

# **Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

**der**

**Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der**

**Universität zu Lübeck**

**vorgelegt von**

**Diplom Humanbiologin Marita Overhoff**

**geboren am 05. 07. 1976 in Thuine**

**Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung von small  
interfering RNA (siRNA) und ein neuartiges Konzept zu ihrer  
Einschleusung in Säugerzellen**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Medizin  
der Universität zu Lübeck unter der Betreuung von  
Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel durchgeführt.

Hiemit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt zu haben.

Lübeck, den 21. 12. 2005

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

**Overhoff,M.** and Sczakiel,G. (2005). Phosphorothioate-stimulated uptake of short interfering RNA by human cells. *EMBO Rep.* 6, 1176-1181.

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

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

## Verzeichnis wichtiger Abkürzungen und Symbole

A	Adenin
AA	Acrylamid
Abb	Abbildung
abs	absolut
AGO	Argonaut Protein
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
asRNA	Antisense-Ribonukleinsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BJAB	humane B-Zelllinie
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ci	Curie
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
d	Durchmesser
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCL	Dicer ähnliches Protein ( <u>D</u> icer <u>l</u> ike <u>p</u> rotein)
Dcr	Dicer
dCTP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DGCR8	DiGeorge Syndrom kritisches Regiongen ( <u>D</u> i <u>G</u> eorge Syndrome <u>c</u> ritical <u>r</u> egion gene <u>8</u> )
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DRBP	dsRNA Bindungsprotein
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
DSRM	dsRNA Bingsmotif
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig ( <u>d</u> ouble <u>s</u> tranded)
DTT	Dithiothreitol

dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
ECGF	Endothelzell Wachstumsfaktor
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa	Firma
FKS	fötales Kälberserum
fl	flüssig
FXR	Fragiles-X-Mentales Retardations-Protein
G	Guanin
GapDH	Glycinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grünfluoreszierendes Protein
h	Stunden
HeLa	humane Zervixkarzinom Zelllinie
HUVEC	humane Nabelschnurr Endothel Zellen
LB	Luria Broth
min	Minuten
mM	Millimol pro Liter
miRNA	Micro RNA
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaPyr	Natriumpyruvat
NaOAc	Natriumacetat
NEAS	Non essential aminoacids
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ODN	Oligodeoxyribonukleotid
p.a.	zur Analyse (par analysis)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatpuffer
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNK	T4-Polynukleotidkinase
PPW	Paz/PIWI-Protein

PTO	Phosphorothioat-modifiziertes Oligonukleotid
R2D2	Protein bestehend aus 2 RNA-Bindungsmotive assoziiert mit Dcr-2
RDR	RNA abhängige RNA-Polymerase (RNA dependent RNA-polymerase)
rel	relativ
RISC	RNA-induced-silencing complex
RITS	RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing
RLC	RISC Ladungskomplex (RISC loading complex)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SID	systemic RNAi deficient protein
siRNA	small interfering RNA
ss	einzelsträngig
T	Thymin
TBE	Tris/Borat-Puffer mit EDTA
TE	Tris/HCl-Puffer mit EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
tRNA	Transfer RNA
TRBP	TAR RNA Bindungsprotein
TSN	Tudor Staphylococcus Nuklease
U	Uracil
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIG	vasa intronic gene
v/v	Volumen/ Volumen
vs	versus
w/v	Gewicht/ Volumen

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Nukleinsäuren als Träger der genetischen Information</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Nukleinsäuren als therapeutische Wirkstoffe</b>	<b>3</b>
1.2.1	Antisense-Oligonukleotide	3
1.2.2	Ribozym-Technologie	5
<b>1.3</b>	<b>RNA interference</b>	<b>5</b>
1.3.1	Prozessierung von langer doppelsträngiger RNA (dsRNA) durch Dicer zu siRNAs	7
1.3.2	Überführung von siRNAs in den RISC Komplex	8
1.3.3	Degradation der Ziel mRNA	11
1.3.4	miRNA vermitteltes gene silencing	12
<b>1.4</b>	<b>Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die RNAi-Effizienz</b>	<b>13</b>
1.4.1	Biochemische Eigenschaften der siRNA	14
<b>1.5</b>	<b>Mögliche Aufnahmewege von siRNA durch Säugetierzellen</b>	<b>14</b>
1.5.1	Makropinozytose	15
1.5.2	Clathrin-vermittelte Endocytose	15
1.5.3	Caveolin-vermittelte Endozytose	16
1.5.4	Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose	17
<b>2</b>	<b>Arbeits hintergrund und Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>20</b>
3.1.1	Chemikalien	20
3.1.2	Radiochemikalien	21
3.1.3	Material und Reagenzien für die Zellkultur	21
3.1.4	Puffer und Medien	22
3.1.5	Enzyme und Proteine	24
3.1.6	Nukleinsäuren	24
3.1.7	Geräte und sonstige Verbrauchsmaterialien	27
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
3.2.1	Techniken im Umgang mit Nukleinsäuren	28
3.2.2	Experimente mit Säugerzelllinien	32
3.2.3	Mikrobiologische Techniken und Klonierungstechniken	34
3.2.4	Nachweis der physikalischen Aufnahme von Nukleinsäuren	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>

---

<b>4.1</b>	<b>Einfluss der mRNA Struktur auf die Wirksamkeit von siRNAs</b>	<b>38</b>
4.1.1	Strukturvorhersage der mRNA	38
4.1.2	Inhibition der ICAM-1 Expression mit siRNA	39
<b>4.2</b>	<b>Entwicklung einer quantitativen Nachweismethode von siRNA</b>	<b>42</b>
4.2.1	Spontan-Aufnahme von siRNA durch humane Zellen	47
<b>4.3</b>	<b>PTO vermittelte Aufnahme von siRNA</b>	<b>48</b>
4.3.1	Chemische Struktur des Koinkubators	48
4.3.2	Sequenzabhängigkeit des Koinkubators	50
4.3.3	Längenabhängigkeit des Koinkubators	50
4.3.4	Konzentrationsabhängigkeit	51
4.3.5	Einfluss der Trypsin-Behandlung bei der Zellernte auf die aufgenommene Menge an siRNA	52
4.3.6	Aufnahme von Hairpin-RNA und ssRNA	53
4.3.7	PTO stimulierte Aufnahme in unterschiedlichen Zelllinien	54
4.3.8	Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von siRNA	55
4.3.9	Vergleich von PTO-stimulierter siRNA Aufnahme versus Transfektion	56
4.3.10	Biologische Wirksamkeit	57
4.3.11	Beschreibung des PTO-stimulierten Aufnahmeweges durch Inhibitoren und Aktivatoren	59
4.3.12	Freisetzung der siRNA aus dem Golgi	60
4.3.13	Fluoreszenzmikroskopie	62
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>Einfluss der lokalen mRNA Struktur auf die Wirksamkeit der siRNA in Säugerzellen</b>	<b>66</b>
<b>5.2</b>	<b>Aufnahme von siRNA durch Säugetierzellen</b>	<b>69</b>
5.2.1	Optimierung des Nachweisverfahrens	69
5.2.2	Internalisation versus unspezifische Membranassoziation der siRNA	70
5.2.3	Spontan-Aufnahme von siRNA	71
<b>5.3</b>	<b>Stimulation der siRNA Aufnahme durch PTO-Koinkubation</b>	<b>72</b>
5.3.1	Charakterisierung des PTO-Koinkubators für die zelluläre Aufnahme von siRNA	73
5.3.2	Konzentrationsabhängigkeit der siRNA Aufnahme in Säugerzellen	74
5.3.3	Die PTO-stimulierte Aufnahme in den unterschiedlichen Zelltypen	75
5.3.4	Die intrazelluläre siRNA zeigt einen schwachen biologischen Effekt	76

---

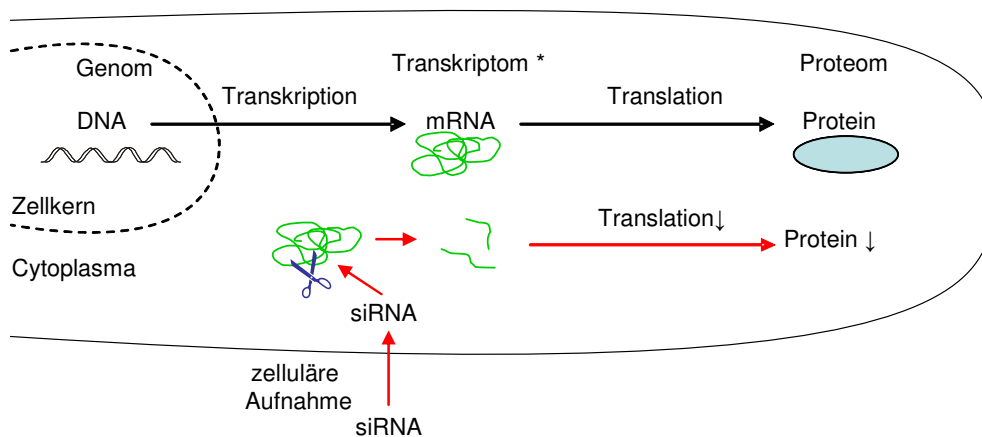
5.3.5	Es handelt sich bei der PTO-stimulierten Aufnahme um eine Caveolin-abhängige Endozytose	76
5.3.6	Lokalisation der siRNA im Golgi-Apparat	78
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>

## 1 Einleitung

Das Wissen über die molekularen Zusammenhänge der Genexpression in Zusammenhang mit der Entschlüsselung des Genoms ermöglicht neue Therapiekonzepte in der modernen Medizin. Bei der Genexpression wird die Information des Gens, während der Transkription auf die mRNA übertragen. Anschließend erfolgt die Translation bei der die Information der mRNA in ein Protein übersetzt wird (Abb. 1). Dieser Mechanismus ermöglicht Behandlungsmethoden auf den Ebenen des Genoms (Gesamtheit der genetischen Informationen einer Zelle), des Transkriptom (Gesamtheit der transkribierten mRNAs) und des Proteoms (Gesamtheit der exprimierten Proteine).

Ein sehr vielversprechendes Konzept auf der Ebene des Transkriptom ist die Nutzung der sequenzspezifischen Degradation einer Ziel-mRNA durch kleine nicht-kodierende doppelsträngige RNAs, die als „short interfering“ RNAs (siRNA) (Elbashir et al., 2001b) bezeichnet werden. Es handelt sich bei diesem Prozess, der als RNA-interference (RNAi) bezeichnet wird (Fire et al., 1998), um ein relativ neues Forschungsgebiet, in dem man noch die Grundlagen des RNAi-Wirkmechanismus genau aufklären muss.

Bei der Entwicklung von Therapeutika ist abgesehen von der Optimierung des Wirkstoffes der effektive Transfer des Wirkstoffes zum Wirkort von entscheidender Bedeutung („drug and delivery“). Die Optimierung eines möglichen Aufnahmeweges geht daher immer einher mit der Optimierung des Wirkstoffes per se.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Genexpression in der Zelle.** Die Information der DNA wird durch die Transkription auf die mRNA (grün) und nachfolgend durch Translation auf ein Protein übertragen. Die siRNAs entfalten ihre Wirkung nach der zellulären Aufnahme im Cytoplasma. Die mRNA (grün) wird sequenzspezifisch geschnitten und im Folgenden degradiert. Dadurch kann die mRNA nicht mehr translatiert werden und die Protein-Menge sinkt.

## 1.1 Nukleinsäuren als Träger der genetischen Information

Man hat schon sehr früh erkannt, dass Nachkommen in Flora und Fauna die Merkmale der Eltern zeigen, aber erst durch Mendel wurde Mitte des 19. Jahrhunderts die ersten Vererbungsregeln erkannt. Mendel entdeckte den Zusammenhang zwischen der gespeicherten Information, dem Genotyp, und dem Aussehen (Phänotyp) eines Lebewesens. Der Begriff des Gens als funktionelle Erbinheit, die die Informationen für die Ausprägung eines Merkmals von einer Generation an die nächste weitergibt, wurde in dieser Zeit geprägt. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts erkannten Biologen die Chromosomen als die Informationsträger innerhalb der Zelle. Der eigentliche Beweis dafür dass die Chromosomen die Erbträger sind, wurde erst im Jahre 1944 erbracht, indem Avery (Avery et al., 1995) durch Übertragung von DNA eines Pneumococcus-Bakterienstammes auf einen anderen Stamm auch Eigenschaften übertragen konnte. 1953 erfolgte durch Watson und Crick (Watson and Crick, 1953) die Aufklärung der Desoxyribonukleinsäure-Struktur (DNA-Struktur). Nukleinsäuren im Allgemeinen sind unverzweigte Makromoleküle, die aus aneinander gereihten Nukleotiduntereinheiten bestehen, die durch 5'-3'-Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft sind. Jede Nukleotiduntereinheit besteht aus einer Phosphatgruppe, einem Zuckermolekül und einer von vier organischen Basen (Abb. 2). Man unterscheidet zwei Klassen von Nukleinsäuren: die Desoxyribonukleinsäure, die als DNA bezeichnet wird und die Ribonukleinsäure, die als RNA bezeichnet wird. Die DNA kommt außer bei einigen Viren in lebenden Organismen nicht als Einzelstrangmolekül vor, sondern als Doppelhelix deren Stränge antiparallel zueinander verlaufen. In der Doppelhelix bildet das Zucker-Phosphatrückgrat die Außenseite und die Basen stapeln sich im Inneren und gehen dabei mit der gegenüberliegenden Base Wasserstoffbrückenbindungen ein. Aus Regeln der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen sind diese Bindungen jeweils nur zwischen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin möglich. Aufgrund dieser spezifischen Wechselwirkung zwischen den Basen bedingt der eine Strang die Basenfolge des komplementären Gegenstranges. Deswegen kann die Information der Chromosomen von einer Generation auf die nächste übertragen werden. Dabei trennen sich die Stränge der DNA-Doppelhelix und dienen jeweils als Matrize für die Synthese eines komplementären Stranges.

Die zweite Klasse der Nukleinsäuren, die RNA, liegt im Gegensatz zur DNA in den meisten Fällen als Einzelstrangmolekül in der Zelle vor. Im Aufbau unterscheidet sich die RNA von der DNA durch den Austausch des Zuckerbausteins Desoxyribose durch Ribose und der Pyrimidinbase Thymin durch Uracil. Die RNA erfüllt in der Zelle sehr unterschiedliche Aufgaben. Die wohl bekanntesten RNA-Spezies sind dabei die

mRNA, die ribosomale RNA (rRNA) und die transfer RNA (tRNA), die für die Proteinexpression unerlässlich sind. Darüber hinaus gibt es noch weitere wichtige RNAs, die gerade in den letzten Jahren zu neuen Einblicken und Erkenntnissen in der Zellbiologie und Molekularbiologie geführt haben. Die Funktion der siRNA, eine dieser entdeckten kleinen RNAs, wird im Folgenden noch näher erläutert.

Während der Proteinexpression kommt es zu dem Zusammenspiel der unterschiedlichen Nucleinsäuren. Dabei werden die Informationen der Chromosomen, bestehend aus der DNA-Doppelhelix, zunächst durch Transkription mit der RNA-Polymerase auf die mRNA übertragen. Die in der mRNA enthaltenen Informationen werden unter Berücksichtigung des genetischen Codes durch Translation an den Ribosomen, die zum Teil aus den ribosomalen RNAs bestehen, im Cytoplasma in Proteine umgewandelt (Abb. 1).

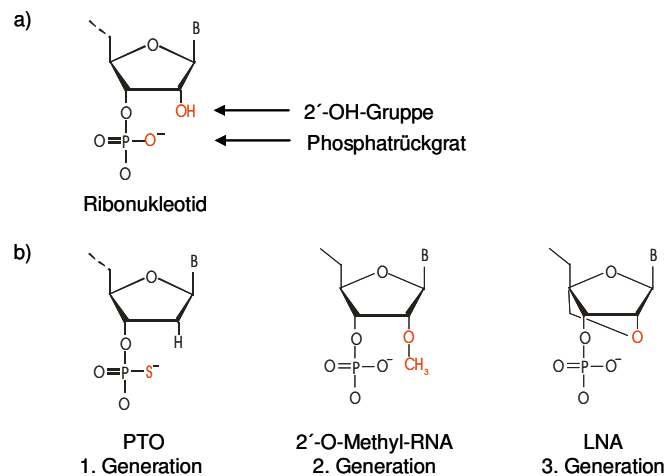
## 1.2 Nucleinsäuren als therapeutische Wirkstoffe

Nucleinsäure-Wirkstoffe sind molekulare Werkzeuge um Genexpression sequenzabhängig zu inhibieren und werden daher für funktionelle Genomuntersuchungen und für therapeutische Zwecke genutzt. Es gibt unterschiedliche Ansätze, die sequenzabhängig zur Degradation einer mRNA führen. Als wichtige Beispiele gelten: 1. die Antisense-Technologie, bei der ein zur Target mRNA komplementäres Oligonukleotid verwendet wird und zur Spaltung der mRNA durch RNase H führt (Bennett and Cowser, 1999), 2. die Ribozym-Technologie, bei der katalytisch wirksame RNAs die Ziel-mRNA spalten (zur Übersicht: James and Gibson, 1998) und 3. die RNAi-Technologie, bei der eine doppelsträngige RNA zur Spaltung der komplementären Ziel-mRNA führt (Elbashir et al., 2001a).

### 1.2.1 Antisense-Oligonukleotide

Antisense-Oligonukleotide (AS-ON) besitzen eine Länge von zirka 15- 25 nt und sind komplementär zu ihrer Ziel-mRNA (zur Übersicht: Kurreck, 2003). Es gibt zwei unterschiedliche Wirkmechanismen für AS-ON. Zum einen binden AS-ON über Watson-Crick-Basenpaarung an die lokale Ziel-Region der Ziel-RNA und aktivieren RNase H, die die Spaltung des RNA-Stranges von DNA-RNA-Duplexen in der Zelle katalysiert. Die Aktivierung der RNase H führt so zur sequenzabhängigen Degradation der Ziel-mRNA (Crooke, 1998). Der zweite Wirkmechanismus von AS-ON führt über die Blockade der Translation der mRNA. Dabei bindet das Oligonukleotid im 5'-UTR (untranslated region) in der Nähe der Translations-Initiationsstelle der mRNA und blockiert somit die Zusammenlagerung des Translationskomplexes quasie sterisch, sodass die Translation der mRNA nicht mehr stattfinden kann.

Die sequenzabhängige Degradation einer mRNA bzw. die spezifische Translationsinhibition führt zu einer Reduktion der Menge des entsprechenden Proteins. Damit man dieses auch *in-vivo* anwenden kann, müssen die verwendeten AS-ON eine hohe Halbwertszeit in biologischen Flüssigkeiten aufweisen. Die Halbwertszeit von DNA beträgt in biologischen Flüssigkeiten wie z.B. Blut nur zirka eine Stunde. Aus diesem Grund wurden die Nukleotide zwecks Stabilitätserhöhung chemisch modifiziert (siehe Abb. 2). Zur ersten Generation dieser Modifikationen gehört die Phosphorothioat-Modifikation (De Clercq et al., 1969; Eckstein, 2000), die die Halbwertszeit der Oligonukleotide im humanen Serum von einer Stunde im unmodifizierten Zustand auf 9 bis 10 Stunden im modifizierten Zustand erhöht (Campbell et al., 1990; Phillips and Zhang, 2000; Kurreck et al., 2002). Da Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide (PTOs) eine unspezifische Bindungsaffinität zu einigen Proteinen aufweisen (Brown et al., 1994; Guvakova et al., 1995), wurden noch weiteren Modifikationen entwickelt. Zu dieser zweiten Generation der Modifikationen gehört die 2'-O-Methyl-RNA Modifikation, die zwar die unspezifische Proteinbindungsaffinität verringert aber nicht die RNase H aktivieren kann (Zamaratski et al., 2001). Dieses Problem wurde durch die Entwicklung von als Gapmer bezeichnete AS-ON gelöst. Ein Gapmer besitzt einen zentralen Block aus Deoxyribonukleotiden, der eine RNase H Spaltung zulässt, und wird flankiert von modifizierten Nukleotiden, die das AS-ON vor Degradation schützen. Mittlerweile gibt es die dritte Generation der Modifikationen mit z.B. den geschlossenen (locked) Nukleinsäuren (LNA) (Orum and Wengel, 2001; Elayadi and Corey, 2001), die im Vergleich zu RNA-RNA und RNA-DNA-Hybriden eine erhöhte Bindungsaffinität zu ihrer Targetregion aufweisen (Christensen et al., 2001).



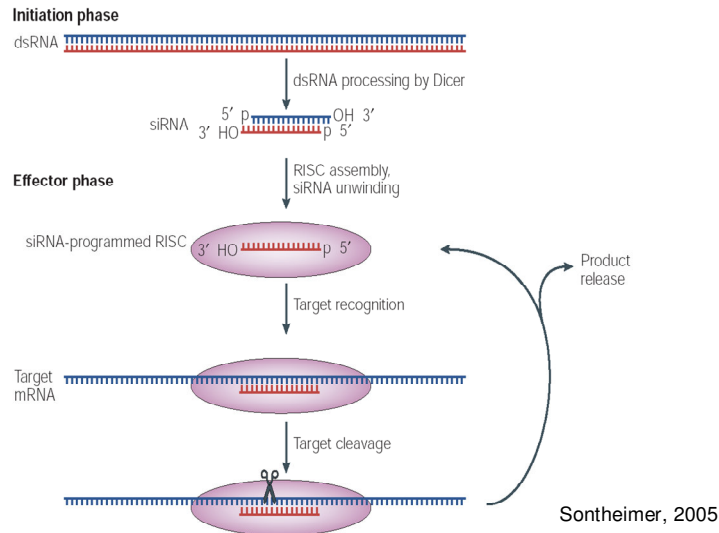
**Abb. 2: Chemisch modifizierte Nukleotide.** B stellt eine der Basen Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymin dar. a) Die Stellen der möglichen Modifikationen sind rot dargestellt und mit einem Pfeil gekennzeichnet. b) Die Modifikationen sind in den Abbildungen der modifizierten Nukleotide rot dargestellt.

### 1.2.2 Ribozym-Technologie

Ribozyme sind RNA-Moleküle mit katalytischer Aktivität. Sie wurden von Cech und Kollegen durch Beobachtungen an selbstspaltenden RNA-Molekülen entdeckt (Cech et al., 1981). Kurze Zeit später wurde von Altman und Kollegen die katalytische RNA in der RNase P entdeckt (Guerrier-Takada et al., 1983). Die intramolekulare RNA-Spaltung wird als *cis*-Reaktion und die intermolekulare RNA-Spaltung als *trans*-Reaktion bezeichnet. In den folgenden Jahren wurden weitere Ribozyme entdeckt. Darunter befanden sich die Hammerhead-, Hairpin- und Hepatitis Delta Virus Ribozyme aus Viren. Die Arbeiten von Uhlenbeck (Uhlenbeck, 1987) und Haseloff (Haseloff and Gerlach, 1988) ermöglichten die Kombination einer katalytischen Domäne mit flankierenden Sequenzen, sodass man Ribozyme konstruieren kann, die sequenzabhängig ihre Ziel-mRNA in *trans* spalten. Damit führen so konstruierte Hammerhead-Ribozyme zur sequenzspezifischen Degradation der Ziel-mRNA. Des Weiteren können die Hammerhead Ribozyme durch die Bindung an ihre Ziel-mRNA auch die Translation der mRNA verhindern (Christoffersen and Marr, 1995), wie es auch bei AS-ONs der Fall ist. Das Hammerhead-Ribozyme gilt als eines der am besten untersuchten Ribozyme.

### 1.3 RNA interference

In den letzten Jahren wurden kleine nicht-kodierende doppelsträngige RNAs entdeckt, die zur sequenzabhängigen Degradation der Ziel-RNA führen. Dieser als RNA interference (RNAi) bezeichnete Prozess ist ein posttranskriptionaler gene silencing Mechanismus (Bernstein et al., 2001b) der in eine Initiations- und eine Effektorphase unterteilt wird (Bernstein et al., 2001a). Während der Initiationsphase wird aus einer langen doppelsträngigen RNA mittels Dicer (Ketting et al., 2001; Bernstein et al., 2001a), einer Multidomänen Ribonuclease III, eine 21-26 nt lange, doppelsträngige RNA mit 2 Nukleotiden Überhang am 3'-Ende, die small interfering RNA (siRNA) (Carmell and Hannon, 2004), geschnitten. Diese siRNA katalysiert in der Effektorphase in einem Zusammenspiel mit dem RISC Komplex (RNA induced silencing complex) (Tomari and Zamore, 2005; Sontheimer, 2005), einem Riboproteinkomplex, die Degradation einer komplementären Ziel-RNA.



**Abb. 3: RNA interference.** Während der Initiationsphase schneidet Dicer lange doppelsträngige RNA zu siRNAs. In der Effektorphase schneidet der mit siRNA programmierte RISC-Komplex sequenzabhängig die Ziel-RNA.

Des Weiteren kann die siRNA zusammen mit RITS (RNA induced initiation of transcriptional gene silencing) (Verdel et al., 2004), einem weiteren Riboproteinkomplex, zu Heterochromatin-Modifikationen (Ekwall, 2004; Baulcombe, 2004; Jones et al., 2001) führen. RNAi konnte bislang in Pflanzen, dort als PTGS (posttranskriptionales gene silencing) bezeichnet, über Protozoen, bis hin zu Tieren nachgewiesen werden.

Diese sequenzabhängige Degradation der Ziel-mRNA ist momentan ein sehr wichtiges Werkzeug für die funktionelle Genomforschung. Zusätzlich sieht man in dem RNAi Prozess ein großes Potential für den therapeutischen Einsatz.

RNAi wurde 1998 von Fire und Kollegen entdeckt indem sie parallel sense und antisense RNA in *C. elegans* injizierten und feststellten, dass diese kombinierte Gabe aufgrund der Doppelstrangbildung sehr viel potenter wirkt als eine Einzelgabe (Fire et al., 1998). Grundlage für diesen Versuch war die Beobachtung von Guo und Kempfues, dass sense RNA als antisense Wirkstoff sehr effektiv ist (Guo and Kempfues, 1995). Nach dem 2001 Elbashir und Kollegen (Elbashir et al., 2001a) herausfanden, dass man die RNAi auch in Säugetierzellen zur Hemmung der Genexpression nutzen kann, war der Weg frei für die Nutzung von RNAi in der funktionellen Genomforschung.

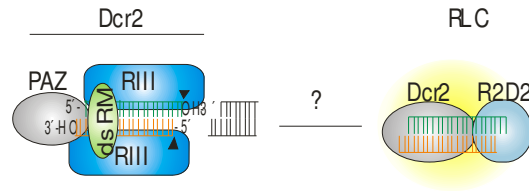
### 1.3.1 Prozessierung von langer doppelsträngiger RNA (dsRNA) durch Dicer zu siRNAs

RNA interference wird durch lange doppelsträngige RNA (dsRNA) initiiert. Die Tatsache, dass RNAi in Würmern von einer Generation zur nächsten vererbbar ist (Grishok et al., 2001), führte zu der Vermutung, dass es neben der langen dsRNA noch ein stabiles Intermediat geben müsse, dessen Struktur oder Chemie die Erkennung einer Ziel-RNA Region ermöglicht. Dieses wurde im Jahre 2000 parallel von 3 Arbeitsgruppen bestätigt, indem gezeigt wurde, dass lange dsRNA durch endonucleolytische Spaltung in 21-26 nt lange dsRNA umgewandelt wird (Hamilton and Baulcombe, 1999; Zamore et al., 2000; Hammond et al., 2000). Die verantwortliche RNase heißt Dicer, eine Multidomänen Ribonuclease III, die lange dsRNA von den Enden ausgehend in siRNA spaltet. Dicer besteht aus 2 RNase III Motiven (Mian, 1997; Rotondo and Fire, 1996), einer dsRNA Bindungsdomäne DSRM (dsRNA-binding motif) (Aravind and Koonin, 2001), einer DExH–RNA-Helikase/ATPase Domäne (Asp(D)-Glu(E)-x-His(H)) und einer Domäne unbekannter Funktion DUF283 (domain of unknown function) (Carmell and Hannon, 2004). Die meisten, aber nicht alle, Dicer-Proteine besitzen ein PAZ-Motiv (Piwi, Argonaute und Zwille Protein) (Cerutti et al., 2000).



**Abb. 4: Schematischer Aufbau von Dicer.** Dicer besteht aus 2 RNase-III-Motiven (RIII), einer RNA-Helikase (DExH-Helikase), einer Domäne unbekannter Funktion (DUF283), einem PAZ-Motiv und einer dsRNA-Bindungsdomäne (DSRM) (Carmell and Hannon, 2004).

Aufgrund biochemischer Analysen der *E.coli* RNase III und dem humanen Dicer geht man davon aus, dass Dicer ein RNA-Prozessierungs-Zentrum aus den RNase III Domänen und den dsRNA Bindungsdomänen DSRM und PAZ besitzt (Zhang et al., 2004). Dabei spaltet jede RNase III Domäne einen Strang der langen dsRNA und hinterlässt an beiden 3´-Enden der RNA 2 Nukleotide Überhang (siehe Abb. 5). Das Ende der langen dsRNA wird dabei von der PAZ-Domäne erkannt und es kommt so zu einer katalytischen Spaltung in ~ 20bp Entfernung (Zhang et al., 2002; Zhang et al., 2004) .



**Abb. 5: Zusammensetzung des Dicer-Komplexes in *Drosophila melanogaster* und Anlagerung von Dcr2 an die Ziel dsRNA.** Dcr2 besteht aus den RNase III, PAZ und dsRM Domänen, die sich um die dsRNA anlagern. Nach der Spaltung der langen dsRNA zu einer siRNA kommt es auf bislang noch nicht geklärtem Weg zur Überführung in den RISC Loading Complex RLC.

Die Anzahl der codierten Dicer Proteine variiert in den untersuchten Spezies von einem bis zu vier Proteinen. *C.elegans* und Vertebraten codieren jeweils nur ein Dicer Protein, wohingegen in *Drosophila* 2 Dicer Proteine (Dcr1 und Dcr2) exprimiert werden. Es gibt in den untersuchten Spezies mehrere dsRNA Bindungsproteine die mit Dicer assoziieren, wie z.B. R2D2 in *Drosophila*, RDE-4 in *C.elegans* und TRBP in Säugetieren. Ob diese Proteine schon eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung der langen dsRNA spielen, ist noch nicht eindeutig geklärt, sicher ist nur, dass sie essentiell für die Überführung der siRNA in den RISC Komplex (Tomari and Zamore, 2005) sind und dass die Dicer Proteine auch ohne Assoziation mit anderen Proteinen in der Lage sind, lange dsRNAs zu spalten (Jaronczyk et al., 2005).

### 1.3.2 Überführung von siRNAs in den RISC Komplex

Die Zusammensetzung des RISC-Komplexes ist in den untersuchten Spezies sehr komplex und beinhaltet je nach Spezies unterschiedliche Proteine (siehe Tab. 1). Am besten ist der schrittweise Zusammenbau bislang für *Drosophila melanogaster* in vitro untersucht worden. Man weiß noch nicht, ob man die einzelnen dort beobachteten Schritte für andere Spezies übernehmen kann.

Spezies Proteine	Vertebraten	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	Pflanzen
<b>Argonaute-Proteine</b>	Ago1 Ago2 Ago3 Ago4	Aubergine Ago1 Piwi Ago2	RDE-1 Alg-1 Alg-2 PPW-2 PPW-1	Ago1 Ago2
<b>RNase III Proteine</b>	Dicer Drosha	Dcr-1 Dcr-2 Drosha	Dcr-1 Drosha	DCL1 DCL2 DCL3
<b>Helikasen</b>	Gemin 3	Spindle-E Armitage	DRH-1/DRH-2 SMG-2 MUT-14	SDE3
<b>RNA-abhängige RNA-Polymerasen</b>			RRF-1 EGO-1 RRF-3	SGS2/SDE1 RDR1 RDR2
<b>dsRNA-Bindungsproteine</b>	DGCR8 TRBP	R2D2 Pasha Loquacious	RDE-4	Hyl1 DRB4
<b>weitere Proteine</b>	TSN Exportin-5 Gemin4	VIG FXR Tudor-SN	ERi-1 RDE-3 SID-1 MUT-7 MUT-8 VIG-1 TSN-1	HEN1 SGS3 SDE4/PoI IV HASTY

**Tab. 1: Proteine, die am „Gene silencing“ in verschiedenen Spezies beteiligt sind.** Ago: Argonaute; Dcr: Dicer; TSN: Tudor-Staphylococcus Nuklease; VIG: „vasa intronic gene“; FXR: Fragiles-X-mental Retardations-Protein; MUT: Mutante; TRBP: TAR RNA Bindungsprotein; DGCR8: DiGeorge Syndrome critical region gene 8; DCL: Dicer like protein; SID: systemic RNAi deficient; DRB: dsRNA Bingsprotein; RDR: RNA dependent RNA-Polymerase; PPW: PAZ/PIWI-Protein;

Der zentrale Schritt bei der Zusammenlagerung des RISC-Komplexes ist der Einbau der siRNA. Die siRNA besteht aus einem „guide-strand“, der komplementär zur Ziel-RNA ist, und einem „passenger-strand“, der im Verlaufe der RISC-Zusammensetzung aus dem Komplex entfernt werden muss. Der Führungsstrang der siRNA („guide-strand“) leitet den RISC-Komplex zur Ziel-RNA (Abb. 6).

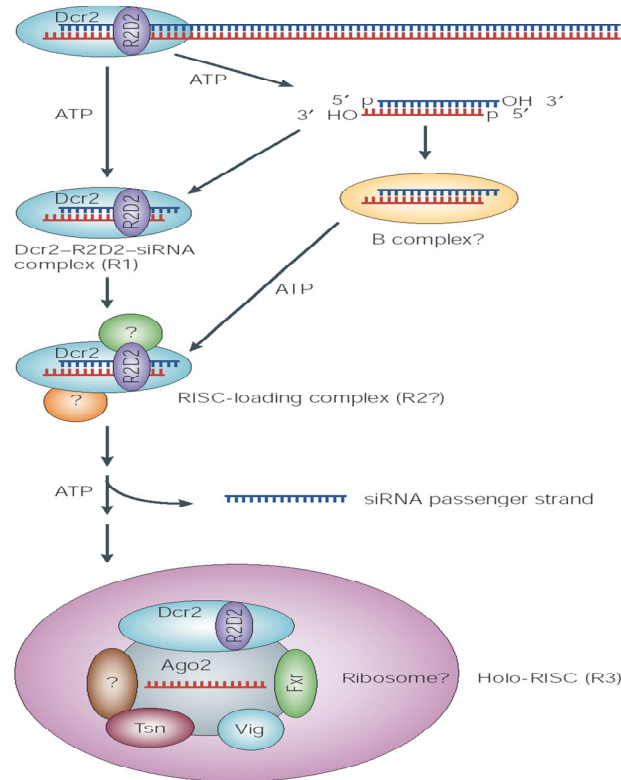
In *Drosophila melanogaster* wird die siRNA vom Dcr2/R2D2 Komplex aufgrund thermodynamischer Unterschiede in den beiden Strängen der siRNA gebunden. Diese thermodynamischen Unterschiede entscheiden darüber, welcher Strang präferentiell in den RISC Komplex eingebaut wird (Schwarz et al., 2003).

Es gibt 2 unterschiedliche Wege, die für den Zusammenbau diskutiert werden. In dem einen Weg beginnt die RISC-Zusammenlagerung mit der Bindung der nach der Prozessierung nicht mehr an Dicer gebundenen siRNA an ein bislang nicht identifiziertes Protein, um den Komplex B zu bilden (Abb. 6). Dabei ist *in-vitro* die Bildung des Komplexes B der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu dem besser

aufgeklärten RISC Ladungs Komplex RLC (Tomari et al., 2004b). Der RLC Komplex enthält sowohl Dcr2 als auch R2D2, zusätzlich zu noch nicht identifizierten weiteren Proteinen. Beide Proteine werden auch *in vivo* für RNAi und die Bildung des RLCs (Tomari et al., 2004a) benötigt. Dabei spielt R2D2 die entscheidende Rolle in der Erkennung der innerhalb der siRNA vorliegenden Stabilitäten (siehe 1.4.1)(Tomari et al., 2004b) und damit für den Einbau des entsprechenden siRNA Stranges in den späteren RISC Komplex (zur Übersicht: Tomari and Zamore, 2005).

Die zweite diskutierte Möglichkeit stammt von Sontheimer und Kollegen (zur Übersicht: Sontheimer, 2005). Dabei geht die Zusammenlagerung des RISC Komplexes zuerst über einen R1 Komplex der aus siRNA, Dcr2 und R2D2 besteht und direkt aus der Prozessierung der langen dsRNA stammt. Die Assoziation dieses Komplexes ist nicht ATP abhängig (Nykanen et al., 2001). Aus diesem Komplex entsteht in Verbindung mit einigen noch nicht aufgeklärten Proteinen in einem ATP-abhängigen Prozess der RLC (Abb. 6). Ob es sich bei den Komplexen B und R1 um ein und denselben Komplex handelt ist noch nicht geklärt.

Im RLC liegt die vorrangig doppelsträngige siRNA (ds siRNA) an das Dcr2/R2D2 Heterodimer gebunden vor. An diesen Komplex binden sich die schon vorher assoziierten Proteine Ago2 (Argonaute Protein 2), Dcr1 (Dicer 1), Fmr1 (Fragiles-x-Mental Retardations-Protein), Tsn (Tudor Staphylococcus Nuklease) und Vig (Vasa intronic gene) und bilden zusammen mit dem Dcr2/R2D2 Heterodimer den HoloRISC Komplex (Ma et al., 2004; Lingel et al., 2004; Song et al., 2004). Das Argonaute Protein Ago 2 interagiert direkt über die PIWI-Domäne mit der RNase III Domäne von Dcr2 im Dcr2/R2D2 Heterodimer und verdrängt diese während des noch nicht näher aufgeklärten Aufwindungsprozess der siRNA aus der direkten Bindung mit der siRNA (Okamura et al., 2004; Tomari et al., 2004b). Das Dcr2/R2D2 Heterodimer bleibt mit dem HoloRISC Komplex assoziiert und bildet zusammen mit diesem den RISC-Komplex, der für die Degradation der Target-RNA verantwortlich ist. Der „passenger-strand“ wird im RISC-Komplex von Ago2 geschnitten und somit aus dem Komplex freigesetzt (Rand et al., 2005; Matranga et al., 2005), so dass der „guide-strand“ den RISC-Komplex zur Ziel-RNA führen kann.



Sontheimer, 2005

**Abb. 6: RISC Zusammensetzung in *Drosophila melanogaster*.** Nach der Abspaltung der siRNA durch Dicer kommt es zu einer Überführung in den RISC-Lading Komplex (RLC) über den Komplex B oder den R1 Komplex. An diesen Komplex lagern sich unter Einfluß von ATP weitere unbekannte Proteine an und bilden den RLC. Nach Anlagerung des Pre-Holo-RISC-Komplexes an den RLC entsteht der Holo-RISC-Komplex bestehend aus Dcr2 (Dicer 2), R2D2, Fxr (Fragiles-X-Mental Retardations-Protein), Ago2 (Argonaute Protein 2), Vig (Vasa intronic gene), TSN (Tudor Staphylococcus Nuklease) und unbekannt Proteinen. Der „guide“ siRNA Strang ist rot und der „passenger“ siRNA Strang ist blau dargestellt.

### 1.3.3 Degradation der Ziel mRNA

Nach der Generierung enthält der RISC-Komplex den Strang der siRNA, der für die Erkennung der Ziel-mRNA durch Basenpaarung verantwortlich ist. Bei einer hohen Komplementarität zwischen Ziel-mRNA und siRNA kommt es zu einer Durchtrennung des mRNA Phosphatrückgrates durch eine endonukleolytische Spaltung (Schwarz et al., 2004; Martinez and Tuschl, 2004). Es handelt sich dabei um eine  $Mg^{2+}$  abhängige Spaltung die 3'- Hydroxy und 5'-Phosphatenden hinterlässt. Der eigentliche Spaltungsvorgang ist ATP unabhängig (Haley and Zamore, 2004; Martinez and Tuschl, 2004) und verändert den RISC Komplex nicht, was diesem erlaubt, als Multi-Turnover Enzym zu agieren (Hutvagner and Zamore, 2002). Obwohl ATP nicht zur Spaltung benötigt wird, erhöht die Gabe von ATP doch die Turn-over Rate des Komplexes, so dass ATP eventuell die Produktfreisetzung begünstigt (Haley and Zamore, 2004).

Die Ziel-RNA wird sehr spezifisch zwischen den Nukleotiden 10 und 11, vom 5'-Ende der siRNA gesehen, geschnitten (Elbashir et al., 2001c). Diese Spaltung wird von dem

Argonaute Protein im RISC Komplex durchgeführt (Song et al., 2003; Liu et al., 2004; Lingel and Izaurralde, 2004). Durch Röntgenkristallanalysen wurde die Struktur des Argonaute Proteins Ago2 von der Arbeitsgruppe um Joshua-Tor aufgeklärt (Song et al., 2003). Ago2 besteht aus 4 Domänen: einer N-terminalen, einer PIWI, einer mittleren und einer PAZ-Domäne. Die PIWI-Domäne weist dabei große Ähnlichkeit zu der Ribonuklease H auf (Lingel et al., 2003).

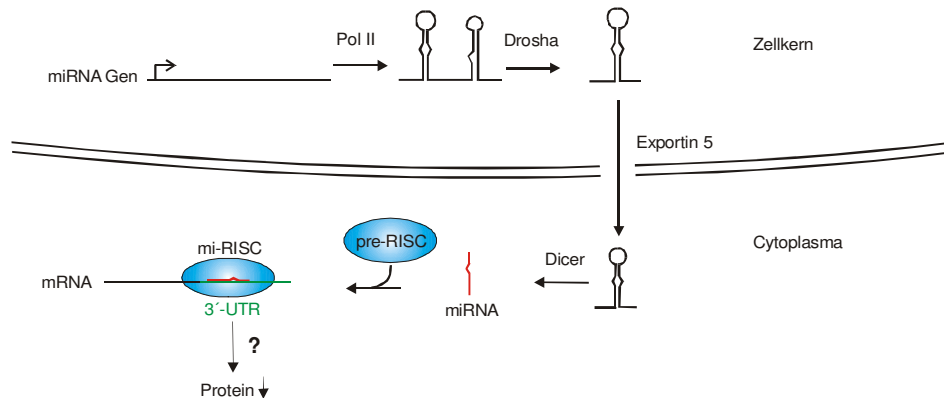
Das momentane Modell der Spaltungsaktivität von Argonauteproteinen ist folgendermaßen: Die siRNA interagiert mit der PAZ Domäne des Proteins (Lingel and Sattler, 2005; Lingel et al., 2004), während die Ziel-RNA in eine Bindungstasche eindringt, die durch die mittlere und die PIWI-Domäne gebildet wird. Dabei ist die Ziel-RNA so positioniert, dass das aktive Zentrum der PIWI-Domäne die Ziel-RNA zwischen den Nukleotiden 10 und 11 spalten kann. Nach der Spaltung der Ziel-RNA, in den meisten Fällen eine mRNA, kommt es zu einer Degradation des restlichen RNA-Stranges, so dass keine Translation der mRNA stattfinden kann und somit die Proteinmenge herunterreguliert wird.

### **1.3.4 miRNA vermitteltes gene silencing**

Micro RNAs (miRNA) gehören zu einer weiteren Klasse der kleinen nicht kodierenden RNAs, die die Proteinmengen durch Interaktion mit der entsprechenden mRNA regulieren können. Die Regulation der Proteinmenge durch miRNAs spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung eines Organismus (Harfe, 2005).

Es handelt sich bei den miRNAs um ~19-25nt lange einzelsträngige RNAs (Bartel, 2004), die aus endogenen Transkripten stammen und mittels Dicer generiert werden. Dabei werden die miRNAs als polycistronisches Primär-Transkript durch die RNA Polymerase II hergestellt. Dieses Primär-Transkript wird durch das RNase III Enzym Drosha noch im Nukleus zur ~70nt langen pre-miRNA gespalten (Grishok et al., 2001) und mittels Exportin 5 aus dem Zellkern transportiert (Bohnsack et al., 2004). Im Cytoplasma wird aus der pre-miRNA mittels Dicer die miRNA gespalten und es kommt zu einer Überführung in den mi-RISC Komplex (Hutvagner and Zamore, 2002). Die einzelsträngige miRNA besitzt Zielregionen im 3'-UTR der entsprechenden mRNA, an die sich der mi-RISC Komplex anlagert. Der genaue Mechanismus miRNA-vermittelten Repression der Proteintranslation ist noch nicht geklärt. Man weiß lediglich, dass RNA bei dem miRNA vermittelten Prozess nicht gespalten wird. Die Verminderung der Proteinmenge muss daher auf einen anderen Weg passieren. Eine Möglichkeit bildet hier die Überführung der mRNA durch Assoziation des mi-RISC Komplexes in Prozessierungs-Körper (P-bodies), die innerhalb der Zelle für die Degradation der

mRNA verantwortlich sind (Jabri, 2005; Liu et al., 2005). Da es bei dem miRNA-Mechanismus zu keiner Degradation der mRNA kommt, wird vermutet, dass die mRNA durch den mi-RISC Komplex in den P-bodies vor Degradation geschützt ist. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Unterbindung der Translation durch die Bindung des mi-RISC Komplexes an die mRNA, indem dieser Komplex zusammen mit noch nicht weiter aufgeklärten Molekülen die Anlagerung des Initiationskomplexes bzw. des Elongationskomplexes sterisch verhindert.



**Abb. 7: miRNA Synthese und Wirkmechanismus.** Die miRNA wird als polycistronische pri-miRNA durch die Polymerase II transkribiert und durch Drosha zur pre-miRNA gespalten. Nach dem Transport aus dem Zellkern durch Exportin 5 wird die pre-miRNA durch Dicer zur miRNA gespalten und in den mi-RISC Komplex eingebaut.

#### 1.4 Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die RNAi-Effizienz

Mittlerweile benutzt man die RNAi Technik standardmäßig für die Charakterisierung von Proteinfunktionen, indem die Menge des zu untersuchenden Proteins posttranskriptional durch RNAi herunterreguliert wird. Für diese Untersuchungen benötigt man sehr effiziente und spezifische siRNAs. Unterschiedliche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wirksamkeit der siRNA dabei von unterschiedlichen Parametern abhängig ist. Zum einen wird die Wirksamkeit von den biochemischen Eigenschaften der siRNA an sich (Schwarz et al., 2003; Reynolds et al., 2004) und zum anderen von den lokalen Struktureigenschaften der Zielregion beeinflusst (Vickers et al., 2003; Holen et al., 2002; Schubert et al., 2005b). Es gibt wahrscheinlich noch weitere Parameter, die die RNAi Effizienz beeinflussen. Diese sind allerdings bislang noch nicht entdeckt worden.

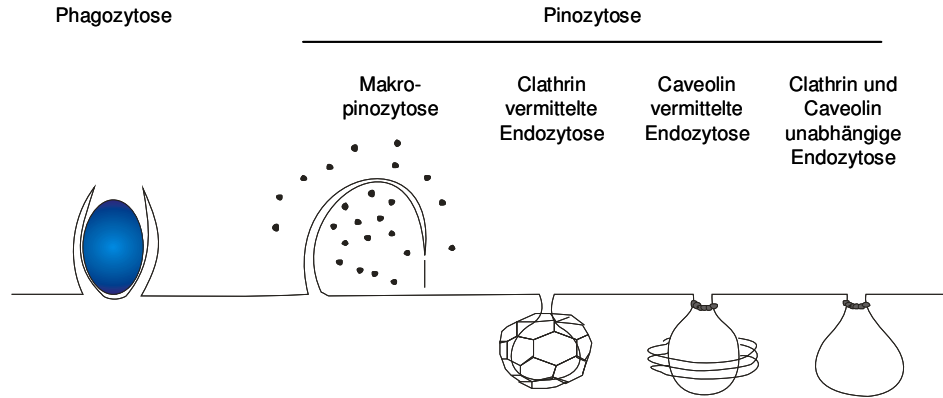
### 1.4.1 Biochemische Eigenschaften der siRNA

Der entscheidende Schritt im RNA interference Prozess ist die Zusammensetzung des RISC-Komplexes. Prinzipiell können sowohl der sense- als auch der antisense-Strang der siRNA in diesen Komplex eingebaut werden (Elbashir et al., 2001c), wobei der sense-Strang für die Degradation eines antisense-Targets und der antisense-Strang für die eines sense-Targets, in den meisten Fällen mRNA, verantwortlich ist. In mehreren Untersuchungen (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003) wurde gezeigt, dass sowohl die 5'-Stabilität als auch die absolute Stabilität der RNA Einzelstränge für den gezielten Einbau nur eines Stranges in den RISC-Komplex verantwortlich ist. Die RNA mit der geringeren Stabilität am 5'-Ende wird effektiver eingebaut, wobei in *Drosophila melanogaster* das Dcr2-R2D2 Heterodimer für die Stabilitätsunterscheidungen der Stränge verantwortlich ist (Tomari et al., 2004b). Dabei bindet Dicer das weniger stabile und R2D2 das stabilere siRNA Ende, und bildet somit den RISC-Loading-Komplex (RLC). Inwiefern nach der Spaltung einer langen dsRNA in siRNA letztere erneut aus dem Dicer-Komplex entlassen wird, um eine neue stabilitätsorientierte Bindung der siRNA zu ermöglichen, ist noch unklar.

## 1.5 Mögliche Aufnahmewege von siRNA durch Säugetierzellen

Um siRNA als Wirkstoff einsetzen zu können müssen diese in die Zielzelle gelangen. Deswegen muss man neben den genauen Kenntnissen über die Wirkmechanismen des siRNA vermittelten RNAi auch genaue Kenntnisse über die Aufnahme der siRNA in Zellen besitzen. Es gibt unterschiedliche Mechanismen der natürlichen Aufnahme in Zellen.

Die Plasmamembran der Zelle ist eine sehr dynamische Struktur, die das Cytoplasma von dem extrazellulären Raum trennt. Zur Versorgung der Zelle müssen Moleküle diese Membran überwinden. Dazu gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Sehr kleine Moleküle, wie Ionen und Aminosäuren, können die Membran durch Kanäle oder spezifische Pumpen durchdringen. Größere Moleküle gelangen durch membrangebundene Vesikel in die Zelle. Diesen Vorgang bezeichnet man als Endozytose. Der Vorgang der Endozytose wird in Phagozytose und Pinozytose unterteilt. Bei der Phagozytose werden große Pathogene wie Bakterien durch spezialisierte Zellen wie Makrophagen, Monozyten oder neutrophile Granulozyten entfernt. Die Pinozytose lässt sich in Clathrin-vermittelte Endozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose, Makropinozytose und Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose unterteilen (zur Übersicht:Conner and Schmid, 2003).



**Abb. 8: Endozytotische Aufnahmewege der Zelle (Conner and Schmid, 2003).** Die endozytotischen Aufnahmewege unterscheiden sich in ihrer Vesikelgröße, in der zu transportierenden Fracht und der Bildung der unterschiedlichen Vesikel.

### 1.5.1 Makropinozytose

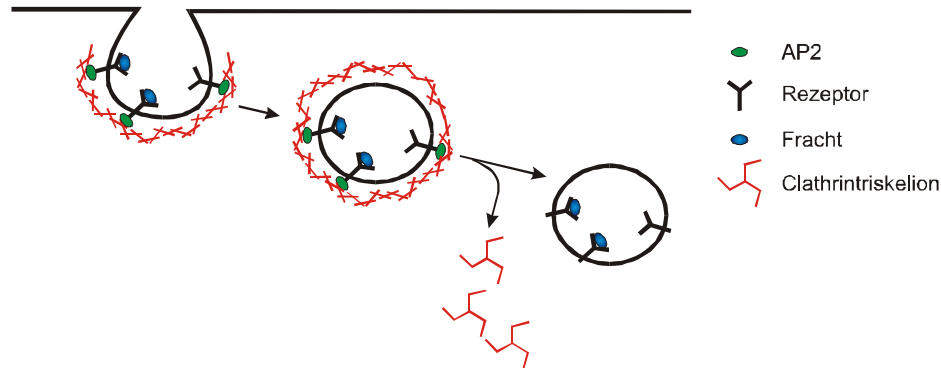
Bei der Makropinozytose stülpt sich die Zellmembran über die zu internalisierenden Moleküle (siehe Abb. 8). Dabei werden bis zu  $1\mu\text{m}$  große Vesikel gebildet, die als Makropinosomen bezeichnet werden. Insgesamt weiß man sehr wenig über die Funktion und den Mechanismus der Makropinozytose. Ob die Fusionierung nur an bestimmten Kontaktstellen der Membran oder überall geschehen kann, ist noch unklar (zur Übersicht: Maniak, 2001).

### 1.5.2 Clathrin-vermittelte Endocytose

Die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) geschieht in allen Säugetierzellen und ist essentiell wichtig für die Aufnahme von Nahrungssubstraten wie z.B. Cholesterol (zur Übersicht: Conner and Schmid, 2003). Während der CME konzentrieren sich Transmembran-Rezeptoren zusammen mit ihren Liganden in Membraneinstülpungen, den sogenannte „coated pits“, die durch zytosolische Proteine, hauptsächlich Clathrin, gebildet werden. Die Membraneinstülpungen schnüren sich unter Mitwirkung von Dynamin in einem GTP-abhängigen Prozess von der Membran ab und bilden ein Clathrin umhülltes Vesikel (Praefcke and McMahon, 2004). Diese Vesikel besitzen einen Durchmesser von 50-100 nm. Gereinigtes Clathrin besitzt die Form eines Triskelions mit drei Armen, von denen jeder Arm aus einer schweren und einer leichten Kette besteht. Diese Triskelien bilden durch Polymerisation die Clathrinhülle (Brodsky et al., 2001).

Zwischen der Membran des Vesikels und der Clathrinhülle befinden sich die als Assembly Proteine (AP) bezeichneten Vernetzungspartikel. Es gibt insgesamt 4 Vernetzungspartikel (Robinson and Bonifacino, 2001), die in unterschiedlichen

Membranabschnürungsprozessen eine wichtige Rolle spielen. Für die Bildung der Clathrin-umhüllten Vesikel während der CME ist der Vernetzungspartikel AP2 verantwortlich. Kurz nach der Abschnürung von der Membran verlieren die Vesikel ihre Clathrinhülle und gehen innerhalb der Zelle ihrer Bestimmung zu (Conner and Schmid, 2003).



**Abb. 9: Clathrin-vermittelte Endozytose.** Nach der Anlagerung der Fracht an die Rezeptoren kommt es zu einer Abschnürung des Clathrin-umhüllten Vesikels. Die Clathrinhülle löst sich anschließend auf und das Vesikel wandert zu seinem Bestimmungsort.

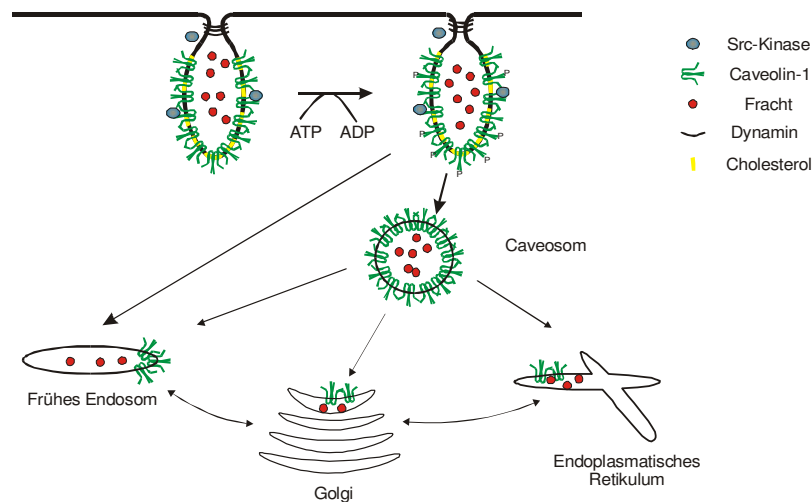
### 1.5.3 Caveolin-vermittelte Endozytose

Caveolae sind cholesterinreiche, flaschenartige Abschnürungen der Plasmamembran (Nabi and Le, 2003), die in vielen Säugetierzellen wie z.B. Endothelzellen vorkommen (Anderson, 1998) und dort an Prozessen wie Endozytose, Transcytose und Signaltransduktion beteiligt sind. In Endothelzellen handelt es sich bei der Caveolin-vermittelten Endozytose um einen Dynamin-abhängigen Prozess. Caveolae kommen nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch in den Caveosomen und den frühen Endosomen vor (Pelkmans et al., 2001; Pelkmans et al., 2004; Pol et al., 1999; Nichols, 2002). Die Bildung der Caveolae ist abhängig von der Expression des Caveolin-1 Proteins Cav1 (Fra et al., 1995). Zellen, die kein Cav1 exprimieren besitzen auch keine Caveolae. Cav1 liegt im Cytoplasma in kleinen Vesikeln vor und kann von dort aus direkt als Teil eines löslichen Lipoprotein-Komplexes in den Golgi-Komplex wandern (Luetterforst et al., 1999; Mundy et al., 2002). Die Caveolae in der Plasmamembran besitzen eine große Anzahl an Cav1 Proteinen.

Analysen des Cav-1 Proteins und der Caveolae haben gezeigt, dass die Caveolae relativ stabile und unmobile Strukturen in Plasmamembranen sind. Diese liegen schon als fertig zusammengebaute Strukturen vor, ohne dass ein Stimulus benötigt wird. Der Zusammenbau der Caveolae ist ein Multistep-Prozess, bei dem Cav1 direkt nach der Synthese aus dem ER in den Golgi-Komplex transportiert wird (Pol et al., 2005; Monier et al., 1995). Dort erfolgt der Zusammenbau der Caveolae, die direkt danach zu der

Zelloberfläche transportiert werden (Tagawa et al., 2005). Hier verbleiben die Strukturen solange, bis ein äußerer Reiz die Abschnürungsprozesse aktiviert.

Nach der Abschnürung von der Plasmamembran kann es zu einer Überführung in Cav1-positive Endosomen mit einem neutralen pH-Wert von pH 7, den sogenannten Caveosomen (Pelkmans and Helenius, 2002; Pelkmans et al., 2001; Nichols, 2003), kommen. Dazu wandern die abgeschnürten Caveolae zu den Caveosomen und verschmelzen mit deren Membran. Die Caveolae können allerdings auch direkt mit frühen Endosomen verschmelzen. Die Caveolae werden bei diesen Prozessen nicht abgebaut, sondern bilden in jeder Membran Microdomänen, die stabil bleiben und auch wieder beladen werden können. Dadurch bilden die Caveolae innerhalb und zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten eine Art shuttle-Service (Pelkmans et al., 2004), der dazu führt, dass durch Caveolae aufgenommene Substanzen sowohl in das ER als auch in den Golgi-Komplex transportiert werden können (Nabi and Le, 2003).



**Abb. 10: Caveolin-vermittelte Aufnahme.** Nach einem äußeren Stimulus kommt es zur Abschnürung der Caveolin-1 positiven Membraneinstülpungen unter ATP-Verbrauch. Die dabei gebildeten Vesikel (Caveosomen) können sowohl mit dem frühen Endosom, dem Golgi als auch mit dem endoplasmatischen Retikulum verschmelzen.

### 1.5.4 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose

Caveolae sind nicht die einzigen cholesterinreichen Mikrodomänen in der Plasmamembran. Bei den anderen Mikrodomänen handelt es sich um 40 bis 50 nm große zweidimensionale Strukturen die als Lipid-rafts bezeichnet werden und frei in der Plasmamembran diffundieren (Anderson and Jacobson, 2002). Die Clathrin und Caveolin-unabhängige Endozytose wurde durch die Aufnahme des Interleukin Rezeptors 2 (IL-R2) entdeckt. IL-R2 muss durch eine Clathrin und Caveolin-unabhängige Endozytose aufgenommen werden, da AP2 negative Mutanten sowie

Dynamin-negative Mutanten die Rezeptor vermittelte Aufnahme von dem IL-R2 nicht beeinflusst haben. Sowohl der Mechanismus als auch der Zusammenbau der Vesikel sind bislang unbekannt (Lamaze et al., 2001).

## 2 Arbeitshintergrund und Zielsetzung

Die Kenntnisse der zellulären Genregulationsmechanismen in Kombination mit der Entwicklung von Verfahren zur Einschleusung von Nukleinsäuren in die Zelle führten in den letzten Jahren zu der Entwicklung von Nukleinsäure-Wirkstoffen. Bei der Entwicklung effektiver Nukleinsäure-Wirkstoffe bilden dementsprechend Untersuchungen zu dem Wirkmechanismus innerhalb der Zelle als auch Untersuchungen zur Einschleusung des Wirkstoffes in die Zelle eine Einheit.

Die Entdeckung der RNA interference (RNAi) im Menschen bietet Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Arzneimittel. Der Prozess des „Gene silencing“ durch kleine nicht kodierende RNAs (siRNA) wurde erst in den letzten Jahren entdeckt. Aus diesem Grunde müssen für die Entwicklung von siRNA-Wirkstoffen zuerst die Grundlagen des RNAi-Mechanismus vollständig verstanden werden, um eventuelle Nebenwirkungen möglichst zu vermeiden und um das Potential, den dieser Mechanismus besitzt, vollständig ausschöpfen zu können. Abgesehen von dem Verständnis des RNAi-Mechanismus und der Schaffung einer möglichst „perfekten“ siRNA für unterschiedliche mRNAs, ist die Einschleusung der siRNA in die entsprechende Zelle und deren Freisetzung innerhalb der Zelle für die Wirksamkeit von entscheidender Bedeutung. Momentan gibt es für die *in-vivo* Anwendung von Nukleinsäure-Wirkstoffen kein effizientes Aufnahmesystem. Der zelluläre Transport von Nukleinsäuren durch die Zellmembran stellt dementsprechend momentan die Haupthürde in der Verabreichung von Nukleinsäure-Wirkstoffen dar.

Diese Arbeit besteht aus zwei unterschiedlichen Schwerpunkten. Im ersten Teil der Arbeit wird der RNAi-Mechanismus bezüglich des Einflusses der mRNA-Struktur auf die Wirksamkeit der siRNA hin erforscht. Hierbei sollen mit Hilfe einer Beispiel-RNA, der ICAM-1 mRNA, der Einfluss unterschiedlicher Struktur motive der mRNA auf die Wirksamkeit verschiedener siRNAs untersucht werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Einschleusung von siRNA in humane Zellen. Dazu soll zunächst ein sensitives Nachweisverfahren zum Nachweis intrazellulärer siRNAs entwickelt werden und anschließend die Aufnahme von siRNAs in Säugerzellen untersucht und verbessert werden.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Cambres, Rockland USA
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Roth, Karlsruhe
ATP	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Sternheim
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Sternheim
Brefeldin A	Sigma, Sternheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
CTP	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Cytochalasin B	Sigma, Sternheim
Chloroquin	Sigma, Sternheim
dATP	Peqlab, Erlangen
dCTP	Peqlab, Erlangen
dGTP	Peqlab, Erlangen
dTTP	Peqlab, Erlangen
Dako Mounting Medium	Dako, Hamburg
Dimethylsulfoxid	Sigma, Sternheim
Dithiothreitol	Gerbu, Gaiberg
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Gibco, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
G418	Serva, Heidelberg
Glycerin	Sigma, Sternheim
GTP	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Harnstoff	Roth, Karlsruhe

Hefeextrakt	Gibco, Karlsruhe
Hering-DNA	Sigma, Sternheim
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Monensin	Sigma, Sternheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma, Sternheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	LKB, Bromma, Schweden
Phenol pH 4,5	Roth, Karlsruhe
Phenol pH 7,5	Roth, Karlsruhe
Propanol	Merck, Darmstadt
Sephadex G-50	Pharmacia, Freiburg i.Br.
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Merck, Darmstadt
UTP	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Wortmannin	Sigma, Sternheim
Xylencyanol	Sigma, Sternheim

### 3.1.2 Radiochemikalien

[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP (10 mCi/ml)	Amersham, Freiburg
-----------------------------------------------	--------------------

### 3.1.3 Material und Reagenzien für die Zellkultur

#### 3.1.3.1 Zelllinien

HeLa	Humane Zervix-Karzinomzelllinie
ECV-304	Humane Harnblasen-Karzinomzelllinie
SK-RC 35	Humane Nieren-Karzinomzelllinie
HUVEC	Primäre humane Nabelschnur Endothelzellen
BJAB	Humane B-Zelllinie
Jurkat	Humane T-Zelllinie
HepG2	Humane Leber-Karzinomzelllinie
BHK-21	Hamster Nierenzelllinie

### 3.1.3.2 Medien und Zusätze

DMEM/F12	Gibco, Karlsruhe
Medium 199	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung	Linearis, Bettingen a.M.
Natriumpyruvat	PAA, Paschingen, Österreich
ECGF	Technoclone, Wien, Österreich
Heparin	Sigma, Sternheim
Fötale Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco, Karlsruhe

### 3.1.3.3 Gebrauchsmaterial

Gewebekulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup>  
Gewebekulturplatten 6, 12, 24, 96 Löcher  
Kammer-Objekträger 4, 8 Kammern  
Kryo-Röhrchen (1,8ml)  
Teflon-beschichtete Objekträger 6 Felder  
Zellschaber, 23 cm lang

## 3.1.4 Puffer und Medien

### 3.1.4.1 Puffer

#### **TE-Puffer (pH 7,4)**

10 mM Tris/HCl (pH 7,4)  
1 mM EDTA

#### **TBE-Puffer (1x)**

89 mM Tris-Base  
89 mM Borsäure  
2 mM EDTA  
pH 8,8

#### **Hybridisierungspuffer**

100 mM NaCl  
20 mM Tris/HCl pH 7,4

#### **TE-Puffer (pH 8,0)**

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)  
1 mM EDTA

#### **PBS-Puffer (1x)**

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
140 mM NaCl  
pH 8,0

#### **RNase Puffer (10x)**

100mM Tris/HCl pH 7,4  
100mM MgCl<sub>2</sub>

**TAE-Puffer (50x)**

1 M Tris-HCl pH 8,5  
500 mM Eisessig  
50 mM EDTA

**Aufschlusspuffer**

1% NP40 in TE-Puffer pH 7,4

**Transformationspuffer**

10 mM PIPES  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
250 mM KCl  
55 mM MnCl<sub>2</sub>  
pH 6,7

**Auftragspuffer für native und semi-denaturierende Polyacrylamidgele (PAA-Gele)**

25 % (w/v) Ficoll 400 in 1x TBE-Puffer  
0,1% Bromphenolblau / 0,05% Xylencyano

**Auftragspuffer für denaturierende PAA-Gele**

50% Glycerin  
3 M Harnstoff  
0,1 % Bromphenolblau/ 0,05% Xylencyanol  
in 1x TBE

**Auftragspuffer für Agarosegele (6x)**

25 % (w/v) Ficoll 400 in 1x TAE-Puffer  
0,1 % Bromphenolblau/ 0,05% Xylencyanol

3.1.4.2 Medien für die Zellkultur

**Medium(+) für BHK-21,HeLa und HepG2**

DMEM/F12  
10% FKS  
1x NEAS

**Medium(+) für HUVEC**

Medium 199  
20% FKS  
ECGF  
5 U/ml Heparin

**Medium(+) für ECV304**

Medium 199  
10% FKS

**Medium(+) für SK-RC 35**

RPMI 1640  
10% FKS  
1mM Natriumpyruvat

**Medium(+) für BJAB und Jurkat**

RPMI 1640  
10% FKS

**Einfriermedium**

Medium(+)  
10% DMSO

**3.1.5 Enzyme und Proteine**

3.1.5.1 Enzyme

<i>Acc</i> 65I	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
<i>Bam</i> HI	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> RI	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Hind</i> III	Gibco, Karlsruhe
Hot Star Gold Polymerase	Eurogentec, Köln
<i>Kpn</i> I	Gibco, Karlsruhe
RNase A/T1 Mix	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Sac</i> I	Gibco, Karlsruhe
T4 Polynukleotidkinase	MBI-Fermentas, St. Leon-Ro
T4 DNA Ligase	Gibco, Karlsruhe
T7 RNA Polymerase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Taq DNA Polymerase	Gibco, Karlsruhe
Superscript II RNaseH <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe

**3.1.6 Nukleinsäuren**

Phosphorothioat-modifizierte Internukleotid-Phosphate wurden durch 's' gekennzeichnet. 2'-O-Methyl-modifizierte Internukleotidbindungen wurden durch '\*' gekennzeichnet.

3.1.6.1 Oligoribonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers (Ulm), Eurogentec (Liège) oder IBA (Göttingen) synthetisiert.

3.1.6.1.1 Ribonukleotide für die Untersuchungen bezüglich des Einflusses der mRNA Struktur auf die Wirksamkeit der siRNA

si424:	s424	5' -UCUUGGCAGCCAGUGGGCAAGtt-3'
	as424	5' -CUUGCCCACUGGCUGCCAAGAtt-3'
si429	s429	5' -GCAGCCAGUGGGCAAGAACCUtt-3'

	as429	5´-AGGUUCUUGCCCACUGGCUGCtt-3´
si640	s640	5´-CAAGGGCUGGAGCUGUUUGAGtt-3´
	as640	5´-CUCAAACAGCUCCAGCCCUUGtt-3´
si650	s650	5´-AGCUGUUUGAGAACACCUCGGtt-3´
	as650	5´-CCGAGGUGUUUCUCAAACAGCUtt-3´
si1141	s1141	5´-CCAGAGGACAACGGGCGCAGCtt-3´
	as1141	5´-GCUGCGCCCGUUGUCCUCUGGtt-3´
si1153	s1153	5´-GGGCGCAGCUUCUCCUGCUCUtt-3´
	as1153	5´-AGAGCAGGAGAAGCUGCGCCtt-3´
si1438	s1438	5´-GAGCACUCAAGGGGAGGUCACtt-3´
	as1438	5´-GUGACCUCCCUUGAGUGUCUtt-3´
si1452	s1452	5´-GGUCACCCGCGAGGUGACCGUtt-3´
	as1452	5´-ACGGUCACCUCGCGGGUGACtt-3´
si2289	s2289	5´-GUACACUGCAGGAGAGUGCCUtt-3´
	as2289	5´-AGGCACUCUCCUGCAGUGUACtt-3´
si2304	s2304	5´-GUGCCUGGCAAAAAGAUCAAAtt-3´
	as2304	5´-UUUGAUCUUUUUGCCAGGCACtt-3´
si839	s839	5´-CCACAGUCACCUAUGGCAACGtt-3´
	as839	5´-CGUUGCCAUAAGGUGACUGUGGtt-3´
si840	s840	5´-CACAGUCACCUAUGGCAACGAtt-3´
	as840	5´-UCGUUGCCAUAAGGUGACUGUGtt-3´
si841	s841	5´-ACAGUCACCUAUGGCAACGACTt-3´
	as841	5´-GUCGUUGCCAUAAGGUGACUGUtt-3´
si842	s842	5´-CAGUCACCUAUGGCAACGACUtt-3´
	as842	5´-AGUCGUUGCCAUAAGGUGACUGtt-3´
si843	s843	5´-AGUCACCUAUGGCAACGACUCtt-3´
	as843	5´-GAGUCGUUGCCAUAAGGUGACUtt-3´
si859	s859	5´-GACUCCUUCUCGGCCAAGGCCtt-3´
	as859	5´-GGCCUUGGCCGAGAAGGAGUCtt-3´
si860	s860	5´-ACUCCUUCUCGGCCAAGGCCUtt-3´
	as860	5´-AGGCCUUGGCCGAGAAGGAGUtt-3´
si861	s861	5´-CUCCUUCUCGGCCAAGGCCUCtt-3´
	as861	5´-GAGGCCUUGGCCGAGAAGGAGtt-3´
si862	s862	5´-UCCUUCUCGGCCAAGGCCUCAtt-3´
	as862	5´-UGAGGCCUUGGCCGAGAAGGAtt-3´
si1546	s1546	5´-GGCCUCAGCACGUACCUCUAUtt-3´
	as1546	5´-AUAGAGGUACGUGCUGAGGCCtt-3´
si1566	s1566	5´-UAACCGCCAGCGGAAGAUCAAtt-3´
	as1566	5´-UUGAUCUCCGCUGGCGGUUAtt-3´
si1591	s1591	5´-UACAGACUACAACAGGCCCAAtt-3´
	as1591	5´-UUGGGCCUGUUGUAGUCUGUAtt-3´

si1595	s1595	5´-GACUACAACAGGCCCAAAAAGtt-3´
	as1595	5´-CUUUUUGGGCCUGUUGUAGUCtt-3´
si1628	s1628	5´-AACCGAACACACAAGCCACGctt-3´
	as1628	5´-GCGUGGCUUGUGUGUUCGGUUt-3´
si1637	s1637	5´-CACAAGCCACGCCUCCUGAAtt-3´
	as1637	5´-UUCAGGGAGGCGUGGCUUGUGtt-3´
si-sc1	s-sc1	5´-CGAACUCACUGGUCUGACCAUtt-3´
	as-sc1	5´-AUGGUCAGACCAGUGAGUUCGtt-3´
si-sc2	s-sc2	5´-CGAACUCACUGGUCUGACCGctt-3´
	as-sc2	5´-GCGGUCAGACCAGUGAGUUCGtt-3´
si-sc3	s-sc3	5´-CGGACGCACUGGUCUGACCGgtt-3´
	as-sc3	5´-CCGGUCAGACCAGUGCGUCCgtt-3´
si-sc4	s-sc4	5´-AGAACACACAGGUCUGAACAUtt-3´
	as-sc4	5´-AUGUUCAGACCUGUGUGUUCUtt-3´

### 3.1.6.1.2 Oligonukleotide für die Untersuchung der Spontanaufnahme von siRNA durch Koinkubation mit PTOs

si2B:	s2B	5´-GCCUCAGCACGUACCUCUAtt-3´
	as2B	5´-UAGAGGUACGUGCUGAGGctt-3´
si-scr:	s-scr	5´-CGAACUCACUGGUCUGACctt-3´
	as-scr	5´-GGUCAGACCAGUGAGUUCGtt-3´
siLam	sLam	5´-CUGGACUUCAGAAAGAAcAtt-3´
	asLam	5´-UGUUCUUCUGGAAGUCCAGtt-3´
siLam-Cy3	sLam	Cy3-5´-CUGGACUUCAGAAAGAAcAtt-3´
	asLam	5´-UGUUCUUCUGGAAGUCCAGtt-3´
siLam-Alexa488	sLam	Alexa488-5´-CUGGACUUCAGAAAGAAcAtt-3´
	asLam	5´-UGUUCUUCUGGAAGUCCAGtt-3´

TM6-4 (RNA) 5´-(UCGUGU)<sub>4</sub>-3´

TM6-4 (Thio-RNA) 5´-(UsCsGsUsGsUs)<sub>4</sub>-3´

### 3.1.6.2 Oligodesoxyribonukleotide

s hp-DNA 5´- CAAGGCCTCAGCACGTACCTCTATAGCAATTGGGTAGAGGT  
ACGTGCTGAGGCAAACGAAAGGTAC -3´

as hp-DNA 5´- CTTTCGTTTGCCTCAGCACGTACCTCTACCGAATTGCTATAG  
AGGTACGTGCTGAGGCCTTGAGCT-3´

TM6-n 5´- (TsCsGsTsGsTs)<sub>n</sub>-3´

TM6-4 (DNA) 5´- (TCGTGT)<sub>4</sub>-3´

TM6-6-Cy3 5´- Cy3-(TCGTGT)<sub>6</sub>-3´

TM6-4 (2'OMe) 5'- (T\*C\*G\*T\*G\*T\*)<sub>4</sub>-3'

S0K27 5'-CsGsGsGsAsTsCsCsAsTsGsGsCsAsGsCsTsGsGsAsGsAsTsA-3'

NovAAAA 5'-AsAsTsCsCsTsCsCsCsCsCsAsGsTsTsCsAsCsCsAsAsAsA-3'

ODN 2006 5'-TsCsGsTsCsGsTsTsTsTsGsTsCsGsTsTsTsTsGsTsCsGsTsT-3'

### 3.1.6.2.1 Primersequenzen für die quantitative PCR zum Nachweis der Lamin A/C und ICAM-1 Expression

Lamin A/C forward 5'-AATGATCGCTTGGCGGTCTA-3'

Lamin A/C reverse 5'-GCCCTGCGTTCTCCGTTT-3'

ICAM-1 forward 5'-GCCACTTCTTCTGTAAGTCTGTGGG-3'

ICAM-1 reverse 5'-CTACCGGCCCTGGGACG-3'

GAPDH forward 5'-AACAGCGACACCCACTTCCTC-3'

GAPDH reverse 5'-GGAGGGGAGATTCAGTGTGGT-3'

### 3.1.7 Geräte und sonstige Verbrauchsmaterialien

Agarosegelsystem	BioRad, München
Avanti J-25 Zentrifuge	Beckman, Krefeld
CO <sub>2</sub> Water Jacketed Inkubator	Forma Scientific, Marietta (USA)
Electrophoresis Power	Pharmacia Biotech, Freiburg
Electrophoresis Power Supply - EPS 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
FACSCalibur (Durchflußcytometer)	BD Biosciences, San Jose (USA)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
GeneAmp 5700	Applied Biosystem, Freiburg
Heizblock Techne DRI-Block® DB 2D	Werner Hassa GmbH, Lübeck
Laborzentrifuge 1K15	SIGMA, St. Louis (USA)
Microfuge® R	Beckman, Krefeld
Mikroskop: Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Bosch, Deutschland
Nanodrop	Peqlab, Erlangen
PAA-Gelkammer	Biometra, Göttingen
PCR-Block UNO II	Biometra, Göttingen
pH-Meter CG 820	Schott Geräte, Darmstadt
Pipetten Pipetman	Gilson, Bad Camberg
Reinstwassersystem Millipore	Millipore System, Schwalbach
Rotixa/RP	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Schüttler IKA Vibrax-VXR	Jahnke & Kunkel

Spektralphotometer DU®	Beckmann, München
Sterile Werkbank: Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
Storage Phosphor Screens	Amersham Pharmacia, Freiburg
Varifuge 3,2 RS	Heraeus Sepatech, Hanau
Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Vortexer REAX 1DR	Heidolph, Schwabach
Wasserbad W22	Medingen (Preiss Daimler)
Zellcounter Gen S System 2	Coulter, Krefeld

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Techniken im Umgang mit Nukleinsäuren

#### 3.2.1.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, um Nukleinsäuren nach Größe und Struktur im elektrischen Feld aufzutrennen. Dazu wurden Agarosegele mit unterschiedlichem Agarosegehalt verwendet. Bei Nukleinsäuren mit einer Länge von mehr als 1000 nt wurde ein 0,7 % (w/v) Agarosegel und bei Nukleinsäuren unter 1000 nt ein 1,5% bis 4% (w/v) Agarosegel verwendet. Dazu wurde der entsprechende Anteil Agarose in 1XTAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und anschließend in die Gelgießkammer mit der entsprechenden Größe gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde das Agarosegel in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1xTAE-Puffer überschichtet. Die mit 6xDNA Probenpuffer versetzten Proben wurden aufgetragen und die Nukleinsäure bei 70V -100V aufgetrennt. Zur Dokumentation wurden die Agarosegele im UV-Licht ( $\lambda = 254\text{nm}$ ) fotografiert.

#### 3.2.1.2 Isolierung von DNA aus Agarose mittels GeneClean Extraktions Kit

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem GeneClean Kit der Firma Q-BIOgene nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurden die DNA und RNA Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Extraktions-Kit aufgearbeitet.

### 3.2.1.3 In-vitro Transkription von RNA

Die In-vitro-Transkription erfolgte mit 100 Units T7-RNA-Polymerase der Firma Fermentas für 60 Min bei 37°C. Anschließend wurde das Transkript im Agarosegel aufgetrennt und mittels des GeneClean Extraktions-Kits aus dem Gel extrahiert. Anschließend erfolgte eine Ethanol-Fällung, um Salze aus der Lösung zu entfernen.

### 3.2.1.4 Hybridisierung von siRNA

Zur Hybridisierung der siRNA wurden die entsprechenden sense und antisense Einzelstränge in 1x Hybridisierungspuffer 3 Min bei 95°C im Wasserbad erhitzt und anschließend im Wasserbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Die Überprüfung der Hybridisierung erfolgt in einer Semi-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

### 3.2.1.5 Radioaktive Markierung von RNA

Durch die T4-Polynukleotidkinase (PNK) kann man eine  $^{32}\text{P}$  5'-Endmarkierung von Nucleinsäuren durchführen. Dabei katalysiert die PNK den Transfer des  $\gamma$ -Phosphats von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  auf das 5'-hydroxylierte Ende der Nucleinsäure. Dazu wurden 16 pmol RNA in Anwesenheit von 16pmol  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  in 1x PNK-Puffer mit 10 U PNK 30 Min bei 37°C phosphoryliert. Anschließend wurde die Lösung durch Gelfiltration von dem freien  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  gereinigt.

### 3.2.1.6 Reinigung von RNA mittels Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration können Nucleinsäuren von niedermolekularen Substanzen durch den Molekularsiebeffekt gereinigt werden. Die höhermolekularen Nucleinsäuren wandern dabei um das poröse Gelfiltrationsmaterial herum und eluieren vor dem in den Poren verfangenen niedermolekularen Material. Dazu wurden die RNA-Lösungen nach der radioaktiven Markierung auf vorher mit autoklaviertem Millipore-Wasser equilibrierten Sephadex G-50 Säulen gegeben. Nach einer Gabe von 400 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  wurde die Nucleinsäure mit weiteren 400 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eluiert.

### 3.2.1.7 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in Lösung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD). Gemessen wurde die Absorption der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der die aromatischen Ringe der Nukleinsäuren die maximale Absorption erreichen. Die Absorptionsmessung erfolgte im NanoDrop. Anhand des Verhältnisses der  $OD_{260nm}$  und der  $OD_{280nm}$  konnte auf die Reinheit der Nukleinsäuren geschlossen werden, da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer OD von 280nm liegt. Reine RNA wies einen 260/280 Quotienten von 2 auf.

### 3.2.1.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamidgele besitzen im Vergleich zu Agarosegelen ein höheres Auflösungsvermögen bei kleinen Nukleinsäurefragmenten (< 1000 nt) und eine größere Ladungskapazität. Man unterscheidet zwischen denaturierenden PAA-Gelen, für die Größen-Auftrennung einzelsträngiger Nukleinsäuren, semi-denaturierende PAA-Gelen, in denen Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren aufgelöst werden, nicht jedoch RNA-RNA Doppelstränge, und native PAA-Gelen, in denen eine Auftrennung nach Größe und Struktur erfolgt. Es wurden vertikale PAA-Gelsysteme verwendet. Die PAA-Gellösung wurde zwischen vorher mit 100% Ethanol gesäuberten und einer Silikondichtung abgedichteten Glasplatten (11 cm x 12 cm) mit einer Stärke von 1mm zum Polymerisieren gegossen. Der Acrylamidanteil (Acrylamid : Bisacrylamid = 19 : 1) hängt dabei von der aufzutrennenden Fragmentgröße ab. Zu 17ml Acrylamidlösung wurden 17µl TEMED und 170µl 10%ige (w/v) APS-Lösung gegeben.

#### 3.2.1.8.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Falle der denaturierenden PAA-Gelelektrophorese enthielt die Acrylamidlösung 8M Harnstoff. Nach der Polymerisation erfolgte ein 20 minütiger Vorlauf des Geles bei 8 Watt, so dass die Temperatur des PAA-Gels mindestens 50°C betrug. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 50% Formamid versetzt und 3 Min bei 95°C denaturiert und danach direkt aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 8 Watt mit ständiger Kontrolle der Geltemperatur, die auf  $\geq 50^\circ\text{C}$  gehalten wurde.

#### 3.2.1.8.2 Semi-denaturierende und Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Im Falle der Semi-denaturierenden PAA-Gelelektrophorese enthielt die Acrylamidlösung 4M Harnstoff. Native-PAA-Gelelektrophoresen waren Harnstoff frei. Nach der Polymerisation erfolgte ein Vorlauf des Geles für 20 Min bei 3 Watt und 4°C

Außenatemperatur vorlaufen. Die Temperatur des PAA-Gels wurde auf  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  gehalten. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit dem entsprechenden Auftragspuffer versetzt und ohne Denaturierungsschritt aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 3 Watt mit ständiger Kontrolle der Geltemperatur, die auf unter  $37^{\circ}\text{C}$  gehalten wurde.

### 3.2.1.9 Blotten von RNA im Semi-Dry Verfahren

Die mittels der PAA-Gelelektrophorese nach Größe und Struktur aufgetrennten RNA Fragmente wurden elektrophoretisch im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurde das Gel auf die mit Wasser benetzte Nylonmembran gebracht. Auf der Anoden und Kathodenseite wurden anschließend je 3 Lagen in 0,5x TBE-Puffer getränktes Whatmanpapier der Stärke 2mm gelegt. Der Blotvorgang wurde bei 400mA für 10 Min durchgeführt. Anschließend wurde die Nylonmembran bei  $90^{\circ}\text{C}$  15 Min lang getrocknet.

#### 3.2.1.10 Isolierung der RNA aus Säugerzellen mittels des RNeasy Mini Kit von Qiagen

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits aus Säugerzellen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte dabei durch QIAshredder-Säulen des Herstellers. Die RNA wurde in  $40\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.1.11 Isolierung der Gesamt-RNA aus Säugerzellen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurden die Zellen einer 12 Loch Schale vor der Extraktion 5x mit  $1,25\text{ml}$  PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Ernte der Zellen mittels einer Trypsin/EDTA Lösung. Die Zellen wurden für 1Min bei  $800\times g$  pelletiert und nachfolgend in  $200\mu\text{l}$  TE-Puffer mit 1%NP40 resuspendiert und 10 Min lang auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurde die Zellsuspension mit  $200\mu\text{l}$  Phenol pH 4,5 10 Min kräftig geschüttelt und danach mindestens 30 Min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $20000\times g$  zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde im Anschluss 2 x mit  $200\mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 3 Min ausgeschüttelt und anschließend zur Phasentrennung 5 Min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $20000 \times g$ . Anschließend wurden  $150\mu\text{l}$  des wässrigen Überstandes zur Ethanol-fällung eingesetzt.

### 3.2.1.12 Ethanolfällung

Zur Ethanolfällung wurde die wässrige Phase aus der RNA-Extraktion mit 2,5 Volumeneinheiten Ethanol, 10 Vol-% NaOAc pH 5.2 und 20µg Glykogen versetzt und 30 Min bei -70°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 Min bei 4°C und 20000xg zentrifugiert. Die pelletierte RNA wurde mit 150µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen. Anschließend wurde die RNA bei RT getrocknet und in 30 µl 1x Hyb-Puffer gelöst.

### 3.2.1.13 Reverse Transkription von RNA

Von der aus den RNA-Extraktionen isolierten RNA wurden 0,8 – 1µg RNA mit der Superscript II RNaseH<sup>-</sup> Reversen Transkriptase nach Angaben des Herstellers mit Random Primern transkribiert. Die aus der Reversen Transkription entstandene cDNA-Lösung wurde in einer 1:10 Verdünnung mit Nuclease-freiem Wasser in die quantitative PCR eingesetzt.

### 3.2.1.14 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion mittels SYBR-Green beruht auf einer sequenzunabhängiger Interkalation von SYBRGreen in doppelsträngiger DNA und der dabei erzeugten Fluoreszenz dieses Farbstoffes. Dabei ist das entstehende Fluoreszenzsignal proportional zur Menge an amplifizierter DNA.

Die qPCR wurde mit dem SYBR-Green PCR core Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 5µl cDNA aus der 1:10 Verdünnung der Reversen Transkription in die Reaktion mit den unter 2.1.6.2 angegebenen Primern eingesetzt. Die Amplifikation und Detektion erfolgte in dem GeneAmp 5700. Als interner Standard wurde GAPDH verwendet.

## 3.2.2 Experimente mit Säugerzelllinien

### 3.2.2.1 Transfektion mit Lipofectamin 2000

Es wurden je nach Zelltyp 100.000 – 150.000 Zellen pro Loch einer 12-well-Schale ausgebracht und 14-16 Stunden lang bei 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1ml PBS erfolgte die Transfektion mit 10µg/ml Lipofectamin und unterschiedlichen Mengen siRNA in 400 µl OptiMEM für 4 Stunden. Danach wurde das Transfektionsmedium durch Medium(+) ersetzt und die Zellen für weitere 24-48 Stunden inkubiert.

### 3.2.2.2 Stimulation der ICAM-1 Expression in ECV304 Zellen durch IL-1 $\beta$

Bei der Zelllinie ECV304 handelt es sich um ein Derivat der Blasenkarzinom Zelllinie T24, bei der man die ICAM-1 Expression mittels IL-1 $\beta$  stimulieren kann. Nach vierstündiger Transfektion wurden die ECV304 Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Medium(+) 4 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> regeneriert. Danach wurde der Zellkulturüberstand verworfen, die Zellen mit Medium(+) und 200 Units/ml IL-1 $\beta$  überschichtet und 14-16 Stunden lang im Brutschrank stimuliert. Die Quantifizierung der ICAM-1 Expression erfolgt nach RNA-Präparation mit dem RNeasy-Mini Kit von Qiagen mittels RT-qPCR.

### 3.2.2.3 Aufnahmeexperimente ohne Transfektionsreagenzien

Die Zellen wurden je nach Versuchsbedingungen in 12 Loch oder 6 Loch Zellkulturplatten 14-16 Stunden vor Versuchsbeginn mit Medium(+) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an siRNA gelöst in OptiMEM in einem Volumen von 400-1000  $\mu$ l. Des Weiteren wurden der Inkubationslösung je nach Versuch unterschiedliche Stimulatoren der zellulären Aufnahme, Inhibitoren spezifisch für die endozytotischen Aufnahmewege und Substanzen zur Freisetzung aus den einzelnen Zellkompartimenten, hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 2 bis 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Gehalt.

### 3.2.2.4 Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden ECV304 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (3.2.2.1). Nach der Regenerationszeit von 14-16 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit einer Dichte von 0,3 Zellen pro Loch einer 96-Loch Platte mit Medium(+) und 800 $\mu$ g/ml G418 vereinzelt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle 72 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 10 Tagen wurden die Zellen im Inversen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Anschließend wurden die Fluoreszenz positiven Zellen für weitere 20 Tage im Selektionsmedium kultiviert. Daraufhin wurden die stabil transfomierten Zellen in Medium (+) mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.2.3 Mikrobiologische Techniken und Klonierungstechniken

#### 3.2.3.1 Sterilisationsmethoden

Medien für die Bakterienkultur, Lösungen ohne hitzelabile oder flüchtige Substanzen und Kunststoffmaterialien wurden bei 2 bar und 120°C für 20 Min autoklaviert. Alle übrigen Lösungen und Puffer wurden durch einen Sterilfilter mit der Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Platinösen wurden durch Ausglühen entkeimt und Spatel mit Ethanol abgeflammt.

#### 3.2.3.2 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

##### **Lagerung von Bakterien**

Zur langfristigen Lagerung von Bakterien wurde eine Glycerinkultur angelegt. Dazu wurden 3 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 14 – 16 Stunden bei 37°C und 200 U/Min inkubiert. Aus dieser Übernachtskultur wurden 500µl Bakterienkultur mit 500µl sterilem Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -80°C.

##### **Plattenkultur**

Für die kurzzeitige Lagerung von Bakterien wurden Plattenkulturen verwendet. Dazu wurden wenige µl Bakteriensuspension auf eine Agarplatte gebracht und mit Hilfe eines Triggalsky-Spatel homogen verteilt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 14-16 Stunden bei 37°C. Diese Plattenkultur konnte bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert werden.

##### **Flüssigkultur**

Für die Präparation von Plasmiden wurden Flüssigkulturen verwendet. Je nach Präparationsmaßstab wurden 3-200 ml LB-Medium mit einer Einzelkultur angeimpft und 14-16 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

#### 3.2.3.3 Herstellung kompetenter DH 5 $\alpha$ *E.coli*- Zellen

250 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkultur angeimpft und bei 37°C und 100 U/Min bis zu einer  $OD_{600nm} = 0,6$  kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 Min auf Eis gekühlt und nachfolgend 15 Min bei 4°C und 5500xg zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 80ml vorgekühltem

Transformationspuffer resuspendiert und anschließend 10 Min auf Eis inkubiert. Nach einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 5500 x g wurde das Bakterienpellet in 18,6 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und unter Schwenken 4x350µl DMSO hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Min bei 0°C wurde die Suspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 3.2.3.4 DNA Hydrolyse mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA mittels Endonukleasen erfolgt nach den Angaben des Herstellers der entsprechenden Restriktionsendonuklease und wird anschließend, im Agarosegel kontrolliert.

### 3.2.3.5 Dephosphorylierung von DNA

Für die nachfolgende Ligation wurden die DNA-Fragmente mit der Kälberdarmphosphatase (CIP) laut Herstellerangaben dephosphoryliert. Die behandelte DNA wurde im Anschluss Phenol-Chloroform extrahiert.

### 3.2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-DNA-Ligase in 1x Ligase-Puffer nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei katalysiert die T4-DNA-Ligase die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3´-Hydroxyl- und den 5´-Phosphatgruppen linearer DNA Fragmente. Da synthetisch hergestellte Oligonukleotide keine 5´-Phosphatgruppen tragen, mussten diese vor der Ligationsreaktion kinasiert werden (3.2.1.5).

### 3.2.3.7 Transformation von kompetenten *E.coli* – Zellen

100 µl chemisch kompetenter DH5α-Zellen wurden mit 10 ng Plasmid-DNA 30 Min auf Eis inkubiert, gefolgt von 45 sec bei 42°C und 2 Min bei 0°C. Nach Zugabe von 500µl vorgewärmten LB-Medium, wurden die Bakterien bei 37°C bei 200 rpm für 1 Stunde inkubiert. Dabei wuchsen die Bakterien in einer nicht selektierenden Umgebung an und wurden nach dieser Inkubationszeit auf den entsprechenden durch Antibiotika selektiven LB-Agarplatten ausplattiert.

### 3.2.3.8 Plasmid-DNA Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Präparation) mittels QIAprep-Spin Miniprep Kit

3ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika werden mit dem transformierten Bakterium angeimpft und für 14 bis 16 Stunden bei 37°C und 200 U/Min inkubiert. Anschließend erfolgt die Plasmid-Präparation nach Angaben des Herstellers.

### 3.2.3.9 Plasmid-DNA Präparation im großen Maßstab (Maxi-Präparation) mittels QIAprep-Spin Maxiprep Kit

Für die Maxi-Plasmid-Präparation wurden 200 ml LB-Medium mit den transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 U/Min kultiviert. Anschließend wurde das Plasmid nach Angaben des Herstellers isoliert.

## 3.2.4 Nachweis der physikalischen Aufnahme von Nukleinsäuren

### 3.2.4.1 Liquid-Hybridization-Assay (LHA)

Zum Nachweis der physikalischen Aufnahme von siRNA durch Säugetierzellen wurde ein Aliquot der durch Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnenen Gesamt-RNA mit 40fmol entsprechender <sup>32</sup>P-markierter sense-RNA-Sonde für 10 Min bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgt das Annealing der radiomarkierten sense-RNA-Sonde an den antisense-Strang der siRNA für 1h bei 37°C. Nach dieser Inkubationszeit wurden 40ng RNase A und 0,1 U RNase T1 zu den annealten Proben gegeben und für weitere 10 Min bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte der Auftrag der Proben mit 1 Vol Probenpuffer ein Semi- bzw. Natives-Polyacrylamidgel. Nach dem Gellauf bei 16mA und 4°C für ~ 3 Stunden wurden die im Gel aufgetrennten RNAs auf eine Hybond N Membran geblottet. Die Visualisierung und Quantifizierung der Signale erfolgte mittels eines PhosphorImagers und dem Programm ImageQuant.

### 3.2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyser der aufgenommenen fluoreszenzmarkierten siRNA erfolgt durch Inverse Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurden 10000 Zellen pro Kammer eines 8 Kammer Objektträgers und 5000 Zellen pro Feld eines 6 Feld Teflon beschichteten Objektträgers im entsprechenden Medium(+) ausgebracht. Nach über Nacht Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit

den Inkubationslösungen, bestehend aus OptiMEM, siRNA +/- PTOs und Aktivatoren bzw. Inhibitoren der Endozytischen Aufnahmewege, über unterschiedliche Zeiträume überschichtet und im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen 5x mit PBS gewaschen und für 10 Min mit 2%(w/v) Paraformaldehyd/ PBS fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem DAKO mounting medium eingedeckelt und bei 4°C bis zur mikroskopischen Untersuchung gelagert.

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Aspekte des RNA-induzierten Gene silencing (RNAi) vorgestellt.

Im ersten Teil wird der Einfluss der lokalen mRNA-Zielregionstruktur auf die Wirksamkeit von siRNAs untersucht. Als Maß für die Wirksamkeit werden  $IC_{50}$ -Werte und die maximale Suppression der ICAM-1 Expression durch siRNAs, die gegen strukturell unterschiedliche Targetregionen dieser mRNA gerichtet sind, ermittelt. Als read-out dienen hierbei RT-qPCR Analysen. Für die Auswahl der verwendeten siRNAs wurde eine Strukturvorhersage mit dem Programm mFold zugrunde gelegt.

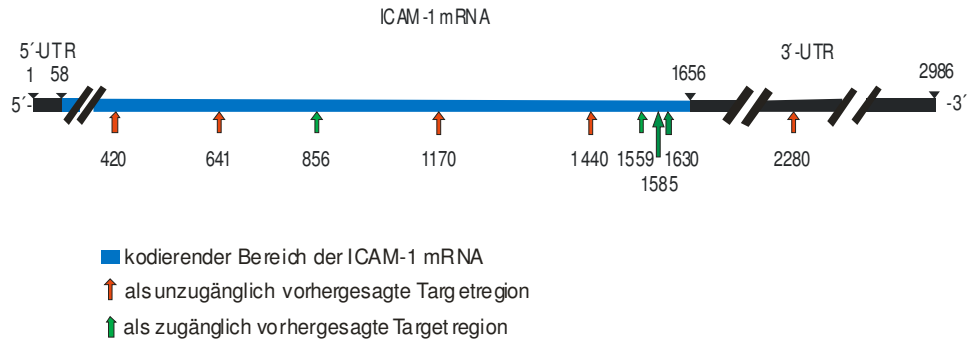
Im zweiten Teil der Arbeit wird ein neuartiger Ansatz für die zellulären Aufnahme von siRNAs vorgestellt. Dafür wurde zunächst ein sehr sensitives Nachweisverfahren zur Detektion intrazellulärer siRNAs entwickelt. Des Weiteren wurde die spontane Aufnahme von siRNAs anhand unterschiedlicher Zelllinien untersucht und durch die Inkubation mit Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotiden (PTOs) entscheidend verbessert. Die PTO-stimulierte Aufnahme von siRNA wurde charakterisiert und es wurden erste Versuche zur biologischen Wirksamkeit der so aufgenommenen siRNA durchgeführt.

### 4.1 Einfluss der mRNA Struktur auf die Wirksamkeit von siRNAs

#### 4.1.1 Strukturvorhersage der mRNA

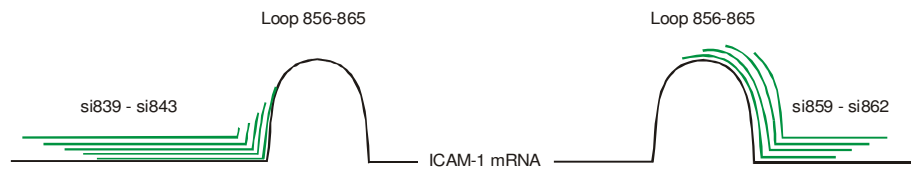
RNA-Moleküle besitzen eine erstaunliche Fähigkeit zur Ausbildung unterschiedlichster Strukturen (zur Übersicht: Schroeder et al., 2004). Der Einfluss der RNA-Struktur auf die Wirksamkeit von AS-ONs wurde in mehreren Studien belegt. Im Folgenden wird der Einfluss der ICAM-1 mRNA-Struktur auf die Wirksamkeit von siRNAs untersucht. Die Strukturvorhersage der ICAM-1 mRNA wurde von Rosel Kretschmer-Kazemi Far (Kretschmer-Kazemi and Sczakiel, 2003) durchgeführt und veröffentlicht. Anhand dieser mit dem Programm mFold durchgeführten Vorhersagen wurden Zielregionen für die siRNAs ausgewählt, bei denen der antisense Strang der siRNA entweder komplementär zu einem als zugänglich oder als unzugänglich vorhergesagten Bereich war. Dazu wurde die ICAM-1 mRNA Struktur in fortlaufenden Fenstergrößen von 800nt mit einer Schrittweite von 100nt bestimmt. Die Strukturvorhersagen wurden auf ungepaarte Bereiche von 10nt Länge und deren Häufigkeit in allen Strukturen untersucht. Als zugänglich wurden diejenigen Zielregionen definiert, die den größten, in den Strukturvorhersagen stark konservierten, ungepaarten Bereich besitzen (Patzel et al., 1999). Wie aus Abb. 11 hervorgeht wurden die Zielregionen über die gesamte

mRNA verteilt gewählt. Zudem wurden sämtliche siRNAs auf mögliche Homologien zu anderen Genen untersucht.



**Abb. 11: Verteilung der siRNA über die ICAM-1 mRNA.** Die ICAM-1 mRNA besitzt am 5'- und am 3'-Ende der mRNA untranslatierte Bereiche (5'-UTR; 3'-UTR). Der kodierende Bereich ist blau dargestellt. Die zugänglichen Targetregionen sind mit einem grünen Pfeil (↑) gekennzeichnet und die unzugänglichen Regionen mit einem roten Pfeil (↑).

Abgesehen von der homogenen Verteilung der siRNAs über die gesamte ICAM-1 mRNA wurden für die Loop-Region 856-865 9 siRNAs konstruiert (Abb. 12), die entweder mit dem 5'- oder mit dem 3'-Ende des antisense-Stranges der siRNA zu dem zugänglichen Bereich komplementär waren. Für die restlichen Zielregionen wurden jeweils 2 siRNAs ausgewählt und auf ihre Wirksamkeit getestet.



**Abb. 12: Schematische Darstellung der Auswahl der siRNAs am Beispiel der Loop-Region 856-865 der ICAM-1 mRNA.** Die in grün dargestellten siRNAs reichen entweder mit dem 5'- oder 3'-Ende des antisense-Stranges in die zugängliche Region, bezeichnet als Loop 856-865, der ICAM-1 mRNA.

#### 4.1.2 Inhibition der ICAM-1 Expression mit siRNA

Die  $IC_{50}$ -Werte und die maximale Suppression der ICAM-1mRNA Expression  $I_{100nM}$  wurden durch transiente Transfektion der Zelllinie ECV304 mit siRNA ermittelt. Dazu wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an siRNA transfiziert. Nach einer Regenerationszeit von 4 Stunden wurde die ICAM-1 Expression durch IL-1 $\beta$  stimuliert und es erfolgte 16 Stunden später die Aufarbeitung der Zellen. Die Menge an ICAM-1 mRNA wurde durch eine RT-qPCR bestimmt. Die Werte wurden auf IL-1 $\beta$ -stimulierte Zellen normiert. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente sind in Tab. 2

dargestellt. In den als zugänglich vorhergesagten Zielregionen ließ sich ein durchschnittlicher  $IC_{50}$ -Wert von 4nM ermitteln, der um eine Logstufe unter dem für die unzugänglichen Zielregionen berechneten  $IC_{50}$ -Wert von 42nM liegt. Allerdings gab es auch bei den für die unzugänglichen Zielregionen konzipierten siRNAs sehr potente siRNAs mit einem  $IC_{50}$ -Wert unterhalb von 10nM. Bei der gemessenen Inhibition der ICAM-1 Expression bei einer 100nM Transfektion der entsprechenden siRNA ( $I_{100nM}$ ) konnte man keinen signifikanten Unterschied zwischen den als zugänglich und unzugänglich vorhergesagten Targetregionen feststellen. Der Hauptunterschied zwischen den zugänglichen und unzugänglichen Zielregionen liegt in der Wahrscheinlichkeit, mit der man dort eine wirksame siRNA konstruieren kann. In den als zugänglich vorhergesagten Regionen hatten alle getesteten siRNAs einen  $IC_{50}$ -Wert von  $\leq 10nM$ , wohingegen in den als nicht zugänglich vorhergesagten Zielregionen nur 50% einen  $IC_{50}$ -Wert von  $\leq 10nM$  vorweisen konnten. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den siRNAs si839 - si843 und si859 - si861 gemessen, obwohl die as-Stränge dieser siRNAs mit unterschiedlichen Enden des antisense-Stranges an die zugänglichen Bereiche des Loop 856-865 paaren (siehe Abb. 12).

a) zugängliche Zielregionen

siRNA	$IC_{50}$ [nM]	$I_{100 nM}$ (%)
si839	5 ± 3	22 ± 1
si840	4 ± 2	28 ± 1
si841	4±30	35±4
si842	3±2	20±3
si843	3±2	8±8
si859	4±5	26±13
si860	2±23	33±15
si861	10±15	31±24
si1595	2±8	18±16
si1546	4±2	11±1
Mittelwert	4	23

b) unzugängliche Zielregionen

siRNA	$IC_{50}$ [nM]	$I_{100 nM}$ (%)
si424	> 100	50±30
si429	>80	40±10
si640	5±2	25±3
si650	4±2	10±2
si1153	7±18	20±3
si1437	6±5	30±12
si1452	40±5	18±14
si2289	>100	~100
Mittelwert	>42	37

**Tab. 2:  $IC_{50}$  und  $I_{100 nM}$  Werte der getesteten siRNAs.** ECV304 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an siRNA transfiziert. Anschließend wurde der  $IC_{50}$ -Wert und der  $I_{100nM}$  mittels RT-qPCR bestimmt. In a) sind die Ergebnisse für die zugänglichen Zielregionen und in b) für die unzugänglichen Regionen dargestellt.

Da mehrere Veröffentlichungen (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003) die Wichtigkeit der absoluten Stabilität der siRNA ( $\Delta G$ ) und besonders der Stabilität am 5'-Ende des antisense-Stranges als Kriterium für das erfolgreiche Design wirksamer siRNAs gezeigt haben, wurden diese Parameter ebenfalls untersucht. Um mögliche Beziehungen zwischen der Wirksamkeit der getesteten siRNA und thermodynamischen Eigenschaften festzustellen, wurden Schmelztemperatur,  $\Delta G$  und die Stabilität am 3'- und 5'-Ende des antisense-Stranges der siRNAs mit Hilfe des Oligo 6 Primer Analyse Programms berechnet. Diese Berechnungen sind in Tab. 3 dargestellt. Es gibt weder in der absoluten Stabilität des antisense-Stranges  $\Delta G$  noch in den Stabilitäten des 3'- bzw. des 5'-Endes des antisense-Stranges einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen getesteten siRNAs.

siRNA	TM Oligo 6 [°C]	$\Delta G$ [kcal/mol]	3' Stabilität [kcal/mol]	5' Stabilität [kcal/mol]
si424	76,4	-50,4	-9	-7,8
si429	76,8	-50,7	-8,7	-11,7
si640	71,9	-46,9	-7,9	-8,5
si650	69,7	-45,3	-10	-9,8
si839	71,4	-46,5	-7,9	-10,1
si840	69,9	-45,9	-8,4	-8,7
si841	70,3	-46,1	-9,7	-8,9
si842	70	-45,6	-9,2	-9,1
si843	70,2	-46	-9,6	-9,1
si859	77,3	-51,2	-12,3	-9,6
si860	77,4	-50,4	-12,3	-10,4
si861	77,1	-50,6	-11,6	-9,7
si862	76,9	-50,9	-10	-8,9
si1153	78,7	-52	-10,2	-12,6
si1438	74,7	-50,1	-9,6	-10,6
si1452	79,7	-53,2	-10,3	-10,5
si1546	71,2	-46,3	-7	-8,2
si1595	66,8	-42,8	-5,2	-8,4
si2289	73,9	-48,9	-11,2	-8,4

**Tab. 3: Thermodynamische Eigenschaften der getesteten siRNAs.** Die Berechnung der thermodynamischen Eigenschaften der unterschiedlichen siRNAs erfolgte mit dem Programm Oligo 6. Die Berechnung der 3'- und 5'-Stabilität erfolgte jeweils mit den 5 endständigen Basenpaaren der siRNA.

Von einigen getesteten siRNAs konnte weder ein  $IC_{50}$  noch ein  $I_{100nM}$  – Wert bestimmt werden, da diese siRNAs eine irreguläre Dosis-Wirkung-Beziehung gezeigt haben. Die Transfektionsergebnisse und die thermodynamischen Eigenschaften dieser siRNA mit irregulären Eigenschaften sind in den Tab. 4a und Tab. 4b dargestellt. Insbesondere für die siRNA si-sc4 wurde eine irreguläre Dosis-Wirkung-Beziehung beobachtet, obwohl diese siRNA keinerlei Homologien zu einer im menschlichen Genom vorhandenen

Sequenz aufweist. Trotzdem verringerte die Transfektion von si-sc4 die ICAM-1 mRNA Menge auf sehr stark. Ebenso verringerte die Transfektion von si2304 die ICAM-1 mRNA Menge und wies selbst bei einer Transfektion von 0,03 nM siRNA keinerlei Dosisabhängigkeit auf.

Bei der Überprüfung der absoluten Stabilität  $\Delta G$  und der Stabilität am 3'- bzw. am 5'-Endes der antisense-Stränge konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen siRNAs und den übrigen siRNAs, die in diese Studie eingegangen sind, festgestellt werden.

a)

	I <sub>0,03 nM</sub> (%)	I <sub>0,3 nM</sub> (%)	I <sub>1 nM</sub> (%)	I <sub>5 nM</sub> (%)	I <sub>10 nM</sub> (%)	I <sub>30 nM</sub> (%)	I <sub>100 nM</sub> (%)
si1141		35	69		44		44
si1566		7	48		19		28
si1591		34	12	28	13	77	34
si2304	26	20	27		49		21
si-sc-4			54		20		27

b)

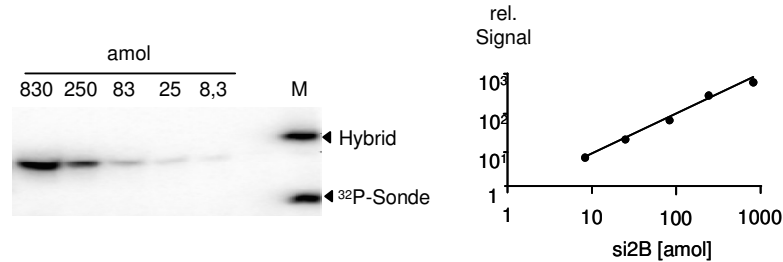
siRNA	Zugänglichkeit der Targetregion	TM [°C]	$\Delta G$ [kcal/mol]	3' Stabilität [kcal/mol]	5' Stabilität [kcal/mol]
si1141	-	78.8	-47.1	-9.7	-8.2
si1566	+	73.7	-48.0	-7.0	-12.3
si1591	+	69.6	-45.5	-9.9	-7.9
si2304	-	65.3	-42.2	-7.0	-11.7
si-sc4		65.9	-43.3	-6.8	-8.1

**Tab. 4: Ermittelte ICAM-1-Expression a) und b) thermodynamische Eigenschaften der irregulären siRNAs.** a) ECV304 Zellen wurden mit den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen an siRNA transfiziert. Anschließend wurde die ICAM-1 mRNA Menge durch RT-qPCR bestimmt. b) Die biophysikalischen Eigenschaften der irregulären siRNAs wurden mit Hilfe des Programms Oligo 6 berechnet.

## 4.2 Entwicklung einer quantitativen Nachweismethode von siRNA

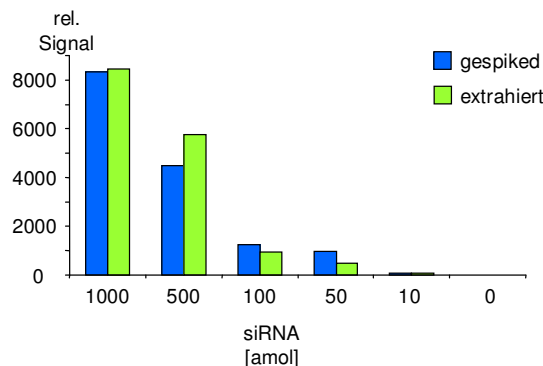
Die Analyse der Spontan-Aufnahme von siRNA durch humane Zellen benötigt eine sehr sensitive und quantitative Methode. Normalerweise nutzt man die 5'-Markierung der Nucleinsäuren mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP als Standardmethode für den intrazellulären Nachweis aufgenommener Nucleinsäuren. Diese Methode war für unsere Zwecke jedoch nicht anwendbar, da wir in Vorexperimenten eine unspezifische Phosphataseaktivität im Zellkulturüberstand nachweisen konnten, wodurch es zu einer Abspaltung des 5'-Phosphats unserer eingesetzten siRNAs kam (Overhoff et al., 2004).





**Abb. 14: Sensitivität und Relation zwischen zugesetzter siRNA und Signal im LHA.** Zu einem Gesamt-RNA-Extrakt aus ECV304 Zellen wurden definierte Mengen an si2B gegeben. Anschließend erfolgte der Nachweis im LHA und die Analyse mittels ImageQuant. Als Marker (M) dienen <sup>32</sup>P-si2B (Hybrid) und <sup>32</sup>P-s2B (<sup>32</sup>P-Sonde).

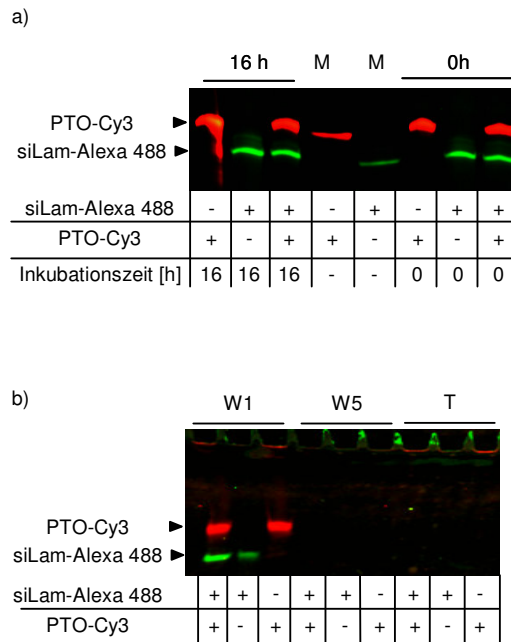
Um eine zuverlässige Aussage über die spontan durch Zellen aufgenommene Menge an siRNA treffen zu können, ist neben einem sehr sensitiven Nachweisverfahren auch ein sehr effektives Extraktionsverfahren für kleine Nukleinsäuren erforderlich. Die zum Zeitpunkt der Experimente auf dem Markt erhältlichen Gesamt-RNA-Extraktionskits hatten eine Ausschlusslänge von 200nt. Da es sich bei siRNAs um RNAs mit einer Länge um 20 nt handelt, musste zunächst überprüft werden, ob die herkömmliche Phenol-Chloroform-Extraktion für RNA die gewünschten kleinen RNAs ohne großen Verlust zuverlässig aus einem Zellextrakt isoliert. Dazu wurde eine definierte Menge an si2B zu einem Zellextrakt aus ECV304 Zellen gegeben und diese mittels Phenol-Chloroform-Extraktion extrahiert. In einem Kontrollexperiment wurde die gleiche Menge an siRNA (si2B) zu einem Gesamt-RNA-Extrakt gegeben (gespiked). Diese wurden anschließend parallel im LHA nachgewiesen. Wie in Abb. 15 erkennbar, ist die siRNA quantitativ aus dem Zellextrakt extrahierbar.



**Abb. 15: Extraktion der siRNA aus Zellextrakt.** Zu einem Gesamtzellextrakt aus ECV304 Zellen wurden definierte Mengen an si2B gegeben und mittels Phenol-Chloroform extrahiert (extrahiert ■). Parallel dazu wurden definierte Mengen an siRNA zu einem ECV-RNA-Extrakt gegeben (gespiked ■). Der Nachweis der siRNAs erfolgte mittels LHA.

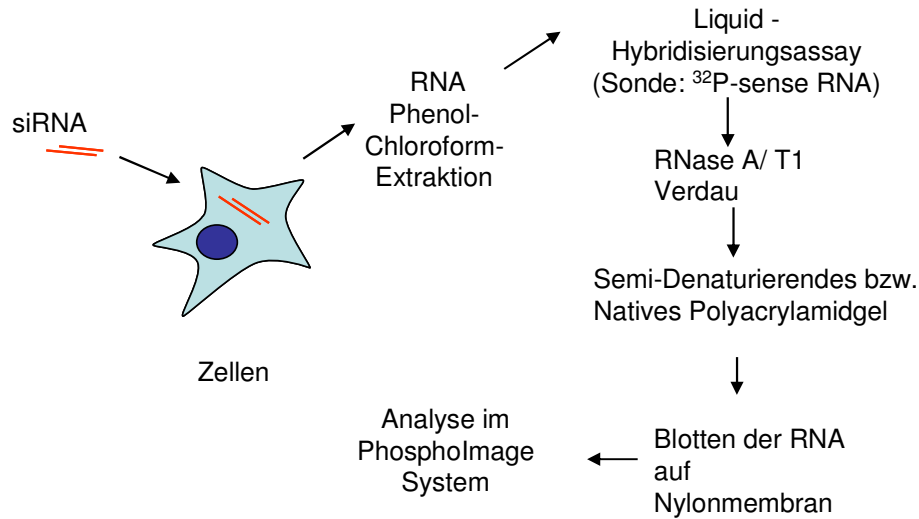
Um sicherzustellen, dass es sich bei der nachgewiesenen siRNA um internalisierte siRNA handelt und nicht um unspezifisch an die Membran gebundene siRNA, wurden

die Waschbedingungen überprüft. Dazu wurden SK-RC35 Zellen mit 200nM siLam-Alexa 488 und 600 nM TM6-6-Cy3 über 16 Stunden in serumfreiem Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 mal mit 1ml PBS gewaschen und für 2 Min mit 200µl einer Trypsin/EDTA Lösung bei 37°C inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 und 16 Stunden, nach den Waschschritten 1 und 5 und nach der Behandlung mit der Trypsin/EDTA Lösung wurden jeweils Aliquots aus dem Überstand entnommen und auf ein 15%iges natives PAA-Gel aufgetragen. Wie man der Abb. 16a) entnehmen kann, blieb sowohl die siRNA als auch das PTO über den Inkubationszeitraum von 16 Stunden intakt. Nach 5 maligem Waschen der Zellen mit 1ml PBS befand sich weder detektierbare siRNA noch detektierbares PTO im Waschüberstand. Auch durch die Inkubation der Zellen mit Trypsin/EDTA konnten keine unspezifisch an der Zellmembran gebundenen Nukleinsäuren freigesetzt werden (siehe Abb. 16b)).



**Abb. 16: a) Stabilität der siRNA und PTOs im Zellkulturüberstand und b) Überprüfung der Waschbedingungen.** SK-RC35 Zellen wurden mit Alexa-488 markierter siLam ± Cy3-markiertem PTO (36nt) inkubiert. a) Aus dem Überstand wurden nach 0 und 16 Stunden Proben entnommen. b) Nach der 16stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen 5 mal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA Lösung behandelt. Die Probenentnahme erfolgte nach den Waschschritten 1 (W1) und 5 (W5) und nach der Trypsinbehandlung (T). Die Proben wurden in einem nativen-Gelsystem aufgetrennt. Als Größenmarker diente ein Cy3-markiertes 36nt langes PTO und Alexa-488 markiertes siLam.

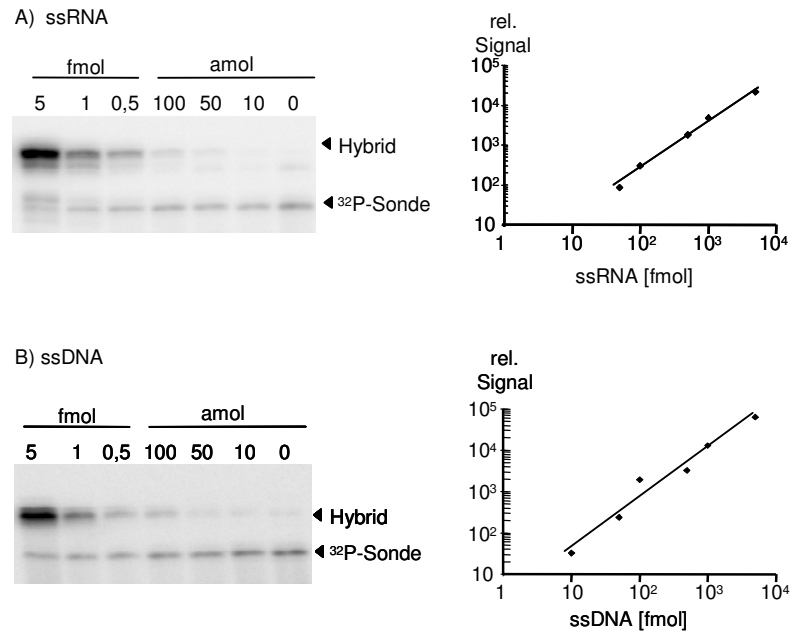
Nach diesen Vorexperimenten erfolgten die Aufnahmeexperimente nach dem in Abb. 17 schematisch dargestellten Protokoll.



**Abb. 17: Schematische Darstellung eines Aufnahmeexperimentes mit anschließendem LHA.** Die siRNA wird über einen bestimmten Zeitraum mit Zellen inkubiert und anschließend erfolgt die RNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform mit Ethanol-Fällung der RNA. Anschließend wird die RNA im LHA mit der Sonde hybridisiert. Überschüssige Sonde wird im RNase A/T1 Schritt verdaut und die RNA im Native-Gelsystem bzw. Semi-Denaturierendem-Gelsystem aufgetrennt. Nach dem Blotten der RNA auf eine Nylon-Membran erfolgt die Analyse des Gels im Phosphorimage System.

Im Anschluss an den siRNA-Nachweis wurde zusätzlich überprüft, ob man generell den LHA auch zum Nachweis anderer kurzer Nukleinsäuren, wie einzelsträngiger RNA und DNA einsetzen kann. Dazu wurden definierte Mengen an ssRNA und ssDNA zu einem Gesamt-RNA-Extrakt gegeben und im LHA nachgewiesen.

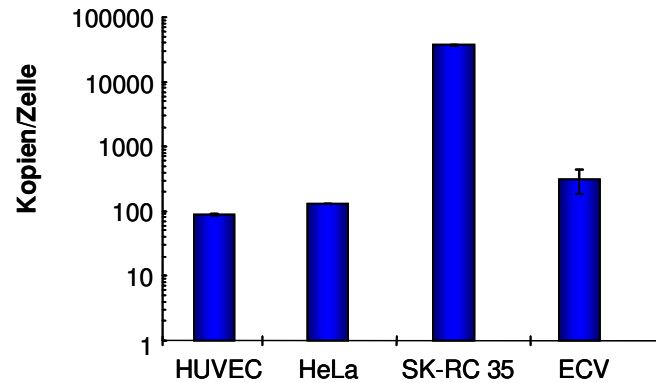
Wie man in Abb. 18 sehen kann ist dieses möglich. Für den unter A) geführten Nachweis von einzelsträngiger RNA und den unter B) geführten Nachweis von einzelsträngiger DNA konnte eine Nachweisgrenze von 100 amol mit einer linear verlaufenden Standardkurve ermittelt werden. Da der Nachweis dieser Nukleinsäurespezies für die Fragestellung, der in dieser Arbeit nachgegangen werden soll, nicht relevant ist, wurde der Assay für diese Nukleinsäuren nicht weiter optimiert.



**Abb. 18: Nachweis von ssRNA und ssDNA durch LHA.** Definierte Mengen an ssRNA und ssDNA wurden zu einem RNA-Extrakt gegeben und mit einer <sup>32</sup>P-RNA-Sonde nachgewiesen. Das daraus resultierende Hybrid wurde im Phosphormager detektiert und quantifiziert.

#### 4.2.1 Spontan-Aufnahme von siRNA durch humane Zellen

Um die spontane Aufnahme von nackten siRNAs durch humane Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit 600nM si2B über 16h Stunden in FKS-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurde der Nachweis aufgenommener siRNA durch den oben beschriebenen LHA durchgeführt. Wie in Abb. 19 dargestellt, nehmen unterschiedliche humane Zellen unterschiedliche Mengen an siRNA auf, wobei die Menge an aufgenommener siRNA in den Zelllinien HeLa und ECV304 in einem ähnlichen Bereich liegen, wie bei den primären HUVEC Zellen. Besonders die humane Nieren Karzinom Zelllinie SK-RC 35 nimmt ohne Transfektionsreagenzien eine große Menge an siRNA auf (~ 30.000 Kopien siRNA/Zelle). Dieses entspricht einer um den Faktor 100 verbesserten Aufnahme gegenüber den weiteren getesteten Zellen. Obwohl die Menge an spontan aufgenommener siRNA in einem messbaren Bereich liegt, ist diese dennoch so gering, dass man keinen biologischen Effekt beobachten kann.



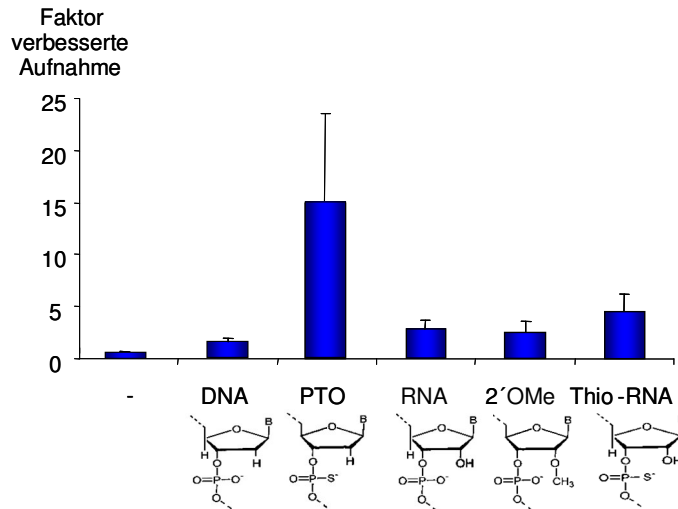
**Abb. 19: Spontane Aufnahme von siRNA durch unterschiedliche Zellen.** Die in der Abb. aufgeführten Zellen wurden mit 600nM si2B über einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Menge an intrazellulärer siRNA mit dem LHA bestimmt.

### 4.3 PTO vermittelte Aufnahme von siRNA

Da die Aufnahme von längeren DNA-Oligonukleotiden durch Koinkubation mit unterschiedlichen physikalischen Formen von Nukleinsäuren wie z.B. supercoiled DNA stimulierbar ist (Lehmann and Sczakiel, 2005), wurde der Einfluss von verschiedenen Nukleinsäuren, unter anderem von an den 3'- und 5'-Enden Phosphorothioat modifizierten DNA-Oligonukleotiden (Gapmere), auf die spontane Aufnahme von siRNA getestet. Das Ergebnis zeigte eine verbesserte Aufnahme der siRNA durch Koinkubation mit den teilmodifizierten Oligonukleotiden. Diese Stimulation der siRNA Aufnahme wurde anschließend charakterisiert. Wesentliche Teile der nachfolgenden Ergebnisse sind publiziert (Overhoff and Sczakiel, 2005).

#### 4.3.1 Chemische Struktur des Koinkubators

Zunächst einmal wurde der Einfluss verschiedener chemischer Strukturen des Koinkubators auf die Aufnahme von siRNA untersucht. Dazu wurde ein 24mer Oligo (TM6-4) in einer Konzentration von 600  $\mu$ M als DNA, RNA, PTO, 2'-O-Methyl RNA und Thio-RNA als Koinkubator in einem Aufnahmeexperiment mit 200nM si2B eingesetzt. Durchgeführt wurde die Inkubation mit ECV304 Zellen unter serumfreien Bedingungen. Wie man in Abb. 20 sehen kann, stimulierte die Anwesenheit von TM6-4, als komplett Phosphorothioat-modifiziertes DNA-Oligonukleotid (PTO), die Aufnahme der siRNA im Mittel um den Faktor  $\sim 15$ . Auch durch Koinkubation mit der entsprechenden Thio-RNA konnte die Aufnahme von siRNA um den Faktor  $\sim 5$  gesteigert werden. Sowohl die Koinkubation mit unmodifizierter DNA und RNA als auch mit 2'-O-Methyl-RNA führte im Vergleich zur Inkubation der siRNA ohne Koinkubator zu keiner signifikanten Steigerung der spontanen Aufnahme von siRNAs.



**Abb. 20: Einfluss der Nucleinsäurechemie auf die Stimulation der siRNA Aufnahme.** ECV304 Zellen wurden mit 200 nM si2B in Gegenwart von den in der Abb. dargestellten unterschiedlichen 24mer Koinkubatoren über 16 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der siRNA-Aufnahme mit dem LHA. Die Aufnahme der siRNA durch Stimulation wurde auf die nicht stimulierte Aufnahme von siRNA normiert.

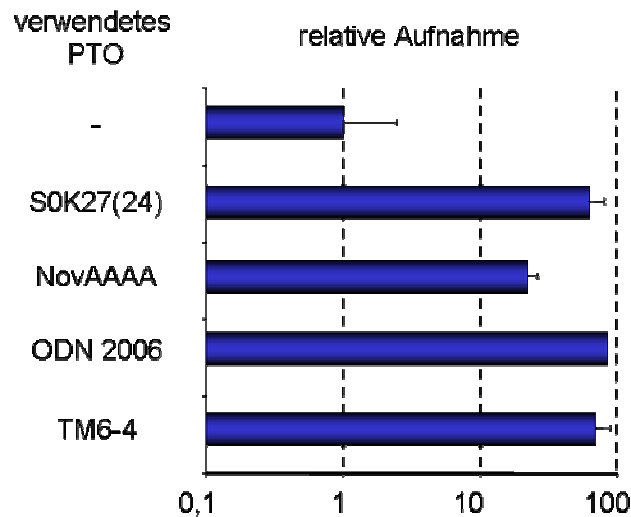
Um zu sehen, ob auch andere Nucleinsäurespezies wie z.B. Plasmid-DNA einen Einfluss auf die Aufnahme von 200nM siRNA haben, wurde siRNA mit jeweils einzelsträngiger RNA (ssRNA), doppelsträngiger DNA (dsDNA), linearem Plasmid und zirkulärem Plasmid mit einer Konzentration von 2µg/ml koinkubiert. Anschließend wurde die aufgenommene siRNA mit dem LHA nachgewiesen. Als positive Kontrollen wurden eine Koinkubation mit TM6-6 und TM6-12, jeweils als PTOs, mitgeführt. Wie aus der Tab. 5 erkennbar ist, hatten nur die PTOs einen Einfluss auf die Aufnahme von siRNA. Die Aufnahme der siRNA bei Koinkubation mit den anderen Nucleinsäurespezies lag unterhalb der Nachweisgrenze von 250 Kopien pro Zelle.

Koinkubierte Nucleinsäure	Länge	Konzentration [nM]	Kopien siRNA pro Zelle
-	-	-	≤ 250
PTO: TM6-6	36 nt	~ 420	~ 3000
PTO: TM6-12	72 nt	~ 210	~7000
unmodifizierte ssRNA	3 kb	~ 5	≤ 250
unmodifizierte: dsDNA	250 bp	~ 30	≤ 250
zirkuläre Plasmid DNA	~ 4 kb	~ 2	≤ 250
lineare Plasmid DNA	~ 4 kb	~ 2	≤ 250

**Tab. 5. Einfluss unterschiedlicher Nucleinsäurespezies auf die Aufnahme von siRNA.** ECV304 Zellen wurden mit 200nM siRNA in Anwesenheit von 2µg/ml der hier angegebenen Koinkubatoren über 16 Stunden inkubiert. Die Molarität der Koinkubatoren ist in der dritten Spalte aufgeführt. Die Nachweisgrenze lag in diesem Versuch bei 250 Kopien/Zelle.

### 4.3.2 Sequenzabhängigkeit des Koinkubators

Die im vorherigen Experiment verwendete Nukleinsäuresequenz für den Koinkubator (TM6-4) wurde als Aufnahmesequenz in der Hamsterzelllinie BHK-21 selektioniert. Um zu testen, ob die Stimulation der siRNA Aufnahme von der Sequenz des Koinkubators abhängt, wurden PTOs mit unterschiedlichen Sequenzen getestet. Dazu wurden ECV304 Zellen mit 200 nM si2B und 600nM des entsprechenden Koinkubators über 16 Stunden inkubiert. Einige dieser PTOs besitzen biologische Aktivität in anderen Bereichen, wie z.B. das immunstimulatorisch wirksame ODN 2006 (Hartmann et al., 2000). Wie man der Abb. 21 entnehmen kann, gab es keinen signifikanten sequenzabhängigen Unterschied in der Stimulation der getesteten PTOs. Die Inkuabtion der ECV304 Zellen mit dem NovAAAA PTO zeigte eine leicht verschlechterte Aufnahme der siRNA gegenüber den anderen getesteten Sequenzen, wobei die Stimulation der Aufnahme auch in diesem Fall einem Faktor von 30 gegenüber der Kontrolle beträgt. Die drei weiteren getesteten Sequenzen S0K27(24), ODN 2006 und TM6-4 zeigten vergleichbare Mengen an aufgenommener siRNA.

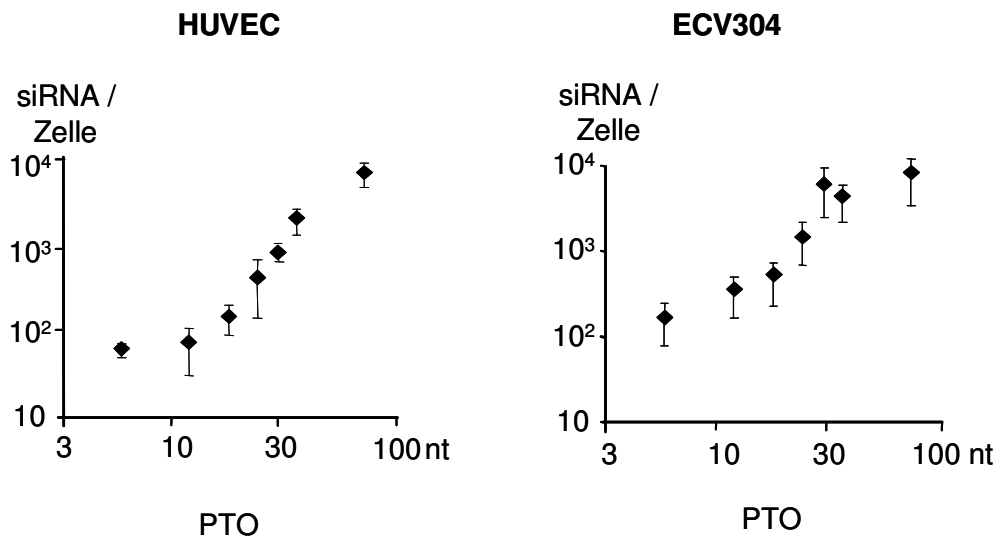


**Abb. 21: Sequenzunabhängigkeit der PTO-stimulierten Aufnahme in ECV304.** ECV304 Zellen wurden mit 200nM siRNA in Gegenwart von 600 nM der unterschiedlichen oben aufgeführten 24mer PTOs über 16 Stunden inkubiert. Angegeben ist die relative Aufnahme der siRNA, bezogen auf die nicht koinkubierte Kontrolle.

### 4.3.3 Längenabhängigkeit des Koinkubators

Um den Einfluss der Länge des Koinkubators auf die siRNA Aufnahme zu untersuchen, wurden PTO Längen von 6, 12, 18, 24, 30, 36 und 72 nt in der Zelllinie ECV304 und den primären Nabelschnur Endothelzellen HUVEC eingesetzt. Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA und 600 nM des entsprechenden PTOs über 16 Stunden

inkubiert. Wie man in Abb. 22 sieht, konnte man eine längenabhängige Stimulation der siRNA Aufnahme in beiden Zellen beobachten. Während die siRNA Aufnahme bei einer Koinkubation mit einem PTO-Hexamer (TM6-1) in der Größenordnung von 100 Kopien pro Zelle lag, zeigte die Koinkubation mit einem 72mer PTO (TM6-12) eine siRNA Aufnahme von 10.000 Kopien pro Zelle. Während man bei den primären HUVEC Zellen mit ansteigender PTO-Kettenlänge einen Anstieg der aufgenommenen siRNA-Menge beobachten konnte, konnte man bei der Zelllinie ECV304 nicht sagen, ob bei einer PTO-Kettenlänge von 30nt bereits ein Plateau für die siRNA-Aufnahme erreicht wurde oder ob sich die Aufnahme mit längeren PTOs (> 72nt) noch steigern lässt. Es wurde in einem Parallelversuch der Einfluss der Masse an PTO auf die Stimulation der Aufnahme der siRNA getestet, da man bei gleichen Konzentrationen aber unterschiedlichen Längen an PTO auch unterschiedliche Massen der modifizierten DNA mit den Zellen inkubiert. Dieser Versuch zeigte, dass die Masse an PTO keinen Einfluss auf die Aufnahme von siRNA durch Zellen hatte (Daten nicht gezeigt).

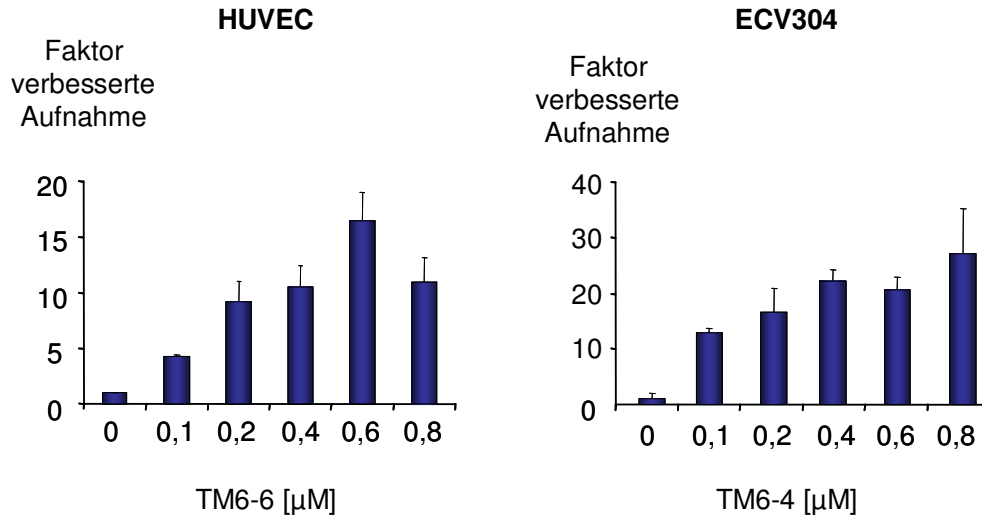


**Abb. 22: Einfluss der Kettenlänge des Koinkubators auf die Aufnahme von siRNA.** HUVEC und ECV304 Zellen wurden mit 600nM PTOs unterschiedlicher Länge und 200nM siRNA mit den oben angegebenen Zellen über einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion und die Quantifizierung der siRNA-Aufnahme mit dem LHA.

#### 4.3.4 Konzentrationsabhängigkeit

Zur Optimierung der PTO-stimulierten Aufnahme von siRNA wurden ansteigende Konzentrationen des PTOs zur Aufnahme von 200nM siRNA in Zellkulturexperimenten getestet. Die Experimente wurden an primären HUVEC Zellen und ECV304 Zellen durchgeführt. Bei den HUVEC und den ECV304 konnte ein halbmaximaler Effekt

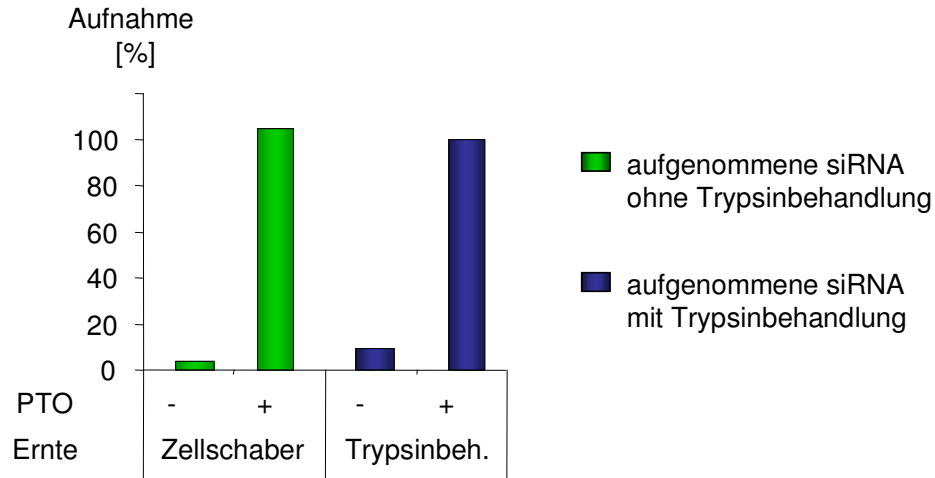
zwischen 100 und 200nM PTO gemessen werden (siehe Abb. 23). Für die HUVEC Zellen, die mit TM6-6, einem 36mer PTO koinkubiert wurden, konnte man die stärkste Stimulation bei einer PTO Konzentration von 600nM sehen, wohingegen bei ECV304, die mit dem PTO TM6-4 (24nt) koinkubiert wurden, schon ab einer Konzentration von 400 nM ein Plateau erreicht wird. Der maximale Faktor der verbesserten Aufnahme liegt bei den HUVEC Zellen bei ca. 15 und bei ECV304 Zellen bei ca. 25.



**Abb. 23: Abhängigkeit der Aufnahme der siRNA von der Konzentration des koinkubierten PTOs.** HUVEC und ECV304 Zellen wurden mit 200nM siRNA in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des angegebenen PTOs (TM6-4 und TM6-6) über einen Zeitraum von 16 Stunden koinkubiert. Die Quantifizierung der siRNA erfolgte mit dem LHA. Der Faktor der verbesserten Aufnahme wurde jeweils auf die nicht koinkubierte Probe normiert.

#### 4.3.5 Einfluss der Trypsin-Behandlung bei der Zellernte auf die aufgenommene Menge an siRNA

Es gibt Vermutungen, dass es durch Trypsin Behandlung zu einer Porenbildung in der Zellmembran kommt und auf diesem Wege zellmembranassoziierte Nukleinsäuren in die Zelle gelangen. Auf der anderen Seite wird die Inkubation der Zellen mit Trypsin zur Abwaschung unspezifischer zellmembranassoziierte Nukleinsäuren genutzt. Um den Einfluss der Trypsin-Behandlung auf die PTO-stimulierte siRNA Aufnahme zu untersuchen, wurden SK-RC35 Zellen mit 1,8μM siRNA ± 1μM TM6-6 PTO über 16 Stunden inkubiert und danach 5 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entweder mit Trypsin oder durch einen Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Die Extraktion der RNA erfolgte parallel. Wie in Abb. 24 zu sehen ist, hatte die Behandlung der Zellen mit Trypsin keinen Einfluss auf die aufgenommene Menge an siRNA, die im LHA nachgewiesen wurde.



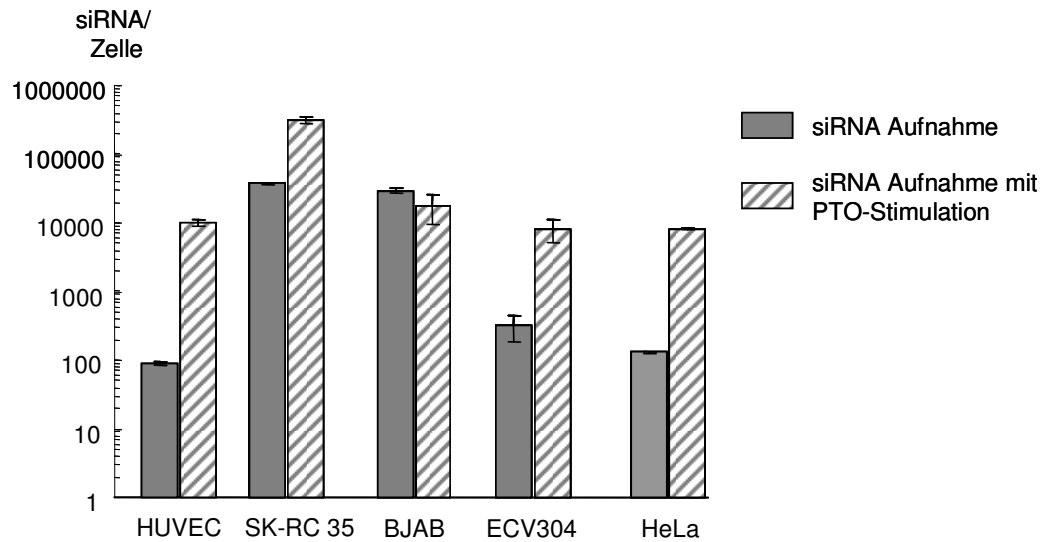
**Abb. 24: Die Aufnahme der siRNA in Abhängigkeit des Verfahrens zur Zellernte.** SK-RC35 Zellen wurden mit  $1,8\mu\text{M}$  siRNA  $\pm$   $1\mu\text{M}$  PTO inkubiert und anschließend für die RNA-Extraktion geerntet. Die Zellen wurden durch Trypsin-Behandlung bzw. durch einen Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Die RNA-Extraktion der Proben erfolgte parallel. Die Quantifizierung der Proben erfolgte im LHA. Die Proben wurden auf die PTO-stimulierte siRNA Aufnahme mit Trypsin-Behandlung normiert.

#### 4.3.6 Aufnahme von Hairpin-RNA und ssRNA

Um den Einfluss von PTO Koinkubation auf die Aufnahme anderer, kurzkettiger Nucleinsäuren zu überprüfen, wurden sowohl Hairpin-RNA (sh-siRNA) als auch einzelsträngige RNA (s-2B) in Gegenwart eines 72mer PTO (TM6-12) mit ECV304 Zellen in serumfreiem Medium für 16 Stunden inkubiert. Der Nachweis der aufgenommenen siRNA erfolgte mit dem LHA mit der  $^{32}\text{P}$ -as-2B Sonde. Die  $\sim 70\text{nt}$  lange Hairpin-RNA besteht aus einem Stamm, der die Sequenz von si2B beinhaltet, und einem Loop aus 9 nt und wurde mittels In-vitro-Transkription hergestellt (Abb. 25a). Dazu wurde zunächst die entsprechende DNA-Sequenz in einen pBluescript-Vektor kloniert. Das daraus entstandene Plasmid wurde sequenziert. Die Struktur wurde durch RNA-Probing in der Bachelor-Arbeit von Herrn Oberwahrenbrock validiert. Diese Struktur entspricht einer pre-miRNA, mit dem Unterschied, dass es keine Fehlpaarungen der RNAs im Stammbereich gibt.

Wie man der Abb. 25 b) entnehmen kann, stimulierte die Koinkubation mit dem 72nt PTO die intrazelluläre Aufnahme der sh-siRNA in dem gleichen Maße in dem auch die Aufnahme der siRNA stimuliert wurde. Im Gegensatz dazu konnte für die ssRNA keine verbesserte Aufnahme durch PTO-Stimulation gezeigt werden.

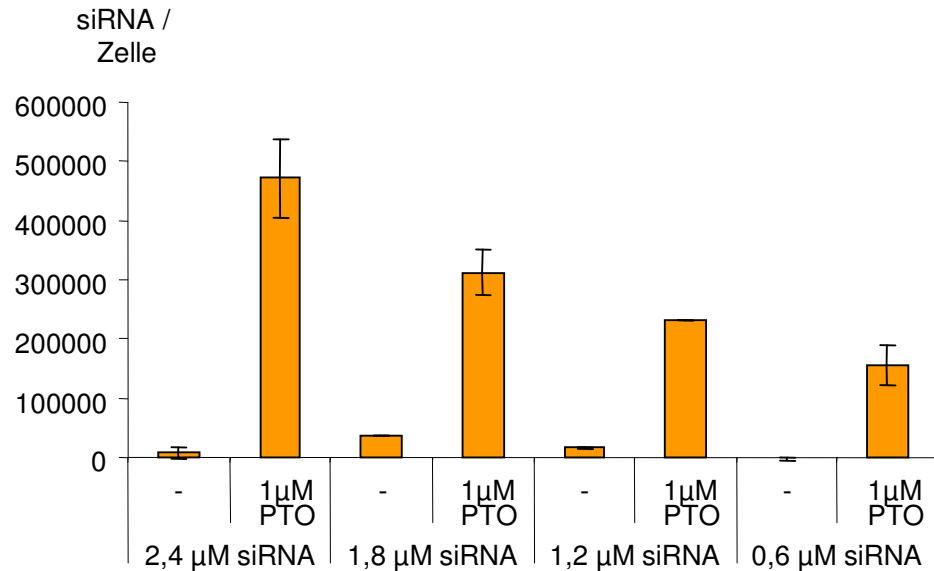




**Abb. 26: Stimulation der Aufnahme durch PTOs in den unterschiedlichen Zelllinien.** Die unterschiedlichen oben angegebenen Zelllinien wurden mit  $1,2 \mu\text{M}$  siRNA  $\pm 1 \mu\text{M}$  PTO über 16 Stunden in OptiMEM inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der internalisierten siRNA über den LHA.

#### 4.3.8 Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von siRNA

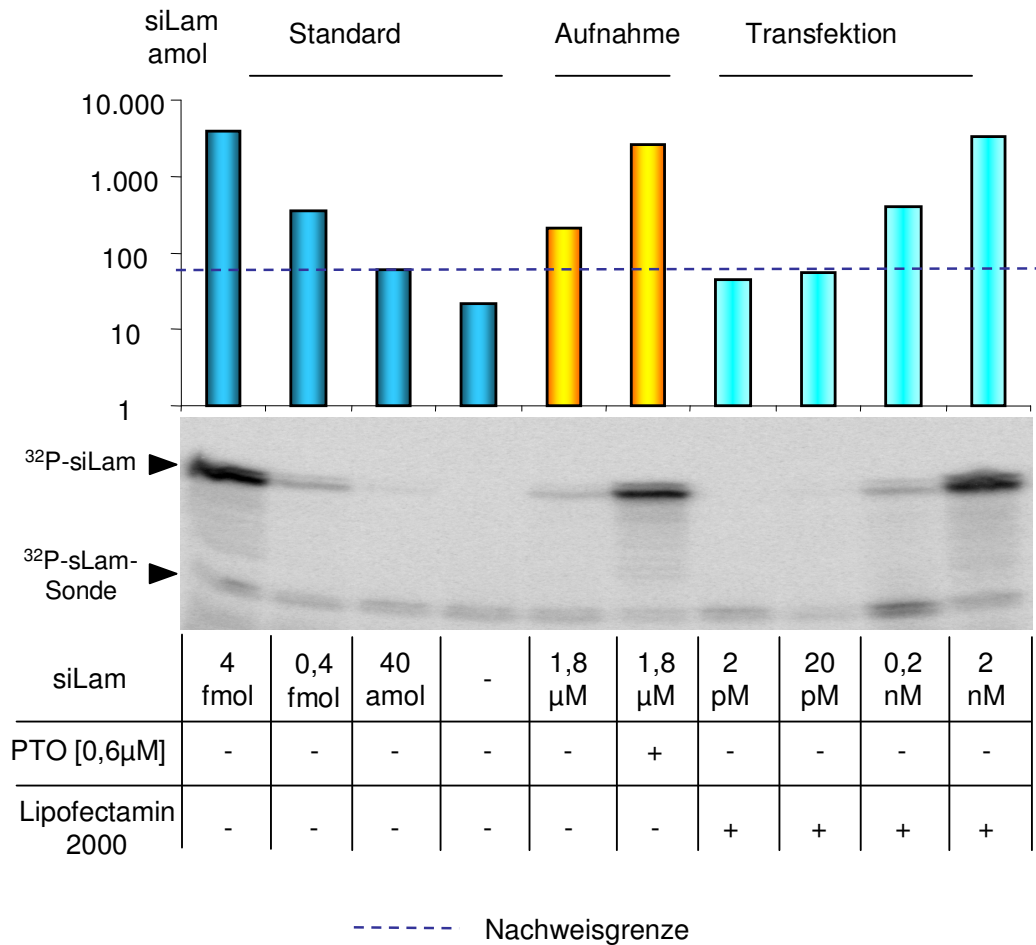
In den vorhergegangenen Versuchen wurde der Koinkubator näher untersucht. Um den Einfluss höherer Konzentrationen an siRNA auf die PTO-vermittelte siRNA Aufnahme hin zu untersuchen, wurden SK-RC 35 Zellen mit absteigenden Konzentrationen an siRNA bei einer konstanten Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  PTO über 16 Stunden in FKS-freiem Medium inkubiert. Wie in Abb. 27, wurde mit ansteigender siRNA Konzentration, die detektierbare Menge an intrazellulärer siRNA nach PTO-Koinkubation höher. Bei einer Inkubation mit  $600 \mu\text{M}$  siRNA nehmen die Zellen  $\sim 130000$  Kopien siRNA pro Zelle auf. Diese Menge erhöht sich auf  $450000$  Kopien pro Zelle bei einer Inkubation von  $2,4 \mu\text{M}$  siRNA mit  $1 \mu\text{M}$  PTO. Die aufgenommene Menge an siRNA ohne Koinkubation hingegen blieb für alle Konzentrationen an siRNA relativ konstant.



**Abb. 27: Konzentrationsabhängigkeit der PTO-Stimulierten Aufnahme von siRNA.** SK-RC35 Zellen wurden mit oben angegebenen Konzentrationen an siRNA  $\pm$  1  $\mu$ M PTO über einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform. Die Menge an internalisierter RNA wurde mit dem LHA bestimmt.

#### 4.3.9 Vergleich von PTO-stimulierter siRNA Aufnahme versus Transfektion

Um den Einfluss der PTO vermittelten Aufnahme von siRNA mit der gebräuchlichen Transfektion durch Lipofectamin 2000 zu vergleichen, wurde eine mit Lipofectamin 2000 durchgeführte Transfektion von siRNA in der Zelllinie SK-RC35 verwendet. Für den Vergleich wurde die Zelllinie SK-RC35 mit ansteigenden Konzentrationen von 2 pM bis hin zu 2nM siLam transfiziert und parallel dazu mit 1,8  $\mu$ M siRNA  $\pm$  0,6  $\mu$ M PTO inkubiert. Wie in Abb. 28 zu sehen, konnten nach der Inkubation der Zellen mit 1,8  $\mu$ M siRNA mit 0,6  $\mu$ M PTO (TM6-12) vergleichbare Mengen an siRNA zu einer 2 nM Transfektion gefunden werden. Die siRNA Menge der 2pM und der 20pM siRNA Transfektion lag unterhalb der Nachweisgrenze von 40 amol siRNA. Die Aufnahme der siRNA ohne Koinkubation mit PTO oder Transfektionsreagenzien lag in dem Bereich einer 0,2 nM Transfektion.

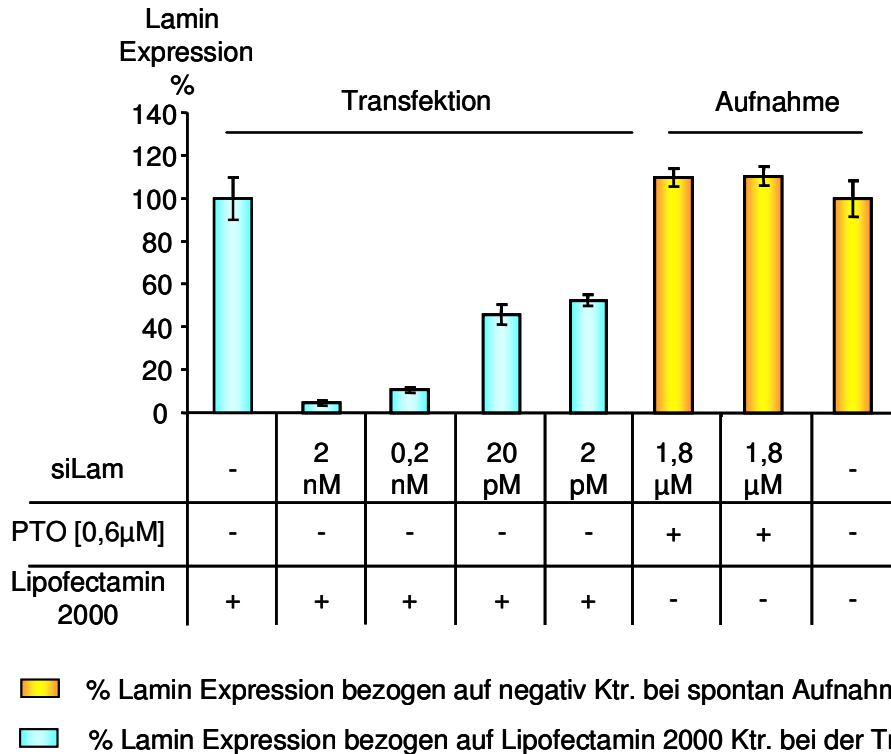


**Abb. 28: Vergleich zwischen Transfektion und PTO-stimulierter siRNA-Aufnahme.** SK-RC35 Zellen wurden mit den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen an siLam transfiziert bzw. in Anwesenheit von PTO inkubiert. Anschließend wurde die aufgenommene siRNA Menge im LHA bestimmt. Für die Standardreihe (Standard) wurden zu unbehandelten Zellen vor der Phenol-Chloroform-Extraktion die angegebenen Mengen an siLam gegeben und extrahiert. Der Nachweis erfolgte durch die Hybridisierung der <sup>32</sup>P-sLam-Sonde. Als Größenmarker wurden in diesem nativen PAA-Gel <sup>32</sup>P-siLam und <sup>32</sup>P-sLam verwendet (dargestellt durch Pfeile). Die Nachweisgrenze ergibt sich aus dem geringsten quantifizierbaren Signal in der Standardreihe, in diesem Fall 40 amol siLam (dargestellt durch eine unterbrochene Linie).

#### 4.3.10 Biologische Wirksamkeit

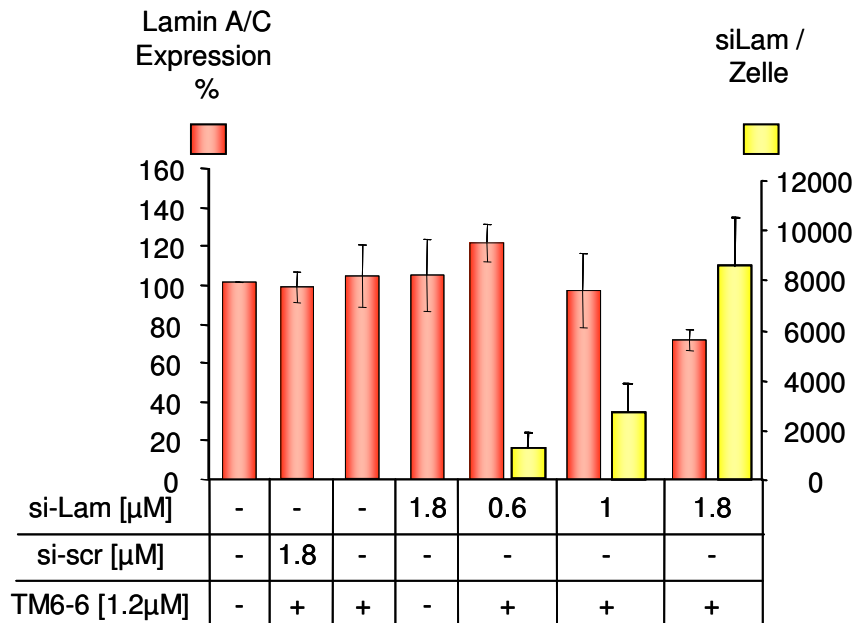
Der IC<sub>50</sub>-Wert von siLam liegt bei ~0,02 nM. Damit handelt es sich bei dieser siRNA um eine sehr wirksame siRNA. Wie in Abb. 29 zu sehen, nehmen die SK-RC35 Zellen durch PTO-Koinkubation eine vergleichbare Menge an siRNA auf, die mit der Menge, die bei einer 2nM Transfektion aufgenommen wird, vergleichbar ist. Die biologische Wirksamkeit der transfizierten als auch PTO-vermittelt aufgenommenen siLam wurde mittels RT-qPCR (siehe 3.2.1.14), über die Quantifizierung der Lamin A/C mRNA Menge, bestimmt (Abb. 29). Trotz der großen Menge siLam, die durch PTO Koinkubation aufgenommen wurde, kommt es zu keinerlei Reduktion der Lamin A/C

mRNA Menge, bezogen auf die negativ Kontrolle, die mit Minimalmedium inkubiert wurde. Bei der 2nM Transfektion hingegen sieht man eine Reduktion der Lamin A/C mRNA Menge um > 95%, bezogen auf die ebenfalls mit Lipofectamin 2000 behandelte Kontrolle.



**Abb. 29: Biologische Wirksamkeit von siLam nach Transfektion oder Koinkubation mit PTO.** SK-RC 35 Zellen wurden transfiziert bzw. mit siRNA + PTO inkubiert und anschließend die Menge an Lamin A/C mRNA in den Zellen mit RT-qPCR bestimmt. Die Lamin-Expression der transfizierten Zellen wurde auf die Transfektionskontrolle normiert und die Lamin-Expression der PTO koinkubierten Zellen auf die negativ Kontrolle, unbehandelte Zellen, normiert.

Da es sich bei der Zelllinie SK-RC 35 um eine transformierte Zelllinie handelt, wurde die biologische Wirksamkeit der durch PTO-Stimulation aufgenommenen siLam in den primären HUVEC Zellen überprüft. Die Aufnahme von siRNA wurde in diesen Zellen durch Inkubation mit dem PTO TM6-6 um den Faktor 100 verbessert (siehe Abb. 26). Wie der Abb. 30 zu entnehmen ist, verringerte sich die durch RT-qPCR nachgewiesene Menge an Lamin A/C mRNA signifikant mit ansteigender Konzentration an inkubierter siLam. Diese Reduktion der mRNA ging einher mit intrazellulär ansteigender Menge an siLam. Die als negative Kontrollen mitgeführten Proben, wie unbehandelte Zellen, Inkubation nur mit TM6-6 PTO oder siLam, sowie die Koinkubation einer unwirksamen siRNA (si-scr) mit PTO, zeigten keine Erniedrigung der Lamin A/C mRNA Menge.

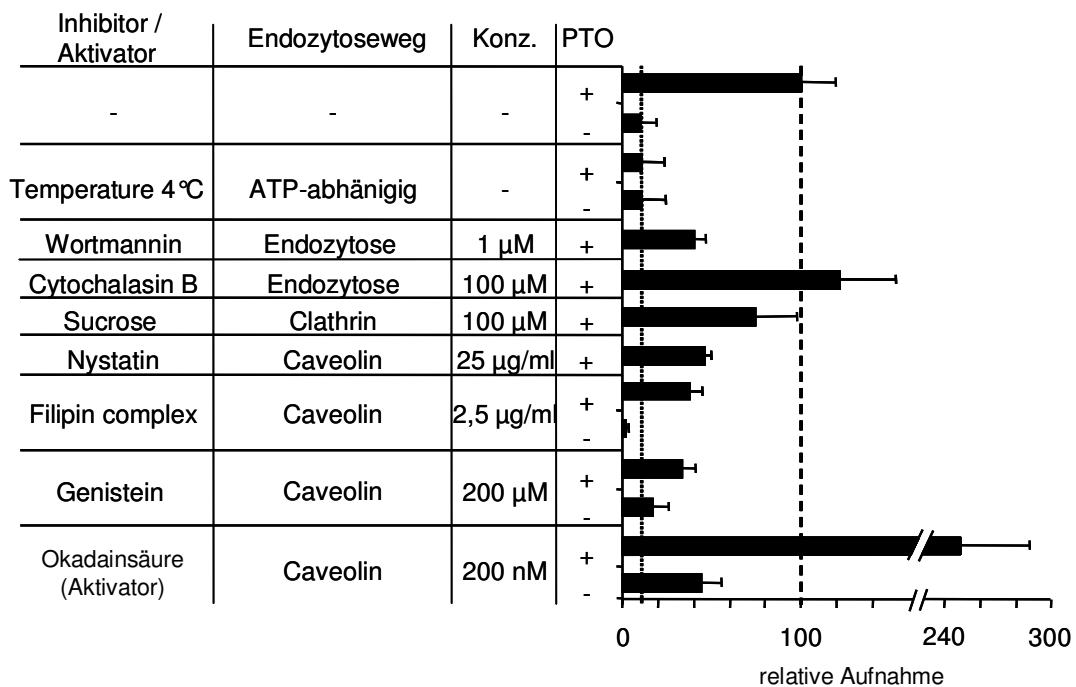


**Abb. 30: Biologische Wirksamkeit spontan aufgenommenen siLam in HUVEC Zellen.** HUVEC Zellen wurden mit siLam in ansteigender Konzentration mit PTO inkubiert. Anschließend wurde die internalisierte Menge an siRNA bestimmt (gelbe Balken) und die Lamin A/C Expression mittels RT-qPCR analysiert (rote Balken). Die Lamin-Expression wurde auf die Negativ-Kontrolle der unbehandelten Zellen normiert.

#### 4.3.11 Beschreibung des PTO-stimulierten Aufnahmeweges durch Inhibitoren und Aktivatoren

Zur Aufklärung des Internalisationsweges der siRNA nach Koinkubation mit PTOs wurden unterschiedliche Inhibitoren für endozytotische Aufnahmewege getestet. Es wurde jeweils 600nM siRNA  $\pm$  1 $\mu\text{M}$  PTO mit ECV-304 Zellen inkubiert. Wie in Abb. 31 zu sehen, inhibierte eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur während der Aufnahmezeit von 2 Stunden auf 4°C die Aufnahme von siRNA trotz Koinkubation mit TM6-6 PTO auf das Aufnahmeniveau ohne PTO-Stimulation. Es muss sich dementsprechend bei der PTO-stimulierten siRNA Aufnahme um einen Energie-abhängigen Prozess handeln. Bei den Inhibitoren für die allgemeine Endozytose Wortmannin und Cytochalasin B konnte nur für Wortmannin eine deutliche Reduktion der Aufnahme bei einer Aufnahmezeit von 16 Stunden beobachtet werden. Der Inhibitor Cytochalasin B hatte keinen Einfluss auf die Internalisation der siRNA. Auch die Inkubation mit 100mM Sucrose, einem Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose, führte zu keiner signifikanten Reduktion der aufgenommenen siRNA Menge. Dahingegen, haben alle drei getesteten Inhibitoren der Caveolin-vermittelten Endozytose zu einer signifikanten Reduktion der durch PTO-Stimulation aufgenommen

Menge an siRNA geführt. Die Aufnahmezeit für die Inkubation mit Fillipin Komplex und Genistein lag bei 16 Stunden, wohingegen die Aufnahmezeit bei der Inkubation mit Nystatin 2 Stunden betrug. Auch der Aktivator der Caveolin-vermittelten Endozytose Okadainsäure führte zu einer signifikanten Steigerung der durch PTO-Stimulation aufgenommenen siRNA-Menge. Durch Okadainsäure wurde ebenfalls die aufgenommene Menge an siRNA ohne PTO-Stimulation auf das vierfache erhöht. Interessanterweise hatten weder die Erniedrigung der Temperatur noch die Inkubation mit Genistein oder Fillipin Komplex einen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von siRNA ohne Koinkubation mit PTO.

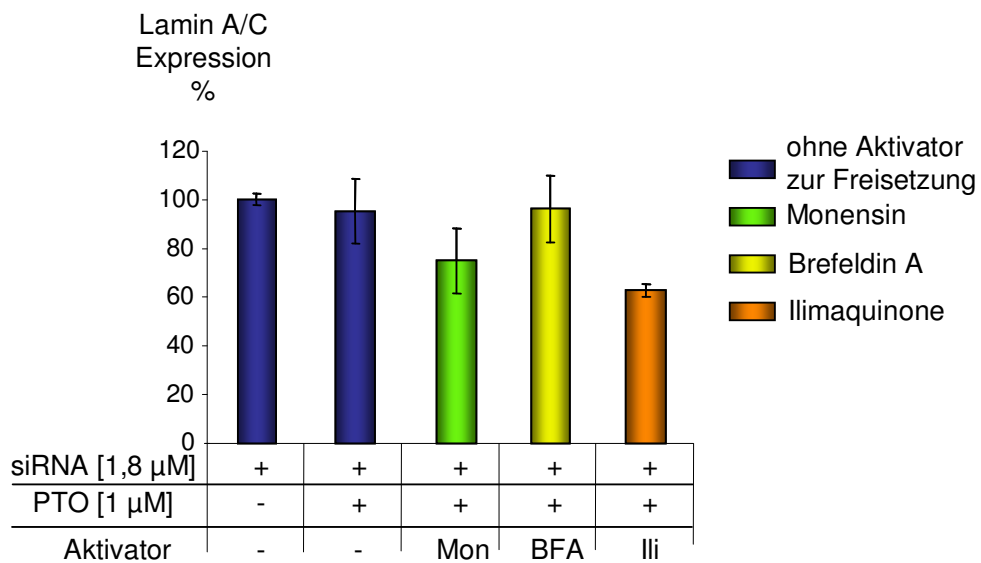


**Abb. 31: Einfluss der unterschiedlichen Inhibitoren der endozytotischen Aufnahmewege auf die PTO-stimulierte Aufnahme von siRNA.** ECV304 Zellen wurden mit siRNA ± PTO über 2 bzw. 16 Stunden in Anwesenheit der Inhibitoren Wortmannin, Cytochalasin B, Sucrose, Nystatin, Filipin complex und Genistein bzw. des Aktivators Okadainsäure inkubiert. Anschließend wurde die internalisierte Menge an siRNA im LHA bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf die PTO-stimulierte siRNA Aufnahme normiert.

#### 4.3.12 Freisetzung der siRNA aus dem Golgi

Um die intrazelluläre Lokalisation der internalisierten siRNA weiter aufzuklären wurden Experimente mit Monensin, Brefeldin A und Ilimaquinon durchgeführt. Monensin führt zur Neutralisation saurer Kompartimente und blockiert den Transport aus diesen Kompartimenten zum Golgi. Brefeldin A und Ilimaquinon führen zur Freisetzung aus dem Golgi (zur Übersicht: Dinter and Berger, 1998). Dazu wurden SK-RC35 Zellen mit 1,8 µM siRNA ± 1µM PTO im FKS-freien Medium für 16 Stunden inkubiert.

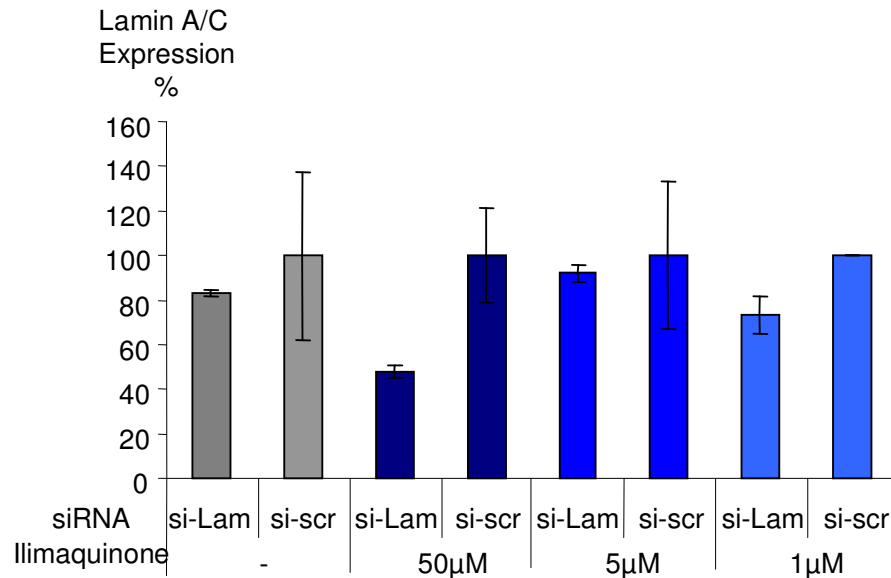
Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit Vollmedium das Monensin, BrefeldinA oder Ilimaquinon enthielt für weitere 24h inkubiert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion und der Nachweis der aufgenommenen siRNA über den LHA und der biologischen Wirksamkeit über eine RT-qPCR. Wie in Abb. 32 zu sehen ist, bewirkte die Inkubation mit Ilimaquinon eine Erniedrigung der Lamin A/C mRNA Menge. Die anderen beiden Aktivatoren zur Freisetzung zeigten dagegen keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. Dieser Effekt ist nicht auf unterschiedliche Mengen an intrazellulärer siRNA zurückzuführen, da die im LHA nachgewiesenen Mengen an aufgenommener siRNA in allen Fällen gleich war (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 32: Behandlung von SK-RC35 Zellen mit unterschiedlichen Substanzen zur Freisetzung der internalisierten siRNA.** SK-RC35 Zellen wurden mit 1,8 µM siRNA ± 1µM PTO über 16 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den aus der Abb. zu entnehmenden Substanzen über einen Zeitraum von 24 Stunden in Vollmedium. Die Quantifizierung der Lamin A/C mRNA Menge erfolgte mit RT-qPCR. Die Werte wurden auf die Proben, die mit 1,8 µM siRNA ohne PTO kultiviert wurden, normiert.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der beobachteten Erniedrigung der Lamin A/C Expression um einen unspezifischen Ilimaquinon-Effekt handelt, der nicht mit der Freisetzung der siRNA aus dem Golgi korreliert, wurde der Versuch mit einer si-scr Kontrolle, die parallel mitgeführt wurde, wiederholt. Des Weiteren wurden unterschiedliche Konzentrationen an Ilimaquinon getestet. Dazu wurden SK-RC35 Zellen mit 1,8 µM siLam bzw. si-scr und 1 µM TM6-12 PTO (72nt) über einen Zeitraum von 16 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in Vollmedium mit Konzentrationen von 0 bis 50 µM Ilimaquinon über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Die gemessenen Werte für die Lamin-Expression wurden jeweils auf die unwirksame si-scr Kontrolle normiert. Wie

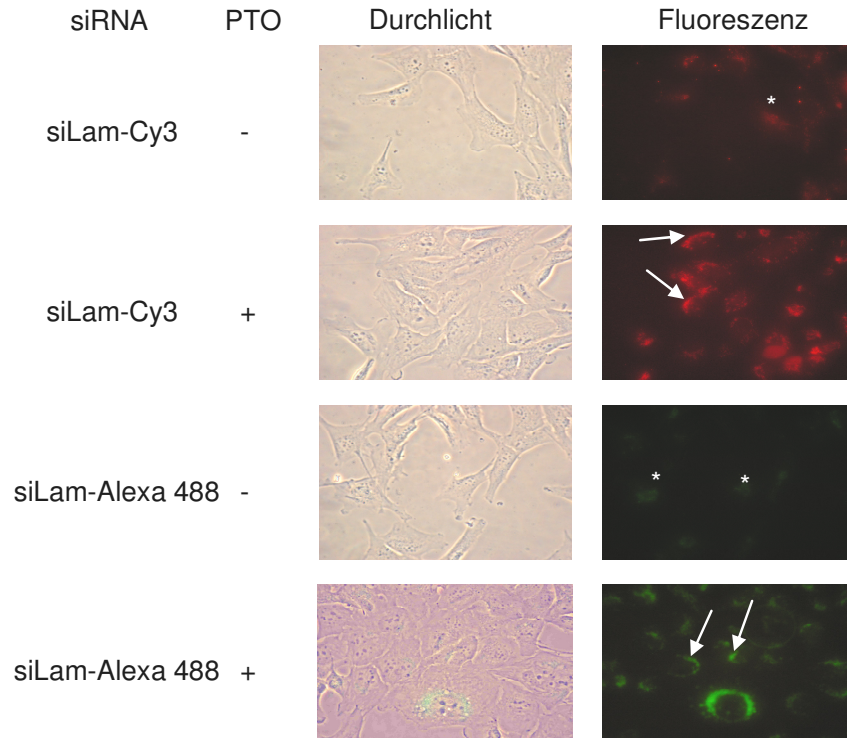
in Abb. 33 zu sehen ist, kommt es bei der Inkubation von siLam in Gegenwart von 50 $\mu$ M Ilimaquinon zu einer Erniedrigung der Lamin Expression auf ~ 40% bezogen auf die si-scr Kontrolle.



**Abb. 33: Behandlung von SK-RC35 Zellen mit ansteigender Konzentration an Ilimaquinon.** Die Freisetzung der siRNA aus dem Golgi wurde indirekt durch die Messung der Reduktion der Lamin A/C mRNA Menge über RT-qPCR ermittelt. SK-RC35 Zellen wurden mit 1,8  $\mu$ M siRNA und 1  $\mu$ M PTO über 16 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an Ilimaquinon über einen Zeitraum von 24 Stunden in Vollmedium. Die Quantifizierung der Lamin A/C mRNA Menge erfolgte mit RT-qPCR und die si-Lam Resultate wurden jeweils auf die entsprechende si-scr Kontrolle normiert.

#### 4.3.13 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Lokalisation der aufgenommenen siRNA näher bestimmen zu können wurden unterschiedliche Arten von Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt. Dazu wurden SK-RC35 Zellen auf einem Objektträger ausgebracht und mit 1,8  $\mu$ M siRNA, die entweder mit Cy3 oder Alexa 488 markiert waren, unter Zugabe sowie ohne Zugabe von 1 $\mu$ M PTO (TM6-12) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen intensiv gewaschen und mit 1% Paraformaldehyd, in PBS gelöst, fixiert. Wie in Abb. 34 zu sehen, nehmen die Zelle in Anwesenheit des PTOs eine größere Menge an markierter siRNA auf (weiße Pfeile). Die Lokalisation der durch PTO-Stimulation aufgenommenen siRNA ist dabei perinukleär. Die ohne PTO-Stimulation aufgenommene siRNA (gekennzeichnet durch weiße Sterne) lässt sich sowohl perinukleär als auch diffus im Cytoplasma verteilt detektieren.

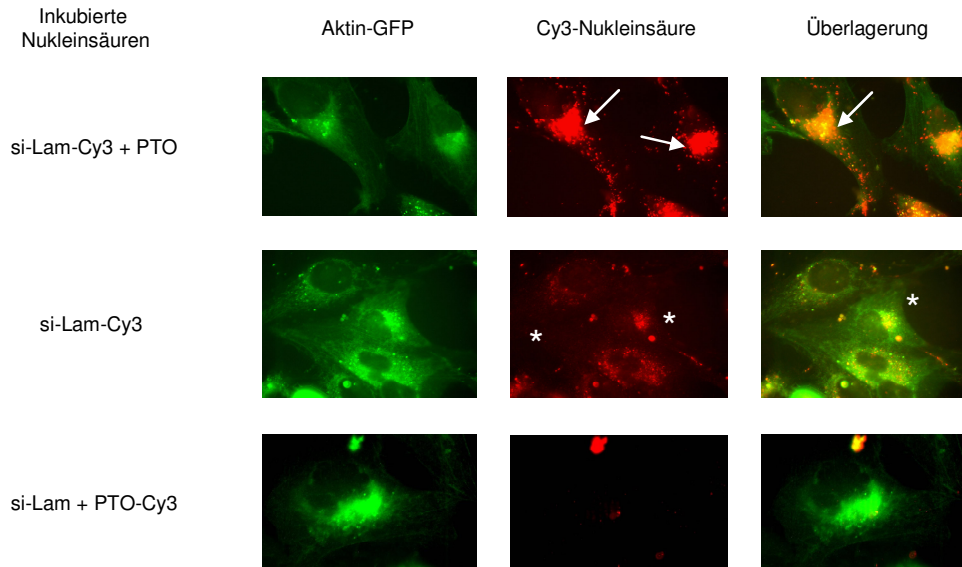


**Abb. 34: Lokalisation fluoreszenzmarkierter internalisierter siRNA in SK-RC35 Zellen.** SK-RC35 Zellen wurden mit  $1,8 \mu\text{M}$  siLam-Cy3 oder siLam-Alexa 488  $\pm 1 \mu\text{M}$  PTO (72 nt) über einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen intensiv gewaschen und fixiert. Die Analyse erfolgte mittels einer Inversen-Fluoreszenzmikroskopie. Die weißen Pfeile kennzeichnen jeweils die durch PTO Stimulation aufgenommene siRNA. Die Sterne kennzeichnen die siRNA Aufnahme ohne PTO Stimulation

Um die Lokalisation der durch PTO-Stimulation aufgenommenen siRNA weiter zu untersuchen, erfolgte eine transiente Transfektion mit Kompartimentmarkern für Aktinfilamente und den Golgi-Apparat. Die Zelllinie ECV-304 wurde stabil mit einem Kompartimentmarker für den Zellkern transfiziert. Bei den Kompartimentmarkern handelt es sich um Plasmide der Firma Clontech. Die Vektoren kodieren für Fusionsproteine bestehend aus einem Kompartimentprotein gekoppelt an ein Fluoreszenzprotein. Die Aufnahmeexperimente mit den Golgi und Aktinfilament-Markern wurden in der Zelllinie SK-RC35 und das Aufnahmeexperiment mit dem Kernmarker in der Zelllinie ECV-304 durchgeführt. Die Inkubation erfolgte mit  $2,4 \mu\text{M}$  Cy3 markierter siRNA in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  72er PTO für 16 Stunden in serumfreiem Medium.

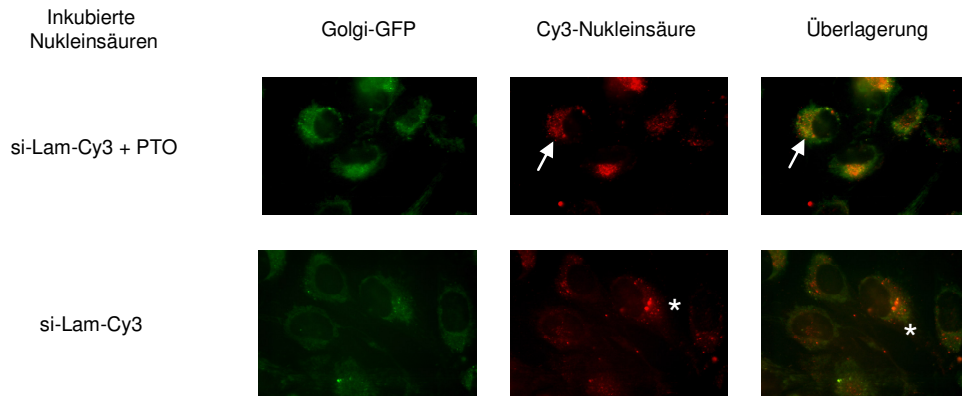
Wie in Abb. 35 -Abb. 37 zu sehen, kam es in allen Fällen zu einer verbesserten Aufnahme von siRNA in Anwesenheit des PTOs. In Abb. 35 wird die Lokalisation der siRNA um den Zellkern in Anwesenheit des PTOs deutlich, während im Falle der alleinigen Inkubation von siRNA, die Verteilung überwiegend cytoplasmatisch ist. In beiden Fällen ist diese Verteilung unabhängig von den Aktinfilamenten. Die Inkubation der SK-RC-35 Zellen mit unmarkierter si-Lam + Cy3-markiertem PTO zeigt, dass das

Cy3-markierte TM6-6 PTO nach 16-stündiger Inkubation nur in geringen Mengen internalisiert wurde.



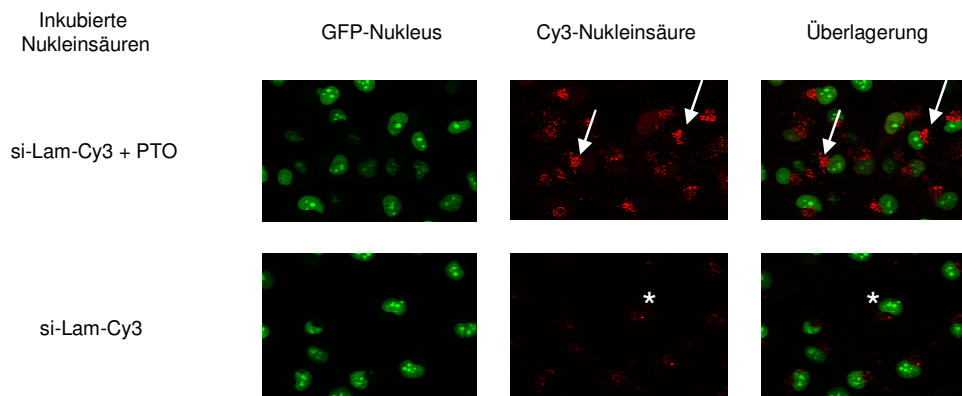
**Abb. 35: Subzelluläre Lokalisation Cy3-markierter siRNA und Cy3-markiertem PTO nach einer 16 stündigen Inkuabtionszeit in SK-RC35 Zellen.** SK-RC35 Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn des Aufnahmeexperimentes mit einem GFP-Aktin-Marker transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit si-Lam-Cy3 ± PTO über 16 Stunden inkubiert. Die Analyse erfolgte im Fluoreszenzmikroskop. Die weißen Pfeile kennzeichnen die si-Lam-Cy3 Aufnahme in Anwesenheit des PTOs. Die weißen Sterne kennzeichnen die si-Lam-Cy3 ohne PTO-Stimulation.

Im Falle der transienten Transfektion mit einem GFP-Golgi-Marker kann man die Kolokalisation der durch PTO-Stimulation aufgenommenen siRNA mit diesem Marker erkennen (Abb. 36). Diese Kolokalisation ist bei der Aufnahme von siRNA ohne PTO marginal. Hier ist die Cy3-markierte siRNA über das Cytoplasma verteilt, wobei sich Überschneidungen mit dem Golgi-Marker erkennen lassen.



**Abb. 36: Kolokalisation der internalisierten Cy3-markierten siRNA mit einem GFP-Golgi-Marker in SK-RC35 Zellen.** SK-RC35 wurden 24 Stunden vor Beginn des Aufnahmeexperimentes mit einem GFP-Golgi-Marker transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit si-Lam-Cy3  $\pm$  PTO über 16 Stunden inkubiert. Die Analyse erfolgte im Fluoreszenzmikroskop. Die weißen Pfeile kennzeichnen die si-Lam-Cy3 Aufnahme in Anwesenheit des PTOs. Die weißen Sterne kennzeichnen die si-Lam-Cy3 ohne PTO-Stimulation.

Um die perinukleäre Lokalisation der in Gegenwart von PTO aufgenommenen siRNA deutlich zu machen, wurden mit einem GFP-Kern-Marker stabil transformierte ECV-304 Zellen mit Cy3-markierter siRNA über 16 Stunden inkubiert. Wie in Abb. 37 zu sehen, lagert sich die durch PTO-Stimulation aufgenommene siRNA an den Zellkern an. Die Aufnahme der siRNA ohne PTO-Stimulation ist in dieser Zelllinie im Vergleich zu den SK-RC35 Zellen sehr schwach ausgeprägt.



**Abb. 37: Perinukleäre Lokalisation der Cy3 markierten siRNA in der GFP-Nukleus stabil transformierten Zelllinie ECV-304.** ECV304-Zellen wurden mit einem GFP-Nukleus-Marker stabil transfiziert. Die Zellen wurden im Aufnahmeexperiment mit si-Lam-Cy3  $\pm$  PTO über 16 Stunden inkubiert. Die Analyse erfolgte im Fluoreszenzmikroskop. Die weißen Pfeile kennzeichnen die si-Lam-Cy3 Aufnahme in Anwesenheit des PTOs. Die weißen Sterne kennzeichnen die si-Lam-Cy3 ohne PTO-Stimulation.

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss der lokalen mRNA Struktur auf die Wirksamkeit der siRNA in Säugerzellen

Diese Arbeit zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen mRNA-Struktur und siRNA Wirksamkeit besteht. Es ist bekannt dass, siRNAs gegen dieselbe mRNA unterschiedliche Wirksamkeiten in Zellkulturexperimenten aufweisen können. Dabei wurde bislang angenommen, dass lediglich die intrinsischen Eigenschaften, wie die 5´-Stabilität der siRNA (Schwarz et al., 2003) oder die interne Stabilität der Nukleotide 9-14, gezählt vom 5´-Ende des antisense-Stranges (as-Strang) (Khvorova et al., 2003), für diesen Unterschied verantwortlich sind. Die in dieser Arbeit getesteten wirksamen siRNAs unterscheiden sich bezüglich ihrer biochemische Eigenschaften nicht signifikant von den unwirksamen siRNAs (Tab. 3). Im Falle der wirksamen siRNAs gegen unzugänglich vorhergesagte Zielregionen, konnte dieser Effekt nicht auf die Differenz zwischen 5´- und 3´-Stabilitäten des as-Stranges zurückgeführt werden. Bei den siRNAs si640 und si1438, beides siRNAs gegen unzugängliche Regionen mit einem  $IC_{50}$ -Wert  $\leq 6nM$  (Tab. 2), sind die 5´-Enden signifikant stabiler ( $>\Delta 0,5$  kcal/mol) als die 3´-Enden der as-RNA (Tab. 3). Diese Differenz führte in den oben erwähnten Publikationen zu einer Reduktion der siRNA-Wirksamkeit. Die siRNA si424, die gegen eine unzugängliche Zielregion gerichtet ist, zeigte trotz geringerer 5´-Stabilität keine biologische Wirksamkeit (Tab. 2 und Tab. 3).

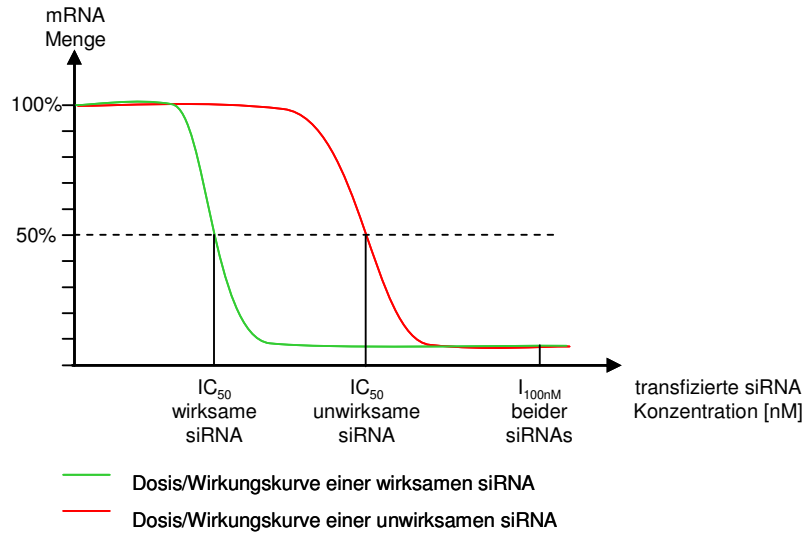
Des Weiteren befinden sich auch in der Gruppe der siRNAs, gegen zugängliche Regionen Beispiele dafür, dass die Wirksamkeit trotz signifikant stabilerer 5´-Enden des as-Stranges nicht reduziert wird (si839 und si1595 in Tab. 2 und Tab. 3). Aufgrund dieser Beobachtungen konnte in dieser Arbeit der Einfluss der intrinsischen Eigenschaften der siRNAs weder bestätigt noch widerlegt werden, da die siRNAs nicht nach diesen Kriterien ausgesucht wurden (siehe Tab. 3).

Im Gegensatz zu den biochemischen Eigenschaften konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, eine wirksame siRNA zu konstruieren, erheblich durch Strukturvorhersagen einer Ziel-mRNA gesteigert wird. Obwohl es auch wirksame siRNAs gegen unzugängliche Zielregionen gab, lag der mittlere  $IC_{50}$ -Wert, der siRNAs von zugänglichen Zielregionen um eine Logstufe unter dem der siRNAs gegen unzugängliche Zielregionen. Des Weiteren gibt es unter den getesteten siRNAs gegen die zugänglichen Regionen kein komplett unwirksames, wie es bei den unzugänglichen Zielregionen der Fall ist (siehe Tab. 2).

Während des RNAi-Prozesses kommt es zu einer Anlagerung des RISC-Komplexes an die siRNA. Es handelt sich bei diesem RISC-Komplex um einen Multiprotein-Komplex, der für die Anlagerung an die zu degradierende mRNA bestimmte räumliche Bedingungen vorfinden muss. Zum einen muss in der dreidimensionalen Faltung der mRNA ausreichend Raum für diesen Komplex zur Anlagerung vorhanden sein und zum anderen sollte, wie in dieser Arbeit gezeigt wird, der Bereich der mRNA ungebunden vorliegen. Falls die lokale Struktur keinen Einfluss auf die siRNA-Wirksamkeit haben sollte, muss es innerhalb des RISC-Komplexes ein Enzym geben, dass die Zielregion entfaltet, so dass für zugängliche und unzugängliche Zielregionen die gleichen energetischen Voraussetzungen für eine Bindung mit dem RISC-Komplex bestehen. Eine solche Komponente wurde bislang jedoch noch nicht entdeckt. Mit dieser Arbeit wurde der Einfluss der mRNA Struktur auf die siRNA Wirksamkeit bestätigt. Diese Erkenntnis stimmt mit weiteren Publikationen überein, die ebenfalls die mRNA-Struktur/siRNA-Wirksamkeit-Beziehung untersucht haben (Schubert et al., 2005a; Luo and Chang, 2004; Bohula et al., 2003; Wunsche and Sczakiel, 2005) und parallel zu der aus dieser Arbeit resultierenden Publikation veröffentlicht wurden (Overhoff et al., 2005).

Auch wenn es, wie schon erwähnt, bei den unzugänglichen Targetregionen wirksame siRNA-Konstrukte gab, ist doch die Wahrscheinlichkeit geringer, in einer solchen Region eine wirksame siRNA zu finden. Aber die Tatsache, dass es eben diese Fälle gab, lässt auf einen sehr komplexen Vorgang der Anlagerung des RISC-Komplexes an die mRNA schließen, bei dem sowohl die mRNA-Struktur eine Rolle spielt als auch andere noch nicht aufgeklärte Mechanismen, die den „strukturellen Nachteil“ einer Zielregion aufheben können.

Bei der maximalen Target-Inhibition, die bei einer transfizierten Konzentration von 100nM gemessen wurde ( $I_{100nM}$ ), konnte kein signifikanter Unterschied zwischen zugänglichen und unzugänglichen Targetregionen beobachtet werden. Es handelt sich bei dieser Konzentration um eine für RNAi Verhältnisse sehr hohe Konzentration, da ab einer transfizierten siRNA Konzentration von ~20nM unspezifische Effekte in den Zellen beobachtet werden können (Persengiev et al., 2004). Dementsprechend könnte es sich bei der hier beobachteten Reduktion der ICAM-1 mRNA um unspezifische Effekte aufgrund der hohen siRNA Konzentration gehandelt haben. Dieses wiederum würde den nicht vorhandenen Unterschied zwischen zugänglichen und unzugänglichen Zielregionen erklären. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass die Dosis-Wirkungskurven der siRNAs sigmoid (Abb. 38).



**Abb. 38: Exemplarische Darstellung von Dosis/Wirkungskurven einer wirksamen und einer unwirksamen siRNA.** Der IC<sub>50</sub>-Wert einer wirksamen siRNA wird bei einer geringeren transfizierten siRNA Konzentration als bei einer unwirksamen siRNA erreicht. Dahingegen ist die nachweisbare mRNA Menge bei einer 100nM Transfektion (I<sub>100nM</sub>) von wirksamen und unwirksamen siRNAs identisch.

In den Plateaubereichen dieser Kurve, bei sehr geringen und sehr hohen transfizierten siRNA Konzentrationen, würde man trotz Unterschiede in der Wirksamkeit (siehe IC<sub>50</sub>), keinen Unterschied in der Ausprägung des Effekts bei einer sehr hohen Konzentration (I<sub>100nM</sub>) beobachten.

Die unterschiedlichen mRNA Ziel-Regionen im 3'-Bereich oder 5'-Bereich der kodierenden Region können einen Einfluss auf die Wirksamkeit der siRNA haben (siehe Tab. 2 und Abb. 11). Die siRNAs si424 und si429, die gegen die im 5'-Bereich der mRNA gelegene unzugängliche Zielregion 420 gerichtet waren, führten auch in hohen transfizierten Konzentrationen nur zu einer sehr schwach ausgeprägten Reduktion der ICAM-1 mRNA Menge. Da man im 5'-Bereich keine konservierten zugänglichen Regionen vorgefunden hat, konnte keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob es sich hierbei um eine Kombination aus einem Positionseffekt (5'-Ende der mRNA) und Struktureffekt (unzugänglich) oder lediglich um den mRNA-Struktureffekt handelte.

Des Weiteren wurde für die Zielregion 856 (Abb. 12), abhängig davon, ob das 5'- oder das 3'-Ende des antisense-Stranges der siRNA auf einen ungepaarten Bereich trifft, kein Unterschied in der biologischen Wirksamkeit ersichtlich. Im Vergleich zu der Eigenschaft von miRNA, als erstes mit der seed-Region (Nukleotide 1-7) mit der mRNA zu interagieren (Lewis et al., 2005; Kawasaki et al., 2004), ist dieses ein deutlicher Unterschied zwischen miRNA und siRNA. Obwohl es bislang noch keine *in-vitro* Experimente zur Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen miRNA und Targetregion

gibt, wird eben dieses in einigen theoretische Arbeiten postuliert (Nam et al., 2005; Wang et al., 2005). Aufgrund der Zielregion 856 gab es, bei den hier untersuchten siRNAs, keine Präferenz zuerst mit dem 5'-Ende des antisense Stranges mit einem zugänglichen Bereich zu interagieren, wie es bei der miRNA der Fall wäre (Wang et al., 2005). Ob ein spezifisches Ende der siRNA zuerst mit der Ziel-mRNA interagiert, ist bislang unklar.

Die Tatsache, dass es siRNAs gibt, die keine Konzentrationsabhängigkeit in ihrer Wirksamkeit zeigten (siehe Tab. 4) beziehungsweise die trotz einer als unzugänglich vorhergesagten Zielregion sehr potent sind (siehe Tab. 2), lässt darauf schließen, dass es in dem Bereich der RNA interference noch weitere wichtige Faktoren gibt, die die Wirksamkeit einer siRNA beeinflussen können.

Die hier getesteten siRNAs gegen zugängliche Zielregionen zeigen alle einen  $IC_{50}$ -Wert von  $\leq 10nM$ , ohne dass bei ihrer Auswahl auf biochemische Eigenschaften geachtet wurde. Dementsprechend sollte eine Kombination mit den Erkenntnissen über die intrinsischen Eigenschaften der siRNA eine sicherere Auswahl potentieller hoch wirksamer siRNAs ermöglichen. Dies ist für die Nutzung von siRNAs als möglichen Wirkstoff von großer Bedeutung, da man um potentielle Nebenwirkungen zu vermeiden jeweils eine möglichst geringe Dosis der entsprechenden Substanz einsetzen möchte.

## 5.2 Aufnahme von siRNA durch Säugetierzellen

Neben der Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen siRNA und mRNA wurde die Aufnahme der siRNA durch Säugetierzellen untersucht.

### 5.2.1 Optimierung des Nachweisverfahrens

Zur Untersuchung der Aufnahme von siRNA durch Säugetierzellen wurde ein sensitives Nachweisverfahren benötigt. Ein solches Verfahren war zu Beginn dieser Arbeit nicht käuflich zu erwerben, so dass zunächst einmal die vorhandenen Methoden zum Nachweis von RNA auf ihre Tauglichkeit bezüglich der Sensitivität und der Reproduzierbarkeit geprüft werden mussten. Als Methode der Wahl hat sich der RNA-Protection-Assay herausgestellt. Dabei wird die nachzuweisende RNA indirekt über die Hybridisierung mit einer markierten Sonde detektiert und die nicht gebundene Sonde durch einen RNase Schritt verdaut. Dieser RNase Verdau musste für diese Methode optimiert werden. Bei dem Verdau von si2B RNase A/T1 entsteht bei geringer RNase Konzentration eine Doppelbande, die auf das unstabilere 3'-Ende des si2B Doppelstranges zurückzuführen war. Trotz des hierbei teilweise zu erkennenden Anverdaus der siRNA, konnte kein Verlust der Signalstärke im Vergleich zu der unverdauten Probe festgestellt werden. Bei dem Verdau von siRNAs, bei denen beide

Enden aus mehrfachen G-C Basenpaaren bestanden, wie z.B. bei der si-scr RNA (Daten nicht gezeigt), wurde keinerlei Anverdau der siRNA beobachtet.

Die in diesem Assay erreichte Sensitivität von 10 amol für den Nachweis von siRNA (Abb. 14) und auch Spezifität (Overhoff et al., 2005), waren geeignet für den Nachweis von geringen Mengen an intrazellulärer siRNA. Mittlerweile gibt es ein sehr ähnliches Nachweisverfahren für siRNA und miRNA von der Firma Ambion mit dem Namen miRVana-Detection-Kit, welches RNAs mit demselben Verfahren nachweist. In diesem Fall werden die nachgewiesenen RNAs allerdings in einem denaturierenden Gelsystem nach dem Verdau aufgetrennt, so dass es keine Möglichkeit mehr gibt zwischen nicht verdauter ungebundener Sonde und nicht verdauter gebundener Sonde, die dementsprechend die nachzuweisende RNA darstellt, zu unterscheiden. In dem hier vorgestellten Verfahren wurde ein natives bzw. semi-denaturierendes Gelsystem verwendet, bei dem die RNA-RNA Doppelstränge intakt bleiben. Anhand des Laufverhaltens der gelabelten RNA konnte zwischen nicht vollständig verdauten Proben und „echtem“ Signal unterschieden werden. Dieses stellt eine Absicherung innerhalb des Assays dar.

Die Ausgleichsgeraden für den Nachweis von siRNA, ssRNA und ssDNA waren linear und boten damit die Grundlage für eine Quantifizierung der aufgenommenen siRNA (Abb. 18). Allerdings lag die Nachweisgrenze für ssRNA und ssDNA bei 100 amol. Dieses entsprach einer um den Faktor 10 verringerten Sensitivität im Vergleich zu der für den Nachweis von siRNA erreichten Sensitivität von 10 amol.

### **5.2.2 Internalisation versus unspezifische Membranassoziation der siRNA**

Um sicherzustellen, dass mit dem LHA nur internalisierte siRNAs nachgewiesen wurden, wurden die Zellen 5mal intensiv mit PBS gewaschen und anschließend durch eine Trypsin-Behandlung vom Plattenboden gelöst. Wie der Abb. 16 zu entnehmen ist, wurden durch das intensive Waschen mit PBS die siRNAs und die PTOs aus dem Überstand entfernt. Auch durch die anschließende Trypsin-Behandlung konnten keine unspezifisch an die Zellmembran gebundenen siRNA freigesetzt werden. Trotzdem stellte die Trypsinbehandlung sicher, dass es auf der Zellmembran keine unspezifisch gebundene siRNA gab, da membranständige Proteine, die eventuell die siRNA gebunden hätten, verdaut wurden. Die negative Seite dieser Behandlung ist, dass es durch die Trypsinbehandlung zu einer Porenbildung innerhalb der Zellmembran kommen könnte und unspezifisch an die Zellmembran gebundene Nukleinsäuren so in die Zelle gelangen könnten. Für die verwendeten Versuchsbedingungen konnte dies

allerdings ausgeschlossen werden, da sowohl mit als auch ohne Trypsinbehandlung zur Zellernte die gleiche Menge an siRNA aufgenommen wurde (Abb. 24).

Durch die Inkubation der Zellen mit Fluoreszenz-markierter siRNA konnte die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung der siRNA an die Zellmembran letztendlich ausgeschlossen werden. Die siRNA wurde auch ohne Trypsinbehandlung eindeutig intrazellulär lokalisiert (Abb. 37). Die Aufnahme ist dabei unabhängig von dem verwendeten Fluorophor, da sowohl die intrazelluläre Lokalisation als auch das Aufnahmeverhalten der markierten siRNA bei allen getesteten Fluorophoren gleich blieb (Abb. 34 - Abb. 37).

### **5.2.3 Spontan-Aufnahme von siRNA**

Die bei der Inkubation von siRNA mit unterschiedlichen Zellen ermittelten aufgenommenen siRNA Mengen pro Zellen lagen in einem Bereich, der nicht biologisch aktiv ist. Dennoch ist die Beobachtung interessant, dass die Zelllinie SK-RC 35 spontan wesentlich mehr siRNA aufgenommen hat als die übrigen getesteten Zellen.

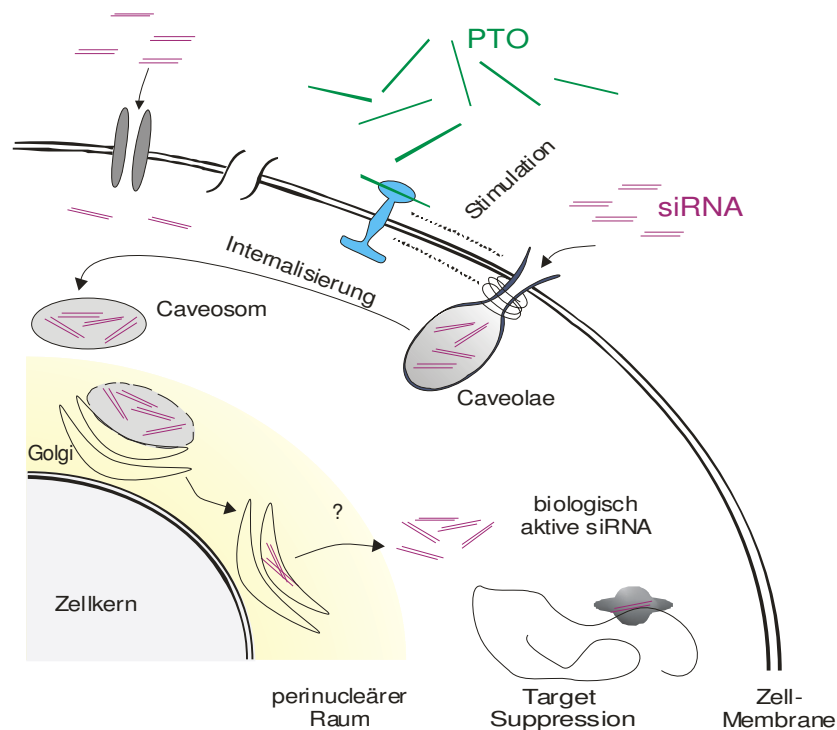
Trotzdem handelt es sich bei der spontanen Aufnahme von siRNA nicht um einen biologisch relevanten Prozess, da es trotz hoher extrazellulärer Konzentrationen an siRNA, keinen biologischen Effekt gab. Der RNAi Mechanismus ist sehr potent und ist teilweise schon ab einer transfizierten Konzentration von 2pM biologisch wirksam. Dementsprechend sollten bei einem biologischen zellulären Aufnahmeprozess und damit der Überführung der aktiv aufgenommenen siRNA in eine biologisch relevante intrazelluläre Umgebung, wie z.B. in den RISC-Komplex, die hier getesteten siRNA Konzentrationen ausreichen, um die entsprechende Ziel-mRNA zu degradieren. Dieses war allerdings nicht der Fall (siehe Abb. 29), sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei der Aufnahme von siRNA ohne PTO-Stimulation um eine unspezifische Aufnahme handelt, bei der die siRNA, ganz abgesehen von der geringen aufgenommenen Menge, für die RNAi-Maschinerie nicht zugänglich gemacht wurde (Lingor et al., 2004).

Des Weiteren kam es in den hier durchgeführten Experimenten, trotz einer Erhöhung der extrazellulären Konzentration an siRNA, zu keiner Erhöhung der intrazellulär nachgewiesenen Menge an siRNA (Abb. 27). Dieses Verhalten lässt im Zusammenhang mit der Tatsache, dass keine Reduktion der Ziel-mRNA beobachtet wurde, auf einen unspezifischen Aufnahmeweg schließen. Ansonsten würde man erwarten, dass die intrazelluläre siRNA Menge solange ansteigt bis es zu einem biologischen Effekt kommt. Dieses konnte man trotz der siRNA im Überstand nicht beobachten.

Ein weiteres Indiz für eine unspezifische Aufnahme ist die Tatsache, dass es sich bei diesem Prozess um keinen energieabhängigen Prozess handelte (Abb. 31), da man durch Temperaturniedrigung die aufgenommene siRNA Menge nicht reduzieren konnte.

### 5.3 Stimulation der siRNA Aufnahme durch PTO-Koinkubation

Die während dieser Arbeit aufgetretene Beobachtung, dass die siRNA Aufnahme der Zellen durch Koinkubation mit Phosphorothioat-modifizierter DNA (PTOs) gesteigert wird, wurde im letzten Teil der Arbeit näher untersucht. Die in dieser Arbeit beobachteten Resultate sind mit dem in Abb. 39 schematisch dargestellten Mechanismus der PTO-stimulierten Aufnahme konsistent. Dabei bindet das PTO längen- und konzentrationsabhängig, unabhängig von der Sequenz, an einen membranständigen Rezeptor. Die Bindung an diesen Rezeptor führt zu einer Stimulation der Caveolin-vermittelten Aufnahme und dadurch zu einer unspezifischen Aufnahme von siRNA. Nach der Caveolin-abhängigen Endozytose wird die siRNA über Caveosomen zum Golgi transportiert. Dort verbleibt die siRNA bis zu ihrem Abbau, ohne dass sie in biologisch relevanten Mengen aus dem Golgi freigesetzt wird.



**Abb. 39: Schematische Darstellung der PTO-stimulierten Aufnahme.** Nach einem äußeren Stimulus durch die koinkubierten PTOs (grün) kommt es zu einer Stimulation der Caveolin-vermittelten Aufnahme und damit zu einer Internalisierung der siRNA (rot). Anschließend wird die siRNA über die Caveosomen in den Golgi transportiert. Dabei ist unklar, ob bzw. wie es zu der Freisetzung der siRNA aus dem Golgi-Apparat kommen kann.

### **5.3.1 Charakterisierung des PTO-Koinkubators für die zelluläre Aufnahme von siRNA**

Die Aufnahme der siRNA wurde durch die Inkubation mit unterschiedlichen Arten an kurzen Nukleinsäuren um den Faktor 2-3 gesteigert. Aber nur durch die Einbringung von Phosphorothioat-Brücken zwischen den Nukleotiden war diese Stimulation auch signifikant (Abb. 20). Im Falle der PTOs konnte man eine Stimulation um mehrere Log-Stufen erreichen, je nach Konzentration und Länge des Koinkubators (Abb. 22 und Abb. 23). Bei der Thioat-RNA war die Stimulation geringer ausgeprägt. Dieses lässt darauf schließen, dass die Thioat-Brücken einen entscheidenden Einfluss auf die Stimulation der siRNA Aufnahme besitzen. Es ist aus vielen Publikationen bekannt, dass sich DNAs und PTOs, bezüglich ihrer Affinität zur Zellmembran und ihrer intrazellulären Aufnahme voneinander unterscheiden (Sester et al., 2000; Zhao et al., 1993). Der Mechanismus, durch den PTOs in Zellen aufgenommen werden ist noch nicht aufgeklärt und auch die Proteine, die zur Bindung von PTOs an die Zellmembran benötigt werden, sind noch nicht identifiziert (Krieg et al., 2000; Bennett, 1993), auch wenn es die Vermutung gibt, dass es sich bei der Aufnahme von PTOs um eine Clathrin-vermittelte Endozytose handelt.

Es ist bekannt, dass PTOs aufgrund ihres Thioat-Rückgrates eine unspezifische Wechselwirkung mit Proteinen eingehen können (Kurreck, 2003). Ob es bei der PTO-stimulierten siRNA-Aufnahme zu einer unspezifischen Bindung des PTOs an ein Zellmembranprotein kommt und somit eine Signalkaskade ausgelöst wird, bei der es am Ende zur Internalisierung der siRNA kommt, kann man aufgrund der hier gemachten Beobachtungen weder ausschließen noch eindeutig verifizieren.

Bei der PTO-stimulierten siRNA Aufnahme konnte keine signifikante Sequenzabhängigkeit der getesteten PTOs beobachtet werden (Abb. 21). Dennoch war die Stimulation der Aufnahme bei Koinkubation mit der Sequenz NovAAAA nicht so stark ausgeprägt, wie bei den anderen getesteten PTOs. Durch die Koinkubation von Poly-A, Poly-G, Poly-C und Poly-T, jeweils als 36nt lange PTOs, konnte die Aufnahme der siRNA im Vergleich zu der TM6-6 Sequenz nur leicht gesteigert werden, wobei Poly-G die stärkste Stimulation der Aufnahme bewirkt hat. Daraus kann man schließen, dass die Stimulation der Aufnahme zwar nicht direkt von der Sequenz abhängig ist, dass es aber durchaus Faktoren innerhalb der Sequenz gibt, die die Stimulation noch steigern können. Interessanter Weise war zum Beispiel das NovAAAA-PTO die einzige Sequenz unter den getesteten PTOs, die nur ein einziges Guanosin beinhaltete. Diese Beobachtung, zusammen mit der Beobachtung, dass ein Poly-G die stärkste Stimulation unter den Poly-Nukleotiden hervorgerufen hat, lässt

darauf schließen, dass zumindest dieses Nukleotid einen Einfluss auf die Stimulation besitzt. Bei den zur Koinkubation verwendeten Sequenzen sollte dementsprechend auf ein ausgewogenes Verhältnis zwischen den einzelnen Basen geachtet werden, wie es bei den anderen Sequenzen der Fall war.

Durch Koinkubation mit anderen Nukleinsäurespezies, konnte keine Steigerung der siRNA-Aufnahme durch Zellen beobachtet werden, wie man es bei der Aufnahme von längeren DNA-Oligonucleotiden beobachten kann (Lehmann and Sczakiel, 2005). Das wiederum lässt auf einen anderen endozytotischen Aufnahmeweg schließen als es bei den DNA-Nukleotiden, die einem sequenzabhängigen Aufnahmemechanismus gefolgt sind, der Fall ist.

Auch die Längenabhängigkeit der PTO-stimulierten siRNA Aufnahme vom PTO lässt sich mit der Vermutung der unspezifischen Membranproteinbindung erklären (Abb. 22). In beiden getesteten Zellen wurde beobachtet, dass die Stimulation der Aufnahme erst ab einer PTO Länge von 24nt einsetzt. Im Falle der Zelllinie ECV304 kann man keine Aussage darüber treffen, ob bei 30nt Länge des PTOs ein Plateau in der siRNA-Aufnahme erreicht wird oder ob man durch eine weitere Verlängerung des PTOs die siRNA-Aufnahme noch steigern kann. Bei den primären HUVEC Zellen hingegen führte die Verlängerung des PTOs bei einer Verdopplung der Länge zu einer Stimulation der Aufnahme um ~ eine Log-Stufe.

### **5.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der siRNA Aufnahme in Säugerzellen**

Bei der Konzentration des koinkubierten PTOs zeigten die beiden Zellen ECV304 und HUVEC eine halbmaximale Stimulation der Aufnahme bei einer Konzentration zwischen 100 und 200nM, wobei die Konzentration der aufzunehmenden siRNA 200nM betrug. Dabei ist zu beachten, dass in der Zelllinie ECV304 die maximale Stimulation bei einer Konzentration von 800nM PTO zu 200nM siRNA erreicht wurde. Dies entspricht einem Verhältnis von 4:1. Allerdings wurde ab einer Konzentration von 400nM unter Berücksichtigung der Standardabweichung ein Plateau in der Stimulation beobachtet. In den primären HUVEC Zellen konnte ein linearer Anstieg der Stimulation bis zu einer Konzentration von 600nM und danach ein Abfall eben dieser beobachtet werden. Dies entspricht bei maximaler Stimulation mit einer Konzentration von 600nM PTO, einem Verhältnis PTO zu siRNA von 3:1. Das Erreichen eines Plateaus trotz steigender Konzentration an PTO, lässt auf eine Rezeptor-vermittelte Stimulation durch die PTOs schließen, da eine Absättigung dieser Rezeptoren, auch durch eine Erhöhung der PTO Konzentration, keine weitere Stimulation ermöglichen würde. All dieses lässt in Kombination mit der Beobachtung, dass siRNA und PTOs im Überstand keinen Komplex bildeten (Abb. 16) und die Aufnahme von Cy3-markierten PTOs unter

den hier angewendeten Versuchsbedingungen nicht stattfand (Abb. 36), auf einen Aufnahmeweg schließen, der durch die PTOs stimuliert wird, bei dem diese aber nicht mit internalisiert werden.

Da PTOs in hohen Konzentrationen cytotoxisch sein können, wurde das Verhältnis 1:3 von siRNA zu PTO bis zu einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M PTO beibehalten. Darüber hinaus wurde nur die siRNA Konzentration erhöht. Die Erhöhung der siRNA Konzentration von 600nM auf bis zu 2,4  $\mu$ M in der Zelllinie SK-RC35 führte zu einer signifikanten Erhöhung der aufgenommenen siRNA Menge in Anwesenheit von 1  $\mu$ M PTO. Eine Erhöhung der extrazellulären Konzentration an siRNA ohne Anwesenheit von PTO führte zu keiner Steigerung der Aufnahme (Abb. 27). Daraus lassen sich zwei unterschiedliche Schlussfolgerungen ziehen: Zum einen scheint die spontane Aufnahme von siRNA ohne PTO-Stimulation bei einer extrazellulären Konzentration von 600nM abgesättigt zu sein, d.h. dass Rezeptoren oder ähnliches, die für die Aufnahme verantwortlich sind, schon vollständig an siRNA gebunden vorliegen und es dementsprechend bei einer Erhöhung der extrazellulären Konzentration keine weitere Steigerung mehr geben kann. Zum anderen haben die Prozesse, die für die PTO-stimulierte Aufnahme von siRNA verantwortlich sind, bei einer extrazellulären Konzentration von 2,4  $\mu$ M siRNA noch nicht ihre volle Kapazität erreicht. Daraus kann man auf eine hohe Wiederverwertungsrate der für diesen Prozess verantwortlichen Faktoren, z.B. der Caveolae, schließen.

### **5.3.3 Die PTO-stimulierte Aufnahme in den unterschiedlichen Zelltypen**

Bei der PTO-stimulierten Aufnahme, wie auch schon bei der spontanen Aufnahme von siRNA ohne Koinkubation, wurden Unterschiede bei der aufgenommenen siRNA Menge in den unterschiedlichen Zelltypen detektiert (Abb. 26). Besonders bemerkenswert ist dabei die unterschiedliche Ausprägung des Stimulationseffektes in den unterschiedlichen Zellen. Während bei ECV304, HUVEC und HeLa Zellen jeweils ein Stimulationseffekt von einem Faktor 100 zu beobachten war, betrug dieser Effekt in der Zelllinie SK-RC35 nur den Faktor 10. Da allerdings die Zelllinie SK-RC35 auch schon ohne Stimulation durch PTO eine sehr hohe Menge an siRNA aufnahm, kam es mit der PTO-Stimulation, zu einer siRNA-Aufnahme die in dem Bereich einer 2nM siRNA-Transfektion lag. Bei der lymphoiden Zelllinie BJAB konnte keinerlei Stimulation der Aufnahme zu beobachtet werden. Dieses kann darauf zurückgeführt werden, dass in lymphoiden Zellen das Protein Cav1 nicht exprimiert wird und das es deswegen in diesen Zellen zu keiner Caveolae-Bildung kommt (5.3.5).

### **5.3.4 Die intrazelluläre siRNA zeigt einen schwachen biologischen Effekt**

Die durch die Aufnahme mit diesen hohen Konzentrationen an siRNA erreichten intrazellulären Mengen an siRNA entsprechen einer 2nM Transfektion mit Lipofectamin 2000 (Abb. 28). Trotzdem konnte in der Zelllinie SK-RC35 kein biologischer Effekt beobachtet werden (Abb. 29). Bei den primären HUVEC Zellen hingegen konnte ein biologischer Effekt beobachtet werden. Dabei korrelierte die Erniedrigung der Lamin A/C mRNA Menge mit der detektierten Menge an intrazellulärer siRNA (Abb. 30). Den Unterschied zwischen dem Verhalten dieser beiden Zelltypen kann man wiederum auf die schon oben erwähnten Faktoren zurückführen, wobei die primären HUVEC Zellen viel eher einer *in-vivo* Situation entsprechen. Trotz der Korrelation zwischen der aufgenommenen Menge an siRNA und des biologischen Effekts, ist dieser nicht so stark ausgeprägt, wie man es bei der intrazellulär gemessenen Menge erwarten würde. D.h. die siRNA, die PTO-stimuliert aufgenommen wurde, liegt innerhalb der Zelle nicht in einer bioverfügbaren Form bzw. Lokalisation vor. Dieses Problem ist von anderen Nukleinsäurewirkstoffen schon bekannt und ist bislang noch nicht befriedigend gelöst worden. Die meisten Nukleinsäurewirkstoffe werden durch eine Endocytose aufgenommen und nach ihrer Aufnahme im Endosom bzw. im Lysosom entweder abgebaut oder sie bleiben eingeschlossen. Die effektive Freisetzung aus diesen Kompartimenten ist bislang trotz intensiver Forschung noch nicht geglückt.

### **5.3.5 Es handelt sich bei der PTO-stimulierten Aufnahme um eine Caveolin-abhängige Endozytose**

Die durch PTO-Stimulation aufgenommene siRNA lag nicht in einer bioverfügbaren Form innerhalb der Zellen vor. Daher wurde der Aufnahmeweg der siRNA näher charakterisiert, um eine Freisetzung innerhalb der Zellen zu ermöglichen. Dazu wurde der Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren und Aktivatoren für endozytotische Aufnahmewege *in-vitro* getestet. Wie der Abb. 31 zu entnehmen ist, hat die Erniedrigung der Temperatur von 37°C auf 4°C einen signifikanten Einfluss auf die PTO-stimulierte Aufnahme der siRNA. Die aufgenommene Menge entsprach bei einer Inkubationstemperatur von 4°C der Menge an aufgenommener siRNA ohne PTO-Stimulation. Durch Erniedrigung der Temperatur von 37°C auf 4°C werden Energie-abhängige Prozesse inhibiert. Dementsprechend muss es sich bei der PTO-stimulierten siRNA-Aufnahme um einen Energie-abhängigen Prozess handeln. Die Erniedrigung der Temperatur hat keinen Einfluss auf die aufgenommene Menge an siRNA ohne PTO-Stimulation, so dass es sich wahrscheinlich bei den beiden

Aufnahmewegen um einen ATP-abhängigen und einen ATP-unabhängigen Weg handelt.

Bei den Inhibitoren Wortmannin und Cytochalasin B, die beide ganz allgemein den Vorgang der Endozytose inhibieren, wurden widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Der Inhibitor Wortmannin erniedrigt im Gegensatz zu Cytochalasin B die aufgenommene Menge an siRNA. Die Inkubation mit Sucrose, einem Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose, zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von siRNA nach PTO-Stimulation.

Die Inhibitoren für die Caveolin-vermittelten Endozytose Nystatin, Filipin-Komplex und Genistein zeigten hingegen eine signifikante Erniedrigung der durch PTO-Stimulation aufgenommenen Menge an siRNA. Diese Inhibitoren wirken auf unterschiedliche Bereiche der Caveolin-vermittelten Endozytose. Nystatin und Genistein verringern die freie Cholesterol-Menge, die sowohl für die Bildung der Caveolae als auch für die Bildung der Lipid-rafts bei der Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytose notwendig sind. Bei dem Filipin-Komplex handelt es sich um einen Inhibitor der src-Kinase, der für die Abschnürung der Caveolae von der Membran essentiell wichtig ist. Diese Kinase hat keinen Einfluss auf die Aufnahme von Molekülen durch die Clathrin- und Caveolin unabhängige Endozytose. Die Okadainsäure, ein Phosphatase-Inhibitor, ist ein Aktivator der Caveolin-vermittelten Endozytose und führt zu einer Aktivierung der Abschnürung der Caveolae aus der Zellmembran. Die Inkubation der Zellen mit der Okadainsäure führte sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von PTO im Medium zu einer signifikanten Erhöhung der aufgenommenen siRNA-Menge. Diese Ergebnisse lassen auf einen Caveolin-vermittelten Aufnahmeweg für die PTO-stimulierte Aufnahme schließen. Die Tatsache, dass die Aktivierung der Caveolin-vermittelten Aufnahme durch Okadainsäure zu einer weiteren Erhöhung der aufgenommenen siRNA Menge führt, weist darauf hin, dass die Inkubation mit PTO keinen Einfluss auf die Phosphatase Aktivität besitzt, da eine Konzentrationserhöhung des PTOs keine Verstärkung der Stimulation gezeigt hat. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um einen additiven Prozess aus Phosphatase-Inhibition durch Okadainsäure und äußerer Stimulation der Caveolin-vermittelten Aufnahme durch PTO.

Die Beobachtung, dass im Fall von lymphoiden Zellen, die kein Caveolin-1 Protein exprimieren, keine Stimulation der Aufnahme beobachtet werden konnte, stimmt mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen überein. Mit der Caveolin-vermittelten Aufnahme vereinbar ist die Beobachtung, dass eine Erhöhung der extrazellulären siRNA Konzentration zu einer Erhöhung der intrazellulären siRNA Menge führte, ohne dass es bei der relativ hohen Konzentration von 2,4 $\mu$ M zu einer Absättigung der

Aufnahme kam (Abb. 27). Bei den Caveolae handelt es sich um relativ immobile, in der Plasmamembran vorhandene, Strukturen, die sich nach der Stimulation sehr schnell abschnüren. Nach erfolgter Abgabe der Fracht kommt es wiederum zu einer Verschmelzung der Caveolae mit der Plasmamembran. Bei einem äußeren Stimulus, in diesem Fall wahrscheinlich die Inkubation mit PTO, nimmt die Zelle je nach siRNA-Konzentration im Überstand eine bestimmte Menge an siRNA auf. Es handelt sich bei der Caveolin-vermittelten Endozytose um eine Flüssigphasen-Endozytose, d.h. je höher die Konzentration an siRNA in dem aufgenommenen Überstand, umso höher die Konzentration der intrazellulär vorhandenen siRNA. Das heißt auch, dass es in diesem Aufnahme-Prozess wahrscheinlich keinen spezifischen Rezeptor für siRNA gibt. Um dieses auszuschließen, müssten noch Wettbewerbsversuche und Aufnahmeexperimente mit anderen Nukleinsäuren oder Molekülen, die spezifisch über die Caveolin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden, angeschlossen werden.

Im Falle der Spontan-Aufnahme von siRNA ohne PTO-Stimulation konnte man keine sichere Aussage in Bezug auf den Aufnahmeweg treffen. Die Inkubation mit den unterschiedlichen Inhibitoren führte zu keiner signifikanten Erniedrigung der aufgenommenen Menge an siRNA. Lediglich die Aktivierung durch die Okadainsäure konnte zu einer Erhöhung der siRNA Menge führen. Dies lässt auf einen ATP-unabhängigen und siRNA-unspezifischen Aufnahmeweg schließen, wie es zum Beispiel bei der Makropinozytose der Fall wäre.

### **5.3.6 Lokalisation der siRNA im Golgi-Apparat**

Nach der Caveolin-vermittelten Endozytose gibt es unterschiedliche Zellkompartimente zu denen die siRNA transportiert werden kann. Es besteht die Möglichkeit eines Transportes in die frühen Endosomen, in das Endoplasmatische Retikulum und in den Golgi-Apparat. Anhand der in Abb. 34 bis Abb. 37 gezeigten Fluoreszenzaufnahmen befand sich die durch PTO-Stimulation aufgenommene siRNA im Gegensatz zur der spontan aufgenommenen siRNA im perinukleären Raum. Es handelt sich bei dem Zellkompartiment wahrscheinlich um den Golgi, da es bei einer transienten Transfektion der Zellen mit einem GFP-gelabelten Golgi spezifischen Protein und einer nachfolgenden PTO-stimulierten Aufnahme von Cy3-gelabelter siRNA zu einer Überlappung der Fluoreszenzen gekommen ist (Abb. 36). Die siRNA kann sowohl über das Endoplasmatische Retikulum als auch direkt aus den Caveosomen in den Golgi gelangen. In beiden Fällen kommt es nicht zum Transport über Endosomen, was auch mit den beobachteten Ergebnissen zur Freisetzung aus sauren Kompartimenten übereinstimmt. Sowohl die Inkubation mit Monensin (Abb. 32) als auch mit Chloroquin (nicht gezeigt), hat weder zu einer Verringerung der internalisierten Menge an siRNA

noch zu einem biologischen Effekt geführt. Wenn siRNAs aus einem Kompartiment freigesetzt werden in dem man dieses Kompartiment durch Substanzen zerstört, wird die siRNA in den cytoplasmatischen Raum entlassen. Nur ein geringer Teil der siRNA würde genügen um einen biologischen Effekt durch den Einbau in den RISC-Komplex herbeizuführen. Bei der Inkubation mit Ilimaquinon, welches die Freisetzung aus dem Golgi durch Zerstörung von diesem herbeiführt, konnte man einen biologischen Effekt der siRNA beobachten. In dem Fall der Inkubation der Zellen mit 50µM Ilimaquinone wurde die Lamin A/C mRNA Menge im Vergleich auf 40% verringert. Dieses lässt auf die Freisetzung der si-Lam aus dem Kompartiment Golgi schließen und auf die nachfolgende Überführung in den RISC-Komplex.

Insgesamt handelt es sich bei der PTO-stimulierten Aufnahme von siRNA um eine viel versprechende Methode, um siRNA auch *in-vivo* als Therapeutikum anwenden zu können. Dadurch, dass es sich bei der Chemie des PTOs um ein schon in klinischen Studien etabliertes System handelt, bei dem Nebenwirkungen bereits untersucht wurden, ist zumindest die *in-vivo* Anwendung bei den hier verwendeten PTO-Konzentrationen möglich, ohne Nebenwirkungen hervorzurufen. Damit wäre eine erste Hürde, nämlich die der zellulären Aufnahme der siRNA, bei einer *in-vivo* Applikation überwunden. Inwiefern die siRNA *in-vivo* aus dem Golgi freigesetzt werden kann, muss im Weiteren untersucht werden. Zuerst müssen allerdings ganz generell *in-vivo* Experimente mit der Applikation von siRNA mit PTO in der Maus durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die *in-vitro* gefundene stimulierte Aufnahme von siRNA auch *in-vivo* stattfindet und ob es dabei Unterschiede in der Aufnahme in den unterschiedlichen Geweben gibt, wie es *in-vitro* bei den unterschiedlichen Zellen der Fall war.

## 6 Zusammenfassung

Die Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge der Genexpression führten in den letzten Jahren zu der Entwicklung von Nukleinsäure-Wirkstoffen. Durch die Entdeckung des RNA interference Prozesses in humanen Zellen rückte die siRNA dabei in den Focus der modernen Medizin. Um siRNA als potentiellen Wirkstoff für die Behandlung von Krankheiten nutzen zu können, muss sowohl erforscht werden, wie der Wirkmechanismus des „Gene silencing“ durch siRNA ist, als auch wie die siRNA effektiv in die Zellen gelangen kann.

Der Gedanke, die mRNA Zielstruktur könne die Wirksamkeit von siRNA beeinflussen, begründet sich auf frühere Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen mRNA und antisense Oligonukleotid. Der Einfluss der mRNA-Struktur auf die Wirksamkeit der siRNA war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht bekannt. Im Verlauf der Arbeit konnte dieser Einfluss durch die Messung der biologischen Aktivität verschiedener siRNAs gegen unterschiedliche Strukturelemente der ICAM-1 mRNA im humanen Zellkultursystem gemessen werden. Die biologische Aktivität der transfizierten siRNA wurde durch die Quantifizierung der ICAM-1 mRNA durch RT-qPCR ermittelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Einschleusung von siRNAs in humane Zellen untersucht. Dazu konnte zunächst ein Nachweisverfahren auf der Grundlage des RNase-Protektions-Assays für die Quantifizierung der aufgenommenen siRNAs entwickelt werden. Im Anschluss daran konnte ein neuartiges Verfahren zur Einschleusung von siRNAs in Säugerzellen entwickelt werden. Bei diesem Verfahren wird die Caveolin-vermittelte Endozytose von siRNA durch eine Koinkubation mit Phosphorothioat modifizierten DNA Oligonukleotiden (PTO) gesteigert. Diese PTO-stimulierte Aufnahme von siRNA in humane Zellen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit näher charakterisiert.

## 7 Literaturverzeichnis

Anderson,R.G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199-225.

Anderson,R.G. and Jacobson,K. (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296, 1821-1825.

Aravind,L. and Koonin,E.V. (2001). A natural classification of ribonucleases. *Methods Enzymol.* 341, 3-28.

Avery,O.T., MacLeod,C.M., and McCarty,M. (1995). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944. *Mol. Med.* 1, 344-365.

Bartel,D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

Baulcombe,D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.

Bennett,C.F. and Cowser,L.M. (1999). Application of antisense oligonucleotides for gene functionalization and target validation. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1, 359-371.

Bennett,R.M. (1993). As nature intended? The uptake of DNA and oligonucleotides by eukaryotic cells. *Antisense Res. Dev.* 3, 235-241.

Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., and Hannon,G.J. (2001a). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

Bernstein,E., Denli,A.M., and Hannon,G.J. (2001b). The rest is silence. *RNA.* 7, 1509-1521.

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

- Bohula,E.A., Salisbury,A.J., Sohail,M., Playford,M.P., Riedemann,J., Southern,E.M., and Macaulay,V.M. (2003). The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *J. Biol. Chem.* *278*, 15991-15997.
- Brodsky,F.M., Chen,C.Y., Knuehl,C., Towler,M.C., and Wakeham,D.E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 517-568.
- Brown,D.A., Kang,S.H., Gryaznov,S.M., DeDionisio,L., Heidenreich,O., Sullivan,S., Xu,X., and Nerenberg,M.I. (1994). Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J. Biol. Chem.* *269*, 26801-26805.
- Campbell,J.M., Bacon,T.A., and Wickstrom,E. (1990). Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J. Biochem. Biophys. Methods* *20*, 259-267.
- Carmell,M.A. and Hannon,G.J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 214-218.
- Cech,T.R., Zaug,A.J., and Grabowski,P.J. (1981). 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.
- Cerutti,L., Mian,N., and Bateman,A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 481-482.
- Christensen,U., Jacobsen,N., Rajwanshi,V.K., Wengel,J., and Koch,T. (2001). Stopped-flow kinetics of locked nucleic acid (LNA)-oligonucleotide duplex formation: studies of LNA-DNA and DNA-DNA interactions. *Biochem. J.* *354*, 481-484.
- Christoffersen,R.E. and Marr,J.J. (1995). Ribozymes as human therapeutic agents. *J. Med. Chem.* *38*, 2023-2037.

- Conner,S.D. and Schmid,S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- Crooke,S.T. (1998). Molecular mechanisms of antisense drugs: RNase H. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8, 133-134.
- De Clercq,E., Eckstein,F., Sternbach,H., and Merigan,T.C. (1969). Interferon induction by and ribonuclease sensitivity of thiophosphate-substituted polyribonucleotides. *Antimicrobial. Agents Chemother.* 9, 187-191.
- Dinter,A. and Berger,E.G. (1998). Golgi-disturbing agents. *Histochem. Cell Biol.* 109, 571-590.
- Eckstein,F. (2000). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10, 117-121.
- Ekwall,K. (2004). The RITS complex-A direct link between small RNA and heterochromatin. *Mol. Cell* 13, 304-305.
- Elayadi,A.N. and Corey,D.R. (2001). Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2, 558-561.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., and Tuschl,T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir,S.M., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Elbashir,S.M., Martinez,J., Patkaniowska,A., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.
- Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., and Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

- Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., and Parton, R.G. (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 8655-8659.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* *106*, 23-34.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* *35*, 849-857.
- Guo, S. and Kemphues, K.J. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* *81*, 611-620.
- Guvakova, M.A., Yakubov, L.A., Vlodayky, I., Tonkinson, J.L., and Stein, C.A. (1995). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* *270*, 2620-2627.
- Haley, B. and Zamore, P.D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 599-606.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* *286*, 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* *404*, 293-296.
- Harfe, B.D. (2005). MicroRNAs in vertebrate development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *15*, 410-415.
- Hartmann, G., Weeratna, R.D., Ballas, Z.K., Payette, P., Blackwell, S., Suparto, I., Rasmussen, W.L., Waldschmidt, M., Sajuthi, D., Purcell, R.H., Davis, H.L., and Krieg, A.M. (2000). Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide

for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* *164*, 1617-1624.

Haseloff, J. and Gerlach, W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* *334*, 585-591.

Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E., and Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* *30*, 1757-1766.

Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* *297*, 2056-2060.

Jabri, E. (2005). P-bodies take a RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 564.

James, H.A. and Gibson, I. (1998). The therapeutic potential of ribozymes. *Blood* *91*, 371-382.

Jaronczyk, K., Carmichael, J.B., and Hobman, T.C. (2005). Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others? *Biochem. J.* *387*, 561-571.

Jones, L., Ratcliff, F., and Baulcombe, D.C. (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr. Biol.* *11*, 747-757.

Kawasaki, H., Wadhwa, R., and Taira, K. (2004). World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA. *Differentiation* *72*, 58-64.

Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* *15*, 2654-2659.

Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209-216.

- Kretschmer-Kazemi,F.R. and Sczakiel,G. (2003). The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* *31*, 4417-4424.
- Krieg,A.M., Hartmann,G., and Yi,A.K. (2000). Mechanism of action of CpG DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *247*, 1-21.
- Kurreck,J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* *270*, 1628-1644.
- Kurreck,J., Wyszko,E., Gillen,C., and Erdmann,V.A. (2002). Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* *30*, 1911-1918.
- Lamaze,C., Dujeancourt,A., Baba,T., Lo,C.G., Benmerah,A., and Dautry-Varsat,A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* *7*, 661-671.
- Lehmann,M.J. and Sczakiel,G. (2005). Spontaneous uptake of biologically active recombinant DNA by mammalian cells via a selected DNA segment. *Gene Ther.* *12*, 446-451.
- Lewis,B.P., Burge,C.B., and Bartel,D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15-20.
- Lingel,A. and Izaurralde,E. (2004). RNAi: finding the elusive endonuclease. *RNA.* *10*, 1675-1679.
- Lingel,A. and Sattler,M. (2005). Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *15*, 107-115.
- Lingel,A., Simon,B., Izaurralde,E., and Sattler,M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* *426*, 465-469.
- Lingel,A., Simon,B., Izaurralde,E., and Sattler,M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 576-577.

- Lingor,P., Michel,U., Scholl,U., Bahr,M., and Kugler,S. (2004). Transfection of "naked" siRNA results in endosomal uptake and metabolic impairment in cultured neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *315*, 1126-1133.
- Liu,J., Carmell,M.A., Rivas,F.V., Marsden,C.G., Thomson,J.M., Song,J.J., Hammond,S.M., Joshua-Tor,L., and Hannon,G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* *305*, 1437-1441.
- Liu,J., Valencia-Sanchez,M.A., Hannon,G.J., and Parker,R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 719-723.
- Lutterforst,R., Stang,E., Zorzi,N., Carozzi,A., Way,M., and Parton,R.G. (1999). Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule. *J. Cell Biol.* *145*, 1443-1459.
- Luo,K.Q. and Chang,D.C. (2004). The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *318*, 303-310.
- Ma,J.B., Ye,K., and Patel,D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* *429*, 318-322.
- Maniak,M. (2001). Fluid-phase uptake and transit in axenic Dictyostelium cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1525*, 197-204.
- Martinez,J. and Tuschl,T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* *18*, 975-980.
- Matranga,C., Tomari,Y., Shin,C., Bartel,D.P., and Zamore,P.D. (2005). Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. *Cell* *123*, 607-620.
- Mian,I.S. (1997). Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res.* *25*, 3187-3195.

- Monier,S., Parton,R.G., Vogel,F., Behlke,J., Henske,A., and Kurzchalia,T.V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 6, 911-927.
- Mundy,D.I., Machleidt,T., Ying,Y.S., Anderson,R.G., and Bloom,G.S. (2002). Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 115, 4327-4339.
- Nabi,I.R. and Le,P.U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* 161, 673-677.
- Nam,J.W., Shin,K.R., Han,J., Lee,Y., Kim,V.N., and Zhang,B.T. (2005). Human microRNA prediction through a probabilistic co-learning model of sequence and structure. *Nucleic Acids Res.* 33, 3570-3581.
- Nichols,B. (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* 116, 4707-4714.
- Nichols,B.J. (2002). A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 374-378.
- Nykanen,A., Haley,B., and Zamore,P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.
- Okamura,K., Ishizuka,A., Siomi,H., and Siomi,M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev.* 18, 1655-1666.
- Orum,H. and Wengel,J. (2001). Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3, 239-243.
- Overhoff,M., Alken,M., Far,R.K., Lemaitre,M., Lebleu,B., Sczakiel,G., and Robbins,I. (2005). Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J. Mol. Biol.* 348, 871-881.
- Overhoff,M. and Sczakiel,G. (2005). Phosphorothioate-stimulated uptake of short interfering RNA by human cells. *EMBO Rep.* 6, 1176-1181.

- Overhoff,M., Wünsche,W., and Sczakiel,G. (2004). Quantitative detection of siRNA and single-stranded oligonucleotides: relationship between uptake and biological activity of siRNA. *Nucleic Acids Res.* *32*, e170.
- Patzel,V., Steidl,U., Kronenwett,R., Haas,R., and Sczakiel,G. (1999). A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic Acids Res.* *27*, 4328-4334.
- Pelkmans,L., Burli,T., Zerial,M., and Helenius,A. (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* *118*, 767-780.
- Pelkmans,L. and Helenius,A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic.* *3*, 311-320.
- Pelkmans,L., Kartenbeck,J., and Helenius,A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* *3*, 473-483.
- Persengiev,S.P., Zhu,X., and Green,M.R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA.* *10*, 12-18.
- Phillips,M.I. and Zhang,Y.C. (2000). Basic principles of using antisense oligonucleotides in vivo. *Methods Enzymol.* *313*, 46-56.
- Pol,A., Calvo,M., Lu,A., and Enrich,C. (1999). The "early-sorting" endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21). *Hepatology* *29*, 1848-1857.
- Pol,A., Martin,S., Fernandez,M.A., Ingelmo-Torres,M., Ferguson,C., Enrich,C., and Parton,R.G. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2091-2105.
- Praefcke,G.J. and McMahon,H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 133-147.

- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell* 123, 621-629.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorov, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22, 326-330.
- Robinson, M.S. and Bonifacino, J.S. (2001). Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 444-453.
- Rotondo, G. and Frendewey, D. (1996). Purification and characterization of the Pac1 ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 24, 2377-2386.
- Schroeder, R., Barta, A., and Semrad, K. (2004). Strategies for RNA folding and assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 908-919.
- Schubert, S., Grunweller, A., Erdmann, V.A., and Kurreck, J. (2005a). Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J. Mol. Biol.* 348, 883-893.
- Schubert, S., Grunweller, A., Erdmann, V.A., and Kurreck, J. (2005b). Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J. Mol. Biol.* 348, 883-893.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Schwarz, D.S., Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease. *Curr. Biol.* 14, 787-791.
- Sester, D.P., Naik, S., Beasley, S.J., Hume, D.A., and Stacey, K.J. (2000). Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J. Immunol.* 165, 4165-4173.
- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* 10, 1026-1032.

- Song,J.J., Smith,S.K., Hannon,G.J., and Joshua-Tor,L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434-1437.
- Sontheimer,E.J. (2005). Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 127-138.
- Tagawa,A., Mezzacasa,A., Hayer,A., Longatti,A., Pelkmans,L., and Helenius,A. (2005). Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J. Cell Biol.* *170*, 769-779.
- Tomari,Y., Du,T., Haley,B., Schwarz,D.S., Bennett,R., Cook,H.A., Koppetsch,B.S., Theurkauf,W.E., and Zamore,P.D. (2004a). RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* *116*, 831-841.
- Tomari,Y., Matranga,C., Haley,B., Martinez,N., and Zamore,P.D. (2004b). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* *306*, 1377-1380.
- Tomari,Y. and Zamore,P.D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* *19*, 517-529.
- Uhlenbeck,O.C. (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* *328*, 596-600.
- Verdel,A., Jia,S., Gerber,S., Sugiyama,T., Gygi,S., Grewal,S.I., and Moazed,D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* *303*, 672-676.
- Vickers,T.A., Koo,S., Bennett,C.F., Crooke,S.T., Dean,N.M., and Baker,B.F. (2003). Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J. Biol. Chem.* *278*, 7108-7118.
- Wang,X., Zhang,J., Li,F., Gu,J., He,T., Zhang,X., and Li,Y. (2005). MicroRNA identification based on sequence and structure alignment. *Bioinformatics.* *21*, 3610-3614.
- Watson,J.D. and Crick,F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* *171*, 737-738.

- Wünsche,W. and Sczakiel,G. (2005). The activity of siRNA in mammalian cells is related to the kinetics of siRNA-target recognition in vitro: mechanistic implications. *J. Mol. Biol.* *345*, 203-209.
- Zamaratski,E., Pradeepkumar,P.I., and Chattopadhyaya,J. (2001). A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J. Biochem. Biophys. Methods* *48*, 189-208.
- Zamore,P.D., Tuschl,T., Sharp,P.A., and Bartel,D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* *101*, 25-33.
- Zhang,H., Kolb,F.A., Brondani,V., Billy,E., and Filipowicz,W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J.* *21*, 5875-5885.
- Zhang,H., Kolb,F.A., Jaskiewicz,L., Westhof,E., and Filipowicz,W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* *118*, 57-68.
- Zhao,Q., Matson,S., Herrera,C.J., Fisher,E., Yu,H., and Krieg,A.M. (1993). Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides. *Antisense Res. Dev.* *3*, 53-66.

## Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. G. Sczakiel für die gute Betreuung und die Überlassung des Themas.

Ich danke insbesondere Herrn Winfried Wünsche für die ständige Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich nochmals Herrn Winfried Wünsche, Frau Gabriele Kreutzfeldt, Frau Miriam Mende, Frau Alessandra Mescalchin und Herrn Carsten Geist für das ausgesprochen nette, persönliche Arbeitsklima.

Des Weiteren möchte ich Frau Dina Grohmann, Herrn Carsten Geist und Frau Mescalchin für die Einführung des „Super-Matches“ danken.

Darüber hinaus gilt mein Dank natürlich auch allen anderen Mitgliedern des Institutes für Molekulare Medizin.

Es ist mir ein besonderes Bedürfnis meinen Eltern und meinen Brüdern für ihre Unterstützung während dieser Zeit zu danken.

Für ihre mentale Unterstützung möchte Birte Wöstenberg, Svenja Hardtke, Uwe Speck und besonders Björte Pürschel danken.