals die Bedeutung der zellulären Ago2-Protein-Menge für die Effektivität der siRNA-vermittelten RNAi. Im Bezug auf die Reduktion der siLAM-Wirksamkeit durch die LF2000-vermittelte Transfektion der PS-ONs asKtrl II, III und IV und asAgo2 3024/24mut, lässt sich ableiten, dass der stressinduzierende Effekt weitgehend unabhängig von der Sequenz der PS-ONs erscheint. Aufgrund der Tatsache, dass das asKtrl I von allen getesteten PS-ONs am AT-reichsten ist, kann jedoch über eine Sensitivität des Effektes gegenüber GC-reichen Sequenzen spekuliert werden. Aus diesen Analysen konnte abgeleitet werden, dass mit Hilfe von PS-modifiziertes asONs Funktionsanalysen von RNAi-assoziierten Proteinen durchgeführt werden können, die beobachteten Effekte jedoch durch entsprechend stringente Kontrollen, wie z.B. Kontroll-ONs der gleichen Länge und Basenzusammensetzung abgesichert werden müssen. Ausserdem können die beobachteten Effekte durch alternativ chemisch-modifizierte asONs abgesichert und eventuell sogar verstärkt werden (Abbildung 4.24 (A)).

Weiterhin musste ausgeschlossen werden, dass der durch die LF2000-vermittelte Transfektion von PS-ONs induzierte Zellstress durch die Wahl des Transfektionsreagenz bedingt ist. Dies wurde überprüft, indem der inhibitorische Effekt des asAgo2 3024/24 auf der Ago2-mRNA- und

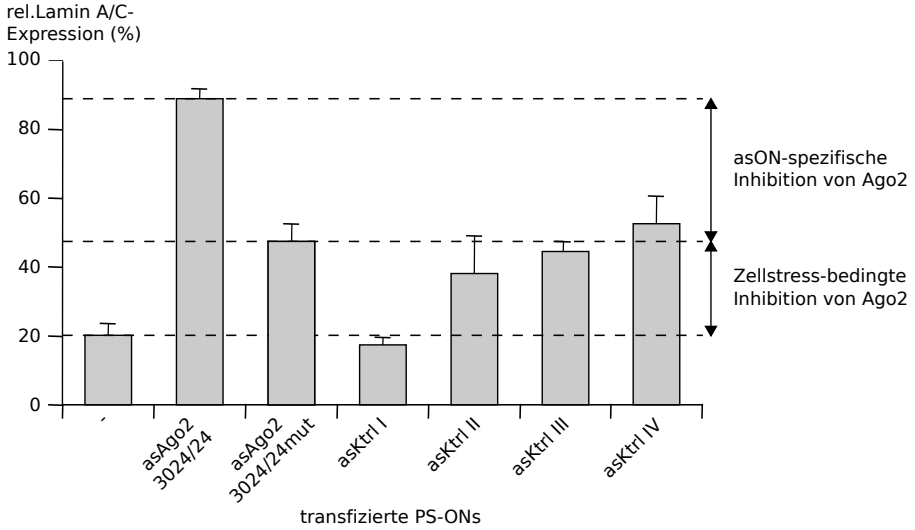


Abbildung 4.34: Die LF2000-vermittelte Transfektion von Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotiden (PS-ONs) kann mit einer Zellstress-bedingten Reduktion der Effektivität von siRNA-Wirkstoffen einhergehen. ECV-304 Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit den in der Abbildung angegebenen PS-ONs LF2000-vermittelt transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen ebenfalls LF2000-vermittelt mit 50 pM siLAM bzw. siscr3 transfiziert. Weitere 24 h später wurde die Inhibition der Lamin A/C-Expression mittels RT-qPCR bestimmt. Die Lamin A/C-Expression in siscr3-behandelten Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Die vollständige siLAM-Wirksamkeit in Abwesenheit von PS-induzierten Zellstress ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

der Ago2-Protein-Ebene im Anschluss an dessen zelluläre Einschleusung durch Elektroporation (Abschnitt 3.4.6) bestimmt wurde. Dabei wurde die Stärke des angelegten elektrischen Feldes so gewählt, dass der durch die Elektroporation erzeugte Zellstress möglichst gering ausgeprägt war. Weiterhin wurde im Anschluss an die Elektroporation der entstehende Zelldebris vollständig entfernt um eine möglichst optimale Regeneration der Zellen zu gewährleisten. Die verwendeten ECV-304 Zellen wurden mit entweder mit 100 nM oder mit 1 μM asAgo2 3024/24 bzw. dessen Kontrolle 3024/24mut elektroporiert. Zum Vergleich erfolgte die Elektroporation von 10 nM oder 100 nM siAgo2 bzw. deren Kontrolle siscr3. Die hohen Nukleinsäurekonzentrationen sind durch die Tatsache bedingt, dass bei der Elektroporation die durch die Komplexierung mit dem Transfektionsreagenz stattfindende Aufkonzentrierung entfällt. Stattdessen stellt sich während des elektrischen Pulses ein Gleichgewicht zwischen der Nukleinsäurekonzentration im Puffer und im Zellinneren ein. Der Nachweis der asAgo2 3024/24- bzw. der siAgo2-Wirksamkeit erfolgte 24 h nach der Elektroporation durch Quantifizierung der Ago2-mRNA-Menge im Gesamt-RNA-Extrakt mittels RT-qPCR bzw. der Ago2-Protein-Menge im Gesamtzelllysat mittels Western-Analyse. Wie in Abbildung 4.35 dargestellt, wurde auch nach der Elektroporation des asAgo2 3024/24 die bereits für die LF2000-vermittelte Transfektion beobachtete Diskrepanz des inhibitorischen Effektes auf der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene beobachtet (Abbildung 4.35). Im Gegensatz dazu wurde für die siAgo2 wiederum eine gute Korrelation zwischen der Inhibition der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Expression detektiert. Diese Analyse zeigte, dass die PS-vermittelte Induktion von Zellstress nicht ausschließlich durch das Transfektionsreagenz LF2000 hervorgerufen wird. Trotz alle dem sind nahezu alle Verfahren zur zellulären Einschleusung von Nukleinsäure-

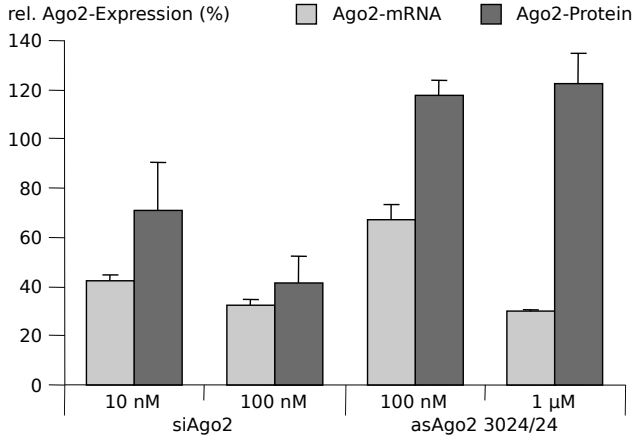


Abbildung 4.35: Die Diskrepanz des inhibitorischen Effektes des asAgo2 3024/24 auf der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene wird auch im Anschluss an dessen zelluläre Einschleusung mittels Elektroporation beobachtet werden. ECV-304 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen asAgo2 3024/24 bzw. 3024/24mut oder siAgo2 bzw. siscr3 elektroporiert. Nach 24 h erfolgte die Analyse der Ago2-Expression auf der mRNA-Ebene mittels RT-qPCR und auf der Protein-Ebene mittels Western-Analyse. Die Ago2-Expression in asAgo2 3024/24mut- bzw. siscr3-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Wirkstoffen mit einer Form von Zellstress verbunden, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die PS-vermittelte Induktion von Zellstress aus der Kombination der zellulären Nukleinsäure-Einschleusung und der PS-Chemie hervorgeht.

Effizienz von siRNA-Wirkstoffen nach der Inkubation mit PS-ONs

In Abschnitt 4.1 wurde am Beispiel der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung verdeutlicht, dass die Konjugation von Polypeptid-abgeleiteten Transport- und Sortierungssignalen an siRNA deren intrazelluläre Freisetzung induziert und dies mit einer bis zu 10-fach gesteigerten biologischen Wirksamkeit korreliert ist (Abschnitt 4.1.4). Berücksichtigt man jedoch die Tatsache, dass für die halbmaximale Inhibition eines Zielgens nur ca. 12 siRNA-Moleküle pro Zelle benötigt werden (Tabelle 1.2), muss es angesichts der mit Hilfe der PS-Stimulation eingeschleusten ca. 15.000 siRNA-Moleküle pro Zelle bei halbmaximaler Zielgen-Inhibition weitere Faktoren geben, die die Wirksamkeit der eingeschleusten siRNA-Moleküle reduzieren. Die Beobachtung, dass die LF2000-vermittelte Transfektion von PS-ONs sequenzunabhängig die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen reduzieren kann, führte zu der Frage, ob bereits die extrazelluläre PS-Stimulation von ECV-304 Zellen die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen beeinflusst. Um dies zu überprüfen, wurden ECV-304 Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 24 h mit dem PS-ON TM6-12 in einer Konzentration von 1 μM in OptiMEM-Medium inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen LF2000-vermittelt mit einer Konzentrationsreihe von 3 – 300 pM siLAM bzw. siscr3 transfiziert (Abschnitt 3.4.5). Nach 24 h erfolgte die Quantifizierung der siLAM-Wirksamkeit über den Nachweis der Lamin A/C-mRNA-Mengen im Gesamt-RNA-Extrakt mittels RT-qPCR (Abschnitt 3.4.8). Als Vergleichswert für die Effektivität der siLAM wurde mit Hilfe des Programms *GraFit 5* diejenige siLAM-Konzentration bestimmt, die für die halbmaximale Reduktion der Lamin A/C-mRNA-Menge benötigt wurde. Dieser als IC_{50} bezeichnete Wert bestätigte, dass bereits durch die extrazelluläre PS-Stimulation von

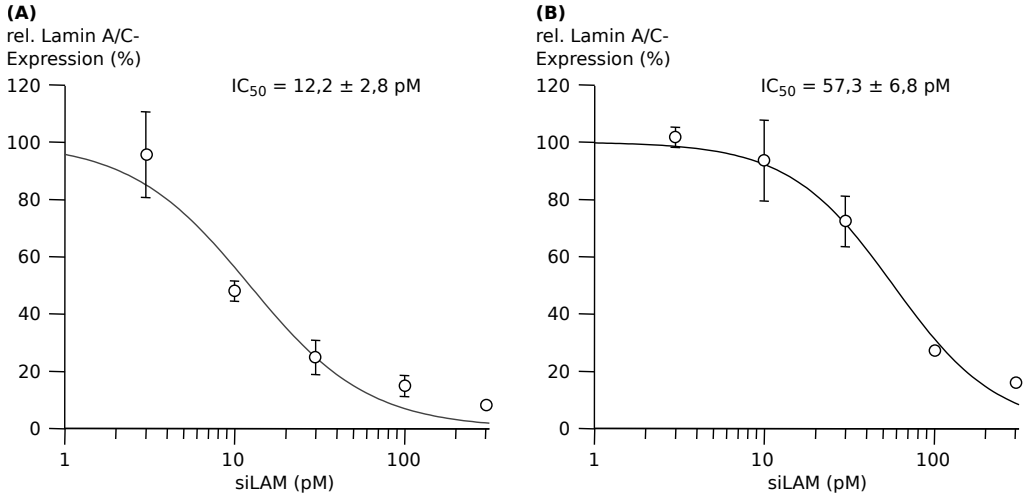


Abbildung 4.36: Die Inkubation von ECV-304 Zellen mit PS-ONs geht mit einer Zellstress-bedingten Reduktion der Effektivität von siLAM einher. ECV-304 Zellen wurden entweder (A) unbehandelt belassen oder (B) mit dem PS-ON TM6-12 in einer Konzentration von 1 μM in OptiMEM-Medium inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an siLAM bzw. siscr3 LF2000-vermittelt transfiziert. Weitere 24 h später wurde die Inhibition der Lamin A/C-Expression mittels RT-qPCR bestimmt. Die Lamin A/C-Expression in siscr3-behandelten Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Die Berechnung der IC_{50}-Werte der siLAM unter den genannten Bedingungen erfolgte mit Hilfe des Programms *GraFit 5* unter Verwendung einer hyperbolischen Gleichung. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, das in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

ECV-304 Zellen, die Wirksamkeit der eingeschleusten siLAM-Moleküle ca. 4,5-fach reduziert wird (Abbildung 4.36). Das Ausmaß der Reduktion der siLAM-Wirksamkeit durch die extrazelluläre PS-Stimulation der Zellen ist dabei in etwa vergleichbar zu der Reduktion der siLAM-Wirksamkeit, die durch die LF2000-vermittelte zelluläre Einschleusung von PS-ONs erzeugt wird. Für diese Beobachtungen gibt es mindestens 2 mögliche Erklärungen. Zum einen könnte die Inkubation der Zellen mit PS-ONs deren Spontanaufnahme induzieren. Dies widerspricht der bisherigen Ansicht, dass während der PS-stimulierten zellulären siRNA-Einschleusung keine Ko-Einschleusung der PS-ONs erfolgt (Abschnitt 1.2.3). Es ist jedoch vorstellbar, dass eine zelluläre Einschleusung der PS-ONs in so geringem Maße erfolgt, dass die intrazelluläre Menge der PS-ONs unter das Detektionslimit der Fluoreszenzmikroskopie fällt. Zum anderen könnte durch die Inkubation der Zellen mit PS-ONs deren Bindung an Proteine der Zellmembran erfolgen und dies eventuell die Induktion zellulärer Signalkaskaden nach sich ziehen. Dies ist vorstellbar, da bereits gezeigt wurde, dass PS-ONs mit der Zelloberfläche interagieren [27]. Das würde bedeuten, dass bereits die extrazelluläre Präsenz von PS-ONs zur Induktion von Zellstress führt. Im Bezug auf die PS-stimulierte zelluläre Einschleusung von siRNA wurde mit diesen Analysen ein weiterer Faktor ermittelt, der die Wirksamkeit der eingeschleusten siRNAs limitiert.

4.3.4 Fazit – dritter Teil

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Ago2-Lokalisation gezeigt, dass durch verschiedene Arten von Zellstress eine Umverteilung des Ago-Proteins von einer diffusen zytosolischen Loksalisation hin zu einer Akkumulation des Proteins

in SGs induziert wird. Durch Zellfraktionierungsexperimente konnte diese Beobachtung bestätigt und außerdem gezeigt werden, dass nach Induktion von oxidativem Stress mittels Natriumarsenit-Behandlung nur noch eine Ago2-Subpopulation nachzuweisen ist, wohingegen Ago2 in unbehandelten Zellen in 3 Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung und/oder in 3 unterschiedlich dichten Kompartimenten erscheint. Besonders eindrucksvoll ist der inverse Zusammenhang zwischen der erhöhten Ago2-Protein-Stabilität und der verringerten RNAi-Effektivität unter zellulären Stressbedingungen. Dies erinnert an eine Depot-ähnliche Akkumulation von potentiell aktiven Ago2-Proteinen in SGs unter zellulären Stressbedingungen. Diese Annahme wird durch die Reversibilität der Zellstress-bedingten Reduktion der RNAi-Effizienz von siRNA- und miRNA-Wirkstoffen gestützt. Zusammenfassend lässt sich aus den vorgestellten Analysen ableiten, dass SGs im Bezug auf die RNAi funktionell-inaktive Strukturen im Zytosol der Zelle darstellen. Anhand der induzierten Umverteilung des Ago2-Proteins unter zellulären Stressbedingungen konnte der Einfluss der funktionellen Zugänglichkeit des Ago2-Proteins auf die Effektivität der RNAi verdeutlicht werden. Die in diesem Zusammenhang identifizierten Zellstress-induzierenden Eigenschaften von PS-ONs beeinflussen ebenfalls die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen, die durch PS-Stimulation zellulär eingeschleust wurden (Abschnitt 4.1), sowie die Effizienz von PS-modifizierten asON-Werkzeugen in Bezug auf die Inhibition der Ago2-Protein-Expression (Abschnitt 4.2).

5 Diskussion

5.1 Limitierende Faktoren auf dem Weg zur therapeutischen Einführung von siRNA-Wirkstoffen

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein post-transkriptionell ansetzender Mechanismus zur Regulation der Genexpression, der in allen höheren Organismen von der Pflanze bis zum Menschen konserviert ist. Die Entdeckung, dass synthetische *small interfering* RNAs (siRNAs) diesen endogenen Mechanismus für die sequenzspezifische Inhibition prinzipiell jeden beliebigen Zielgens ausnutzen können, schürte die Hoffnung auf neuartige, RNAi-basierte Therapiekonzepte für bisher nicht behandelbare Erkrankungen. Während sich synthetische siRNAs bereits zu einem molekularbiologischen Standard-Werkzeug für Genfunktionsanalysen entwickelt haben, müssen auf dem Weg zum breiten therapeutischen Einsatz von siRNA-Wirkstoffen noch verschiedene Hürden überwunden werden.

Durch intensive Erforschung der Kriterien der RNAi-Maschinerie ist es mittlerweile zwar relativ einfach, geeignete siRNAs für Genfunktionsanalysen in Zellkultur zu identifizieren und herzustellen, für die Entwicklung eines siRNA-Wirkstoffs ist die intrinsische Effzienz der Inhibition der Genexpression allein jedoch nicht ausreichend. Die Stabilität, die Bioverfügbarkeit und vor allem die Spezifität und Sicherheit sind ebenfalls maßgeblich [62]. Zur Verbesserung der Stabilität, Spezifität und Sicherheit von siRNA-Wirkstoffen haben sich in den letzten Jahren verschiedene chemische Modifikationen als nützlich erwiesen (Abschnitt 1.1.2 und [71, 85]).

Um jedoch als Wirkstoff geeignet zu sein, müssen siRNAs erfolgreich in Zielzellen eingeschleust werden (Abbildung 5.1 (A)). Diese erste Hürde auf dem Weg zur therapeutischen Einführung von siRNA-Wirkstoffen konnte in Vorarbeiten durch die Entdeckung, dass Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide (PS-ONs) die zelluläre Einschleusung „nackter“ siRNAs bis zum Tausendfachen stimulieren können, weitestgehend überwunden werden. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl ebenfalls sehr effizienter siRNA-Einschlesungsverfahren, wie z. B die siRNA-Transfektion mit Hilfe von zellpenetrierenden Peptiden oder kationischen Lipiden, entwickelt (Abschnitt 1.2.1 und [59, 230]). Diesen nicht-viralen Einschleusungsverfahren ist gemein, dass sie die endozytotische Einschleusung der siRNAs induzieren, da siRNAs aufgrund ihrer Größe und negativen Ladung die Zellmembran nicht durch einfache Diffusion passieren können.

Im Anschluss an die zelluläre siRNA-Einschleusung muss gewährleistet werden, dass die siRNAs in das Zytosol der Zielzellen gelangen und nicht in Transportvesikel oder anderen Zielkompartimenten verbleiben (Abbildung 5.1 (B)). Die intrazelluläre siRNA-Freisetzung stellt die zweite, bisher nicht überwundene Hürde auf dem zur therapeutischen Einführung von siRNA-Wirkstoffen dar. Mit dem Ziel die intrazelluläre Freisetzung von siRNA-Wirkstoffen zu verbessern, wurden im ersten Teil dieser Arbeit 2 Konzepte getestet. Zum einen die Induktion der intrazellulären

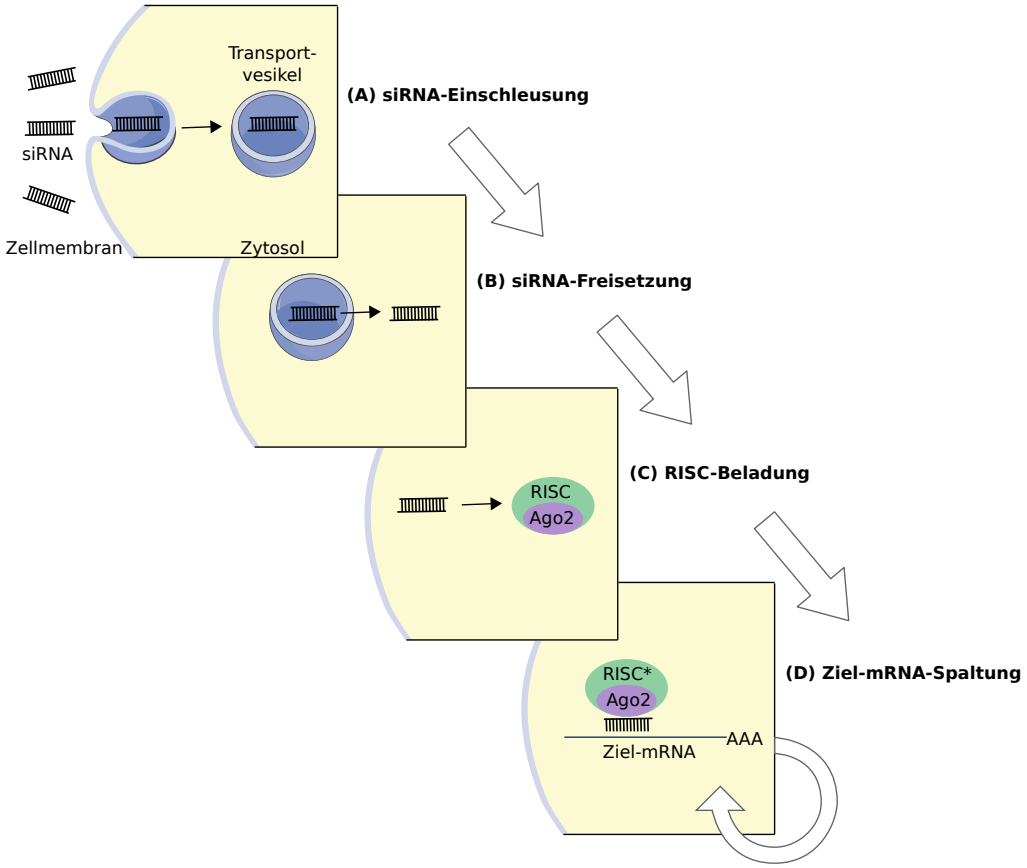


Abbildung 5.1: Kritische Schritte der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz. Für die effiziente siRNA-vermittelte Inhibition der Expression eines Zielgens müssen unter anderem folgende Bedingungen erfüllt werden: (A) die effiziente endozytotische Einschleusung der siRNA in die Zielzelle, (B) die effiziente intrazelluläre Freisetzung der siRNA in das Zytosol der Zielzelle, (C) die funktionelle Zugänglichkeit des RNA *induced silencing complex* (RISC), so dass die siRNA von der Endonuklease Ago2 gebunden werden kann und (D) die Effizienz der RISC-Aktivierung (RISC*), so dass dieser die Hybridisierung des *antisense* Stranges der siRNA an die Ziel-mRNA und nachfolgend deren Spaltung induziert. Daraufhin werden die Spaltprodukte der Ziel-mRNA aus dem RISC entlassen und aufgrund ihrer jetzt ungeschützten Enden rasch durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut. Der *antisense* Strang der siRNA verbleibt dabei im RISC, so dass dieser eine weitere Ziel-mRNA binden und deren Spaltung katalysieren kann.

siRNA-Freisetzung durch das transiente Auflösen des Zielkompartimentes, das die siRNAs intrazellulär einschließt. Zum anderen die Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung mit Hilfe von kovalent konjugierten Polypeptid-abgeleiteten Signalpeptiden.

Die Translokation der siRNAs in das Zytosol der Zielzellen führt dazu, dass die siRNAs von der RNAi-Maschinerie erkannt und in den RNA *induced silencing complex* (RISC) eingebaut werden können, dessen Schlüsselkomponente die Endonuklease Ago2 darstellt (Abbildung 5.1 (C)). Der nun aktivierte RISC induziert die Hybridisierung des *antisense* Stranges der siRNA an deren komplementäre Zielsequenz innerhalb der Ziel-mRNA (Abbildung 5.1 (D)). Es folgt die Spaltung der Ziel-mRNA, die nach deren Freisetzung aus dem RISC durch ihre jetzt ungeschützten Enden rasch durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut wird. Der *antisense* Strang der siRNA verbleibt dabei im RISC, so dass er eine weitere Ziel-mRNA binden und deren Spaltung katalysieren kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht inwieweit die Menge des intrazellulär zur Verfügung stehenden Ago2-Proteins die Effizienz der siRNA- und *micro* RNA (miRNA)-vermittelten RNAi limitiert. Im dritten Teil dieser Arbeit wurde eine mögliche dritte Hürde auf dem Weg zur therapeutischen Einführung von siRNA-Wirkstoffen, die funktionelle Zugänglichkeit der RNAi-Maschinerie, untersucht. Es wurde analysiert, inwieweit zelluläre Stressbedingungen die Lokalisation und damit die funktionelle Zugänglichkeit des Ago2-Proteins sowie die Effizienz der RNAi beeinflussen. Zusammenfassend sollte mit dieser Arbeit das Verständnis der Biologie der RNAi-vermittelten Gensuppression auf quantitativer Ebene erweitert werden.

5.2 Einfluss der siRNA-Bioverfügbarkeit auf die Effizienz der RNA-Interferenz

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der siRNA-Bioverfügbarkeit auf die RNAi-Effizienz am Modellsystem der PS-stimulierten zellulären siRNA-Einschleusung untersucht. Die PS-Stimulation ist ein sehr vielversprechendes und effizientes Verfahren zur zellulären Einschleusung synthetischer siRNAs, das auf der Caveolin-abhängigen Endozytose beruht. Dies birgt den großen Vorteil, dass die eingeschleusten siRNAs das endolysosomale Kompartiment umgehen und damit ihrer schnellen Degradation entgehen können. Die bisherige Limitierung dieses Einschleusungsverfahrens liegt in der geringen intrazellulären siRNA-Freisetzung auf dem Weg zum endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. aus diesem Zielkompartiment heraus. Dies führt dazu, dass trotz großer Mengen intrazellulär nachweisbarer siRNA-Moleküle nur eine sehr schwache Suppression der Zielgen-Expression beobachtet werden kann [129, 132, 204]. Die im Folgenden diskutierten Konzepte wurden mit dem Ziel erprobt, den Einfluss des intrazellulären siRNA-Transportes bzw. der intrazellulären siRNA-Freisetzung auf die Effizienz der Zielgen-Suppression zu demonstrieren.

5.2.1 Verbesserung der siRNA-Bioverfügbarkeit mit Hilfe von Ilimaquinon

In Vorarbeiten wurde das ER als das Zielkompartiment der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung identifiziert. Diese Analysen zeigten, dass innerhalb kürzester Zeit ($\leq$ 30 min) siRNA-Moleküle in diesem Kompartiment akkumulieren und sich ihre Lokalisation in den nachfolgenden 24 h nicht mehr ändert [130]. In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob die in dem ER zurückgehaltenen siRNA-Moleküle potentiell aktiv wären, d.h. die Spaltung ihrer endogenen Ziel-mRNA induzieren könnten, wenn sie das Zytosol erreichen. Diese Analysen basierten auf der transienten, Ilimaquinon (IQ)-vermittelten Auflösung des ERs im Anschluss an die PS-stimulierte Einschleusung der Lamin A/C-gerichteten siLAM, die auch in allen nachfolgenden Analysen als Modell-siRNA verwendet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass IQ, eigentlich als ein Golgi-Apparat-auflösendes Agens bekannt [220], in höheren Konzentrationen ebenfalls das Auflösen des ERs induziert (Abbildung 4.2). Diese Beobachtung stimmt mit den Arbeiten von Wang *et al.* überein, die als erste demonstrierten, dass der Effekt von IQ nicht Golgi-spezifisch ist [221]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das IQ-induzierte Auslösen des ERs mit einer gesteigerten siLAM-Wirksamkeit einher geht (Abbildung 4.3). In Abwesenheit von IQ sowie unter Bedingungen eines aufgelösten Golgi-Apparates aber intakten ERs (Abbildung 4.1 und 4.2) wurde dagegen keine siLAM-vermittelte

Reduktion der Lamin A/C-mRNA-Menge beobachtet. Dies lässt den Schluss zu, dass der beobachtete Effekt der gesteigerten siLAM-Wirksamkeit spezifisch für die siLAM-Freisetzung aus dem ER ist und wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Behandlung von ECV-304 Zellen mit hohen Ilimaquinon-Konzentrationen im Bereich von 12,5 – 100 μM mit der intrazellulären Freisetzung mittels PS-Stimulation eingeschleuster siLAM-Moleküle korreliert ist [130]. Somit konnte aus diesen Analysen abgeleitet werden, dass die intrazellulär eingeschlossenen siRNAs potentiell aktiv sind, deren Freisetzung in das Zytosol der Zelle die Interaktion mit der RNAi-Maschinerie gewährleistet und die Suppression der Zielgen-Expression ermöglicht.

Ähnliche experimentelle Ansätze wurden auch für andere siRNA-Einschleusungsverfahren erfolgreich erprobt, wie z.B. für die zelluläre siRNA-Einschleusung mit Hilfe von zellpenetrierenden Peptiden [135, 231]. Dieses Einschleusungsverfahren basiert hauptsächlich auf der Clathrin-abhängigen Endozytose und wird durch die intrazelluläre Freisetzung der siRNAs aus den Endosomen limitiert. Mit Hilfe von endosomolytischen Substanzen, wie z.B. Chloroquin, konnte die Wirksamkeit von siRNA im Anschluss an deren Peptid-vermittelte zelluläre Einschleusung ebenfalls gesteigert werden. Chloroquin verhindert das Ansäuern der Endosomen [232]. Dadurch wird die Zeitspanne bis zum lysosomalen Abbau der eingeschleusten siRNAs verlängert und teilweise werden die Endosomen sogar zerstört, so dass sie ihren Inhalt in das Zytosol der Zelle entlassen. Vergleichbare Erfolge konnten weiterhin mit ähnlich wirkenden Substanzen, wie z.B. Kalzium, Sukrose oder Pyrenebutyrat, erzielt werden [233–235]. Allerdings gehen alle diese Zusätze mit einer erhöhten Zytotoxizität oder anderen Nebenwirkungen einher, die spätestens im Hinblick auf *in vivo* Anwendungen nicht tolerierbar sind. Zusätzlich zu der beschriebenen Zytotoxizität wäre eine systemische Anwendung dieser Substanzen undenkbar, da sie keinerlei Spezifität für die Zielzellen der siRNAs gewährleisten. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Folgenden ein Konzept getestet, dass die Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung mit Hilfe von kovalent konjugierten Polypeptid-abgeleiteten Transport- und Sortierungssignalen ermöglichen soll. Dies birgt den Vorteil, dass die siRNA-Peptid-Konjugate ihre intrazelluläre Freisetzung quasi selbst induzieren könnten und somit keine weiteren Zusätze benötigt würden. Weiterhin könnte damit eine langsamere und vor allem kontinuierlichere siRNA-Freisetzung ermöglicht werden. Dies wäre im Hinblick auf siRNA-vermittelte Langzeiteffekte von großer Bedeutung, da ein plötzliches Übersättigen der RNAi-Maschinerie darin resultieren kann, dass ein Großteil der freigesetzten siRNAs von zytosolischen Nukleasen degradiert wird bevor ein Einbau in den RISC erfolgen kann. Dieser Effekt könnte auch erklären, warum in den vorgestellten Analysen die nahezu vollständige Ilimaquinon-induzierte siLAM-Freisetzung „nur“ mit einer ca. 50 %igen Inhibition der Lamin A/C-Expression einher ging.

5.2.2 Verbesserung der siRNA-Bioverfügbarkeit mit Hilfe von Signalpeptiden

Ein Signalpeptid ist eine kurze Sequenz von ca. 3 – 60 Aminosäuren, entweder am N- oder C-terminalen Ende eines Proteins lokalisiert, die über den Bestimmungsort und den Transportweg des Proteins innerhalb der Zelle entscheidet. Signalpeptide können sowohl intrazellulär als auch extrazellulär von Rezeptoren oder anderen Interaktionspartnern erkannt werden und somit die transmembrane Translokation des gekoppelten Proteins induzieren [236, 237]. Es ist bekannt, dass

Signalpeptide auf andere Proteine übertragen werden können und damit eine gezielte intrazelluläre Steuerung des Proteins von Interesse ermöglichen [163, 166, 167]. Die Übertragbarkeit von Signalpeptiden auf siRNA und somit auf die „Nukleinsäure-Welt“ ist bisher nicht beschrieben.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch die Konjugation von 4 ausgewählten Signalpeptiden (Abschnitt 1.3.3 und Abbildung 4.4) die Bioverfügbarkeit der siLAM im Anschluss an deren PS-stimulierte zelluläre Einschleusung verbessert werden kann und ob dies mit einer gesteigerten siLAM-Wirksamkeit korreliert ist. Von den 4 getesteten siLAM-Peptid-Konjugaten induzierten 3 im Anschluss an deren PS-stimulierte zelluläre Einschleusung eine gesteigerte Inhibition der Lamin A/C-Expression im Vergleich zur unkonjugierten siLAM (Abbildung 4.5). Dieser Effekt war am stärksten für das siLAM-TOX-Konjugat ausgeprägt, so dass dieses Konjugat als Leitsubstanz ausgewählt und im Folgenden hinsichtlich der intrinsischen Wirksamkeit (Abbildung 4.7), der zytosolischen und Serum-Stabilität (Abbildung 4.9), der Effektivität der zellulären Einschleusung (Abbildung 4.10), der Spezifität des inhibitorischen Effektes (Abbildung 4.11 und 4.12), der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des inhibitorischen Effektes (Abbildung 4.6 und 4.14) sowie der intrazellulären Bioverfügbarkeit (Abbildung 4.13) genauer charakterisiert wurde.

Die verbesserte Wirksamkeit des siLAM-TOX-Konjugates korrelierte mit einer größeren intrazellulären Fläche, die von dem Konjugat im Vergleich zur unkonjugierten siLAM ca. 2 h nach Beginn der PS-stimulierten Einschleusung eingenommen wurde. Dies wurde als Zeichen für die intrazelluläre Freisetzung des siLAM-TOX-Konjugates bewertet und konnte durch die Beobachtung gestärkt werden, dass zu späteren Zeitpunkten eine geringere Fläche detektiert wurde, was impliziert, dass die verbleibende eingeschlossene Menge des siLAM-TOX-Konjugates ebenfalls vergleichbar abnahm. Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Ultrazentrifugationsexperimenten gezeigt werden, dass sich im Anschluss an die PS-stimulierte siLAM- bzw. siLAM-TOX-Einschleusung eine größere Menge des siLAM-TOX-Konjugates im Vergleich zur unkonjugierten siLAM in der zytosolischen Fraktion eines Gesamtzelllysates befindet, was ebenfalls auf eine verstärkte Freisetzung in das Zytosol und somit auf eine verbesserte Bioverfügbarkeit des siLAM-TOX-Konjugates hinweist.

Im Anbetracht dessen, dass das siLAM-TOX-Konjugat eine leicht verringerte intrinsische Wirksamkeit (Abbildung 4.7) aufweist und durch die Konjugation des TOX-Peptides die zytosolische Stabilität (Abbildung 4.9), die Spezifität (Abbildung 4.11) und die zelluläre Einschleusung (Abbildung 4.10) nicht beeinflusst werden, konnte geschlussfolgert werden, dass die Konjugation des TOX-Peptides an die siLAM einen positiven Einfluss auf deren Bioverfügbarkeit im Anschluss an die PS-stimulierte zelluläre Einschleusung hat. Weiterhin ist im Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung die erhöhte Serumstabilität des siLAM-TOX-Konjugates (Abbildung 4.9) vielversprechend, die in den durchgeführten Analysen jedoch keine Rolle spielte, da diese in Serum-freien OptiMEM-Medium durchgeführt wurden.

Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass in der „Protein-Welt“ natürlich vorkommende Signalpeptide auf siRNA und somit auf die „Nukleinsäure-Welt“ übertragbar sind. Am Beispiel des TOX-Peptides konnte gezeigt werden, dass Signalpeptide die intrazelluläre Freisetzung von siRNA induzieren können und dies mit einer gesteigerten siRNA-Wirksamkeit einher geht. Weiterhin werden durch diese Analysen siRNA-Peptid-Konjugate als geeignete Werkzeuge eingeführt um die Bedeutung des intrazellulären siRNA-Transportes sowie der intrazellulären siRNA-Lokalisation für die siRNA-Wirksamkeit zu untersuchen.

In Anschlussarbeiten sollte überprüft werden, ob die in dieser Arbeit beobachtete moderate Wirksamkeitssteigerung der siLAM durch den Einsatz von optimierten Signalpeptiden weiter ausgebaut werden kann. Weiterhin ist es von besonderem Interesse, ob dieser Ansatz auch auf andere siRNA-Einschleusungsverfahren, wie z.B. die siRNA-Einschleusung mit Hilfe von zellpenetrierenden Peptiden, sowie auf andere Klassen von Nukleinsäure-Wirkstoffen, wie z.B. miRNAs, *antisense* Oligonukleotide (asONs) oder Aptamere, übertragbar ist.

Die Beobachtung, dass prinzipiell beide Stränge der siRNA an ihrem 3'-Ende, z.B. durch Konjugation eines Signalpeptides modifiziert werden können (Abbildung 4.8 und [204]), lässt die Möglichkeit offen, dass an das freie 3'-Ende eines siRNA-Peptid-Konjugates ein weiteres Signalpeptid konjugiert werden könnte, dass z.B. durch Tumorzell-spezifische Rezeptoren erkannt wird. Als Beispiel aus der Literatur ist das Tripeptid Arginin-Glycin-Aspartat (RGD-Motiv) zu nennen. Dieses Signalpeptid wird von vielen Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Fibronektin oder Kollagen, exprimiert und bildet die minimal aktive Erkennungssequenz von Integrinen, die vor allem auf der Oberfläche von endothelialen Tumorzellen überexprimiert werden [238, 239]. Damit könnte mit Hilfe von Signalpeptiden neben der verbesserten siRNA-Bioverfügbarkeit auch noch die Zielzellspezifität der siRNA ermöglicht werden, was in Hinblick auf *in vivo* Anwendungen unerlässlich wäre.

Mit beiden getesteten Ansätzen (Abschnitt 4.1.2: IQ-induzierte siRNA-Freisetzung, Abschnitt 4.1.3: Signalpeptid-vermittelte siRNA-Freisetzung) konnte am Beispiel der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung verdeutlicht werden, dass die momentane Limitierung der bestehenden siRNA-Einschleusungsverfahren in der intrazellulären siRNA-Bioverfügbarkeit liegt. Beispiele aus der Literatur bestätigen, dass diese Problematik nicht auf die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung beschränkt ist (Abschnitt 1.3 und [132]). So wurde beispielsweise von Dr. Sandra Laufer gezeigt, dass im Anschluss an die MPGα-vermittelte siRNA-Einschleusung nur ca. 0,1 % der intrazellulär vorliegenden siRNA-Moleküle bioverfügbar sind [231]. In der selben Arbeit wurde weiterhin beschrieben, dass für die halbmaximale Zielgen-Inhibition nur 12 siRNA-Moleküle pro Zelle benötigt werden. Diese müssen jedoch vollständig bioverfügbar im Zytosol der Zelle vorliegen. Dadurch wird zum einen das Potential des RNAi-Mechanismus verdeutlicht, zum anderen aber auch der Bedarf an innovativen Konzepten zur Verbesserung der siRNA-Bioverfügbarkeit unterstrichen. Um das vollständige Potential der RNAi ausnutzen zu können, müssen also keine neuen Einschleusungsverfahren entwickelt werden, sondern die bestehenden im Hinblick auf eine verbesserte Freisetzung der eingeschleusten und potentiell aktiven siRNAs optimiert werden. Die Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung mit Hilfe von kovalent konjugierten Signalpeptiden stellt dabei einen ersten vielversprechenden Ansatz dar, der in Zukunft mit Hilfe von optimierten Peptidsequenzen weiter ausgebaut werden sollte.

Weiterhin spricht die Tatsache, dass es sich bei der RNAi um einen katalytischen Mechanismus handelt, d.h. ein siRNA-Molekül kann durch Bindung an Ago2/RISC die Spaltung mehrerer mRNAs induzieren [85], für eine verstärkte Fokussierung auf die Thematik der siRNA-Bioverfügbarkeit. Sowohl *in vitro* als auch in Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass bei halbmaximaler Zielgen-Inhibition 1 siRNA-Molekül die Ago2-vermittelte Spaltung von mehr als 50 Ziel-mRNAs induzieren kann [231, 240]. Somit könnte im Hinblick auf die therapeutische Anwendung von siRNA-Wirkstoffen durch Verbesserung der intrazellulären siRNA-Bioverfügbarkeit im Anschluss an die erfolgreiche zelluläre Einschleusung eine erhebliche Reduktion der für ei-

ne effiziente Zielgen-Inhibition notwendigen Wirkstoff-Dosen erzielt werden. Dies wäre nicht nur aus Kostengründen erstrebenswert, sondern könnte auch für die Spezifität und Sicherheit siRNA-basierter Therapeutika von enormer Bedeutung sein.

5.3 Einfluss der funktionellen Ago2-Zugänglichkeit auf die Effizienz der RNA-Interferenz

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Effizienz der siRNA-vermittelten RNAi als Funktion der siRNA-Bioverfügbarkeit untersucht. In Anbetracht dessen, dass siRNA-Wirkstoffe ihren inhibitorischen Effekt unter Ausnutzung der endogenen RNAi-Maschinerie vermitteln, kann angenommen werden, dass die Effizienz der siRNA-vermittelten RNAi ebenfalls eine Funktion der funktionellen Zugänglichkeit der RNAi-Maschinerie ist. Da die endogen kodierten miRNAs ebenfalls unter Ausnutzung der RNAi-Maschinerie essentielle regulatorische Funktionen im Bereich der Entwicklung, der Proliferation, der Hämatopoese und der Apoptose [31–35] einnehmen, ist von einer Regulation der RNAi-Maschinerie auszugehen, die der Expression und Funktion RNAi-assoziierter Proteine Spezifität verleiht. Der Zusammenhang zwischen der Effizienz der RNAi und der funktionellen Zugänglichkeit RNAi-assoziierter Proteine und vor allem dessen Bedeutung für die therapeutische Einführung von siRNA-Wirkstoffen wurde bisher nicht untersucht. Jedoch weisen 3 erst kürzlich publizierte Studien darauf hin, dass sowohl die Lokalisation und Stabilität als auch die Funktion von RNAi-assoziierten Proteinen, wie z.B. Ago2 und dem TAR RNA-bindenden Protein (TRBP), durch post-translationelle Modifikationen reguliert werden können (Abschnitt 1.4.1 und [173, 174, 176]). Arbeiten aus dem *Mus musculus* und dem *Drosophila* System zeigen, dass die Regulation der RNAi-Maschinerie nicht auf das humane System beschränkt ist, denn auch in diesen Organismen wurden post-translationelle Modifikationen RNAi-assoziierter Proteine identifiziert und deren Einfluss auf die Lokalisation und Stabilität der betreffenden Proteine gezeigt [178–180]. Interessanterweise ist allen bisher identifizierten post-translationellen Modifikationen der RNAi-Maschinerie gemein, dass sie durch bestimmte zelluläre Bedingungen, wie z.B. durch definierte Entwicklungsstadien oder veränderte Proliferationseigenschaften, stimuliert werden können, so dass über die Existenz zellulärer Mechanismen spekuliert werden kann, die die Effizienz der RNAi regulieren um die natürliche Genexpression an die Zustände der Zelle anzupassen.

Im zweiten und dritten Teil dieser Arbeit sollte die Bedeutung der funktionellen Zugänglichkeit der RNAi-Maschinerie für die Effizienz von siRNA- und miRNA-Wirkstoffen in quantitativer Form untersucht werden. Dabei wurde Ago2 als Modell-Protein der RNAi-Maschinerie ausgewählt und der Zusammenhang zwischen der Ago2-Protein-Menge, die der RNAi-Maschnierie zur Verfügung steht und der Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi anhand der im Folgenden diskutierten Ansätze verdeutlicht.

5.3.1 Genfunktionsanalyse von Ago2 unter Ausschluss des RNAi-Mechanismus

Ago2 ist das einzige von vier humanen Ago-Proteinen (Ago1 – Ago4), das eine Endonuklease-Aktivitität aufweist und deshalb, unter der Voraussetzung der vollständigen Komplementarität zwischen dem Ago2-assoziierten *antisense* Strang der siRNA und der Ziel-mRNA, die siRNA-

vermittelte Spaltung der Ziel-mRNA induzieren kann [41, 42]. Bisher ist nur eine einzige miRNA, die miR-196 bekannt, die die Ago2-abhängige Spaltung durch Bindung an eine vollständig komplementäre und evolutionär konservierte Zielsequenz innerhalb der Hoxb8-mRNA induziert [241]. Trotzdem ist Ago2 ebenfalls Teil des aktivierten miRNA-beladenen RISC (miRISC), so dass von weiteren über die endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA hinausgehenden Funktionen des Ago2-Proteins ausgegangen werden kann. So werden beispielsweise sowohl Endonuklease-unabhängige als auch Endonuklease-abhängige Funktionen des Ago2-Proteins im Prozess der miRNA-Biogenese diskutiert [32, 190, 242, 243]. Weiterhin ist bekannt, dass Ago2 mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4E um die Bindung der 5'-Cap-Struktur einer Ziel-mRNA direkt konkurrieren und somit die Rekrutierung der kleinen ribosomalen Untereinheit und die Translationsinitiation der Ziel-mRNA unterbinden kann [244].

Basierend auf dem Kenntnisstand, dass Ago2 somit sowohl in der siRNA- als auch der miRNA-vermittelten RNAi regulatorische Funktionen einnimmt, wurden asON-Werkzeuge entworfen, anhand derer die Bedeutung der zellulären Ago2-Protein-Menge für die Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi in quantitativer Form untersucht werden sollte. Alle bisherigen Studien zur Identifikation und Charakterisierung von RNAi-assoziierten Proteinen basieren entweder auf der Plasmid-vermittelten Überexpression dieser Proteine [42, 245] oder auf der siRNA-vermittelten Expressionsinhibition dieser Proteine [42, 246]. Diese Ansätze können jedoch mit unerwünschten Nebeneffekten einhergehen, wie z.B. der Sättigung der endogenen RNAi-Maschinerie oder dem Verschieben von stöchiometrischen Gleichgewichten einzelner Proteinkomponenten des RISC. Die in dieser Arbeiten verwendeten Ago2-gerichteten asONs induzieren die RNase H-abhängige Spaltung der Ago2-mRNA und vermitteln somit die Ago2-Suppression, ohne dabei sequenz-unabhängig mit dem Mechanismus der RNAi zu interferieren.

Trotz der bis zu 75 %igen Sequenzhomologie der mRNAs der 4 humanen Ago-Proteine ist es durch Kombination von Sequenzabgleichen und Vorhersagen der Ago2-mRNA-Sekundärstruktur gelungen, asONs zu entwerfen, die eine spezifische RNase H-abhängige Spaltung der Ago2-mRNA induzieren, ohne dabei mit der Expression der 3 anderen Ago-Proteine zu interferieren (Abbildung 4.18 und [202, 224, 225]). Von insgesamt 12 entworfenen, vollständig PS-modifizierten asONs reduzierten 5 die Ago2-mRNA-Expression im Vergleich zur Ausgangsexpression um $\geq$ 50 % (Abbildung 4.17). Dabei wies das asAgo2 3024/24 mit einer Reduktion der Ago2-mRNA-Menge auf ca. 15 % der Ausgangsexpression sogar eine bessere Wirksamkeit auf als die von der Firma *ISIS Pharmaceuticals* publizierte Positivkontrolle ISIS136764. Deshalb wurde das asAgo2 3024/24 als Leitsubstanz ausgewählt und im Folgenden hinsichtlich der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des inhibitorischen Effektes auf der Ago2-mRNA und der Ago2-Protein-Ebene (Abbildung 4.19 und 4.20) genauer charakterisiert. Dabei wurde im Vergleich zu einem siRNA-basierten Kontroll-Ansatz beobachtet, dass das Ausmaß der asAgo2 3024/24-vermittelten Reduktion der zellulären Ago2-mRNA-Menge nicht mit einer vergleichbaren Reduktionen der zellulären Ago2-Protein-Menge korreliert ist. Mit Hilfe von Fraktionierungsexperimenten konnte ausgeschlossen werden, dass die Diskrepanz des inhibitorischen Effektes des asAgo2 3024/24 auf der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene im Vergleich zur siAgo2-vermittelten Ago2-Inhibition dadurch bedingt ist, dass asONs die RNase H-abhängige Spaltung ihrer Ziel-mRNA hauptsächlich im Zellkern induzieren und siRNAs die Ago2-abhängige Spaltung der Ziel-mRNA dagegen im Zytosol vermitteln. In beiden Fällen wurde eine vergleichbare Inhibition der nahezu ausschließlich im Zytosol der Zelle

nachweisbaren Ago2-mRNA beobachtet (Abbildung 4.21).

Jedoch konnte durch Vermeiden der PS-Modifikationen im Rückgrat der asAgo2 3024/24-Sequenz in Kombination mit dem Einführen von 2'-O-Methyl (OMe)-Modifikationen in den flankierenden Bereichen der asAgo2 3024/24-Sequenz (Abschnitt 2.10.2) die Diskrepanz des inhibitorischen Effektes auf der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene behoben werden und eine vergleichbare Reduktion der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Expression auf ca. 50 % des Ausgangsexpression erzielt werden (Abbildung 4.22 und 4.23). Mit diesem als asAgo2 $3024/24^{OMe}$ bezeichneten asON konnte anschließend in RNAi-Funktionstests gezeigt werden, dass die Menge des zur Verfügung stehenden Ago2-Proteins die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen nachhaltig, die Effizienz von miRNA-Wirkstoffen dagegen nur marginal beeinflusst (Abbildung 4.24). Diese Beobachtung ist in dem Sinne neuartig, dass bisher angenommen wurde, dass Ago2 ebenfalls eine essentielle Komponente miRNA-vermittelten Gensuppression darstellt. Allerdings beruhten diese Beobachtungen, wie bereits oben erwähnt, auf der Überexpression von Ago2 bzw. auf der siRNA-vermittelten Spaltung der Ago2-mRNA, so dass eine unspezifische Interferenz mit dem RNAi-Mechanismus in diesen Arbeiten nicht ausgeschlossen werden kann. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde in einer Studie von Mescalchin *et al.*, in der auch das asAgo2 3024/24 verwendet wurde, gezeigt, dass sich die aus der asON-vermittelten Inhibition der 4 humanen Ago-Proteine hervorgehenden Phänotypen von denen der siRNA-vermittelten Ago-Inhibition sowohl in der Quantität als auch in der Qualität der beobachteten Effekte unterscheiden [202]. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass für die Effizienz der miRNA-vermittelte RNAi vor allem die Menge des zur Verfügung stehenden Ago1-Proteins entscheidend ist.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen muss berücksichtigt werden, dass für die miRNA-Funktionsanalysen die bereits reife miRNA mlet7A in die verwendeten ECV-304 Zellen eingeschleust wurde. Somit kann keine Aussage über die quantitative Bedeutung des Ago2-Proteins für die miRNA-Biogenese getroffen werden. Trotzdem können im Bezug auf die Ago2-Funktion innerhalb des aktivierten miRISC mindestens 2 mögliche Schlüsse gezogen werden. Entweder wird die Ago2-Funktion innerhalb des miRISC durch die asAgo2 $3024/24^{OMe}$-vermittelte Reduktion der Ago2-Protein-Menge um ca. 50 % im Vergleich zur Ausgangexpression nur geringfügig beeinflusst, oder aber durch andere RNAi-assoziierte Proteine kompensiert. Für eine redundante Belegung der funktionellen Komponenten der miRNA-vermittelten RNAi spricht, dass nach jüngsten Schätzungen bis zu 30 % der Protein-kodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden [169, 170] und auch die Arbeit von Mescalchin *et al.* impliziert, dass sich die 4 humanen Ago-Proteine bezüglich ihrer Funktionen innerhalb der miRNA-vermittelten RNAi gegenseitig kompensieren können [202].

In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die zelluläre Ago2-Protein-Menge die Effizienz der siRNA-vermittelten RNAi entscheidend beeinflusst, zeigten Diederichs *et al.*, dass durch die Überexpression von Ago2 die RNAi-Effizienz verschiedener *short hairpin* RNAs (shRNAs) dahingehend verschoben wird, dass die Wirksamkeit von shRNAs deren *antisense* Strang eine vollständige Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA aufweist verstärkt wirkt, wohingegen shRNAs deren *antisense* Strang eine unvollständige Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA aufweist an Wirksamkeit verlieren [245]. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass unter Bedingungen der reduzierten Ago2-Protein-Menge die Inhibition von Ziel-mRNAs gefördert wird, die keine vollständig komplementäre Zielsequenz aufweisen und schließt somit auch so genannte *off targets* von siRNA-Wirkstoffen ein. Dies unterstreicht vor allem im Hinblick auf die therapeutische Einführung

von siRNA-Wirkstoffen die Bedeutung der zellulären Ago2-Protein-Menge.

Zusammenfassend lässt sich aus diesem Teil der Arbeit ableiten, dass asONs geeignete Werkzeuge darstellen um die Bedeutung ausgewählter RNAi-assoziierter Proteine in quantitativer Form zu untersuchen. Dies wurde hier am Beispiel des Ago2-Proteins verdeutlicht und führte zu der Schlussfolgerung, dass die der RNAi-Maschinerie zur Verfügung stehende Ago2-Protein-Menge die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen entscheidend, die Effizienz von miRNA-Wirkstoffe dagegen nur geringfügig beeinflusst. Beim Einsatz der asON-Werkzeuge für RNAi-Funktionsanalysen muss berücksichtigt werden, dass das Ausmaß ihres inhibitorischen Effektes auf die Ago2-Protein-Expression von den verwendeten chemischen Modifikationen innerhalb der asON-Sequenz abhängig ist und durch Einführen von PS-Modifikationen negativ beeinflusst werden kann. Dieser Aspekt wird in Abschnitt 5.3.2 nochmals aufgegriffen und detailliert diskutiert.

5.3.2 Funktionelle Inaktivierung von Ago2 unter Zellstressbedingungen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen durch die Effizienz der intrazellulären siRNA-Freisetzung, d.h. durch die siRNA-Bioverfügbarkeit, limitiert wird (Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen streng mit der zur Verfügung stehenden zellulären Ago2-Protein-Menge korreliert ist (Abschnitt 5.3.2). Dies wurde anhand der sequenz-spezifischen asON-vermittelten Inhibitionen von Ago2 demonstriert und verdeutlichte erstmalig die unterschiedliche Bedeutung der zellulären Ago2-Protein-Menge für die siRNA- und miRNA-vermittelte RNAi. Während die Reduktion der zellulären Ago2-Protein-Menge innerhalb der miRNA-vermittelten RNAi scheinbar durch andere RNAi-assoziierte Proteine bzw. durch die 3 anderen Ago-Proteine kompensiert werden kann, nimmt Ago2 innerhalb der siRNA-vermittelten RNAi eine exklusive Rolle ein, die dazu führt, dass bereits eine Reduktionen der zellulären Ago2-Protein-Menge um 30 – 50 % im Vergleich zur Ausgangexpression die Effizienz der siRNA-vermittelten RNAi entscheidend einschränkt.

Aktuelle Studien weisen daraufhin, dass zelluläre Stressbedingungen eine Reorganisation des intrazellulären Ago2-Verteilungsmusters von einer diffusen zytosolischen Lokalisation hin zu einer Akkumulation von Ago2 in Stressgranulen (SGs) und *processing bodies* (PBs) induzieren können (Abschnitt 1.4.2). Deshalb wurde im dritten Teil dieser Arbeit untersucht, ob unter zellulären Stressbedingungen die Ago2-Protein-Menge die der RNAi-Maschinerie zur Verfügung steht und daraus resultierend die Effizienz der RNAi beeinflusst wird.

Gegenwärtig wird angenommen, dass der Prozess der RNAi hauptsächlich innerhalb des Zytosols der Zelle stattfindet, jedoch wurde ebenfalls eine nukleäre Form des Ago2-enthaltenen RISC beschrieben [191–193]. Innerhalb des Zytosols wurde eine Verknüpfung der RNAi mit den PBs, die teilweise auch als GW *bodies* bezeichnet werden, beschrieben [54, 186, 247]. Diese transienten Strukturen im Zytosol der Zelle übernehmen wichtige Funktionen innerhalb des mRNA-Katabolismus und enthalten neben Exonukleasen und *decapping* Proteinen auch Ago-Proteine [197, 198]. Obgleich es aktuell kontrovers diskutiert wird, ob PBs für die RNAi essentiell sind oder sich einfach als Konsequenz der aktiven miRNA-vermittelten Translationsinihibition ausbilden [55, 248–250], ist es wahrscheinlich, dass PBs die Effizienz und/oder die Kinetik der miRNA-vermittelten RNAi beeinflussen. Für die Bedeutsamkeit der PBs spricht, dass die PB-Assoziation von Ago2, dem Schlüsselprotein des RISC, durch verschiedene post-translationelle Modifikationen,

wie z.B. der Hydroxylierung von Prolin-700 bzw. der Phosphorylierung von Serin-387, reguliert wird [173, 174].

Wie bereits erwähnt wurde, assoziiert Ago2 innerhalb des Zytosols nicht nur mit den PBs sondern auch mit SGs. Im Gegensatz zu PBs existieren mikroskopisch detektierbare SGs in „ungestressten“ Säugerzellen nicht, die Behandlung der Zellen mit Zellstress-induzierenden Substanzen, wie z.B. Natriumarsenit, resultiert jedoch in einer raschen Ausbildung dieser amorphen Strukturen im Zytosol der Zelle [195, 198]. In Übereinstimmung mit der stimulierbaren Ausbildung von SGs wurde beobachtet, dass Ago2 unter Bedingungen von oxidativem oder translationellem Stress in SGs akkumuliert [195, 196, 200]. SGs bestehen vor allem aus blockierten Translationsinitiationskomplexen, die sowohl mRNAs und kleine ribosomale Untereinheiten als auch eine Vielzahl von Translationsinitiationsfaktoren, wie eIF3, eIF4E und eIF4G enthalten [197, 198]. Weiterhin ist bekannt, dass PBs und SGs einige ihrer Komponenten, zu denen auch Ago2 gehört, austauschen, so dass darüber spekuliert wird, dass PBs und SGs sowohl räumlich als auch funktionell verknüpft sind [197, 199]. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob und wenn ja, welche Funktion SGs innerhalb der RNAi-vermittelten Genregulation einnehmen und ob die SG-Akkumulation von Ago2 als Antwort auf Zellstressbedingungen die Effizienz der RNAi beeinflusst. Dieser Aspekt wurde im dritten Teil dieser Arbeit eingehend untersucht und wird im Folgenden diskutiert.

Zunächst wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt, dass Ago2 unter verschiedenen Zellstressbedingungen in SGs akkumuliert (Abbildung 4.25). Dabei zeigte sich, dass die SG-Akkumulation von Ago2 nicht nur durch die etablierten Induktoren Natriumarsenit und Hitzschock stimuliert werden kann, sondern interessanter Weise auch durch die LF2000-vermittelte Transfektion des PS-ONs asAgo2 3024/24mut. Im Gegensatz dazu stimulierte die LF2000-vermittelte Transfektion der gleichen ON-Sequenz, die jedoch keine PS-Modifikationen aufweist und stattdessen durch OMe-Modifikationen stabilisiert wird, weder die intrazelluläre Umverteilung von Ago2 noch die Ausbildung von TIA1-positiven SGs. Weiterhin blieb die PB-Assoziation von Ago2 unter allen in dieser Arbeit untersuchten Zellstressbedingungen unbeeinflusst (Abbildung 4.26).

Mit Hilfe von zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass unter Zellstressbedingungen eine metabolische Stabilisierung des Ago2-Proteins erfolgt. Zum einen blieb die Ago2-Protein-Menge von einem Block der zellulären Translation über 48 h mit Hilfe des Translationinhibitors Cycloheximid unbeeinflusst (Abbildung 4.28), obwohl die Ago2-Halbwertszeit von Weinmann *et al.* als $\leq$ 10 h abgeschätzt wurde [226]. Zum anderen erwies sich das Ago2-Protein unter den untersuchten Zellstressbedingungen als resistent gegenüber der siRNA-vermittelten Expressionsinhibition, trotz der zu unbehandelten Zellen vergleichbaren Reduktion der Ago2-mRNA-Menge auf ca. 15 % der Ausgangsexpression (Abbildung 4.29). Die Tatsache, dass auch die LF2000-vermittelte PS-ON-Transfektion die metabolische Stabilisierung von Ago2 induzierte, erklärte im Nachhinein die Diskrepanz des inhibitorischen Effektes des vollständig PS-modifizierten asAgo2 3024/24 auf der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene (Abschnitt 5.3.1). Der Zusammenhang, dass durch das Vermeiden von PS-Modifikationen innerhalb der asAgo2 3024/24-Sequenz zum einen die SG-Akkumulation von Ago2 vermieden und zum anderen ein vergleichbarer inhibitorischer Effekt auf der Ago2-mRNA- und der Ago2-Protein-Ebene erzielt werden kann, führte zu der Schlussfolgerung, dass Ago2 in SGs stabilisiert und/oder durch räumliche Abtrennung vor dem metabolischen Abbau geschützt wird.

Die intrazelluläre Umverteilung des Ago2-Proteins im Anschluss an die Natriumarsenit-Behandlung von ECV-304 Zellen konnte durch Fraktionierungsexperimente unter Anwendung der Dichte-Gradientenzentrifugation bestätigt werden. Diese Analyse zeigte, dass Ago2 in unbehandelten Zellen in mindestens 3 Subpopulationen (Komplex I – III) nachgewiesen werden kann (Abbildung 4.27) und bestätigte publizierte Daten bezüglich der Ago2-Komplexbildung [193, 228]. Von Hoeck *et al.* wurden diese 3 Subpopulationen von Ago2 wie folgt charakterisiert: (i) die Ausbildung von Komplex II und III ist RNase A-sensitiv, so dass die Autoren schlussfolgerten, dass diese Komplexe mRNAs enthalten, (ii) alle 3 Komplexe assoziieren mit miRNAs, (iii) nur Komplex I kann die Spaltung einer Ziel-mRNA induzieren und (iv) Komplex I und III können die Prozessierung einer *precursor* (pre)-miRNA zu einer reifen miRNA induzieren [228]. In Natriumarsenit-behandelten Zellen wurde dagegen nur eine Ago2-Population detektiert (Abbildung 4.27). Die Komplexe I und III konnten nicht nachgewiesen werden und der weiterhin nachweisbare Komplex II sedimentierte bei etwas kleineren Dichten, so dass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich hierbei um einen unabhängigen Komplex handelt, der deshalb als Komplex II* bezeichnet wurde.

Obwohl nicht direkt von der von Höck *et al.* durchgeführten Charakterisierung der Ago2-Subpopulationen [228] auf die Fraktionierungsexperimente dieser Arbeit rückgeschlossen werden kann, implizieren diese Analysen, dass der Verlust distinkter Ago2-Subpopulationen in Natriumarsenit-behandelten Zellen das Spektrum der Ago2-Funktionen und damit auch die RNAi-Effizienz eingeschränken könnte. Diese Annahme wurde im Folgenden experimentell belegt, indem gezeigt wurde, dass in Natriumarsenit-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ein nahezu vollständiger Verlust der siLAM- bzw. mlet7A-vermittelten RNAi zu verzeichnen ist (Abbildung 4.32). In Übereinstimmung mit den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen wurde auch in Zellen, die entweder der LF2000-vermittelten PS-ON-Transfektionen oder einem Hitzeschock ausgesetzt wurden, eine 2 – 3-fach reduzierte siLAM- bzw. mlet7A-Wirksamkeit nachgewiesen. Dabei konnte mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der intrazellulären siLAM- bzw. mlet7A-Lokalisation ausgeschlossen werden, dass die Reduktion der RNAi-Effizienz unter Zellstressbedingungen durch ein verändertes intrazelluläres Verteilungsmuster der eingeschleusten siLAM- bzw. mlet7A-Moleküle hervorgerufen wurden (Abbildung 4.30 und 4.31). Weiterhin lieferte die fluoreszenzmikroskopische Analyse keinen Hinweis darauf, dass die Menge der eingeschleusten siLAM- bzw. mlet7A-Moleküle unter den untersuchten Zellstressbedingungen reduziert war.

Es muss aber auch berücksichtigt werden, dass mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nicht zwischen funktionell aktiven und funktionell-inaktiven siLAM- bzw. mlet7A-Molekülen unterschieden werden kann. Berücksichtigt man die kürzlich beschriebene Anzahl von nur 12 siRNA-Molekülen pro Zelle, die für die halbmaximale siRNA-vermittelte Zielgen-Inhibition notwendig sind, muss davon ausgegangen werden, dass der aktive Anteil der intrazellulär nachweisbaren siRNA-Moleküle nicht vor dem Hintergrund der bis zu 1000-fachen Menge funktionell inaktiver siRNA-Moleküle bestimmt werden kann. Gleiches gilt für den Nachweis der funktionell-aktiven Ago2-Moleküle mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass nur ein Bruchteil der zellulären Ago2-Protein-Menge zum Zeitpunkt der fluoreszenzmikroskopischen Analyse siRNA gebunden hat und Teil des aktiven RISC ist. Dieser Aspekt könnte in Anschlussarbeiten z.B. mit Hilfe der Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie untersucht werden. Diese Methodik ermöglicht den Nachweis der Interaktion von 2 Fluorophor-gekoppelten Molekülen (z.B. Ago2 und siRNA) auf Einzelmolekül-Ebene [193, 251] und könnte damit Aufschluss über den An-

teil der funktionell-aktiven Ago2- bzw. siRNA-Moleküle unter Standardbedingungen sowie unter Zellstressbedingungen geben.

Trotz der beschriebenen methodischen Einschränkungen kann im Bezug auf die durchgeführten RNAi-Funktionanalysen abgeleitet werden, dass die mit der Zellstress-induzierten SG-Akkumulation von Ago2 einhergehende metabolische Stabilisierung des Proteins invers mit der RNAi-Effizienz korreliert ist. Dies impliziert eine Depot-ähnliche Akkumulation von potentiell aktiven Ago2-Molekülen in den SGs, die vor dem Eintritt in die RNAi-Maschinerie zurückgehalten werden. Dies erinnert phänotypisch an die Akkumulation von potentiell aktiven siRNA-Molekülen im ER oder den Endosomen im Anschluss an deren erfolgreiche zelluläre Einschleusung (Abschnitt 5.2). In Abschnitt 5.2 wurde geschlussfolgert, dass der Anteil der erfolgreich eingeschleusten siRNA-Moleküle, die in das Zytosol der Zelle freigesetzt werden, die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen limitiert. Aus diesem Abschnitt kann nun abgeleitet werden, dass die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen ebenfalls von dem Anteil der zellulären Ago2-Moleküle, die dem RISC zur Ausführung der RNAi zur Verfügung stehen, limitiert wird. Dies ist konform mit der mit Hilfe der Ago2-gericheteten asON-Werkzeuge abgeleiteten Abhängigkeit der Effizienz von siRNA-Wirkstoffen von der zur Verfügung stehenden zellulären Ago2-Proteine-Menge (Abschnitt 5.3.1).

Die Korrelation der weitgehend unbeeinflussten miRNA-Wirksamkeit unter Bedingungen der asON-vermittelten Reduktion der Ago2-Protein-Menge um 30 – 50 % im Vergleich zur Ausgangsexpression (Abschnitt 5.3.1) und der eingeschränkten miRNA-Wirksamkeit unter Zellstressbedingungen ist dagegen schwieriger. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die SG-Akkumulation von Ago2 unter Zellstressbedingungen ein quantitativer Verlust der für den aktiven miRISC notwendigen Ago2-Moleküle erfolgt, der in diesem Fall nicht durch andere RNAi-assoziierte Proteine bzw. durch die 3 anderen Ago-Proteine kompensiert werden kann. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass auch andere für die miRNA-vermittelte RNAi essentielle Proteine unter Zellstressbedingungen in SGs akkumulieren und damit ebenfalls der RNAi-Maschinerie entzogen werden.

Zum Beispiel beschrieben Leung *et al.*, dass neben Ago2 auch die 3 anderen Ago-Proteine unter Bedingungen von translationellem oder oxidativem Stress in SGs rekrutiert werden [195]. Ähnliche Beobachtungen wurden innerhalb dieser Arbeit auch für Ago1 gemacht (Daten nicht gezeigt) und ebenfalls von Gallois-Montbrun *et al.* beschrieben [200]. Aufgrund der Tatsache, dass Mescalchin *et al.* zeigten, dass für die Effizienz der miRNA-vermittelte RNAi vor allem die zur Verfügung stehende Ago1-Protein-Menge von Bedeutung ist [202], könnte die Reduktion der miRNA-vermittelten RNAi unter den in dieser Arbeit untersuchten Zellstressbedingungen, also auch durch Akkumulation von potentiell aktiven Ago1-Molekülen in SGs bedingt sein.

Weiterhin zeigten Pare *et al.*, dass der Protein-Kinase R *activator* (PACT) unter Zellstressbedingungen ebenfalls in SGs akkumuliert [196]. PACT ist als dsRNA-bindendes Protein Teil des Dicer-Komplexes und bindet auch Ago2 (Abschnitt 1.1.2 und [38]). Die Funktion von PACT innerhalb des Dicer-Komplexes ist bisher nicht eindeutig geklärt, es wird jedoch darüber spekuliert, dass PACT die Positionierung der an Dicer gebundenen langen Doppelstrang-RNA (dsRNA) bzw. der pre-miRNA gewährleistet und im Anschluss die Assemblierung des siRNA- bzw. miRNA-beladenen RISC beeinflusst (Jennifer Doudna auf dem Keystone Meeting 2010 „*RNA Silencing: Mechanism, Biology and Application*“ und [38]). Wie bereits aus dem Namen abzuleiten ist, wurde PACT ursprünglich aufgrund der Eigenschaft charakterisiert, dass es unter Zellstressbedingungen die Protein-Kinase R (PKR) aktiviert, die wiederum eine Vielzahl pro-apoptischer Signalkaskaden

stimuliert [252, 253]. Interessanterweise zeigten Patel *et al.*, dass die PACT-vermittelte Aktivierung der PKR durch Natriumarsenite stimuliert werden kann [253]. Im Gegensatz dazu induziert TRPB, ein weiteres Protein des Dicer-Komplexes, dass PACT strukturell ähnelt und PACT innerhalb des Dicer-Komplexes auch funktionell ersetzen kann, den entgegengesetzten Effekt, d.h. die Inaktivierung der PKR. Weiterhin zeigten Lee *et al.*, dass TRBP und Dicer im Gegensatz zu Ago2 und PACT unter Zellstressbedingungen nicht in SGs akkumulieren. Dies könnte einen Zusammenhang zwischen der SG-Rekrutierung von Ago2 und PACT unter Zellstressbedingungen, der Induktion Zellstress-regulierter Signalkaskaden und dem Verlust der RNAi-Effizienz implizieren.

Neben den bisher beschriebenen Zellstress-Induktoren (Natriumarsenit, PS-ON-Transfektion, Hitzeschock), für die mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung gezeigt wurde, dass sie die SG-Akkumulation von Ago2 stimulieren, wurde in die Analyse der Effizienz der siLAM- bzw. der mlet7A-vermittelten RNAi auch die Induktion von translationellem Stress durch die Cycloheximid-Behandlung der verwendeten ECV-304 Zellen einbezogen. Analog zu den bisher beschriebenen Zellstress-Induktoren wurde auch für Cycloheximid gezeigt, dass es die metabolische Stabilisierung des Ago2-Proteins und somit dessen Resistenz gegenüber der siRNA-vermittelten Reduktion der zellulären Ago2-Protein-Menge induziert (Abbildung 4.28 und 4.29). Es wurde jedoch kein Einfluss auf die Effizienz der siLAM-vermittelten RNAi beobachtet (Abbildung 4.32). Im Gegensatz dazu wurde in Cycloheximid-behandelten Zellen eine ca. 2,5-fach reduzierte Effizienz der mlet7A-vermittelten RNAi bestimmt (Abbildung 4.32). Da bekannt ist, dass Cycloheximid das Auflösen von SGs und PBs induziert [198], ist die Interpretation der Daten schwierig. Es könnte aber spekuliert werden, dass die reduzierte Effizienz der mlet7A-vermittelten RNAi durch den Verlust der PBs bedingt ist. Dies würde für die Bedeutung der PBs innerhalb der miRNA-vermittelten RNAi sprechen. In Bezug auf die im Anschluss an die Cycloheximid-Behandlung unbeeinflusste Effizienz der siLAM-vermittelten RNAi könnte darüber spekuliert werden, dass Zellstressbedingungen, die keine SG-Akkumulation von Ago2 und/oder anderen Komponenten der RNAi-Maschinerie hervorrufen, die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen auch nicht eingeschränken, was gleichbedeutend mit einem kausalen Zusammenhang zwischen der SG-Akkumulation von Komponenten der RNAi-Maschinerie und der eingeschränkten Effizienz der siRNA-vermittelten RNAi wäre. Dieser Zusammenhang ist in dieser Arbeit jedoch nur am Beispiel der Induktion von translationellem Stress mit Hilfe von Cycloheximid untersucht worden. Um diesbezüglich gesicherte Aussagen treffen zu können, müssten in Anschlussarbeiten weitere Zellstress-Induktoren, die keine SG-Akkumulation von Ago2 und/oder anderen Komponenten der RNAi-Maschinerie induzieren, im Bezug auf die RNAi-Effizienz getestet werden.

Weiterhin wurden in den letzten Jahren im Bezug auf die Biologie humanpathogener Viren, wie z.B. der Infektion und Replikation des Hepatitis C-Virus, sowohl provirale (miR-122) als auch antivirale (miR-196, miR-296, miR-351, miR-431, miR-448) miRNAs identifiziert [254, 255]. Deshalb wäre es von besonderem Interesse zu überprüfen, ob Viren sich in bestimmten Stadien ihres Lebenszyklus die Stimulation der SG-Akkumulation von Ago2 und/oder anderer Komponenten der RNAi-Maschinerie zu nutze machen um RNAi-basierte antivirale Abwehrstrategien zu umgehen. Dies würde für die generelle Bedeutsamkeit des Zusammenhangs zwischen der Induktion von Zellstress, der SG-Akkumulation von Komponenten der RNAi-Maschinerie und dem Verlust der RNAi sprechen, der in dieser Arbeit, abgesehen vom Hitzeschock, mit Hilfe eher artifizieller Zellstress-Induktoren verdeutlicht wurde.

Für eine typische Zellstress-Antwort würde man erwarten, dass die daraus hervorgehenden Effekte reversibel sind und dies war auch der Fall für die Reduktion der Effizienz der siRNA- bzw. miRNA-vermittelten RNAi unter den in dieser Arbeit untersuchten Zellstressbedingungen (Abbildung 4.33). Die Analyse der Effizienz der siLAM- bzw. mlet7A-vermittelten RNAi entweder direkt im Anschluss an die Zellstress-Induktion oder 24 h bzw. 48 h nach der Zellstress-Induktion verdeutlichte, dass die Dauer vom Absetzen des Zellstress-Induktors bis zur Wiederherstellung der vollen RNAi-Effizienz von der Art der Zellstress-Induktion abhängig ist und auch zwischen der siLAM- und der mlet7A-vermittelten RNAi wurden diesbezüglich Unterschiede beobachtet. Im Fall der siLAM-vermittelten RNAi erfolgte der Wiedergewinn der RNAi-Effizienz am schnellsten für die LF2000-vermittelte PS-ON-Transfektion und den Hitzschock. Im Fall der miRNA-vermittelten RNAi erfolgte der Wiedergewinn der RNAi-Effizienz ebenfalls für die LF2000-vermittelte PS-ON-Transfektion am schnellsten, gefolgt von den Zellstress-Induktoren Natriumarsenit, Cycloheximid und dem Hitzeschock in der aufgeführten Reihenfolge. Für die abnehmende Effizienz der siLAM-vermittelten RNAi 24 h bzw. 48 h nach Absetzen der Cycloheximid-Behandlung, konnte aufgrund der bereits erwähnten Eigenschaft von Cycloheximid das Auflösen von SGs und PBs zu induzieren, keine zufriedenstellende Erklärung gefunden werden.

Mit Hilfe der in diesem Abschnitt beschriebenen experimentellen Beobachtungen wurde das in Abbildung 5.2 dargestellte Minimalmodell bezüglich des intrazellulären Verteilungsmusters von Ago2 und dessen Bedeutung für die Effizienz der RNAi abgeleitet. Gemäß diesem Modell ist die Zelle in zwei sich funktionell unterscheidende Kompartimente unterteilt. Das eine Kompartiment schließt das Zytosol, den Zellkern und die PBs ein und ermöglicht die effiziente Ausführung der RNAi da Ago2 in diesem Kompartiment in einer in Bezug auf die RNAi biologisch-aktiven Form vorliegt. Das andere Kompartiment schließt die SGs ein und unterbindet die effiziente Ausführung der RNAi, da Ago2 in diesem Kompartiment in einer biologisch-inaktiven Form vorliegt.

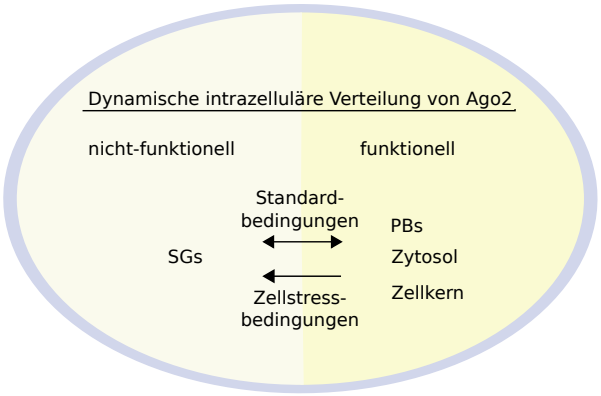


Abbildung 5.2: Minimalmodell der Korrelation von Zellstressbedingungen, der Translokation von Ago2 in Stressgranulen (SGs) und der eingeschränkten RNAi-Aktivität. Die aktive siRNA- und miRNA-vermittelte Genregulation erfolgt unter zellulären Standardbedingungen in dem funktionellen RNAi-Kompartiment, das das Zytosol, den Zellkern und die *processing bodies* (PBs) einschließt. Das nicht-funktionelle Kompartiment schließt die SGs ein in denen Ago2 unter Zellstressbedingungen akkumuliert. Da die Effizienz der RNAi reversibel mit der Induktion von Zellstress korreliert ist, kann über einen kontinuierlichen Austausch von Ago2 zwischen diesen beiden Kompartimenten spekuliert werden. Unter Zellstressbedingungen wird dieses Gleichgewicht gestört. Dies führt zur Akkumulation von Ago2 in den SGs und könnte die funktionelle Interaktionen von Ago2 mit der RNAi-Maschinerie unterbinden.

Basierend auf dem aktuellen Erkenntnisstand wird in dem Modell ein unter Standardbedingungen kontinuierlich stattfindender Austausch von Ago2 zwischen diesen beiden Kompartimenten angenommen. Unter Zellstressbedingungen, z.B. ausgelöst durch Natriumarsenit, wird dieses Gleichgewicht gestört und in Richtung des im Bezug auf die RNAi funktionell-inaktiven Kompartimentes verschoben. Obwohl mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie keine quantitativen Aussagen getroffen werden können, ist die Fluoreszenzintensität der unter Zellstressbedingungen in den SGs akkumulierenden Ago2-Moleküle bemerkenswert groß, so dass darüber spekuliert werden kann, dass unter diesen Bedingungen der Hauptteil der zellulären Ago2-Moleküle in einer biologisch-inaktiven Form vorliegt. Nach Absetzen der Zellstress-Induktoren stellt sich das Gleichgewicht des intrazellulären Verteilungsmusters von Ago2 wieder ein (Winfried Wünsche, persönliche Mittteilung) und dies wird durch den Wiedergewinn der RNAi-Effizienz reflektiert (Abbildung 4.33).

In diesem Kontext sollte das von Kedersha *et al.* postulierte Modell erwähnt werden, dass mRNAs, die von deassemblierten Polysomen freigesetzt wurden, zunächst in SGs sortiert und gespeichert werden und von dort ausgewählte mRNAs in die PBs überführt und degradiert werden [199]. Dies ist konform mit der von Leung *et al.* postulierten Annahme, dass die miRNA enthaltenden Ribonukleoproteinkomplexe (miRNPs), die in SGs und PBs nachgewiesen werden können, unterschiedliche funktionelle Zustände der miRNPs darstellen [195, 256]. Beide Modelle implizieren die funktionelle Verknüpfung von SGs und PBs und unterstreichen die Bedeutsamkeit der dynamischen Verteilung ihrer Komponenten zu denen auch Ago2 gehört.

In Anschlussarbeiten sollten die komplexen Zusammenhänge zwischen der Induktion von Zellstress, der Induktion Zellstress-bedingter Signalkaskaden und der Effizienz der RNAi weiterführend untersucht werden. Man könnte beispielsweise darüber spekulieren, dass Ago2 unter Zellstressbedingungen eine bisher unbekannte zelluläre Funktion übernimmt, die dessen SG-Lokalisation voraussetzt und der effizienten Ausführung der RNAi entgegen wirkt. Eine weitere mögliche Erklärung der beobachteten Effekte wäre, dass die Fähigkeit der Zelle zur effizienten Ausführung der RNAi im Widerspruch zu kritischen Mechanismen der zellulären Stressantworten steht, d.h. eine inverse Verknüpfung dieser Mechanismen existieren könnte. Dies würde implizieren, dass die zelluläre Reaktion auf eine akute Stresssituation eine höhere Priorität aufweist als die effiziente Ausführung der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi. Weiterhin wurde in dieser Arbeit in Bezug auf die Effizienz der miRNA-vermittelten RNAi „nur“ ein artifizielles miRNA-System untersucht. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob unter zellulären Stressbedingungen die Wirksamkeit der endogen-kodierten miRNAs vergleichbar eingeschränkt wird und ob es eventuell auch miRNAs gibt, deren Aktivität unter Zellstressbedingungen gefördert wird.

Abschließend wurden die Zellstress-induzierenden Eigenschaften von PS-ONs weitergehend untersucht, deren Charakterisierung für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist, da sowohl die in Abschnitt 4.1 beschriebene PS-stimulierte zelluläre Einschleusung von siRNA als auch die in Abschnitt 4.2 beschriebenen Ago2-gerichteten asON-Werkzeuge sich diese chemische Modifikation zu nutze machen.

Phosphorothioate gehören zu den ersten und noch heute am häufigsten verwendeten modifizierten Nukleotiden [257]. Durch die Substitution eines Nicht-Brücken-Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom sind Phosphorothioate gegenüber nukleolytischer Degradation resistent. Die Einführung von PS-Modifikationen in asON-Sequenzen schließt weder die Ausbildung von regulären Watson-Crick-Basenpaarungen noch die Aktivierung der RNase H aus. Die limitierenden Fakto-

ren, die mit der Einführung von PS-Modifikationen in asON-Sequenzen einher gehen, sind die im Vergleich zu unmodifizierten asONs geringere Affinität zu ihrer Ziel-mRNA, die unspezifische Interaktion mit Polyanion-bindenden Proteinen und die Hybrisierung an unvollständig komplementäre mRNAs, was zur unspezifischen Degradation dieser über die RNase H führt [258].

In Bezug auf die PS-modifizierten Ago2-gerichteten asONs konnte mit Hilfe von ebenfalls PS-modifizierten Kontroll-ONs eine weitgehende Unabhängigkeit des Zellstress-induzierenden Effektes von der Sequenz des PS-ON abgeleitet werden und über eine gewisse Sensitivität des Effektes gegenüber GC-reichen Sequenzen spekuliert werden (Abschnitt 4.34). Weiterhin konnte mit Hilfe der Elektroporation als Alternative für die LF2000-vermittelte Transfektion gezeigt werden, dass der Zellstress-induzierende Effekt des PS-modifizierten asAgo2 3024/24 nicht ausschließlich durch das Transfektionsreagenz LF2000 hervorgerufen wird (Abbildung 4.35). Dies ist konform mit der Beobachtung, dass durch die LF2000-vermittelte Transfektion eines OMe-modifizierten ONs weder die intrazelluläre Umverteilung von Ago2 noch die Ausbildung von TIA1-positiven SGs induziert wurde (Abbildung 4.25). Trotz der beschriebenen Zellstress-induzierenden Eigenschaften des PS-modifizierten asAgo2 3024/24, konnten in RNAi-Funktionsanalysen unter der Voraussetzung entsprechend stringent gewählter Kontrollen, vergleichbare Phänotypen wie unter Verwendung des asAgo2 3024/24 in seiner OMe-modifizierten Form beobachtet werden (Abbildung 4.34 und 4.24). Deshalb wurde aus diesen Analysen abgeleitet, dass mit Hilfe von PS-modifiziertes asONs Funktionsanalysen von RNAi-assoziierten Proteinen durchgeführt werden können, die beobachteten Effekte jedoch durch entsprechend stringente Kontrollen, wie z.B. vergleichbar chemisch-modifizierten Kontroll-ONs der gleichen Länge und Basenzusammensetzung, abgesichert werden müssen. Weiterhin sollten die beobachteten Effekte durch alternativ chemisch-modifizierte asONs abgesichert werden.

Überraschenderweise wurde im Anschluss an die simple PS-ON-Inkubation von ECV-304 Zellen ebenfalls eine vergleichbare Reduktion der siLAM-Wirksamkeit beobachtet wie in Zellen, in die mit Hilfe der LF2000-vermittelten Transfektion PS-ONs eingeschleust wurden (Abbildung 4.36). Dies widersprach der aus Vorarbeiten abgeleiteten Annahme, dass während der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung weder eine Komplexierung noch eine Ko-Einschleusung der siRNAs und PS-ONs in die Zelle erfolgt [131]. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die zelluläre Einschleusung der PS-ONs in so geringem Maße erfolgt, dass diese mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie zwar nicht detektiert werden kann, aber ausreicht, um eine zelluläre Stressantwort zu induzieren. Andererseits ist es aufgrund der bekannten Affinität von PS-ONs zu Polyanion-bindenden Proteinen auch vorstellbar, dass bereits durch die extrazelluläre Bindung an Zellmembran-Proteine zelluläre Signalkaskaden induziert werden könnten, die letztlich die beobachtete Stressantwort auslösen. Die beschriebene Abhängigkeit des Ausmaßes der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung von der Länge des PS-ON [131] spricht ebenfalls eher für die Vermutung, dass eine unspezifische Membranbindung der PS-ONs stattfindet.

Während die Problematik der PS-vermittelten Zellstress-Induktion im Fall der asON-Werkzeuge durch Einführen alternativer chemischer Modfikationen umgangen werden konnte, ist dies für die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung nicht so einfach möglich. Es konnte in Vorarbeiten zwar gezeigt werden, dass auch andere Arten von Nukleinsäuren die Einschleusung von „nackter“ siRNA um den Faktor $2-3$ steigern können [129], jedoch ist dies nicht vergleichbar zu der bis zu 1000-fach gesteigerten siRNA-Einschleusung in Gegenwart von PS-ONs. Dass aber auch die Koinkubation

mit Thioat-RNA die siRNA-Einschleusung nur um den Faktor 4 steigerte [129], führt zu der Annahme, dass die Schwefelatome im Rückgrat der PS-ONs den stimulierenden Effekt allein nicht erklären können. Eher könnte darüber spekuliert werden, dass die Konformation und/oder die Ladungsverteilung des PS-modifizierten Nukleinsäurerückgrates für den stimulatorischen Effekt entscheidend sind. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, mit Hilfe von Nukleotid-Analoga, die die Konformation und/oder Ladungsverteilung von PS-ONs nachahmen, den stimulatorischen Effekt bezüglich der siRNA-Einschleusung zu bewahren und gleichzeitig den Zellstress-induzierenden Effekt der PS-ONs zu umgehen.

Die Bedeutsamkeit der durch chemisch synthetisierte PS-ONs hervorgerufenen Zellstressantwort könnte aus einer kürzlich erschienen Studie von Wang *et al.* abgeleitet werden. Die Autoren dieser Studie zeigten erstmalig, dass einige bakterielle Gene in ihrem DNA-Rückgrat PS-Modifikationen aufweisen. Basierend auf dieser Entdeckung wurde in Abschnitt 1.2.3 die Hypothese aufgestellt, dass die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung auf der natürlichen Fähigkeit PS-modifizierter bakterieller DNA zur Stimulation zellulärer Einschleusung basieren könnte. Angesichts der in dieser Arbeit beschriebenen PS-bedingten Zellstressinduktion erscheint diese Hypothese nicht weniger sinnvoll, es muss jedoch ebenfalls in Betracht gezogen werden, dass die Zelle ihrerseits Abwehrmechanismen entwickelt haben könnte, die durch die Erkennung von als „fremd“ eingestufter PS-modifizierter DNA stimuliert werden können. In Anschlussarbeiten sollte deshalb überprüft werden, ob die Zellstressinduktion durch PS-ONs mit der Aktivierung bestimmter Signalkaskaden und/oder mit der Induktion spezifischer posttranslationeller Modifikationen von Komponenten der RNAi-Maschinerie verknüpft ist, so dass der Zusammenhang zwischen der PS-vermittelten Induktion einer Zellstressantwort und der eingeschränkten Effizienz RNAi-basierter Wirkstoffe unter diesen Bedingungen weitergehend erklärt werden könnte.

Zuletzt sollte ein weiterer Aspekt nicht unerwähnt bleiben. Durch den Austausch eines Nichtbrücken-Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatoms wird der Phosphodiestergruppe im Rückgrat eines PS-ON Chiralität verliehen, so dass pro Internukleotidverknüpfung jeweils zwei diastereomere Konfigurationen (R_P und S_P) möglich sind. Dies bedeutet, dass für ein PS-ON der Länge n bis zu 2^n verschiedene Stereoisomeren möglich sind. In Abhängigkeit von der diastereomeren Konfiguration der Internukleotidverknüpfungen weisen PS-ONs unterschiedliche Eigenschaften auf. Beispielsweise weist ein PS-modifiziertes asON, dass ausschließlich R_P-diastereomere Internukleotidverknüpfungen trägt, eine höhere Bindungsaffinität zur Ziel-mRNA, eine verstärkte RNase H-Aktivierung, aber eine geringere Nukleaseresistenz als ein asON auf, das ausschließlich S_P-diastereomere Internukleotidverknüpfungen aufweist [259, 260]. Kommerziell erhältliche PS-ONs liegen in der Regel in diastereomerischen Gemischen vor und weisen deshalb intermediäre Eigenschaften bezüglich der Bindungsaffinität, der Stärke der RNase H-Aktivierung und der Nuklease-Stabilität auf. In bakterieller DNA wurden bisher nur R_P-diastereomere Internukleotid-Verknüpfungen nachgewiesen. Aufgrund der mittlerweile entwickelten Verfahren zur stereospezifischen Synthese von PS-ONs [259–261] wäre es interessant zu überprüfen, ob ein PS-ON, dass ausschließlich S_P-diastereomere Internukleotidverknüpfungen aufweist, keine Zellstressantwort induziert und weiterhin die zelluläre siRNA-Einschleusung stimulieren kann. Dies könnte die Wirksamkeit von siRNAs, die mittels PS-Stimulation zellulär eingeschleust wurden weiter steigern und in Kombination mit der Signalpeptid-vermittelten intrazellulären siRNA-Freisetzung einen wirkungsvollen Einsatz der PS-vermittelten zellulären siRNA-Einschleusung ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein post-transkriptionell ansetzender genregulatorischer Mechanismus, der in allen höheren Organismen von der Pflanze bis zum Menschen konserviert ist. Mit Hilfe chemisch synthetisierter *small interfering* RNAs (siRNAs) kann dieser endogene Mechanismus für die sequenzspezifische Suppression der Expression eines jeden beliebigen Zielgens ausgenutzt werden. Allerdings können siRNAs aufgrund ihrer Größe und negativen Ladung die Zellmembran von Säugerzellen nicht in ausreichendem Maße passieren, so dass ihr therapeutischer Einsatz nur unter Anwendung eines effizienten siRNA-Einschleusungsverfahrens erfolgen kann. Deshalb wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl effizienter siRNA-Einschleusungsverfahren entwickelt, die auf den natürlichen endozytotischen Aufnahmewegen von Säugerzellen basieren. Allerdings werden diese Verfahren beinahe ausnahmslos durch die intrazelluläre siRNA-Freisetzung in das Zytosol der Zelle, das den Wirkort der RNAi darstellt, limitiert. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden am Beispiel der Phosphorothioat (PS)-stimulierten siRNA-Einschleusung 2 Konzepte zur Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung erprobt.

Das erste Konzept beruhte auf der Ilimaquinon-vermittelten Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung in Folge des transienten Auflösens des endoplasmatischen Retikulums (ER), dem Zielkompartiment der PS-stimulierten siRNA-Einschleusung. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Ilimaquinon-Behandlung der verwendeten Säugerzellen im Anschluss an die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung die siRNA-Wirksamkeit gesteigert werden kann und dies spezifisch für die siRNA-Freisetzung aus dem ER ist. Aufgrund der hohen Toxizität, die mit dem transienten Auflösen zellulärer Organellen verbunden ist, ist dieses Konzept jedoch nicht auf *in vivo* Anwendungen übertragbar.

Das zweite Konzept macht sich die Konjugation von siRNA an Polypeptid-abgeleitete Signalpeptide zur Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung zunutze. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass in der „Proteinwelt“ etablierte Signalpeptide auf siRNA und somit auf die „Nukleinsäurewelt“ übertragbar sind und die Induktion der intrazellulären siRNA-Freisetzung ermöglichen. Von den 4 getesteten siRNA-Peptid-Konjugaten erwies sich das siLAM-TOX-Konjugat als das potenteste und wurde deshalb detailliert charakterisiert. Berücksichtigt man die ca. 2,5-fach reduzierte intrinsische Wirksamkeit des siLAM-TOX-Konjugates (IC_{50} = 27 pM) im Vergleich zur unkonjugierten siLAM (IC_{50} = 11 pM) sowie die vergleichbare Stabilität, Spezifität und zelluläre Einschleusung, kann von einer ca. 10-fach verbesserten biologischen Wirksamkeit des siLAM-TOX-Konjugates gegenüber der unkonjugierten siLAM bedingt durch die TOX-Signalpeptid-vermittelte intrazelluläre Freisetzung des Konjugates ausgegangen werden.

Somit konnte mit beiden getesteten Konzepten bestätigt werden, dass die siRNA-Wirksamkeit im Anschluss an die PS-stimulierte siRNA-Einschleusung durch die intrazelluläre siRNA-Bioverfügbarkeit limitiert wird. Mit der Signalpeptid-vermittelten siRNA-Freisetzung wurde ein vielversprechender Ansatz gefunden, diese Hürde zu überwinden.

Die Tatsache, dass siRNA-Wirkstoffe den endogenen Mechanismus der RNAi nutzen um ihren inhibitorischen Effekt zu vermitteln, impliziert, dass die Effizienz von siRNA-Wirkstoffen ebenfalls von der Effizienz der von ihnen genutzten RNAi-Maschinerie abhängig ist. Dieser Aspekt wurde im zweiten und dritten Teil dieser Arbeit am Beispiel der Schlüsselkomponente der RNAi-Maschinerie, dem Ago2-Protein, untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Effizienz der RNAi-vermittelten Gensuppression als Funktion der zur Verfügung stehenden Ago2-Protein-Menge untersucht. Dafür wurden Ago2-gerichtete *antisense* Oligonukleotid-Werkzeuge entworfen, die die RNase H-abhängige Spaltung der Ago2-mRNA induzieren ohne dabei mit der Expression der 3 anderen sehr homologen Ago-Proteine oder dem Mechanismus der RNAi sequenzunabhängig zu interferieren. Mit Hilfe des asAgo2 3024/24, dem potentesten von insgesamt 12 entworfenen asONs, konnte die unterschiedliche Bedeutung der zur Verfügung stehenden zellulären Ago2-Protein-Menge für die Effizienz der siRNA-vermittelten RNAi und der endogenen *micro* RNA (miRNA)-vermittelten RNAi erstmalig in quantitativer Form gezeigt werden. Während die Reduktion der zellulären Ago2-Protein-Menge um 50 % im Vergleich zur Ausgangsexpression innerhalb der miRNA-vermittelten RNAi scheinbar durch andere RNAi-assoziierte Proteine und/oder durch die 3 anderen Ago-Proteine kompensiert werden kann, nimmt Ago2 innerhalb der siRNA-vermittelten RNAi eine exklusive Rolle ein, die dazu führt, dass bereits eine Reduktionen der zellulären Ago2-Protein-Menge um 30 % im Vergleich zur Ausgangsexpression die Effizienz der siRNA-vermittelten RNAi nahezu vollständig aufhebt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde erstmalig demonstriert, dass die Effizienz der RNAi-vermittelten Gensuppression nicht nur eine Funktion der siRNA-Bioverfügbarkeit und der zur Verfügung stehenden zellulären Ago2-Protein-Menge ist, sondern ebenfalls maßgeblich durch die subzelluläre Lokalisation des Ago2-Proteins beeinflusst wird. Es wurde gezeigt, dass die Induktion von Zellstress die Akkumulation von Ago2 in Stressgranulen (SGs) und die metabolische Stabilisierung des Proteins nach sich zieht. Dieser Zusammenhang geht mit dem Verlust distinkter Ago2-Subpopulationen einher und ist mit der Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi invers korreliert. Vergleichbar zu einer klassischen Zellstress-Reaktion ist auch die SG-Akkumulation von Ago2 nach Absetzen des Zellstress-Induktors reversibel und dies wird durch den Wiedergewinn der Effizienz der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi reflektiert. Neben den beiden etablierten Zellstress-Induktoren Natriumarsenit und Hitzeschock wurde die SG-Akkumulation von Ago2 und der damit verbundene Verlust der RNAi-Effzienz auch im Anschluss an die zelluläre Einschleusung von PS-modifizierten Oligonukleotiden beobachtet. Basierend auf diesen Analysen konnte ein Minimalmodell bezüglich des subzellulären Verteilungsmusters von Ago2 und dessen Bedeutung für die RNAi-Effizienz abgeleitet werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit durch die Kombination der qualitativen Analyse der siRNA- sowie der Ago2-Lokalisation und der quantitativen Analyse des Ausmaßes an Beteiligung des Ago2-Proteins an der RNAi-vermittelten Gensuppression gezeigt werden, dass für den therapeutischen Einsatz von siRNA-Wirkstoffen nicht nur deren effiziente Einschleusung in die Zielzelle gewährleistet werden muss, sondern nachfolgend auch deren intrazelluläre Freisetzung sowie die funktionelle und räumliche Zugänglichkeit der von ihnen genutzten RNAi-Maschinerie.

7 Literaturverzeichnis

[1] F.A. Rogers, J.A. Lloyd, and P.M. Glazer. Triplex-forming oligonucleotides as potential tools for modulation of gene expression. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 5:319–326, 2005.

[2] I. Drude, V. Dombos, S. Vauléon, and S. Müller. Drugs made of RNA: development and application of engineered RNAs for gene therapy. *Mini Rev Med Chem*, 7:912–931, 2007.

[3] R.R. Breaker. DNA enzymes. *Nat Biotechnol*, 15:427–431, 1997.

[4] J.H. Chan, S. Lim, and W.S. Wong. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33:533–540, 2006.

[5] Y. Dorsett and T. Tuschl. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 3:318–329, 2004.

[6] J. Weiler, J. Hunziker, and J. Hall. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther*, 13:496–502, 2006.

[7] M.J. Mann. Transcription factor decoys: a new model for disease intervention. *Ann N Y Acad Sci*, 1058:128–139, 2005.

[8] S.M. Nimjee, C.P. Rusconi, and B.A. Sullenger. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med*, 56:555–583, 2005.

[9] B.M. Paterson, B.E. Roberts, and E.L. Kuff. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:4370–4374, 1977.

[10] M.L. Stephenson and P.C. Zamecnik. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75:285–288, 1978.

[11] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, and S. Altman. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35:849–857, 1983.

[12] T.R. Cech, A.J. Zaug, and P.J. Grabowski. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, 27:487–496, 1981.

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

[14] R.C. Lee, R.L. Feinbaum, and V. Ambros. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small rnas with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75:843–854, 1993.

[15] B.J. Reinhart, F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz, and G. Ruvkun. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature*, 403:901–906, 2000.

[16] N.C. Lau, L.P. Lim, E.G. Weinstein, and D.P. Bartel. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science*, 294:858–862, 2001.

[17] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294:853–858, 2001.

[18] R.C. Lee and V. Ambros. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. *Science*, 294:862–864, 2001.

[19] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411:494–498, 2001.

[20] N.J. Caplen, S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R.A. Morgan. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:9742–9747, 2001.

[21] H. Wu, A.R. MacLeod, W.F. Lima, and S.T. Crooke. Identification and partial purification of human double strand RNase activity. A novel terminating mechanism for oligoribonucleotide antisense drugs. *J Biol Chem*, 273:2532–2542, 1998.

[22] H. Wu, W.F. Lima, H. Zhang, A. Fan, H. Sun, and S.T. Crooke. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem*, 279:17181–17189, 2004.

[23] R. Kretschmer-Kazemi Far, W. Nedbal, and G. Sczakiel. Concepts to automate the theoretical design of effective antisense oligonucleotides. *Bioinformatics*, 17:1058–1061, 2001.

[24] T.A. Vickers, J.R. Wyatt, and S.M. Freier. Effects of RNA secondary structure on cellular antisense activity. *Nucleic Acids Res*, 28:1340–1347, 2000.

[25] L. Smith, K.B. Andersen, L. Hovgaard, and J.W. Jaroszewski. Rational selection of antisense oligonucleotide sequences. *Eur J Pharm Sci*, 11:191–198, 2000.

[26] S.T. Crooke. Progress in antisense technology: the end of the beginning. *Methods Enzymol*, 313:3–45, 2000.

[27] J. Kurreck. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*, 270:1628–1644, 2003.

[28] R.M. Orr. Technology evaluation: fomivirsen, Isis Pharmaceuticals Inc/CIBA vision. *Curr Opin Mol Ther*, 3:288–294, 2001.

[29] S.T. Crooke. Progress in antisense technology. *Annu Rev Med*, 55:61–95, 2004.

[30] K.H. Altmann, D. Fabbro, N.M. Dean, T. Geiger, B.P. Monia, M. Müller, and P. Nicklin. Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem Soc Trans*, 24:630–637, 1996.

[31] J. Martinez and M. Busslinger. Life beyond cleavage: the case of Ago2 and hematopoiesis. *Genes Dev*, 21:1983–1988, 2007.

[32] D. O'Carroll, I. Mecklenbrauker, P.P. Das, A. Santana, U. Koenig, A.J. Enright, E.A. Miska, and A. Tarakhovsky. A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes Dev*, 21:1999–2004, 2007.

[33] I. Alvarez-Garcia and E.A. Miska. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132:4653–4662, 2005.

[34] T. Dalmay. MicroRNAs and cancer. *J Intern Med*, 263:366–375, 2008.

[35] B.F. Yang, Y.J. Lu, and Z.G. Wang. MicroRNAs and apoptosis: implications in the molecular therapy of human disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36:951–960, 2009.

[36] M.A. Carmell, Z. Xuan, M.Q. Zhang, and G.J. Hannon. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, 16:2733–2742, 2002.

[37] E. Bernstein, A.A. Caudy, S.M. Hammond, and G.J. Hannon. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363–366, 2001.

[38] Y. Lee, I. Hur, S.Y. Park, Y.K. Kim, M.R. Suh, and V.N. Kim. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*, 25:522–532, 2006.

[39] G. Meister and T. Tuschl. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431:343–349, 2004.

[40] M.A. Carmell and G.J. Hannon. Rnase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, 11:214–218, 2004.

[41] J. Liu, M.A. Carmell, F.V. Rivas, C.G. Marsden, J.M. Thomson, J.J. Song, S.M. Hammond, L. Joshua-Tor, and G.J. Hannon. Argonaute 2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305:1437–1441, 2004.

[42] G. Meister, M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl. Human Argonaute 2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15:185–197, 2004.

[43] C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D.P. Bartel, and P.D. Zamore. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123:607–620, 2005.

[44] T.A. Rand, S. Petersen, F. Du, and X. Wang. Argonaute 2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123:621–629, 2005.

[45] S.M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. *EMBO J*, 20:6877–6888, 2001.

[46] G. Hutvágner and P.D. Zamore. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297:2056–2060, 2002.

[47] A. de Fougerolles, H.P. Vornlocher, J. Maraganore, and J. Lieberman. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 6:443–453, 2007.

[48] L. He and G.J. Hannon. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5:522–531, 2004.

[49] M.T. Bohnsack, K. Czaplinski, and D. Gorlich. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10:185–191, 2004.

[50] H. Siomi and M.C. Siomi. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457:396–404, 2009.

[51] G. Hutvagner and M.J. Simard. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:22–32, 2008.

[52] J. Brennecke, A. Stark, R.B. Russell, and S.M. Cohen. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3:e85, 2005.

[53] N. Rajewsky. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*, 38 Suppl:S8–13, 2006.

[54] J. Liu, M.A. Valencia-Sanchez, G.J. Hannon, and R. Parker. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7:719–723, 2005.

[55] R.S. Pillai, S.N. Bhattacharyya, C.G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, and W. Filipowicz. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309:1573–1576, 2005.

[56] M. Jinek and J.A. Doudna. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457:405–412, 2009.

[57] S.E. Raper, N. Chirmule, F.S. Lee, N.A. Wivel, A. Bagg, G.P. Gao, J.M. Wilson, and M.L. Batshaw. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, 80:148–158, 2003.

[58] E. Check. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature*, 433:561, 2005.

[59] D. De Paula, M.V.L.B. Bentley, and R.I. Mahato. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. *RNA*, 13:431–456, 2007.

[60] M. Overhoff, M. Alken, R. Kretschmer-Kazemi Far, M. Lemaitre, B. Lebleu, G. Sczakiel, and I. Robbins. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol*, 348:871–881, 2005.

[61] R. Kretschmer-Kazemi Far and G. Sczakiel. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 31:4417–4424, 2003.

[62] Y. Pei and T. Tuschl. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods*, 3:670–676, 2006.

[63] A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall, and A. Khvorova. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 22:326–330, 2004.

[64] H. Tafer, S.L. Ameres, G. Obernosterer, C.A. Gebeshuber, R. Schroeder, J. Martinez, and I.L. Hofacker. The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nat Biotechnol*, 26:578–583, 2008.

[65] D.M. Dykxhoorn and J. Lieberman. Running interference: prospects and obstacles to using small interfering rnas as small molecule drugs. *Annu Rev Biomed Eng*, 8:377–402, 2006.

[66] D.S. Schwarz, G. Hutvágner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P.D. Zamore. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115:199–208, 2003.

[67] A. Khvorova, A. Reynolds, and S.D. Jayasena. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115:209–216, 2003.

[68] Y.L. Chiu and T.M. Rana. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell*, 10:549–561, 2002.

[69] J.M. Layzer, A.P. McCaffrey, A.K. Tanner, Z. Huang, M.A. Kay, and B.A. Sullenger. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*, 10:766–771, 2004.

[70] S. Choung, Y.J. Kim, S. Kim, H.O. Park, and Y.C. Choi. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem Biophys Res Commun*, 342:919–927, 2006.

[71] M. Manoharan. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr Opin Chem Biol*, 8:570–579, 2004.

[72] R.I. Mahato, K. Cheng, and R.V. Guntaka. Modulation of gene expression by antisense and antigene oligodeoxynucleotides and small interfering RNA. *Expert Opin Drug Deliv*, 2:3–28, 2005.

[73] F. Czauderna, M. Fechtner, S. Dames, H. Aygün, A. Klippel, G.J. Pronk, K. Giese, and J. Kaufmann. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 31:2705–2716, 2003.

[74] J. Elmén, H. Thonberg, K. Ljungberg, M. Frieden, M. Westergaard, Y. Xu, B. Wahren, Z. Liang, H. Ørum, T. Koch, and C. Wahlestedt. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res*, 33:439–447, 2005.

[75] D.S. Schwarz, H. Ding, L. Kennington, J.T. Moore, J. Schelter, J. Burchard, P.S. Linsley, N. Aronin, Z. Xu, and P.D. Zamore. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genet*, 2:e140, 2006.

[76] M. Robbins, A. Judge, L. Liang, K. McClintock, E. Yaworski, and I. MacLachlan. 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol Ther*, 15:1663–1669, 2007.

[77] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, and P.J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46:3–26, 2001.

[78] S.J. Reich, J. Fosnot, A. Kuroki, W. Tang, X. Yang, A.M. Maguire, J. Bennett, and M.J. Tolentino. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis*, 9:210–216, 2003.

[79] M.J. Tolentino, A.J. Brucker, J. Fosnot, G.S. Ying, I.H. Wu, G. Malik, S. Wan, and S.J. Reich. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina*, 24:132–138, 2004.

[80] M. Overhoff, W. Wuensche, and G. Sczakiel. Quantitative detection of siRNA and single-stranded oligonucleotides: relationship between uptake and biological activity of siRNA. *Nucleic Acids Res*, 32:e170, 2004.

[81] V.P. Torchilin. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng*, 8:343–375, 2006.

[82] W. Li and F.C. Szoka. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res*, 24:438–449, 2007.

[83] R.I. Mahato, K. Anwer, F. Tagliaferri, C. Meaney, P. Leonard, M.S. Wadhwa, M. Logan, M. French, and A. Rolland. Biodistribution and gene expression of lipid/plasmid complexes after systemic administration. *Hum Gene Ther*, 9:2083–2099, 1998.

[84] S. Spagnou, A.D. Miller, and M. Keller. Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry*, 43:13348–13356, 2004.

[85] T.M. Rana. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:23–36, 2007.

[86] R.I. Mahato, A. Rolland, and E. Tomlinson. Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*, 14:853–859, 1997.

[87] L.Y. Song, Q.F. Ahkong, Q. Rong, Z. Wang, S. Ansell, M.J. Hope, and B. Mui. Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1558:1–13, 2002.

[88] D.V. Morrissey, J.A. Lockridge, L. Shaw, K. Blanchard, K. Jensen, W. Breen, K. Hartsough, L. Machemer, S. Radka, V. Jadhav, N. Vaish, S. Zinnen, C. Vargeese, K. Bowman, C.S. Shaffer, L.B. Jeffs, A. Judge, I. MacLachlan, and B. Polisky. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*, 23:1002–1007, 2005.

[89] T.S. Zimmermann, A.C. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M.N. Fedoruk, J. Harborth, J.A. Heyes, L.B. Jeffs, M. John, A.D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L.V. Nechev, L.R. Palmer, T. Racie, I. Rohl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A.J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H.P. Vornlocher, and I. MacLachlan. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441:111–114, 2006.

[90] T.W. Geisbert, L.E. Hensley, E. Kagan, E.Z. Yu, J.B. Geisbert, K. Daddario-DiCaprio, E.A. Fritz, P.B. Jahrling, K. McClintock, J.R. Phelps, A.C. Lee, A. Judge, L.B. Jeffs, and I. MacLachlan. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. *J Infect Dis*, 193:1650–1657, 2006.

[91] L.N. Patel, J.L. Zaro, and W.C. Shen. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*, 24:1977–1992, 2007.

[92] T.S. Zatsepin, J.J. Turner, T.S. Oretskaya, and M.J. Gait. Conjugates of oligonucleotides and analogues with cell penetrating peptides as gene silencing agents. *Curr Pharm Des*, 11:3639–3654, 2005.

[93] J.P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M.J. Gait, L.V. Chernomordik, and B. Lebleu. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*, 278:585–590, 2003.

[94] R. Fischer, K. Köhler, M. Fotin-Mleczek, and R. Brock. A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem*, 279:12625–12635, 2004.

[95] F. Simeoni, M.C. Morris, F. Heitz, and G. Divita. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 31:2717–2724, 2003.

[96] T.J. Davidson, S. Harel, V.A. Arboleda, G.F. Prunell, M.L. Shelanski, L.A. Greene, and C.M. Troy. Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J Neurosci*, 24:10040–10046, 2004.

[97] W.J. Kim, L.V. Christensen, S. Jo, J.W. Yockman, J.H. Jeong, Y.H. Kim, and S.W. Kim. Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol Ther*, 14:343–350, 2006.

[98] R. Hormes, M. Homann, I. Oelze, P. Marschall, M. Tabler, F. Eckstein, and G. Sczakiel. The subcellular localization and length of hammerhead ribozymes determine efficacy in human cells. *Nucleic Acids Res*, 25:769–775, 1997.

[99] M. Graessmann and A. Graessmann. Microinjection of tissue culture cells. *Methods Enzymol*, 101:482–492, 1983.

[100] U. Zimmermann, G. Pilwat, and F. Riemann. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys J*, 14:881–899, 1974.

[101] Y. Akaneya, B. Jiang, and T. Tsumoto. RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. *J Neurophysiol*, 93:594–602, 2005.

[102] R.A. Bejjani, C. Andrieu, C. Bloquel, M. Berdugo, D. BenEzra, and F. Behar-Cohen. Electrically assisted ocular gene therapy. *Surv Ophthalmol*, 52:196–208, 2007.

[103] H.P. Vornlocher. Antibody-directed cell-type-specific delivery of siRNA. *Trends Mol Med*, 12:1–3, 2006.

[104] E. Song, P. Zhu, S.K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D.M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D.B. Weiner, P. Shankar, W.A. Marasco, and J. Lieberman. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*, 23:709–717, 2005.

[105] J.O. McNamara, E.R. Andrechek, Y. Wang, K.D. Viles, R.E. Rempel, E. Gilboa, B.A. Sullenger, and P.H. Giangrande. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol*, 24:1005–1015, 2006.

[106] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R.K. Pandey, T. Racie, K.G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, and H.P. Vornlocher. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432:173–178, 2004.

[107] C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H.P. Vornlocher, and C. Unverzagt. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 14:4975–4977, 2004.

[108] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:7297–7301, 1995.

[109] B. Urban-Klein, S. Werth, S. Abuharbeid, F. Czubayko, and A. Aigner. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther*, 12:461–466, 2005.

[110] Y. Minakuchi, F. Takeshita, N. Kosaka, H. Sasaki, Y. Yamamoto, M. Kouno, K. Honma, S. Nagahara, K. Hanai, A. Sano, T. Kato, M. Terada, and T. Ochiya. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*, 32:e109, 2004.

[111] S.D. Conner and S.L. Schmid. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422:37–44, 2003.

[112] G.J. Doherty and H.T. McMahon. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78:857–902, 2009.

[113] F. Sallusto, M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility

complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, 182:389–400, 1995.

[114] E. Perret, A. Lakkaraju, S. Deborde, R. Schreiner, and E. Rodriguez-Boulan. Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol*, 17:423–434, 2005.

[115] S. Mayor and R.E. Pagano. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:603–612, 2007.

[116] E.J. Ungewickell and L. Hinrichsen. Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol*, 19:417–425, 2007.

[117] F.M. Brodsky, C.Y. Chen, C. Knuehl, M.C. Towler, and D.E. Wakeham. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:517–568, 2001.

[118] S.J. Royle. The cellular functions of clathrin. *Cell Mol Life Sci*, 63:1823–1832, 2006.

[119] T.V. Kurzchalia and R.G. Parton. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*, 11:424–431, 1999.

[120] R.G. Parton and K. Simons. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:185–194, 2007.

[121] W. Schubert, P.G. Frank, B. Razani, D.S. Park, C.W. Chow, and M.P. Lisanti. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem*, 276:48619–48622, 2001.

[122] M. Drab, P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F.C. Luft, A. Schedl, H. Haller, and T.V. Kurzchalia. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*, 293:2449–2452, 2001.

[123] F. Galbiati, J.A. Engelman, D. Volonte, X.L. Zhang, C. Minetti, M. Li, H. Hou, B. Kneitz, W. Edelmann, and M.P. Lisanti. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem*, 276:21425–21433, 2001.

[124] B. Razani, X.B. Wang, J.A. Engelman, M. Battista, G. Lagaud, X.L. Zhang, B. Kneitz, H. Hou, G.J. Christ, W. Edelmann, and M.P. Lisanti. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol*, 22:2329–2344, 2002.

[125] A. Tagawa, A. Mezzacasa, A. Hayer, A. Longatti, L. Pelkmans, and A. Helenius. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol*, 170:769–779, 2005.

[126] L. Pelkmans, T. Bürli, M. Zerial, and A. Helenius. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*, 118:767–780, 2004.

[127] P.U. Le and I.R. Nabi. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the Endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 116:1059–1071, 2003.

[128] R.G.W. Anderson and K. Jacobson. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*, 296:1821–1825, 2002.

[129] M. Overhoff and G. Sczakiel. Phosphorothioate-stimulated uptake of short interfering RNA by human cells. *EMBO Rep*, 6:1176–1181, 2005.

[130] M. Rompf. Studies on the relationship between subcellular localization and biological efficiency of siRNA and siRNA-peptide conjugates. Masterarbeit, Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck, 2007.

[131] M. Overhoff. Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung von small interfering RNA (siRNA) und ein neuartiges Konzept zu ihrer Einschleusung in Säugerzellen. Doktorarbeit, Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck, 2006.

[132] A. Mescalchin, A. Detzer, M. Wecke, M. Overhoff, W. Wuensche, and G. Sczakiel. Cellular uptake and intracellular release are major obstacles to the therapeutic application of siRNA: novel options by phosphorothioate-stimulated delivery. *Expert Opin Biol Ther*, 7:1531–1538, 2007.

[133] L. Wang, S. Chen, T. Xu, K. Taghizadeh, J.S. Wishnok, X. Zhou, D. You, Z. Deng, and P.C. Dedon. Phosphorothioation of DNA in bacteria by dnd genes. *Nat Chem Biol*, 3:709–710, 2007.

[134] F. Eckstein. Phosphorothioation of DNA in bacteria. *Nat Chem Biol*, 3:689–690, 2007.

[135] S. Veldhoen, S.D. Laufer, A. Trampe, and T. Restle. Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic Acids Res*, 34:6561–6573, 2006.

[136] S.D. Laufer and T. Restle. Peptide-mediated cellular delivery of oligonucleotide-based therapeutics in vitro: quantitative evaluation of overall efficacy employing easy to handle reporter systems. *Curr Pharm Des*, 14:3637–3655, 2008.

[137] P.O. Falnes and K. Sandvig. Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol*, 12:407–413, 2000.

[138] K. Sandvig and B. van Deurs. Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 18:1–24, 2002.

[139] K. Sandvig and B. van Deurs. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther*, 12:865–872, 2005.

[140] J.M. Lord, D.C. Smith, and L.M. Roberts. Toxin entry: how bacterial proteins get into mammalian cells. *Cell Microbiol*, 1:85–91, 1999.

[141] K. Sandvig and S. Olsnes. Rapid entry of nicked diphtheria toxin into cells at low pH. Characterization of the entry process and effects of low pH on the toxin molecule. *J Biol Chem*, 256:9068–9076, 1981.

[142] K. Sandvig and S. Olsnes. Diphtheria toxin-induced channels in Vero cells selective for monovalent cations. *J Biol Chem*, 263:12352–12359, 1988.

[143] R. Ratts, C. Trujillo, A. Bharti, J. van der Spek, R. Harrison, and J.R. Murphy. A conserved motif in transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:15635–15640, 2005.

[144] R. Sannerud, J. Saraste, and B. Goud. Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route: pathways and machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 15:438–445, 2003.

[145] K. Sandvig, O. Garred, K. Prydz, J.V. Kozlov, S.H. Hansen, and B. van Deurs. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature*, 358:510–512, 1992.

[146] K. Turton, J.A. Chaddock, and K.R. Acharya. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci*, 27:552–558, 2002.

[147] W.I. Lencer and B. Tsai. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem Sci*, 28:639–645, 2003.

[148] J.X. Zhang, I. Braakman, K.E. Matlack, and A. Helenius. Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Mol Biol Cell*, 8:1943–1954, 1997.

[149] J.C. Simpson, L.M. Roberts, K. Romisch, J. Davey, D.H. Wolf, and J.M. Lord. Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett*, 459:80–84, 1999.

[150] K. Romisch. Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci*, 112:4185–4191, 1999.

[151] S. Munro and H.R. Pelham. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 48:899–907, 1987.

[152] W.I. Lencer, C. Constable, S. Moe, M.G. Jobling, H.M. Webb, S. Ruston, J.L. Madara, T.R. Hirst, and R.K. Holmes. Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol*, 131:951–962, 1995.

[153] R. Gaur, P.K. Gupta, A. Goyal, W. Wels, and Y. Singh. Delivery of nucleic acid into mammalian cells by anthrax toxin. *Biochem Biophys Res Commun*, 297:1121–1127, 2002.

[154] L.B. Barrett, M. Berry, W.B. Ying, M.N. Hodgkin, L.W. Seymour, A.M. Gonzalez, M.L. Read, A. Baird, and A. Logan. CTb targeted non-viral cDNA delivery enhances transgene expression in neurons. *J Gene Med*, 6:429–438, 2004.

[155] L.B. Barrett, A. Logan, M. Berry, W. Ying, A.M. Gonzalez, A. Baird, and L.W. Seymour. Targeted transfection of neuronal cells using a poly(D-lysine)-cholera-toxin b chain conjugate. *Biochem Soc Trans*, 27:851–857, 1999.

[156] J. Fominaya, C. Uherek, and W. Wels. A chimeric fusion protein containing transforming growth factor-alpha mediates gene transfer via binding to the EGF receptor. *Gene Ther*, 5:521–530, 1998.

[157] D.G. Wright, Y. Zhang, and J.R. Murphy. Effective delivery of antisense peptide nucleic acid oligomers into cells by anthrax protective antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, 376:200–205, 2008.

[158] L. Pelkmans and A. Helenius. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 15:414–422, 2003.

[159] A.E. Smith and A. Helenius. How viruses enter animal cells. *Science*, 304:237–242, 2004.

[160] D. Mudhakir and H. Harashima. Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus. *AAPS J*, 11:65–77, 2009.

[161] M. Marsh and A. Helenius. Virus entry: open sesame. *Cell*, 124:729–740, 2006.

[162] J.J. Skehel and D.C. Wiley. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 69:531–569, 2000.

[163] D. Kalderon, B.L. Roberts, W.D. Richardson, and A.E. Smith. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39:499–509, 1984.

[164] L.J. Brandén, A.J. Mohamed, and C.I. Smith. A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat Biotechnol*, 17:784–787, 1999.

[165] E.H. Pap, T.B. Dansen, R. van Summeren, and K.W. Wirtz. Peptide-based targeting of fluorophores to organelles in living cells. *Exp Cell Res*, 265:288–293, 2001.

[166] M. Suokas, R. Myllyla, and S. Kellokumpu. A single C-terminal peptide segment mediates both membrane association and localization of lysyl hydroxylase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 275:17863–17868, 2000.

[167] K.V.K. Mohan, I. Som, and C.D. Atreya. Identification of a type 1 peroxisomal targeting signal in a viral protein and demonstration of its targeting to the organelle. *J Virol*, 76:2543–2547, 2002.

[168] T. Ohrt, D. Merkle, K. Birkenfeld, C.J. Echeverri, and P. Schwille. In situ fluorescence analysis demonstrates active siRNA exclusion from the nucleus by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*, 34:1369–1380, 2006.

[169] B.P. Lewis, C.B. Burge, and D.P. Bartel. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120:15–20, 2005.

[170] X. Xie, J. Lu, E.J. Kulbokas, T.R. Golub, V. Mootha, K. Lindblad-Toh, E.S. Lander, and M. Kellis. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434:338–345, 2005.

[171] V. Ambros. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107:823–826, 2001.

[172] E.G. Moss. MicroRNAs: hidden in the genome. *Curr Biol*, 12:R138–R140, 2002.

[173] H.H. Qi, P.P. Ongusaha, J. Myllyharju, D. Cheng, O. Pakkanen, Y. Shi, S.W. Lee, J. Peng, and Y. Shi. Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature*, 455:421–424, 2008.

[174] Y. Zeng, H. Sankala, X. Zhang, and P.R. Graves. Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J*, 413:429–436, 2008.

[175] B.D. Adams, K.P. Claffey, and B.A. White. Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. *Endocrinology*, 150:14–23, 2009.

[176] Z. Paroo, X. Ye, S. Chen, and Q. Liu. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell*, 139:112–122, 2009.

[177] Z. Chen, T.B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M.H. Cobb. MAP kinases. *Chem Rev*, 101:2449–2476, 2001.

[178] Y. Kirino, N. Kim, M. Planell-Saguer, E. Khandros, S. Chiorean, P.S. Klein, I. Rigoutsos, T.A. Jongens, and Z. Mourelatos. Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat Cell Biol*, 11:652–658, 2009.

[179] M. Reuter, S. Chuma, T. Tanaka, T. Franz, A. Stark, and R.S. Pillai. Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat Struct Mol Biol*, 16:639–646, 2009.

[180] V.V. Vagin, J. Wohlschlegel, J. Qu, Z. Jonsson, X. Huang, S. Chuma, A. Girard, R. Sachidanandam, G.J. Hannon, and A.A. Aravin. Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev*, 23:1749–1762, 2009.

[181] T. Thomson and H. Lin. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25:355–376, 2009.

[182] I. Heo and V.N. Kim. Regulating the regulators: posttranslational modifications of RNA silencing factors. *Cell*, 139:28–31, 2009.

[183] J.W. Pham, J.L. Pellino, Y.S. Lee, R.W. Carthew, and E.J. Sontheimer. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in Drosophila. *Cell*, 117:83–94, 2004.

[184] J.R. Kennerdell, S. Yamaguchi, and R.W. Carthew. RNAi is activated during Drosophila oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes Dev*, 16:1884–1889, 2002.

[185] G.L. Sen, T.S. Wehrman, and H.M. Blau. mRNA translation is not a prerequisite for small interfering RNA-mediated mRNA cleavage. *Differentiation*, 73:287–293, 2005.

[186] G.L. Sen and H.M. Blau. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, 7:633–636, 2005.

[187] T. Sasaki, A. Shiohama, S. Minoshima, and N. Shimizu. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 82:323–330, 2003.

[188] J. Hoeck and G. Meister. The Argonaute protein family. *Genome Biol*, 9:210, 2008.

[189] A. Girard, R. Sachidanandam, G.J. Hannon, and M.A. Carmell. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442:199–202, 2006.

[190] S. Diederichs and D.A. Haber. Dual role for Argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 131:1097–1108, 2007.

[191] G.B. Robb, K.M. Brown, J. Khurana, and T.M. Rana. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 12:133–137, 2005.

[192] S. Ruedel, A. Flatley, L. Weinmann, E. Kremmer, and G. Meister. A multifunctional human Argonaute 2-specific monoclonal antibody. *RNA*, 14:1244–1253, 2008.

[193] T. Ohrt, J. Muetze, W. Staroske, L. Weinmann, J. Hoeck, K. Crell, G. Meister, and P. Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC in vivo in human cells. *Nucleic Acids Res*, 36:6439–6449, 2008.

[194] G.S. Tan, B.G. Garchow, X. Liu, J. Yeung, J.P. Morris, T.L. Cuellar, M.T. McManus, and M. Kiriakidou. Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2. *Nucleic Acids Res*, 37:7533–7545, 2009.

[195] A.K. Leung, J.M. Calabrese, and P.A. Sharp. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:18125–18130, 2006.

[196] J.M. Pare, N. Tahbaz, J. Lopez-Orozco, P. LaPointe, P. Lasko, and T.C. Hobman. Hsp90 regulates the function of Argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. *Mol Biol Cell*, 20:3273–3284, 2009.

[197] P. Anderson and N. Kedersha. RNA granules. *J Cell Biol*, 172:803–808, 2006.

[198] N. Kedersha and P. Anderson. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol*, 431:61–81, 2007.

[199] N. Kedersha, G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M.J. Fritzler, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.E. Golan, and P. Anderson. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*, 169:871–884, 2005.

[200] S. Gallois-Montbrun, B. Kramer, C.M. Swanson, H. Byers, S. Lynham, M. Ward, and M.H. Malim. Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol*, 81:2165–2178, 2007.

[201] C. Mayr, M.T. Hemann, and D.P. Bartel. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*, 315:1576–1579, 2007.

[202] A. Mescalchin, A. Detzer, U. Weirauch, M.J. Hahnel, C. Engel, and G. Sczakiel. Antisense tools for functional studies of human Argonaute proteins. Manuskript in Revision bei *RNA*, 2010 (im Druck).

[203] S.M. Elbashir, J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26:199–213, 2002.

[204] A. Detzer, M. Overhoff, W. Wuensche, M. Rompf, J.J. Turner, G.D. Ivanova, M.J. Gait, and G. Sczakiel. Increased RNAi is related to intracellular release of siRNA via a covalently attached signal peptide. *RNA*, 15:627–636, 2009.

[205] R. Kretschmer-Kazemi Far and G. Sczakiel. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 31:4417–4424, 2003.

[206] T.A. Vickers, W.F. Lima, J.G. Nichols, and S.T. Crooke. Reduced levels of Ago2 expression result in increased siRNA competition in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 35:6598–6610, 2007.

[207] V. Patzel, J. zu Putlitz, S. Wieland, H.E. Blum, and G. Sczakiel. Theoretical and experimental selection parameters for HBV-directed antisense RNA are related to increased RNA-RNA annealing. *Biol Chem*, 378:539–543, 1997.

[208] G. Sczakiel. The design of antisense RNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 7:439–444, 1997.

[209] R. Kretschmer-Kazemi Far, J. Leppert, K. Frank, and G. Sczakiel. Technical improvements in the computational target search for antisense oligonucleotides. *Oligonucleotides*, 15:223–233, 2005.

[210] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.

[211] P. Yang, X.Q. He, L. Peng, A.P. Li, X.R. Wang, J.W. Zhou, and Q.Z. Liu. The role of oxidative stress in hormesis induced by sodium arsenite in human embryo lung fibroblast (HELF) cellular proliferation model. *J Toxicol Environ Health A*, 70:976–983, 2007.

[212] H. Inoue, N. Hisamoto, J.H. An, R.P. Oliveira, E. Nishida, T. K. Blackwell, and K. Matsumoto. The C. elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev*, 19:2278–2283, 2005.

[213] V.N. Ivanov and T.K. Hei. Sodium arsenite accelerates TRAIL-mediated apoptosis in melanoma cells through upregulation of TRAIL-R1/R2 surface levels and downregulation of cFLIP expression. *Exp Cell Res*, 312:4120–4138, 2006.

[214] T. Schneider-Poetsch, J. Ju, D.E. Eyler, Y. Dang, S. Bhat, W.C. Merrick, R. Green, B. Shen, and J.O. Liu. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol*, 6:209–217, 2010.

[215] D.W. Gray and P.J. Morris. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain Technol*, 62:373–381, 1987.

[216] J.D. Dignam, R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 11:1475–1489, 1983.

[217] N. Benlimame, D. Simard, and I.R. Nabi. Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct membranous tubular organelle. *J Cell Biol*, 129:459–471, 1995.

[218] A.A. Richards, E. Stang, R. Pepperkok, and R.G. Parton. Inhibitors of COP-mediated transport and cholera toxin action inhibit simian virus 40 infection. *Mol Biol Cell*, 13:1750–1764, 2002.

[219] A. Dinter and E.G. Berger. Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol*, 109:571–590, 1998.

[220] P.A. Takizawa, J.K. Yucel, B. Veit, D.J. Faulkner, T. Deerinck, G. Soto, M. Ellisman, and V. Malhotra. Complete vesiculation of Golgi membranes and inhibition of protein transport by a novel sea sponge metabolite, ilimaquinone. *Cell*, 73:1079–1090, 1993.

[221] H.J. Wang, N. Benlimame, and I. Nabi. The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum. *J.Cell Sci.*, 110:3043–3053, 1997.

[222] G. Sczakiel and R. Kretschmer-Kazemi Far. The role of target accessibility for antisense inhibition. *Curr Opin Mol Ther*, 4:149–153, 2002.

[223] R.V. Giles and D.M. Tidd. Increased specificity for antisense oligodeoxynucleotide targeting of RNA cleavage by RNase H using chimeric methylphosphonodiester/phosphodiester structures. *Nucleic Acids Res*, 20:763–770, 1992.

[224] U. Weirauch. Komplementation von Ago2 in humanen Zellen. Masterarbeit, Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck, 2008.

[225] M.J. Hahnel. Funktionsanalyse von humanen Argonauten durch Antisense-Oligonukleotide. Bachelorarbeit, Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck, 2009.

[226] L. Weinmann, J. Hoeck, T. Ivacevic, T. Ohrt, J. Muetze, P. Schwille, E. Kremmer, V. Benes, H. Urlaub, and G. Meister. Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell*, 136:496–507, 2009.

[227] J.N. Savas, B. Ma, K. Deinhardt, B.P. Culver, S. Restituito, L. Wu, J.G. Belasco, M.V. Chao, and N. Tanese. A role for huntington disease protein in dendritic RNA granules. *J Biol Chem*, 285:13142–13153, 2010.

[228] J. Hoeck, L. Weinmann, C. Ender, S. Ruedel, E. Kremmer, M. Raabe, H. Urlaub, and G. Meister. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mrna-protein complexes in human cells. *EMBO Rep*, 8:1052–1060, 2007.

[229] J.F. Thompson, L.S. Hayes, and D.B. Lloyd. Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene*, 103:171–177, 1991.

[230] R. Juliano, M.R. Alam, V. Dixit, and H. Kang. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 36:4158–4171, 2008.

[231] S.D. Laufer. Quantitative Untersuchung der Aufnahme und des biologischen Effekts von oligomeren Nukleinsäurewirkstoffen nach Peptid-vermitteltem Transport in Säugerzellen. Doktorarbeit, Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck, 2008.

[232] F.R. Maxfield. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J Cell Biol*, 95:676–681, 1982.

[233] T. Takeuchi, M. Kosuge, A. Tadokoro, Y. Sugiura, M. Nishi, M. Kawata, N. Sakai, S. Matile, and S. Futaki. Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chem Biol*, 1:299–303, 2006.

[234] T. Shiraishi, S. Pankratova, and P.E. Nielsen. Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides. *Chem Biol*, 12:923–929, 2005.

[235] S. Abes, D. Williams, P. Prevot, A. Thierry, M.J. Gait, and B. Lebleu. Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J Control Release*, 110:595–604, 2006.

[236] G. von Heijne. The signal peptide. *J Membr Biol*, 115:195–201, 1990.

[237] N. Zheng and L.M. Gierasch. Signal sequences: the same yet different. *Cell*, 86:849–852, 1996.

[238] S. Zitzmann, V. Ehemann, and M. Schwab. Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells in vivo. *Cancer Res*, 62:5139–5143, 2002.

[239] R. Pasqualini, E. Koivunen, and E. Ruoslahti. Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat Biotechnol*, 15:542–546, 1997.

[240] B. Haley and P.D. Zamore. Kinetic analysis of the rnai enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol*, 11:599–606, 2004.

[241] S. Yekta, I.H. Shih, and D.P. Bartel. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 304:594–596, 2004.

[242] E. Maniataki and Z. Mourelatos. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*, 19:2979–2990, 2005.

[243] D. Cifuentes, H. Xue, D.W. Taylor, H. Patnode, Y. Mishima, S. Cheloufi, E. Ma, S. Mane, G.J. Hannon, N. Lawson, S. Wolfe, and A.J. Giraldez. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*, 2010.

[244] M. Kiriakidou, G.S. Tan, S. Lamprinaki, M. De Planell-Saguer, P.T. Nelson, and Z. Mourelatos. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, 129:1141–1151, 2007.

[245] S. Diederichs, S. Jung, S.M. Rothenberg, G.A. Smolen, B.G. Mlody, and D.A. Haber. Co-expression of Argonaute-2 enhances RNA interference toward perfect match binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:9284–9289, 2008.

[246] K. Lykke-Andersen, M.J. Gilchrist, J.B. Grabarek, P. Das, E. Miska, and M. Zernicka-Goetz. Maternal Argonaute 2 is essential for early mouse development at the maternal-zygotic transition. *Mol Biol Cell*, 19:4383–4392, 2008.

[247] A. Jakymiw, S. Lian, T. Eystathioy, S. Li, M. Satoh, J.C. Hamel, M.J. Fritzler, and E.K.L. Chan. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol*, 7:1267–1274, 2005.

[248] S.N. Bhattacharyya, R. Habermacher, U. Martine, E.I. Closs, and W. Filipowicz. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 125:1111–1124, 2006.

[249] A. Eulalio, I. Behm-Ansmant, D. Schweizer, and E. Izaurralde. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, 27:3970–3981, 2007.

[250] C.Y. Chu and T.M. Rana. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol*, 4:e210, 2006.

[251] E. Haustein and P. Schwille. Single-molecule spectroscopic methods. *Curr Opin Struct Biol*, 14:531–540, 2004.

[252] G.A. Peters, R. Hartmann, J. Qin, and G.C. Sen. Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol*, 21:1908–1920, 2001.

[253] C.V. Patel, I. Handy, T. Goldsmith, and R.C. Patel. PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem*, 275:37993–37998, 2000.

[254] I.M. Pedersen, G. Cheng, S. Wieland, S. Volinia, C.M. Croce, F.V. Chisari, and M. David. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*, 449:919–922, 2007.

[255] C.L. Jopling, M. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, and P. Sarnow. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309:1577–1581, 2005.

[256] A.K. Leung and P.A. Sharp. Function and localization of microRNAs in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71:29–38, 2006.

[257] F. Eckstein. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 10:117–121, 2000.

[258] L.V. Ravichandran, N.M. Dean, and E.G. Marcusson. Use of antisense oligonucleotides in functional genomics and target validation. *Oligonucleotides*, 14:49–64, 2004.

[259] Y. Lu. Recent advances in the stereocontrolled synthesis of antisense phosphorothioates. *Mini Rev Med Chem*, 6:319–330, 2006.

[260] D. Yu, E.R. Kandimalla, A. Roskey, Q. Zhao, L. Chen, J. Chen, and S. Agrawal. Stereo-enriched phosphorothioate oligodeoxynucleotides: synthesis, biophysical and biological properties. *Bioorg Med Chem*, 8:275–284, 2000.

[261] W.J. Stec and Z.J. Lesnikowski. Stereospecific synthesis of P-chiral analogs of oligonucleotides. *Methods Mol Biol*, 20:285–313, 1993.

A Anhang

A.1 Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen erläutert. Bei englisch-sprachigen Abkürzungen ist die Erläuterung ebenfalls in englischer Sprache angegeben und soweit diese im deutschen Sprachgebrauch vorhanden ist, durch eine deutsche Übersetzung ergänzt.

3'-UTR	3' untranslatierte Region
A	Adenin
AK	Antikörper
amol	Atomol
aM	Atomol pro Liter
AMF	Autokriner Motilitätsfaktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arf	*adenosine-5'-diphosphate ribosylation factor*, Adenosin-5'-diphosphat-Ribosylierungsfaktor
as	*antisense*
asAgo2	Ago2-gerichtetes *antisense* Oligonukleotid
asON	*antisense* Oligonukleotid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	*bovin serum albumin*, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	*complementary desoxyribonucleic acid*, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CH_3COONa	Natriumacetat
CHX	Cycloheximid
CTF	*cytosolic translocation factor*, zytosolischer Translokationsfaktor
CTxB	Choleratoxin-B-Untereinheit
d	*day*, Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
ds	*double-stranded*, doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
DTT	Dithiothreitol
ECGS	*endothelial cell growth supplement*, Wachstumszusatz für Endothelzellen
E.coli	*Escherichia coli*

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	*epidermal growth factor receptor*, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EIF2C2	*eukaryotic translation initiation factor 2C*, eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2C
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FDA	Fluoresceindiacetat
FKS	fötales Kälberserum
FL	Firefly Luciferase
fM	Femtomol pro Liter
fmol	Femtomol
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
GAPDH	Glycerinaldhyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GUSB	β-Glukoronidase
h	*hour*, Stunde
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
hmga2	*high mobility group AT-hook 2*
HPLC	*high performance liquid chromatography*, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	*horse radish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase
Hsp	*heat shock protein*, Hitzeschock-Protein
H_2O	Wasser
IC_{50}	Konzentration eines Inhibitors, die zur halbmaximalen Inhibition der gemessenen Reaktion führt
IgG	Immunglobulin G
IQ	Ilimaquinon
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	*knock out*
l	Liter
LF2000	*Lipofectamine™ 2000*
LNA	*locked nucleic acid*
mol	Mol
M	Mol pro Liter
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*, Mitogen-aktivierte Proteinkinase
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid

min	Minuten
mmol	Millimol
mM	Millimol pro Liter
miRISC	*micro ribonucleic acid loaded RNA induced silencing complex*
miRNA	*micro ribonucleic acid*
miRNP	*micro ribonucleic acid* enthaltender Ribonukleoproteinkomplex
mRNA	*messenger ribonucleic acid*, Vorläufer-Ribonukleinsäure
Na_2HPO_4	Natriumdihydrogenphosphat
$NaAsO_2$	Natriumarsenit
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NLS	*nuclear localization signal*, Kernlokalisation-Signal
nmol	Nanomol
nM	Nanomol pro Liter
NP40	Nonidet P40
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OMe	2'O-Methyl
OMe-ON	2'O-Methyl-modifiziertes Oligonukleotid
ON	Oligonukleotid
ORF	*open reading frame*, offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PACT	*protein kinase R activator*, Proteinkinase R-Aktivator
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	*processing bodies*, Prozessierungskörperchen
PBS	*phosphat-buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung
piRNA	*Piwi interacting ribonucleic acid*
pmol	Pikomol
pM	Pikomol pro Liter
PMO	Phosphoroamidat Morpholino Oligomer
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PNA	*peptide nucleic acid*
PNS	*post nuclear supernatant*, postnukleärer Überstand
Pol	Polymerase
pre-miRNA	*precursor micro ribonucleic acid*
pri-miRNA	*primary micro ribonucleic acid*
PS	Phosphorothioat
PS-ON	Phosphorothioat-modifiziertes Oligonukleotid
PTS1	*peroxisomal targeting signal 1*, peroxisomale Zielsteuerungssequenz
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	*quantitative polymerase chain reaction*, quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RFU	*relative fluorescence unit*, relative Fluoreszenzeinheit
RISC	*RNA induced silencing complex*

RL	*Renilla* Luciferase
RLU	*relative light unit*, relative Lichteinheit
RNA	*ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	*reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse Transkription
S	Svedberg-Einheit
SDS	*sodium dodecyl sulfat*, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulfat* Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SG	Stressgranule
shRNA	*short hairpin ribonucleic acid*
siRNA	*small interfering ribonucleic acid*
ss	*single-stranded*, einzelsträngig
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
T4-PNK	T4-Polynukleotidkinase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TCA	*trichloracetic acid*, Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylendiamin
TRBP	*TAR RNA binding protein*, TAR RNA-bindendes Protein
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	*vascular endothelial growth factor*, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vgl	vergleiche
v/v	*volume per volume*, Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	*weight per volume*, Gewicht pro Volumen
XC	Xylencyanol
μmol	Mikromol
μM	Mikromol pro Liter

A.2 Lebenslauf

Anke Detzer

Persönliche Daten

Geburtsdatum	**15. Juli 1982**
Geburtsort	**Greifswald**
Familienstand	**ledig**
Nationalität	**deutsch**

Ausbildung

seit 11/2007 **Wissenschaftliche Angestellte (Doktorandin)**
Institut für Molekulare Medizin, UKSH und Universität zu Lübeck

2005 – 2007 **Studium Molecular Life Science**
Universität zu Lübeck, Master of Science, Gesamtnote 1,4 (sehr gut)

09 –12/2006 **Praktikum am Medical Research Council**
Laboratory of Molecular Biology, Cambrigde, UK

2002 – 2005 **Studium Molecular Life Science**
Universität zu Lübeck, Bachelor of Science, Gesamtnote 1,8 (gut)

1989 – 2002 **Schulausbildung**
Sportgymnasium Schwerin, Abitur, Gesamtnote 1,4 (sehr gut)

Im Rahmen der Dissertation betreute Abschlussarbeiten

2010 **Untersuchung des Metabolismus von humanem Ago2**
Christina Engel, Masterarbeit

2008 **Erprobung und Charakterisierung von *antisense* Oligonukleotiden zur Funktionsanalyse von humanem Ago1**
Christina Engel, Bachelorarbeit

2008 **Komplementation von Ago2 in humanen Zellen**
Ulrike Weihrauch, Masterarbeit

A.3 Publikationsliste

Wesentliche Teile dieser Arbeit haben zu den folgenden Publikationen beigetragen.

Originalartikel

A. Detzer, C. Engel, W. Wünsche, and G. Sczakiel. Cell stress is related to decreased RNA interference in human cells. *Nucleic Acids Research*, 2010 (im Druck).

A. Mescalchin, **A. Detzer**, U. Weirauch, M. J. Hahnel, C. Engel, and G. Sczakiel. Antisense tools for functional studies of human Argonaute proteins. *RNA*, 2010 (im Druck).

A. Detzer, M. Overhoff, W. Wünsche, M. Rompf, J. J. Turner, G. D. Ivanova, M. J. Gait, and G. Sczakiel. Increased RNAi is related to intracellular release of siRNA via a covalently attached signal peptide. *RNA*, 15:627–636, 2009.

A. Detzer, M. Overhoff, A. Mescalchin, M. Rompf, and G. Sczakiel. Phosphorothioate- stimulated cellular uptake of siRNA: a cell culture model for mechanistic studies. *Current Pharmaceutical Design*, 14:3666–3673, 2008.

Übersichtsartikel

A. Detzer and G. Sczakiel. Phosphorothioate-stimulated uptake of siRNA by mammalian cells: a novel route for delivery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9:1109–1116, 2009.

A. Mescalchin, **A. Detzer**, M. Wecke, M. Overhoff, W. Wünsche, and G. Sczakiel. Cellular uptake and intracellular release are major obstacles to the therapeutic application of siRNA: novel options by phosphorothioate-stimulated delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7:1531–1538, 2007.

Buchkapitel

S. Laufer, **A. Detzer**, G. Sczakiel, and T. Restle. Selected strategies for the delivery of siRNA *in vitro* and *in vivo*. *RNA Technologies and Their Application*, Springer, 1. Auflage, Seite 29-58, 2010.

Patentanträge

A. Detzer, C. Engel, A. Mescalchin, and G. Sczakiel. Oligonukleotide zur Hemmung und Detektion von humanem Argonaute-2. Anmelder: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Deutsche Antragsnummer: DE 10 2009 024 731.9. Prioritätsdatum: 06. Juli 2009.

A. Detzer, U. Weirauch, and G. Sczakiel. Oligonukleotide zur Hemmung und Detektion von humanem Argonaute-1. Anmelder: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Deutsche Antragsnummer: DE 10 2009 024 732.7. Prioritätsdatum: 06. Juli 2009.

A. Detzer, C. Engel, A. Mescalchin, U. Weirauch, A. Erogullari, and G. Sczakiel. Oligonukleotide zur Hemmung und Detektion von humanen Argonaute-Proteinen. Anmelder: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Anmeldung: PCT/EP 2010/003067. Prioritätsdatum: 19. Mai, 2010.

A.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Dissertation anzufertigen und maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben.
Ganz besonders danke ich:

- **Prof. Dr. Georg Sczakiel** – für die überaus interessante Themenstellung und die sehr zeitintensive und persönliche Betreuung in allen Phasen dieser Dissertation.
- **Prof. Dr. Norbert Tautz** und **Prof. Dr. Thomas Peters** – für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen bzw. den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.
- **Dr. Michael J. Gait**, **Dr. Gabriella D. Ivanova** und **Dr. John J. Turner** vom MRC – Laboratory of Molecular Biology (Cambridge, UK) – für die Synthese der siLAM-Peptid-Konjugate und allen Mitglieder der Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme in ihrem Labor.
- **Prof. Dr. Jens Lykke-Andersen** von der University of California San Diego (La Jolla, CA, USA) – für das freundliche Überlassen des Anti-Dcp1A-Antikörpers.
- **Ulrike Weirauch** und **Christina Engel** – für ihre fleißige Mitarbeit an meinen Dissertations-Projekten während ihrer Master- und Bachelorarbeit bzw. ihres Blockpraktikums.
- **Dr. Marita Overhoff** – für die initiale Einarbeitung in das Projekt der siLAM-Peptid-Konjugate.
- **Winfried Wünsche** – für seine besondere Hilfsbereitschaft, fruchtbare Diskussionen und mein Asyl in seiner klimatisierten „Oase“.
- **Petra Höltig** – dafür, dass sie mir stets die so ungeliebten bürokratischen Angelegenheiten abgenommen hat und immer ein offenes Ohr für alle großen und kleinen Probleme innerhalb und ausserhalb des Laboralltags hat.
- meinen Mit-Doktoranden/innen, **Ulrike Haas**, **Simon Dornseifer**, **Andrea Deerberg** und **Mira Elbasyouny** sowie **Dr. Sandra Laufer** – für die gute Laune, die moralische Unterstützung und eine tolle Zeit innerhalb und ausserhalb des Laboralltags.
- **allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin** und im Speziellen **Gabriele Kreutzfeldt** und **Dr. Rosel Kretschmer-Kazemi Far** – für ihre Hilfsbereitschaft und das sehr angenehme und persönliche Arbeitsklima.
- **den Mädels** – für das wöchentliche Fokussieren auf die wirklich wichtigen Dinge im Leben.
- **meinen Eltern** und **meiner Schwester** – für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihr stetes Bemühen Ruhe und Entspannung in meinem doch eher hektischen Alltag unterzubringen.
- **Fabian** – für seinen unerschütterlichen Optimismus, dem selbst ich mich nicht entziehen kann, für den 24-Stunden Latex-Support (ich weiss, das war ein K(r)ampf) und dafür, dass er mich durch seinen steten Glauben an mich und meine Fähigkeiten durch so einige Tiefpunkte hindurch gelotst hat.