



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Einfluss der Stabilität des siRNA-Antisense Strangs auf
den Gene-Silencing Effekt nach rezeptorvermittelter
Zellaufnahme“

verfasst von / submitted by

Mathias Stadlbauer

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Mag. Dr. Johannes Winkler, Priv.-Doz.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Dr. Johannes Winkler dafür bedanken, mir die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses hochinteressanten Themas zu geben. Überdies auch für die hervorragende Betreuung und die gute Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit.

Großer Dank gebührt auch Mag. pharm. Cornelia Lorenzer wie auch Mag. pharm. Michael Thell, die mir im Laboralltag stets zur Seite standen, wertvolle Ratschläge erteilten und durch deren tatkräftige Unterstützung die Arbeit zu dem gemacht wurde, was sie ist.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mich in sämtlichen Lebenslagen unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
Abstract.....	6
Zusammenfassung.....	7
1. Einleitung.....	8
1.2. RNA-Interferenz.....	8
1.3. RNAi in Therapie und Forschung.....	10
1.4. Barrieren.....	11
1.5. Chemische Modifikationen von siRNAs.....	14
1.6. Drug-Targeting von RNAi über Designed Ankyrin Repeat Proteins.....	16
2. Ziel.....	17
3. Material und Methoden.....	18
3.1. Synthese der modifizierten Antisense-Stränge zur Herstellung der Luciferase siRNA-Duplexe.....	18
3.1.1. Syntheseplan.....	18
3.1.2. Synthese.....	20
3.1.3. Aufreinigung der DNA-RNA-Hybride.....	22
3.2. Analytik der synthetisierten Oligonukleotide.....	24
3.2.1. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	24
3.3.2. Stabilitätstest.....	25
3.3.3. Hochauflösende Massenspektrometrie.....	27
3.4. Zellkulturversuche.....	28
3.4.1. Luciferase-Assay.....	28
3.4.1.1. Herstellung der siRNA Duplexe.....	28
3.4.2. Versuch unter Verwendung von Lipofectamine.....	28
3.4.2.1. Vorbereitung der Testsubstanzen.....	28
3.4.3. Versuch ohne Verwendung von Lipofectamine.....	29
3.4.3.1. Vorbereitung der Testsubstanzen.....	29
3.4.4. Versuch unter Verwendung von DARPin-Konjugaten für die rezeptorvermittelte Zellaufnahme.....	30
3.4.4.1. Vorbereitung der Testsubstanzen.....	30

3.4.5. Zellvorbereitung und Aussaat.....	31
3.4.5.1. Versuchsanordnung	32
3.4.6. Lysieren der Zellen.....	33
3.4.7. Bradford-Assay.....	33
3.4.8. Lumineszenzmessung.....	34
3.4.9. Auswertung der Resultate.....	34
4. Resultate.....	35
4.1. Synthese der modifizierten Antisense-Stränge zur Herstellung der Luciferase siRNA-Duplexe.....	35
4.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
4.3. Stabilitätstest.....	39
4.4. Hochauflösende Massenspektrometrie.....	43
4.5. Luciferase-Assay.....	46
4.5.1. Versuch unter Verwendung von Lipofectamine.....	47
4.5.2. Versuch ohne Verwendung von Lipofectamine.....	52
4.5.3. Versuch unter Verwendung von DARPin-Konjugaten für die rezeptorvermittelte Zellaufnahme.....	55
5. Diskussion.....	61
5.1. Synthese der modifizierten Antisense-Stränge.....	61
5.2. Stabilitätstest.....	65
5.3. Zellkulturversuche.....	67
5.4. Konklusion.....	70
6. Abkürzungsverzeichnis.....	71
7. Referenzen.....	72

Abstract

RNA-Interference is one of the most promising therapeutic principles, because it allows simple and precise post-translational gene knockdown, in which there is hope for treatment of genetic disorders, viral diseases and cancer. However, it is for a difficult task to put RNAi into practise as there are several barriers limiting its implementation. Problems that must be solved are enzymatic degradation and high clearance rates, off-target effects or immune reactions. To date, insufficient endosomal escape is one of the biggest limitations on the implementation of RNAi. Solution approaches like nanoparticles, complexes with polycations and other carrier systems therefore are aimed to improve cellular uptake. Another possibility is chemical modification of siRNAs. In scope of this work, a set of overall 20 individually modified antisense-strands was generated, which make up 20 variations of siRNAs, targeted against the luciferase-mRNA when combined with the sense-strand. Modifications mostly concern methylation of the ribose 2'-OH and a phosphorothioate backbone, whereas selected strands were coupled to cholesterol on the 3'-end. The processed siRNAs were examined on effectiveness in cell-culture experiments using stably Luc-transfected HeLa- and MCF-7-cells. Full 2'-O-Me and/or phosphorothioate modification resulted in strong reduction of gene silencing, while 3'-cholesterol attachment and limited numbers of 2'-O-Me nucleotides had lesser impact. On the other hand, even confined 2'-OH-modifications as well as the 3'-cholesterol attachment resulted in significantly higher enzymatic stability whereas phosphorothioate-backbones did not noticeably contribute to the siRNA's stability. Substances, whose modification patterns showed small loss of efficacy and increased stability at the same time, were used as DARPIn-conjugates for EpCAM-mediated cellular uptake. Primarily, the 3'-cholesterol-coupled antisense-strands were intended for that purpose to investigate the influence on enhancing endosomal escape, but none of the tested substances improved the gene silencing compared to the unmodified antisense strand. The use of modified antisense-strands is promising, hence a precise selection of modified nucleotides provides significant enhancement of the siRNA's stability without losing too much of its knockdown efficacy. The modified siRNAs can prolong the silencing effect, but did not improve short-term gene silencing efficiency after receptor-mediated uptake in our test setting.

Zusammenfassung

RNA-Interferenz stellt eines der attraktivsten Prinzipien für neue Therapieformen dar, da relativ einfach und zielgenau Gene posttranslational ausgeschaltet werden können, was neue Wege in der Behandlung von Erbkrankheiten, Viruserkrankungen und Krebs ebnet. Die Praxis zeigt jedoch ein anderes Bild aufgrund zahlreicher Hürden, welche den enzymatischen Abbau und hohe Clearance-Raten, off-target Effekte oder Immunreaktionen betreffen. Der unzureichende endosomale Escape stellt bisher eine der größten Hürden in der Anwendung von RNAi dar. Lösungsansätze wie Nanopartikel, Komplexe mit Polykationen und andere Carrier-Systeme sollen die Zellaufnahme verbessern. Eine Alternative bezieht sich auf chemischer Modifikation der siRNA. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein Set aus insgesamt 20 unterschiedlich modifizierter Antisense-Stränge generiert, die mit dem Sense-Strang vereint 20 siRNAs mit unterschiedlichen Eigenschaften gegen die mRNA der Luciferase ergeben. Modifikationen beziehen sich hauptsächlich auf Methylierungen der 2'-OH-Gruppe der Ribose sowie Phosphothioate des Backbones, wobei ausgewählte Stränge am 3'-Ende mit Cholesterin verknüpft wurden. Die siRNAs wurden im Zellversuch an stabil Luciferase transfizierten HeLa- und MCF-7-Zellen auf ihre Wirksamkeit getestet. Vollständig 2'-OH-Me- und/oder Phosphothioat-Modifikation resultierte in starkem Effektverlust, während 3'-Cholesterin und geringe Zahl an 2'-O-methylierten Nukleotiden geringeren Einfluss hatten. Hingegen führten bereits wenige 2'-OH-Modifikationen wie auch der Cholesterin-Rest zu signifikant höherer enzymatischer Stabilität, während Phosphothioate kaum Beitrag zur Stabilität der siRNA leisteten. Substanzen mit geringem Effektverlust bei gleichzeitig hoher Beständigkeit wurden als DARPin-Konjugate eingesetzt, welche EpCAM-vermittelt aufgenommen werden sollten. Dazu wurden vorrangig die 3'-Cholesterin-gekoppelten Antisense-Stränge herangezogen um den Einfluss auf erhöhten endosomalen Escape zu ergründen, aber keine der getesteten Substanzen verbesserte das Gene-Silencing verglichen mit dem unmodifizierten Antisense-Strang. Antisense-Modifikationen scheinen vielversprechend, da durch gezielte Auswahl modifizierter Nukleotide Stabilitätserhöhung bei geringem Effektverlust möglich ist. Modifizierte siRNAs können den Gene-Silencing Effekt verlängern, aber diesen nach rezeptorvermittelter Aufnahme in unseren Tests nicht verbessern.

1. Einleitung

1.1. RNA-Interferenz

Doppelsträngige RNA besitzt die Fähigkeit, in verschiedenen Organismen die Genexpression sequenzspezifisch zu hemmen, was als RNA-Interferenz oder abgekürzt RNAi bezeichnet wird. Da für entsprechende Effekte nur wenige dsRNA-Moleküle benötigt werden, handelt es sich um einen potenten Mechanismus.¹ Entdeckt wurde RNAi zuerst im Nematoden *Caenorhabditis elegans* in Behandlung mit doppelsträngiger RNA, was sequenzspezifisches Gene-Silencing zur Folge hatte. A. Fire *et al.* entdeckten dabei, dass sich der Einsatz von doppelsträngiger RNA als effektiver erweist als die Verwendung der individuellen Einzelstränge.² Mechanismen von RNAi, Co-Suppression und Virus-induziertem Silencing sind sich dabei ähnlich. Die zugrundeliegenden biologischen Pathways kommen möglicherweise auch in allen eukaryotischen Lebensformen vor.³

Die Prozessierung von langen dsRNAs über Dicer schafft siRNA-Duplexe von etwa 21 Nukleotiden Länge mit 5'-Phosphaten und 3'-Überhängen von je 2 Nukleotiden. Dieses Enzym ist ein Mitglied der RNase III Familie von Nukleasen, die spezifisch doppelsträngige RNAs schneiden und in verschiedenen Organismen evolutionär konserviert sind.^{4,5} Infolge dessen wird der RNA-induced-silencing-complex (RISC) mit den prozessierten siRNA-Duplexen beladen und kann damit als sequenzspezifische Nuklease agieren.⁶ Verschiedene Proteine spielen eine Rolle in RNAi oder sind selbst Komponenten des RISC, wobei eine genaue Charakterisierung auf molekularer Ebene bis jetzt vor allem Dicer und Argonauten-Proteinen zukam.⁷ Die siRNA innerhalb von RISC wiederum ermöglicht, dass sequenzspezifisch ein Argonauten-Protein über Basenpaarung zu komplementären Target-mRNAs geführt wird. Das Argonauten-Protein muss im Zuge der RISC-Beladung den *guide*-Strang (Antisense) binden und den *passenger*-Strang (Sense) vom Duplex entfernen um RNAi zu ermöglichen, da mithilfe des *guides* die Target-mRNA erkannt werden kann. Diese wird anschließend geschnitten, oder an der Translation gehindert.⁸

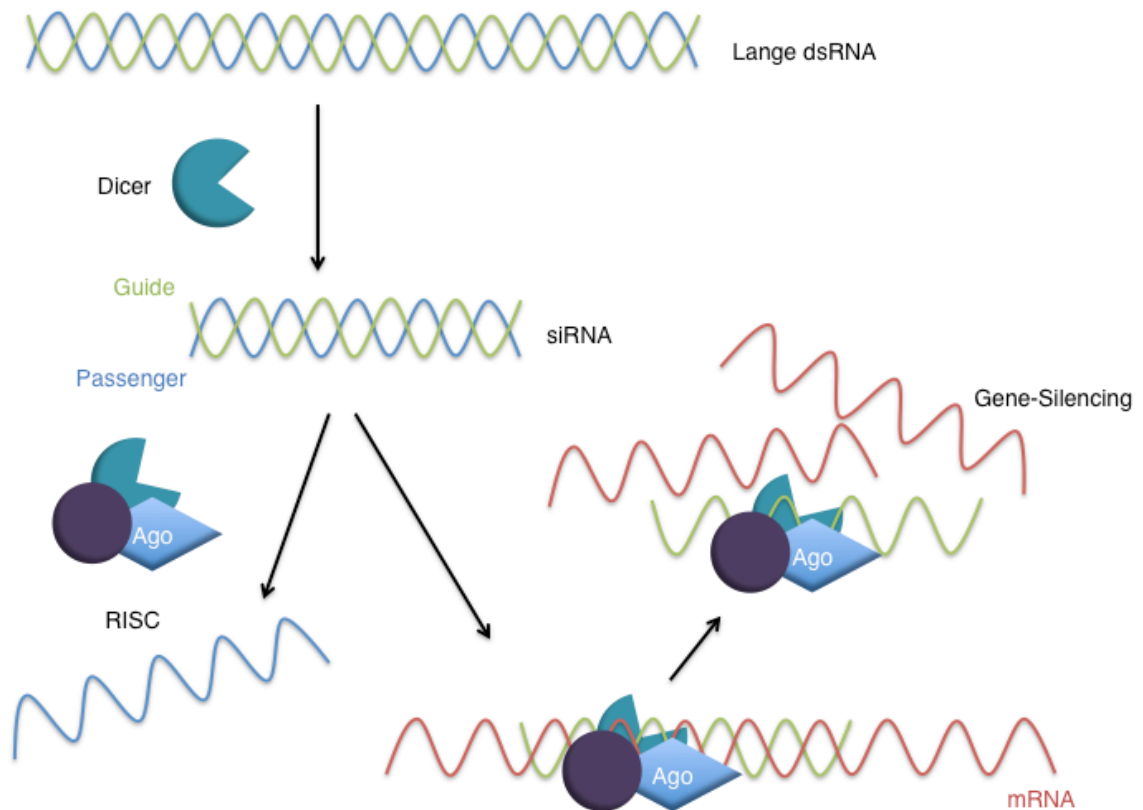


Abb. 1.1. zeigt den schematischen Ablauf von RNAi. Im ersten Schritt oben wird eine lange doppelsträngige RNA von Dicer in die entsprechenden siRNAs geschnitten. Anschließend kommt es zur Assemblierung von RISC und zu dessen Trennung des *guide*-Strangs vom *passenger*-Strang. Der beladene RISC kann nach Hybridisierung mit der passenden mRNA deren Translation unterbinden.

1.2. RNAi in Therapie und Forschung

Die Entdeckung von RNAi durch Fire *et al.* führte zu einer Revolution der funktionellen Genomik, da dieses Verfahren im Gegensatz zu traditionellen Methoden dank seiner Einfachheit und Effizienz auch bei komplexen Systemen wie Säugerzellen eingesetzt werden kann.⁹ Die Methode dient aufgrund ihrer hohen Potenz sowohl zur Aufklärung der Funktion verschiedener Gene, als auch als Basis für neuartige Therapien im Falle krankheitsassoziiierter Gene, wie beispielsweise Erbkrankheiten, Krebserkrankungen und virale Infektionen.¹⁰ Diese Entdeckung animierte zahlreiche große pharmazeutische Unternehmen wie Novartis, Merck, Roche und andere dazu, Forschung in RNAi-basierte Pharmaka zu investieren, was jedoch von vielen nach Jahren wieder aufgegeben wurde, da sich infolge der Barrieren von RNAi kurzfristig nicht die erhofften Erfolge einstellten. Nicht alle Unternehmen haben diese Möglichkeit aufgegeben und können die Erfolge der Forschung in der Nukleinsäure-Delivery nutzen. Viele kleinere Unternehmen, wie Alnylam Pharmaceuticals oder RXi Pharmaceuticals sind nach wie vor auf diesem Gebiet tätig. Man bedenke hier auch, dass monoklonale Antikörper mehr als 20 Jahre an Entwicklung genossen, bevor namhafte Blockbuster den Markt erreichten. Erfolgreiche Produkte wie ALN-VSP02, welches KSP und VEGF von soliden Tumoren als Target nutzt oder ALN-PCS02, was sich gegen PCSK9 in der Therapie der Hypercholesterinämie richtet, zeigten Erfolge in klinischer Testung und können deshalb die Marktreife erlangen.¹¹

Mipomersen-Natrium (Kynamrotm) ist eines der wenigen zugelassenen Gene-Silencing Therapeutika. Dabei handelt es sich um ein Antisense-Oligonukleotid der zweiten Generation, dessen Ziel die mRNA für Apolipoprotein B-100 ist. Es wird per subkutaner Injektion bei Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie eingesetzt.¹²

1.3. Barrieren

Effektive Nutzung von RNAi-basierten Therapeutika setzt effizienten Transport der siRNA zu den korrekten Zielzellen voraus.¹³ Um RNAi zu ermöglichen, muss die siRNA in das Cytosol der Zellen gelangen, was abhängig von angesteuerten Geweben und Administrationsrouten mit Hindernissen verbunden ist. Lokale Verabreichung führt dabei eher zum Erfolg als die systemische Anwendung wie beispielsweise intravenöse Injektion der siRNA. Dabei wird sie über die Zirkulation bei simultaner Elimination im Körper verteilt und muss von Blutgefäßen über das Interstitium zu den Target-Zellen transportiert werden. Einflüsse wie die Degradation der siRNA und ihrer Carrier, Absorption an Proteine, Phagozytose oder Rückhalt im RES erschweren das Erreichen des Ziels. Oberflächeneigenschaften der siRNA und Carrier wie Ladung oder spezifische Antigenbindung beeinflussen die Zellaufnahme. Äußerst schwierig stellt sich das Verlassen des Endosoms dar, um der anschließenden lysosomalen Degradation der Nukleinsäuren zu entgehen. Negative Ladungen, Größe, hohes Molekulargewicht und mangelnde Stabilität verleihen den siRNA-Molekülen darüberhinaus ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften.^{13, 14}

Delivery stellt deswegen einen kritischen Punkt in der Anwendung von RNAi dar. Ein simpler Ansatz ist die direkte Injektion nackter siRNA in das entsprechende Zielgewebe wie das Auge oder die Lunge. Möglichkeiten für die systemische Applikation betreffen beispielsweise Polykation-Nanopartikel, Cholesterin-Konjugate, SNALPs und zahlreiche weitere Möglichkeiten.¹⁵

Eine Grundvoraussetzung für effizienten Einsatz ist ein entsprechender zellulärer Transport welcher der Interaktion zwischen Zelloberfläche und Delivery-System folgen muss. Nach Endozytose kationischer Carrier beispielsweise, muss die siRNA oder der Carrier selbst das Endosom verlassen können, um lysosomalem Abbau zu entgehen und entsprechendes Gene-Silencing zu ermöglichen.¹⁶

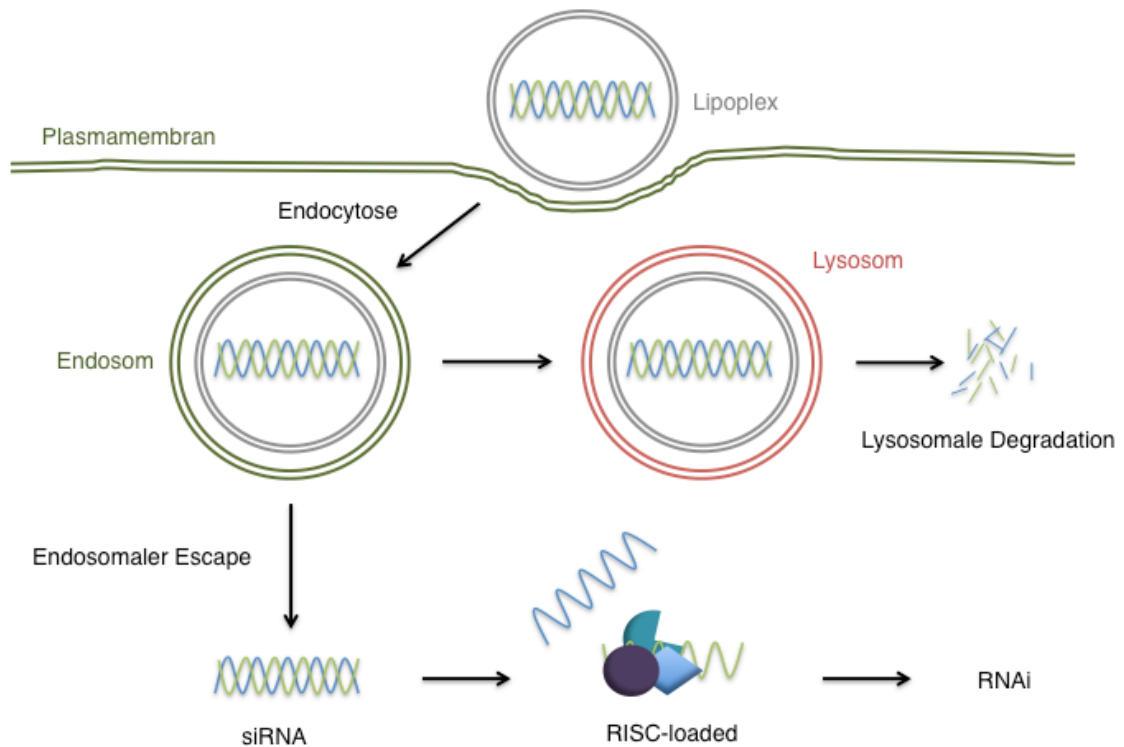


Abb. 1.3. zeigt die zwei möglichen Fälle nach Aufnahme der siRNA. Um RNAi über RISC zu induzieren, muss die siRNA vom Endosom ins Cytosol übergeführt werden. Ist das nicht der Fall, droht die Degradation im Lysosom.

Im Gegensatz zur früheren Meinung, dass es sich bei RNAi um absolut sequenzspezifisches Gene-Silencing handelt, ist heute ersichtlich, dass gewisse Eigenschaften der siRNA oder ihrer Transportsysteme zu eingeschränkter Spezifität im Silencing-Prozess führen. Dabei betreffen diese off-target Effekte beispielsweise microRNA-ähnliche off-target Effekte oder auch Entzündungsreaktionen, welche sowohl über die siRNA, als auch über Carrier-Systeme durch eine Aktivierung von motiv-erkennenden Toll-like-Rezeptoren vermittelt werden können. Die Zufuhr exogener siRNA beeinflusst darüberhinaus miRNA-Prozessierung und deren Funktion aufgrund einer Sättigung der endogenen RNAi-Maschinerie.¹⁷ Die Arbeit von Jackson *et al.* zeigte beispielsweise, dass bereits ein geringes Ausmaß an Sequenzhomologie für off-target Effekte über Kreuz-Hybridisierungen und damit Degradation von Transkripten mit ähnlicher Sequenz ausreichen kann.¹⁸

Problematisch gestaltet sich darüberhinaus die siRNA-vermittelte Aktivierung des angeborenen Immunsystems und die daraus folgende Toxizität, welche zu

exzessiver Cytokin-Ausschüttung sowie Entzündungsreaktionen führen kann. Dieser Prozess wird entweder Toll-like-Rezeptor-abhängig oder -unabhängig vermittelt. Intrazelluläre TLR3, 7 und 8 sind RNA-sensitiv und spielen eine Rolle in der Erkennung pathogener Nucleinsäuren, wobei TLR3 teils auch auf der Zelloberfläche vorkommt. Die TLR-unabhängige Aktivierung von Immunprozessen erfolgt durch Proteine wie RIG1 (retinoic acid inducible gene 1), ein im Cytoplasma lokalisiertes siRNA-bindendes Protein. Dabei können beide Wege simultan stattfinden.¹⁹ Von Judge *et al.* wurde dabei nachgewiesen, dass dieser Effekt sequenzabhängiger Natur ist, wie beispielsweise durch 5'-UGUGU-3'-Motive vermittelt. Dabei ist es möglich durch bereits minimale Basensubstitutionen die immunstimulatorischen Effekte der siRNAs entscheidend zu beeinflussen.²⁰ Folglich wurde entdeckt, dass die Aktivierung des Immunsystems durch Einbau von nur zwei 2'-O-Methyl-modifizierten Guanodin- oder Uridin-Bausteinen erheblich verringert werden kann.²¹

1.4. Chemische Modifikationen von siRNAs

Die Etablierung von RNAi in der Therapie scheint äußerst vielversprechend, jedoch besitzen siRNA-Duplexe zahlreiche Eigenschaften, die denen optimaler Arzneistoffmoleküle entgegentreten. Beispielsweise können sie nur schwer Biomembranen aufgrund ihrer Ladungen überqueren, welche auch zu extensiver Hydratation führen. Verwundbarkeit gegenüber Serumnukleasen des Körpers und fehlende Interaktionen mit Serum-Proteinen wie Albumin führen zu rascher Elimination und folglich kurzen Halbwertszeiten. Weitere Schwierigkeiten betreffen Limitationen in der Gewebeverteilung und off-target Effekte durch mangelnde Spezifität. Mithilfe chemischer Modifikationen wurde deshalb versucht, deren Eigenschaften zu optimieren, um Probleme im effizienten Einsatz zu beseitigen, wobei angenommen wird, dass der RNAi-Mechanismus durch die meisten Modifikationen unbeeinflusst bleibt.²² Ein Ansatz bezieht sich auf die nur bei RNA vorkommende 2'-OH-Gruppe der Ribose, da diese für die RNase-Aktivität von Bedeutung ist. Für den RNAi-Mechanismus zwischen RISC und der mRNA wird diese Gruppe nicht benötigt, da deren Interaktion vor allem strukturelle Charakteristika voraussetzt. Durch diese Modifikation kann darüberhinaus die Beständigkeit in menschlichen Zellen erhöht werden. Man kann die Hydroxylgruppe beispielsweise methylieren oder mit einer Fluorgruppe ausstatten. Das Einführen von Methylgruppen am 2'-OH des Sense- oder Antisense-Strangs verringert die Effekte von RNAi teilweise beträchtlich (abhängig von Zahl und Position in der Sequenz), da der sperrige Methylrest die Interaktionen innerhalb der Silencing-Maschinerie behindert. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einführen von Phosphothioat-Verknüpfungen im Backbone der siRNA. Beide Modifikationen, allen voran die 2'-OH-Methylierung verbessern signifikant die Stabilität gegenüber Nukleasen und können dabei die Effekte von RNAi verlängern.²³ Die Möglichkeiten siRNAs zu modifizieren sind praktisch sehr weit gefächert, wie die Arbeit von Jesper B. Bramsen *et. al.* verdeutlicht, in welcher 21 verschiedene Typen von Veränderungen, unterteilt in 2'-RNA- und 4'-RNA-Modifikationen, Locked RNAs sowie radikale Ribose-Modifikationen, in einem Gesamtset von 2160 unterschiedlichen Duplexen gegen dieselbe Target-mRNA getestet wurden.²⁴ Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung der siRNA mit lipophilen Resten wie beispielsweise Cholesterin, welcher mittels Phosphoramidit-Verfahren am 5'-

Ende eines Strangs oder mithilfe modifizierter CPG-Harze am 3'-Ende angebracht werden kann.^{25, 26} Die Arbeit von Soutschek *et al.* zeigte dabei, dass diese Substanzen dadurch besondere pharmakologische Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* aufweisen. Dabei wurde eine deutliche Bindung an Serumalbumin nachgewiesen. Eine 3'-Cholesterin-gekoppelte siRNA, die sich gegen die mRNA für Apolipoprotein B100 richtete, wurde Mäusen intravenös verabreicht und bereits nach wenigen Stunden konnten signifikante Spiegel der Substanz in Leber, Herz, Niere, Fettgewebe und Lunge nachgewiesen werden, im Gegensatz zu unkonjugierter siRNA. Darüberhinaus wurde Apo B100 deutlich durch RNAi vermindert.²⁷ Die erleichterte Aufnahme ergibt sich durch einen Lipoprotein-abhängigen Mechanismus, wobei neben Cholesterin-gekoppelten siRNAs auch solche mit langen Fettsäuren oder Gallensalzen HDL und LDL binden können. Je nach Lipoprotein wird die Aufnahme in unterschiedliche Gewebe vermittelt, wobei LDL-Konjugate vorrangig die Leber betreffen, HDL die Aufnahme in Gewebe wie Leber, aber auch Nebenniere, Niere und Ovarien vermittelt. Die Aufnahme der lipophilen siRNA in Leberzellen wird dabei zum Teil über Sid1 (Systemic RNAi Deficient-1) nach Andocken der siRNA-Lipoprotein-Komplexe am entsprechenden Rezeptor vermittelt.²⁸

1.5. Drug-Targeting von RNAi über Designed Ankyrin Repeat

Proteins

Als hochaffin bindende Moleküle haben sich Antikörper sowie Fragmente seit jeher in der biotechnologischen und biomedizinischen Forschung bewährt. Dennoch erweist sich deren Handhabung durch niedrige Expressionsausbeuten oder Aggregatbildungstendenzen als problemverbunden. Darüberhinaus ist die Stabilität der Antikörper abhängig von Disulfidbrücken.²⁹

Bei Designed Ankyrin Repeat Proteins, kurz DARPs, handelt es sich um eine Alternative hochspezifisch bindender Moleküle, abgeleitet von Ankyrin, einer Klasse von Repeat Proteinen. Die Proteine können dabei in hohen Mengen in *E. coli* exprimiert werden, sie sind löslich und liegen als Monomere vor. DARPs zeigen hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen und sind prinzipiell frei von Cystein. Darüberhinaus gestatten sie hohe Variabilität der Aminosäuren in den randomisierten Positionen und zeigen erstaunliche Temperaturstabilität. Damit erfüllen sie viele Kriterien um als neue Klasse von Bindungsproteinen eingesetzt zu werden.^{29, 30} Auch in der klinischen Diagnostik können DARPs eine Alternative zu monoklonalen Antikörpern darstellen, wie die Arbeit von Theurillat *et al.* zeigt, in der mithilfe von DARPs über Gewebemicroarrays der Expressionsstatus des Protoonkogens HER2 mit picomolarer Affinität untersucht werden konnte.³¹

Ligandengesteuerte Diagnostik und zielgerichtete Krebstherapeutika setzen ein spezifisches und effizientes Erkennen von Tumor-assoziierten Antigenen voraus. Monoklonale Antikörper erwiesen sich bis dato als Mittel der Wahl für Imaging, Therapie und Tumortargeting.³² Ein attraktives Target stellt EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) dar, welches von soliden Tumoren exprimiert wird. Nach Bindung von Liganden wird das Protein rasch über Endozytose internalisiert, so können auf diesem Weg cytotoxische Effektoren effizient in Zielzellen befördert werden.³³ Eine Anwendung davon in RNAi zeigt die Arbeit von Winkler *et al.* in der ein signifikantes Gene-Silencing von bcl-2 mithilfe eines DARPin-Protamin-1-Fusionsproteins zur Komplexierung der entsprechenden siRNA an EpCAM-positiven Zellen erreicht wurde.³⁴

2. Ziel

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Set aus unterschiedlich modifizierten Antisense-Strängen einer siRNA generiert und getestet werden, die sich gegen die mRNA der Luciferase richtet. Ein zuvor in der Arbeitsgruppe entwickeltes siRNA-Proteinkonjugat wird zwar sehr spezifisch über den entsprechenden Rezeptor in die Zielzellen aufgenommen, ist aber vorwiegend im Endosom lokalisiert und führt daher nur zu geringem Gene-Silencing. Daher soll untersucht werden, ob chemische Modifikationen am Antisense-Strang, wie etwa eine Ausstattung mit Cholesterin am 3'-Ende das noch immer bestehende Problem des endosomalen Escape beeinflussen oder gar lösen können. Die primäre Überlegung dahinter ist, dass möglicherweise die dadurch verliehene höhere Nuklease-Beständigkeit den siRNAs mehr Zeit zum Verlassen des Endosoms geben könnte. Wie die Literatur zeigt, kann ein Cholesterin-Rest durch die erhöhte Lipophilie das Durchdringen der Lipidmembranen erleichtern. Die hergestellten Produkte sollen in diesem Fall in erster Linie auf ihre Wirksamkeit getestet werden, um zu ermitteln, welches Muster an Modifikationen sich am wenigsten fatal auf die Wirksamkeit der betreffenden siRNA auswirkt. Dabei sollen HeLa-Zellen, die mit dem Luciferase-Gen ausgestattet wurden zum Einsatz kommen und die siRNAs mithilfe eines Transfektionsreagenz in das Cytosol der Zellen verfrachtet werden. Anschließend soll überprüft werden, ob die Cholesterin-gekoppelten siRNAs möglicherweise auch ohne diese Reagenzien unspezifisch von Zellen aufgenommen werden können.

Einflüsse der jeweiligen Modifikationen auf die Stabilität gegenüber einem Abbau durch Nukleasen soll über elektrophoretische Methoden geprüft werden.

Im Anschluss sollten die besten Substanzen der initialen Testung und insbesondere jene mit Cholesterin-Kopplung dazu ausgewählt werden, als Antisense-Stränge von Konjugaten mit Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs), welche gegen den Rezeptor EpCAM gerichtet sind, zu fungieren. Dafür waren MCF-7-Zellen, die ebenfalls mit dem Luciferase-Gen ausgestattet sind, vorgesehen. Hierbei soll schließlich überprüft werden, ob die gewählten Modifikationen den dadurch erhofften Silencing-Effekt signifikant verbessern können.

3. Material und Methoden

3.1. Synthese der modifizierten Antisense-Stränge zur Herstellung der Luciferase siRNA-Duplexe

3.1.1. Syntheseplan

Die geplanten Antisense-Stränge sollten mit einem unterschiedlichen Muster an Modifikationen versehen werden, wobei man sich in dieser Arbeit auf den Einsatz von 2'-O-Methylresten der Ribose, sowie auf Phosphothioat-Modifikationen des Backbones beschränkte. Darüber hinaus wurden insgesamt 6 Stränge am 3'-Ende mit einem Cholesterinrest versehen, der über ein dafür vorgesehenes CPG-Harz über einen entsprechenden Linker angefügt werden konnte. Jede der gewählten Sequenzen verfügt über 3'-Überhänge aus jeweils zwei Desoxythymidinen und zumindest eine Phosphothioat-Modifikation am 3'-Ende. Dabei wurde ein Set aus insgesamt 20 unterschiedlichen siRNA-Antisense-Strängen generiert, welche sich jedoch alle gegen die gleiche Target-mRNA richteten.

Nr	Antisense	Sequenz 5'-3'	Mod	PS	3'-Mod
1.	<i>Compact Luc AS</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	-	1 (3')	
2.	<i>voll modifiziert</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	gesamt	
3.	<i>Phosphothioat</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	-	gesamt	
4.	<i>2'-O-Me (Pyr)</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	
5.	<i>2'-O-Me (Pur)</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	
6.	<i>ohne seed region</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	
7.	<i>terminal (AS gapmer)</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	gesamt	
8.	<i>alternierend</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	
9.	<i>terminal (je 2)</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	gesamt	
10.	<i>Compact Luc AS C</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	-	1 (3')	Chol.
11.	<i>voll modifiziert C</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	gesamt	Chol.
12.	<i>Phosphothioat C</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	-	gesamt	Chol.
13.	<i>2'-O-Me (Pyr) C</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	Chol.
14.	<i>2'-O-Me (Pur) C</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	Chol.
15.	<i>2'-O-Me (Pyr) new</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	
16.	<i>ohne seed region new</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	
17.	<i>terminal (AS gapmer) new</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	gesamt	
18.	<i>alternierend new</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	
19.	<i>terminal (je 2) new</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	gesamt	
20.	<i>2'-O-Me (Pyr) C new</i>	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	2'-O-Me	2 (3')	Chol.

Tabelle 3.1.1. zeigt die Sequenzen der synthetisierten Antisense-Stränge. Alle weisen jeweils den Desoxythymidin-Überhang sowie mindestens eine Phosphothioat-Einheit (PS) auf, hier in **rot** dargestellt. Sechs Substanzen besitzen eine Cholesterinverknüpfung am 3'-Ende (**lila**). Bei den Modifikationen der Ribose handelt es sich ausschließlich um Methylierungen der 2'-OH-Gruppe (**blau**).

3.1.2. Synthese

Im Zuge der Arbeit sollten insgesamt 20 verschiedene Antisense-Stränge einer Luciferase-siRNA hergestellt werden. Zu deren Synthese wurde ein Polygen 10 Säulen Synthesizer (PolyGen GmbH) sowie Synthesereagenzien von Proligo® Reagents (Sigma Aldrich) verwendet. Als Bausteine wurden jeweils fertig geschützte Nukleotide von Sigma Aldrich verwendet, falls für die Sequenz benötigt, auch bereits modifiziert. Zur Anwendung kam hier das Phosphoramidit-Verfahren als Standardverfahren in der Nukleinsäuresynthese an der Festphase. Die Synthese gliedert sich in die Schritte Entschützung, Kopplung, Capping und Oxidation. Aufgrund der Empfindlichkeit von RNA-Nukleotiden wurden diese bestenfalls direkt vor der Synthese als Reagenzien für das Gerät vorbereitet. Dazu wurde eine für den jeweiligen Syntheselauf abgeschätzte Menge der Substanz in wasserfreiem Acetonitril zu 1,5 ml pro 100 mg Nukleotid gelöst und mit Molekularsieb (4Å) versetzt. Dabei wurde auch darauf geachtet, dass die gelösten Substanzen für die Synthese nicht länger als zwei Tage in Verwendung sind.

Als Festphase wurde CPG-Harz (Proligo® Reagents) verwendet, wobei je nach Produkt entweder Universal-CPG oder ein CPG-Harz mit bereits gekoppeltem Desoxythymidin verwendet wurde. Für die 3'-Cholesterin-gekoppelten AS-Stränge wurde eine eigens dafür vorgesehene Festphase verwendet, welche über einen speziellen Linker eine effiziente Kopplung mit Cholesterin erlaubt. Dabei handelte es sich um ein 3'-Cholesterol SynBase™ CPG 1000/110-Harz von Link Technologies Ltd. Die Produkte sollten jeweils von 3' nach 5' synthetisiert werden, was per Computer und der entsprechenden Software des Synthesizers realisiert wurde. Hierbei wurden die benötigten Sequenzen jeweils in 5' nach 3' in das dafür vorgesehene Bedienfeld eingegeben. Dabei wurde bei den Programmeinstellungen darauf geachtet, dass bei Herstellung der Phosphothioate das dafür nötige Syntheseprogramm gewählt wurde und das Gerät die entsprechende Oxidationslösung verwendet. Obwohl es sich bei den 3'-Überhängen um DNA-Bausteine handelt, wurde dennoch durchgehend mit den Einstellungen gearbeitet, die für die RNA-Synthese vonnöten sind. Als In-Prozesskontrolle wird vom Gerät die Trityl-Abspaltung UV-spektrophotometrisch überwacht und gibt einen Ausblick über die Güte der einzelnen Syntheseschritte wieder. Idealerweise sollte diese kontinuierlich über 80 % liegen um gute Ausbeuten zu erzielen. Alle Sequenzen

wurden jeweils ohne DMT-Rest am 5'-Ende synthetisiert. Da aufgrund der Verwendung von fertig modifizierten Bausteinen ein Gesamtset aus 9 unterschiedlichen Nukleotiden Anwendung fand, konnten nicht alle Sequenzen durch die beschränkte Kapazität des Synthesizers von maximal sechs Reagenzien in einem Lauf gefertigt werden. Dabei wurden Teilstücke jeweils bei Zwischenschritten mit bleibendem DMT synthetisiert, welches im nächsten Lauf wiederum zur Kopplung diente.

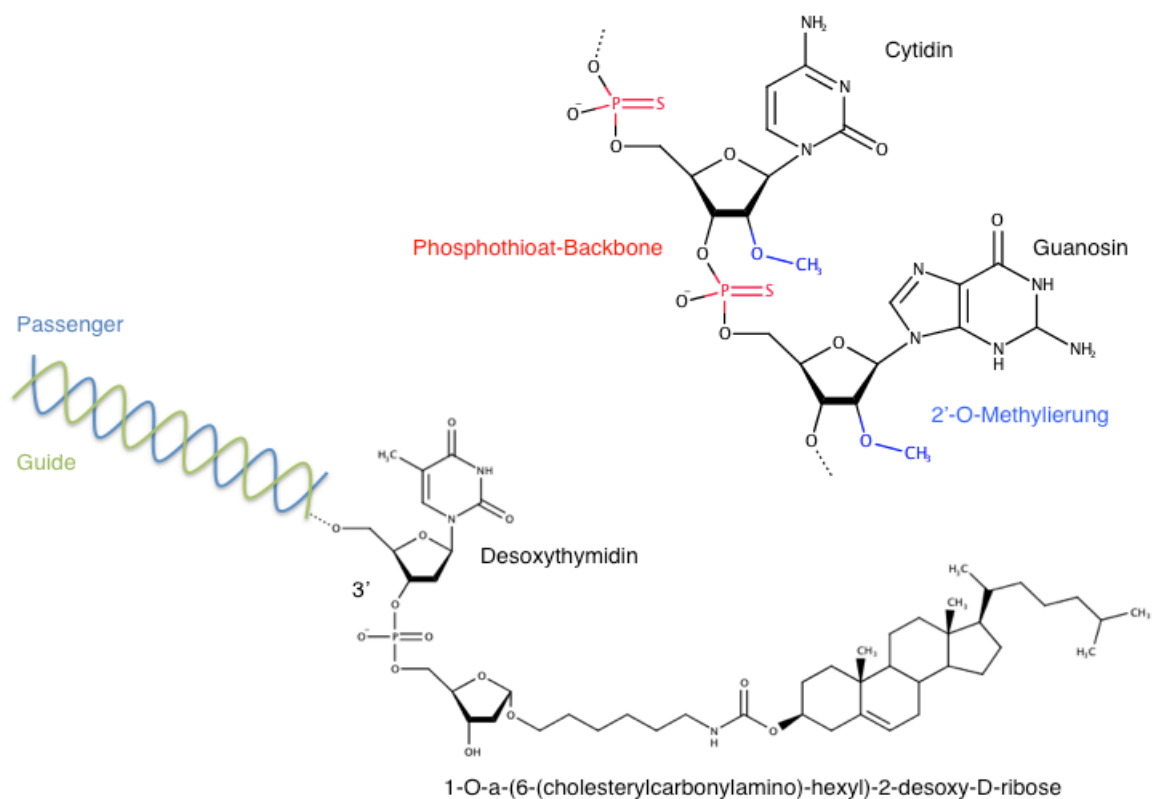


Abb. 3.1.2. zeigt die gewählten Modifikationsmuster der Antisense-Stränge. Rechts oben befindet sich ein Beispiel der Backbone- und Ribose-Modifikation. Der untere Teil zeigt die 3'-Cholesterin-Kopplung am Desoxythymidin des Überhangs. Über den entsprechenden Linker kann dieser Rest an die Phosphatgruppe am 3'-Ende angefügt werden.

3.1.3. Aufreinigung der DNA-RNA-Hybride

Die Harze wurden nach erfolgter Synthese mithilfe eines Metallstifts aus dem Slider entfernt und in Glasphiolen überführt. Falls nicht sofort mit der Aufreinigung fortgefahren wurde, wurden diese Phiolen im Kühlschrank gelagert. Zur Entschützung wurde jeweils 1 ml einer 1:1 Mischung aus Ammoniumhydroxid und Methylamin zu den Harzen hinzugefügt und die Phiolen verschlossen für 10 min bei 55 °C im Trockenschrank belassen. Im Anschluss wurden die Phiolen im Kühlschrank wiederum abgekühlt. Die Lösung der Produkte wurde mithilfe einer Kolbenhubpipette vom Harz abgetrennt und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Dabei wurde 2x mit je 100 µl RNase-freiem Wasser nachgewaschen und darauf geachtet, möglichst keine Harzkugeln zu verschleppen. Anschließend wurden die Lösungen unter Verwendung einer SpeedVac RVC 2-18 und dem Alpha 2-4 LDplus Lyophilisator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) bis zur Trockene eingedampft. Die erhaltenen Rückstände wurden des Weiteren in 50 µl DMSO gelöst und dazu kurz auf 65 °C zur Löslichkeitsverbesserung erhitzt.

Die 2'-OH Gruppen der Ribose mussten, falls unmodifiziert, durch Zugabe von 50 µl Triethanolamin-trihydrofluorid (TEA-3HF) geschützt werden. Dabei wurden die Lösungen für 2,5 h bei 65 °C am Thermomixer comfort (Eppendorf Austria GmbH) belassen. Nach kurzem Abkühlen bestand der nächste Schritt in der Ausfällung der Produkte, wozu zu den Lösungen je 2 µl 3M Natriumacetat und 1 ml Isopropanol hinzugefügt und zwischen jeder Zugabe die Lösungen durch Vortexen am Combi-Spin FVL 2400N (Biosan) gut durchmischt wurden. Die Eppendorf-Gefäße mit dieser Lösung wurden zum Ausfällen der Syntheseprodukte meist über Nacht bei -70 °C gelagert. Die entstandenen Niederschläge wurden bei 4 °C und 12500 U/min für 10 min abzentrifugiert in Gebrauch der Centrifuge 5810 R (Eppendorf).

Überstände wurden abgetrennt und in separaten Eppendorf-Gefäßen bei -70 °C aufbewahrt. Die Niederschläge wurden anschließend mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen, wieder abzentrifugiert und analog Überstände abgetrennt und aufbewahrt. Die Pellets wurden am Thermomixer bei 40 °C getrocknet und im Anschluss in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Bei Löslichkeitsproblemen wurden die Volumina erhöht. Des Weiteren wurden die Lösungen am NanoDrop ND1000 Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH) vermessen. Es sollten insgesamt 100 µM Lösungen der Oligonukleotide hergestellt werden. Dabei wurde

so vorgegangen, dass schrittweise das Probenvolumen durch Zugabe von RNase-freiem Wasser erhöht wurde, bis der gemessene Absorptionswert unter 100 lag und des Weiteren unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($\varepsilon = 212000$) das benötigte Volumen zur Herstellung der gewünschten Konzentration berechnet werden konnte. Die fertigen Produkte wurden bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2. Analytik der synthetisierten Oligonukleotide

3.2.1. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach erfolgter Aufreinigung der Oligonukleotide musste nachgewiesen werden, dass die Synthese zum einen erfolgreich verlief und zum anderen, eine ausreichende Entfernung von Salzen im Zuge der Aufarbeitung erreicht wurde. Zu diesem Zweck wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz PAGE angewendet. Zur Herstellung von 2 Gelen wurden 6,8 g Harnstoff (Serva), 7,5 ml einer 40 % Acrylamid-Stammlösung (Acrylamid:Bisacrylamid 29:1) sowie 1,5 ml 10x TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA, zusammengesetzt aus 890 mM Tris, 890 mM Borat, 2 mM EDTA, pH 8,3) gemischt. Zur Lösungsverbesserung des Harnstoffs wurde das Gemisch kurz in der Mikrowelle erwärmt. Nach Abkühlen wurden noch 7,5 µl TEMED und 75 µl 10 % APS-Lösung zum Starten der Polymerisation hinzugefügt und das Gemisch sofort in die vorher zusammengestellte Apparatur pipettiert. Im direkten Anschluss musste noch der Kamm zur Formung der Probenaschen eingesetzt werden. Zur Polymerisation wurde ein Zeitraum von mindestens 2 Stunden eingehalten. Die fertigen Gele wurden anschließend in die Laufkammer (Bio-Rad Laboratories) eingefügt, diese mit 1x TBE-Puffer befüllt und bei 150 V für etwa 30 min vorlaufen gelassen. Von den zu analysierenden Proben wurden je 0,5 nmol in Eppendorf-Gefäße überführt und mit jeweils 5 µl Formamid-Puffer gemischt. Diese wurden für 3 min auf 95 °C erhitzt und sodann kurz auf Eis gestellt. Die äußeren Taschen des Gels wurden jeweils mit 5 µl eines Standards mithilfe einer Kolbenhubpipette beladen. Die übrigen Taschen wurden mit je 10 µl der jeweiligen Probe bestückt. Im Anschluss wurden die Gele bei 150 V laufen gelassen, bis die Standards etwa 2/3 der Lauffläche erreicht hatten. Nach erfolgter Laufzeit wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten der Apparatur getrennt und mithilfe einer 0,02 % Methylenblau-Lösung unter Verwendung eines Rotamax 120 Rüttlers (Heidolph Instruments GmbH) für 20 min gefärbt. Durch wiederholtes Waschen mit Wasser und häufigem Wechsel der Waschflüssigkeit wurden die Gele größtenteils entfärbt und die einzelnen Banden deutlich sichtbar. Mithilfe des GS-710 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad Laboratories) wurde ein Scan angefertigt unter Verwendung der Software Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

3.3.2. Stabilitätstest

Mithilfe dieser elektrophoretischen Analyse sollte untersucht werden, inwieweit die unterschiedlichen Modifikationsmuster der einzelnen Antisense-Stränge die Stabilität der siRNAs gegen den enzymatischen Abbau durch Serumnukleasen beeinflussen. Hierzu wurden die vorbereiteten 10 μ M Duplexe herangezogen sowie eine unmodifizierte Kontroll-siRNA. Dabei wurden von jeder Probe je 5 Ansätze in Eppendorf-Gefäßen, repräsentativ für 5 Inkubationszeiten, mit 60 pmol Substanzmenge vorbereitet und diese mit je 10 μ l DMEM GlutaMAXTm Medium plus 10 % FBS (GibcoTm, Life TechnologiesTm, Thermo Fisher Scientific) gemischt. Die Proben wurden anschließend für 0 h, 1 h, 3 h, 24 h und 48 h lang bei 37 °C am Thermomixer bei 300 rpm inkubiert. Die 0h-Ansätze wurden sofort, die anderen nach der jeweiligen Inkubationszeit für 2 min auf 90 °C erhitzt. Nach Abkühlen und herunterzentrifugieren wurden die Proben anschließend mit je 2 μ l 6x DNA-Loading Dye vermengt und bis zur weiteren Analyse bei -70 °C gelagert. Zur Bewertung der Stabilität sollten die Proben auf ein 2,5 % Agarosegel aufgetragen werden. Zu dessen Herstellung wurden 4,5 g Agarose für Elektrophoresezwecke (Serva) in einem Erlenmeyerkolben mit 180 ml 1x TBE-Puffer vermengt und unter vorsichtigem Erhitzen in einem Mikrowellenherd eine homogene Lösung hergestellt. Nach kurzem Abkühlen wurden hierzu noch 18 μ l Ethidiumbromid mithilfe einer Kolbenhubpipette hinzugefügt und die Substanz durch Schwenken des Kolbens in der Flüssigkeit verteilt. Anschließend wurde diese Lösung vorsichtig in eine entsprechende Vorrichtung gegossen und der Probenkamm zur Herstellung der Probenaschen eingesetzt. Dieser wurde nach etwa 1 h Polymerisationszeit gleichmäßig aus dem Gel entfernt und das fertige Agarosegel mittels der vorgesehenen Halterung in die entsprechende Elektrophoreseapparatur (Bio-Rad Laboratories) eingebracht. Die Kammer wurde anschließend mit gekühltem 1x TBE-Puffer befüllt bis das Gel gleichmäßig von der Flüssigkeit umgeben war.

Pro Gel konnten die Ansätze von 5 verschiedenen Proben getestet werden. Die erste und die letzte Probenasche zwischen den Testsubstanzen wurden mithilfe einer Kolbenhubpipette mit 5 μ l des GeneRulerTm 100 bp DNA-Ladder der Firma Thermo Scientific als Standard ausgestattet. Dazwischen wurden analog je die gesamten Mengen der Ansätze in aufsteigender Reihenfolge der Inkubationszeiten in die Probenaschen pipettiert. Bei Erreichen der Hälfte der Laufstrecke wurde die

Elektrophorese beendet. Analysiert wurde dieses anschließend durch die Verwendung des ChemiDoc tm XRS (Bio-Rad Laboratories), um die Banden durch UV-Anregung sichtbar zu machen. Mithilfe der Gerätesoftware Quantity One wurde ein Scan des Gels angefertigt und mit selbigem Programm unter Verwendung eines free-hand tools die Bandenintensität der einzelnen Ansätze relativ zum Startzeitpunkt und zur Kontrollsubstanz untersucht.

3.3.3. Hochauflösende Massenspektrometrie

Um letztendlich signifikant die Qualität der jeweiligen Synthesen nachweisen zu können, etwaige Fehlsequenzen oder Veränderungen zu detektieren und den Erfolg der 3'-Cholesterin-Modifikation zu bestätigen, wurden sämtliche Antisense-Oligonukleotide per hochauflösender Massenspektrometrie vermessen. Damit eine ausreichende Entsalzung für die Messung vorlag, wurden die Produkte einer weiteren Aufreinigung unterzogen. Dazu wurden von den Syntheseprodukten jeweils etwa 6 nmol in Eppendorfgefäßen mit einer 7,5 M Ammoniumacetatlösung versetzt und diese nach der Zugabe von etwa 1 ml 96 % Ethanol über Nacht zum Ausfällen der Produkte bei -70° C gelagert. Die erhaltenen Niederschläge wurden bei 0° C und 14000 U/min für 30 min abzentrifugiert. Überstände konnten mithilfe von Kolbenhubpipetten entfernt und verworfen werden. Die Rückstände wurden mit 100 µl eiskaltem 75 % Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert und wiederum bei selbigen Einstellungen für 20 min zentrifugiert. Dabei wurde rasch vorgegangen um zu große Verluste der Produkte durch Resolubilisation zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Überstände wiederum verworfen und die Pellets bei 40° C am Thermozykler getrocknet. Diese konnten in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und am NanoDrop ND1000 Spektrophotometer vermessen werden. Anschließend wurden nach Berechnung der Konzentrationen 10 µM Lösungen der Oligonukleotide bereit, welche zusätzlich einen Gehalt 0,1 µM Ammoniumacetat aufwiesen. Die vorbereiteten Lösungen konnten zur Messung der Massen herangezogen werden. Die Analyse wurde mit dem Electrospray-Quadrupol-Time-of-Flight Massenspektrometer Bruker maXisTM HD durchgeführt. Die Proben wurden mithilfe einer 50 µl Hamilton-Spritze in den Injektor des Geräts eingebracht. Eine entsprechende Vorrichtung gewährte eine automatische Zugabe eines konstanten Probenvolumens in das Massenspektrometer. Erhaltene Spektren wurden mithilfe der Software Bruker Compass DataAnalysis ausgewertet.

3.4. Zellkulturversuche

3.4.1. Luciferase-Assay

Für die Testung der siRNAs wurden verschiedene Arten von Luciferasetests verwendet. Hierbei sollte jeweils untersucht werden, wie effektiv der jeweilige Knock-down der Luciferase, bei unterschiedlicher Art und Weise der Zellaufnahme, ausfallen wird.

3.4.1.1. Herstellung der siRNA-Duplexe

Von den synthetisierten Antisense-Strängen wurden jeweils 10 µM Stocklösungen durch Verdünnen mit RNase-freiem Wasser hergestellt. Ein Aliquot dieser Lösungen wurde sodann in Eppendorf-Gefäßen mit der äquivalenten Menge des entsprechenden 10 µM Sense-Strangs gemischt. Die Gemische wurden für 10 min am Thermomixer auf 80 °C erhitzt und im Anschluss zur Hybridisierung und Generierung von Duplexen auf Eis gestellt.

3.4.2. Versuch unter Verwendung von Lipofectamine

Um den Einfluss der Modifikationen auf den Gene-Silencing Effekt der siRNAs zu untersuchen, wurden die Substanzen zunächst unter Zuhilfenahme von Lipofectamine RNAiMAXTm (Life TechnologiesTm) als Transfektionsreagenz an einer HeLa-Zelllinie getestet. Als Positivkontrolle diente *GSK Luc siRNA* von GlaxoSmithKline Pharma GmbH, welche die theoretisch stärksten Effekte aufweisen sollte.

3.4.2.1. Vorbereitung der Testsubstanzen

Die ersten Versuche sollten unter Verwendung von Lipofectamine RNAiMAX erfolgen, dabei wurde eine Konzentration von 0,3 µl LF pro pmol siRNA gewählt. Alle Lösungen für den Zellversuch wurden um Kontaminationen zu vermeiden unter einer Biosafe 7-130-2 Werkbank (Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH) vorbereitet. Für jeden Versuch wurde zunächst die gewünschte Lipofectamine-Konzentration durch Mischen mit Opti-MEM Reduced Serum Media (GibcoTm) hergestellt. Ein weiterer Schritt bestand darin, die zuvor bereiteten Duplexe mit

Opti-MEM auf die benötigte Konzentration zu bringen. Im Anschluss wurden jeweils diese Lösungen mit einer äquivalenten Menge des vorbereiteten LF-Stocks vermengt und zur Bildung von Lipoplexen für mindestens 10 min bei Raumtemperatur belassen. Der Sinn der Herstellung von Verdünnungen der Duplexe bestand darin, im Anschluss beim Bestücken der Testplatten die korrekten Mengen an siRNA zu erreichen. Hier wurde angedacht, in Form von Triplikaten die Substanzen zu 5 pmol und zu 1 pmol zu testen. Zur Herstellung der Testlösungen für 1 pmol pro well wurden die 5 pmol Stocks jeweils 1:5 mit Opti-MEM verdünnt.

3.4.3. Versuch ohne Verwendung von Lipofectamine

Um eine unspezifische Zellaufnahme ohne Verwendung eines Transfektionsreagenz zu untersuchen, wurde eine entsprechende Versuchsanordnung durchgeführt.

3.4.3.1. Vorbereitung der Testsubstanzen

Für diese Versuche wurden nicht alle hergestellten siRNAs verwendet, sondern vorrangig jene, die eine Cholesterin-Modifikation aufwiesen unter gleichzeitiger Verwendung derselben Substanzen, die nicht mit diesem Rest ausgestattet waren. Hier wurden um mögliche Effekte zu finden jeweils 500 pmol und 100 pmol wieder in Form von Triplikaten getestet. Gleichzeitig wurden als Positivkontrollen die gleichen Substanzen unter Verwendung von Lipofectamine ebenfalls parallel verwendet. Zur Herstellung der Lösungen für diesen Versuch wurden Duplexe von den 100 µM Stocks analog hergestellt um ausreichend hohe Mengen an siRNA in den einzelnen wells schlussendlich erreichen zu können, ohne ein höheres Volumen aufwenden zu müssen. Analog wurde dafür Opti-MEM verwendet und die 500 pmol Lösungen 1:5 verdünnt zur Bereitung der 100 pmol.

3.4.4. Versuch unter Verwendung von DARPin-Konjugaten für die rezeptorvermittelte Zellaufnahme

Für diese Tests wurden zwei verschiedene Arten von DARPin-siRNA-Konjugaten verwendet, ein Maleimid-Konjugat und ein Disulfid-Konjugat, welche über verschiedene Linker mit dem Sense-Strang der entsprechenden siRNA verknüpft sind.

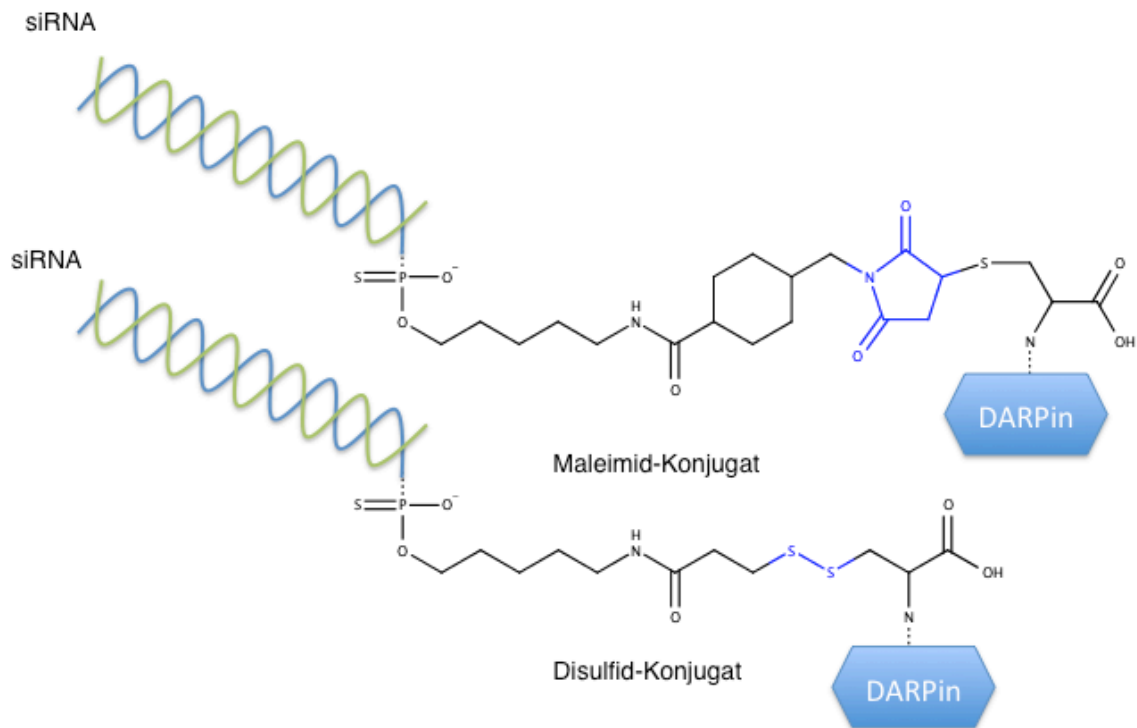


Abb. 3.4.4. zeigt den schematischen Aufbau der eingesetzten DARPin-Konjugate. Zwei unterschiedliche Linker verknüpfen das Bindungsprotein mit dem Sense-Strang. In blau ist jeweils der labile Teil hervorgehoben, welcher nach Zellaufnahme die siRNA vom Konstrukt abtrennen soll um RNAi zu ermöglichen.

3.4.4.1. Vorbereitung der Testsubstanzen

Für die Konjugatversuche wurden jeweils vor allem die Antisense-Stränge mit Cholesterin-Rest sowie die entsprechenden Verbindungen ohne diesen Rest verwendet. Als Kontrolle diente wiederum *Luc siRNA GSK*.

Hierbei wurden steril filtrierte Lösungen der Protein-Konjugate durch Mischen mit Opti-MEM auf die nötige Konzentration gebracht und anschließend mit einer auf gleiche Weise hergestellten, äquivalent konzentrierten Lösung der entsprechenden

Antisense-Stränge gemischt. Um die Proteine nicht zu beschädigen, wurden die Gemische zur Hybridisierung für 10 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend auf Eis gestellt. Von diesen Konjugaten, die dadurch mit einem siRNA-Duplex ausgestattet waren, wurden Aliquote entnommen und mit der notwendigen Menge an Lipofectamine-RNAiMAX gemischt und für 10 min zur Lipoplex-Bildung stehen gelassen. Dieser Schritt diente zur Bereitung von Positivproben, um ein Wirkungsversagen der Konjugate ausschließen zu können. Von den Konjugaten wurden je 100 pmol sowie 300 pmol getestet.

3.4.5. Zellvorbereitung und Aussaat

Für die Versuche wurden die Zelllinien HeLa PGK-EGFP^{Luc} sowie für die Testung der Konjugate MCF-7 PGK-EGFP^{Luc} verwendet, welche beide jeweils stabil mit dem Luciferase-Gen transfiziert waren. Für die überwiegende Zahl an Tests sollten jeweils 25000 Zellen pro well ausgesät werden, bei den Konjugaten wurden 30000 Zellen pro well verwendet. Dazu musste jeweils eine Zellsuspension hergestellt werden, die über die gewünschte Zellzahl pro Volumeneinheit verfügt um bei der Aussaat in jedem well die nötige Zahl an Zellen erreichen zu können. Zur Vorbereitung der Zellen wurden DPBS (Gibco[™]) zum Waschen und TrypLE[™] (Thermo Fisher Scientific) 1x für 3 min bei 37 °C zum Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen herangezogen. Die Zellen wurden jeweils unter der Verwendung von DMEM-GlutaMAX Medium von Gibco[™] resuspendiert und auch auf die benötigte Zellzahl eingestellt. Die überwiegende Zahl an Versuchen wurde dabei mit Medium durchgeführt, welches 10 % fetales Kälberserum von Gibco[™] enthielt. Ausgewählte Tests wurden hingegen mit Medium ohne FBS durchgeführt, wobei hier erst nach 2,5 Stunden nachträglich die benötigte Menge FBS in die einzelnen wells hinzugefügt wurde. Bevor die Zellen in die jeweiligen wells pipettiert wurden, wurden diese mit 10 µl bzw. 20 µl der Testsubstanzen versetzt. Wells für unbehandelte Zellen sollten auf gleiche Weise mit Opti-MEM ausgestattet werden. Die benötigte Menge der Zellsuspension wurde mithilfe einer Multikanalpipette von Eppendorf pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 100 µl pro well erreicht wurde. Für sämtliche Versuche wurden 96 well plates von Greiner Bio One International GmbH verwendet. Die Platten wurden jeweils für 48 h bei 37 °C im Celculture CO₂ Incubator (Esco Micro Pte Ltd.) aufbewahrt.

3.4.5.1. Versuchsanordnung

Je nach Assay wurden teils unterschiedliche Versuchsanordnungen gewählt. Jede Platte wurde so angeordnet, dass der äußere Ring der 96-well Platte keine Testsubstanzen enthalten soll, da hier durch eine mögliche stärkere Abnahme des Volumens eine Konzentrierung auftreten würde. In der Regel wurden die jeweiligen Substanzen aufgrund der größeren statistischen Signifikanz in Form von Triplikaten getestet. Bei Anwendung der siRNA-Konjugate musste aufgrund geringer Mengen auf die Verwendung von Duplikaten zurückgegriffen werden bei Einsatz von 300 pmol. Falls es der Platz der Platte erlaubte, wurden auch einzelne Reihen zwischen den Testsubstanzen mit Medium ohne Zellen bestückt, um mögliche gegenseitige Beeinflussung des Detektors durch die wells zu verringern.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		untreated	1 5 pmol	1 5 pmol	1 5 pmol	untreated	2 5 pmol	2 5 pmol	2 5 pmol	untreated	untreated	
C		untreated	3 5 pmol	3 5 pmol	3 5 pmol	untreated	4 5 pmol	4 5 pmol	4 5 pmol	untreated	untreated	
D		untreated	5 5 pmol	5 5 pmol	5 5 pmol	untreated	control 5 pmol	control 5 pmol	control 5 pmol	untreated	untreated	
E		untreated	1 1 pmol	1 1 pmol	1 1 pmol	untreated	2 1 pmol	2 1 pmol	2 1 pmol	untreated	untreated	
F		untreated	3 1 pmol	3 1 pmol	3 1 pmol	untreated	4 1 pmol	4 1 pmol	4 1 pmol	untreated	untreated	
G		untreated	5 1 pmol	5 1 pmol	5 1 pmol	untreated	control 1 pmol	control 1 pmol	control 1 pmol	untreated	untreated	
H												

Abb. 3.4.5. zeigt ein Beispiel einer Plattenanordnung des Tests. Der äußere Ring bleibt frei, zwischen den Triplikaten sind unbehandelte Zellen angeordnet. Die Nummern stehen für die jeweiligen Substanzen, wie sie im Synthesepan angeordnet sind.

3.4.6. Lysieren der Zellen

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Überstände aus den wells abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit je 100 µl DPBS(1x) gewaschen und wiederum mithilfe einer Mini-Vac Eco (Axon Lab AG) abgesaugt. Anschließend wurde im Fall der HeLa-Zellen 30 µl einer vorher hergestellten 1:5 Mischung eines 5x passiven Lysis Buffer von Promega mit Wasser in die wells pipettiert. Für die MCF-7-Zellen kamen je 20 µl zum Einsatz. Zur Lyse wurden die Platten für etwa 30 min am Rüttler bei 100 rpm belassen, dabei zwischendurch versucht, durch leichtes Klopfen die Zellen vom Boden abzulösen. Der Erfolg der Lyse wurde optisch am Nikon TMS Invertmikroskop (Nikon Inc.) überprüft.

3.4.7. Bradford-Assay

Zur Normalisierung der Messwerte, Kompensation etwaiger Verringerungen der Zellzahl durch toxische Effekte und um die Verringerungen der Lumineszenzwerte auf die eingesetzten Substanzen zurückführen zu können, kam ein Bradford-Assay zum Einsatz. Dabei wurde eine transparente 96 well Platte von Greiner verwendet. Auf der Platte wurden jeweils zwei Kalibrierreihen mit ansteigender Konzentration von BSA erstellt. Es wurden von einer BSA-Stammlösung jeweils 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 10 µl pro 20 µl Gesamtvolumen mit Wasser gemischt. Im Anschluss wurden in die übrigen wells, die für die Messung benötigt wurden, je 18 µl Wasser pipettiert. Von den jeweiligen wells der Platte für die Lumineszenzmessung wurden 2 µl des Lysats in die korrespondierenden wells für den Bradford-Assay pipettiert. Anschließend wurden in allen je 180 µl des Bradford-Reagens hinzugefügt und die Platte mit Deckel am Tecan Infinite M200 PRO multimode microplate reader (Tecan Trading AG) bei 595 nm vermessen. Die Messung wurde durch das entsprechende Programm der Software i-Control (Tecan Trading AG) ermöglicht, Messwerte als Microsoft Excel-file als Matrix aufgezeichnet.

3.4.8. Lumineszenzmessung

Für die Messung wurde wiederum der Tecan Scanner herangezogen. Dafür wurde der Injektor B des Geräts mit vorher aufgetautem LBL-Reagens geprimed und die Platte ohne Deckel in den Scanner eingebracht. Das entsprechende Programm in i-Control ermöglichte es, dass über den Injektor je 50 µl des Reagens in die ausgewählten wells eingebracht wurden und im Anschluss daran sofort die Lumineszenz gemessen werden konnte. Messwerte wurden wiederum über ein Excel-file aufgezeichnet.

3.4.9. Auswertung der Resultate

Sämtliche Ergebnisse wurden unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel ausgewertet. Dabei wurde im ersten Schritt von den Bradford-Daten eine Kalibriergerade erstellt, mit deren Hilfe die jeweiligen Proteinmengen der wells berechnet werden konnten. Damit konnten die einzelnen Werte in Bezug zum Durchschnittswert der unbehandelten Zellen gesetzt und ein ungefähre prozentueller Wert der Zellzahl ermittelt, sowie toxische Effekte erkannt werden. Die Lumineszenzwerte konnten in Bezug zu den Werten der unbehandelten Zellen berechnet werden und wurden sowohl als Durchschnittswert unnormalisiert, wie auch unter Berücksichtigung der Bradford-Daten graphisch in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Standardabweichungen der einzelnen Messwerte der Triplikate beziehungsweise Duplikate wurden ebenfalls berechnet. Deutliche Ausreißer wurden nicht in die Berechnung miteinbezogen.

Auf statistische Signifikanz wurde mittels student's t-test geprüft, und p-Werte < 0.05 als signifikant bewertet.

4. Resultate

4.1. Synthese der modifizierten Antisense-Stränge zur Herstellung der Luciferase siRNA-Duplexe

Die Synthese der insgesamt zwanzig verschiedenen Antisense-Stränge über den Polygen-Synthesizer verlief größtenteils ohne Probleme. Die vom Gerät gelieferten Trityl-Absorptionswerte der Abspaltlösung waren durchgehend in Bereichen größer gleich 80 %, was wünschenswert hohe Syntheseausbeuten versprach. Eine besondere Herausforderung lag in der möglichst praktischen und ökonomischen Auswahl der einzelnen Teilsequenzen, die in einem Lauf miteinander synthetisiert werden sollten. Da, wie bereits im Abschnitt Material und Methoden erwähnt, der Synthesizer über eine beschränkte Ladekapazität an Nukleinsäurebausteinen verfügt und deshalb oftmals ein Austausch dieser Lösungen nötig war, wurde darauf geachtet, dass pro Syntheselauf immer jeweils diejenigen Antisense-Stränge ausgewählt wurden, bei denen miteinander pro Lauf ein Maximum synthetisiert werden konnte, ohne die Lösungen oft austauschen zu müssen. Die Verwendung des 3'-Cholesterol SynBase[™] CPG 1000/110-Harzes zeigte keinerlei Unterschiede bei der In-Prozess-Kontrolle.

Die Produkte auf den jeweiligen Syntheseharzen wurden nach abgeschlossener Synthese wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben entschützt und aufgereinigt. Hierbei wurde insbesondere darauf geachtet, bei Zwischenlagerung die Produkte immer auf Eis zu stellen um keine Degradierung und ebenfalls keinen Verlust des 3'-Cholesterinrestes zu riskieren.

Die Konzentrationsbestimmung am NanoDrop ND1000 Spektrophotometer und die nachfolgende Berechnung zeigten, dass die einzelnen Syntheseausbeuten größtenteils sehr hoch waren. Einige Antisense-Stränge lieferten hohe Ausbeuten über 100 nmol, während andere nur etwa die Hälfte aufwiesen.

Nr.	Menge nmol	Nr.	Menge nmol	Nr.	Menge nmol	Nr.	Menge nmol
1.	49,6	6.	63,0	11.	82,9	16.	47,9
2.	152,3	7.	140,1	12.	49,1	17.	101,3
3.	130,8	8.	114,2	13.	116,0	18.	68,0
4.	127,0	9.	102,7	14.	69,5	19.	109,7
5.	22,4	10.	52,4	15.	171,7	20.	81,5

Tabelle 4.1. zeigt die Gesamtausbeute der erhaltenen Syntheseprodukte in nmol. Die eingesetzten Mengen des Startnukleotids bzw. des Cholesterin-modifizierten Harzes wurden nicht genau bestimmt, lagen aber im Bereich von 150-250 nmol.

Nach der Verdünnung und Konzentrationseinstellung auf 100 μ M wurden die Antisense-Stränge über die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf das Vorliegen von Unreinheiten und Fehlsequenzen hin untersucht.

4.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

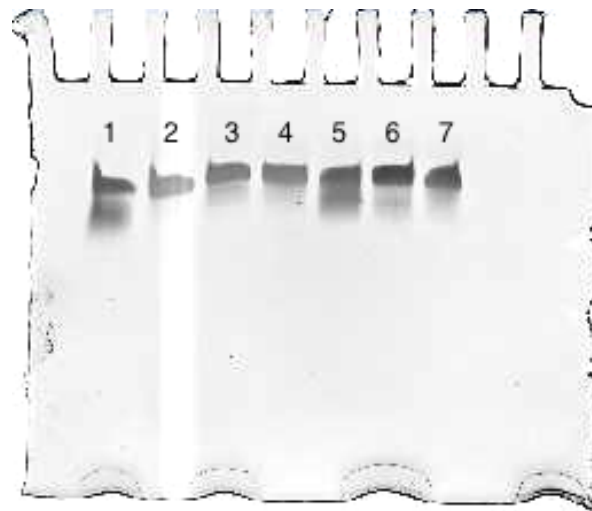


Abb. 4.2.1. zeigt ein Polyacrylamid-Gel der ersten sieben Antisense-Stränge, die Nummerierung entspricht der Tabelle 3.1. Die einzelnen Banden befinden sich auf einer einheitlichen Linie, da es sich jeweils um Produkte von 21 bp Länge handelt.

Die Bandenintensitäten variieren nur leicht, was entweder durch geringe Konzentrationsunterschiede oder Auftragefehler zustande gekommen sein konnte.

Weder deutliche Fehlsequenzen, noch Unreinheiten fallen auf.

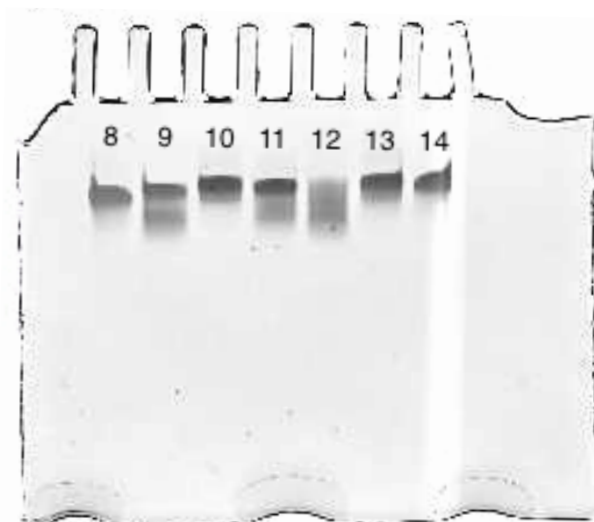


Abb. 4.2.2. zeigt das Gel von weiteren sieben Antisense-Strängen. Bei Nummer **13** (*2'-O-Me (Pyr) C*) und **14** (*2'-O-Me (Pur) C*) handelt es sich um 3'-Cholesterin-gekoppelte Stränge, weshalb diese auch aufgrund der höheren Masse eine geringere Migrationsstrecke aufweisen. Insgesamt scheinen auch hier keine

Fehlsequenzen oder markante Unreinheiten aufzuscheinen, lediglich AS **12** (*Phosphothioat C*) unterscheidet sich vom Rest, da hier keine scharfe Bande vorliegt.



Abb. 4.2.3. zeigt das Gel der nach dem ursprünglichen Set aus 14 Substanzen abgeänderten, neuen Antisense-Stränge. Die beiden nicht beschrifteten Banden rechts sind andere Nukleinsäuren, die am gleichen Gel mitliefen. Verglichen mit den beiden vorigen Versuchen, zeigen sich hier große Unterschiede in der Synthesequalität. Substanz **20** (*2'-O-Me (Pyr) C new*) ist durch die 3'-Cholesterin-Kopplung wieder etwas höher gelegen als der Rest, jedoch weist diese hier eine eindeutige zweite Bande auf. Auch bei den Strängen **16** (*ohne seed region new*), **17** (*terminal (AS gapmer) new*) und **18** (*alternierend new*) findet sich eine gut zu sehende zweite Bande, welche insbesondere auf Fehlsequenzen durch einzelne unvollständige Kopplungen hindeutet. Die Konzentrationen der verkürzten Produkte scheinen jedoch gemessen an ihrer Bandenintensität wesentlich geringer zu sein, als jene der vollständigen Antisense-Stränge, die auf erwarteter Höhe der Migrationsstrecke zu sehen sind.

4.3. Stabilitätstest

Mithilfe dieser Tests sollte ergründet werden, in welchem Ausmaß die unterschiedlichen Modifikationsmuster der einzelnen Antisense-Stränge zur Erhöhung der Stabilität der Duplexe beitragen, wobei ein Vergleich mit einer völlig unmodifizierten siRNA als Kontrolle herangezogen wurde. Die enzymatische Stabilität sollte durch die im Zellmedium mit 10 % FBS vorhandenen Serumnukleasen auf die Probe gestellt werden. Die Ansätze der unterschiedlichen Inkubationszeiträume wurden über ein 2,5 % Agarosegel aufgetrennt und durch optische Auswertung sowie Bandenintensitätsmessung wurde festgestellt, in welchem Ausmaß ein Abbau stattgefunden hat.

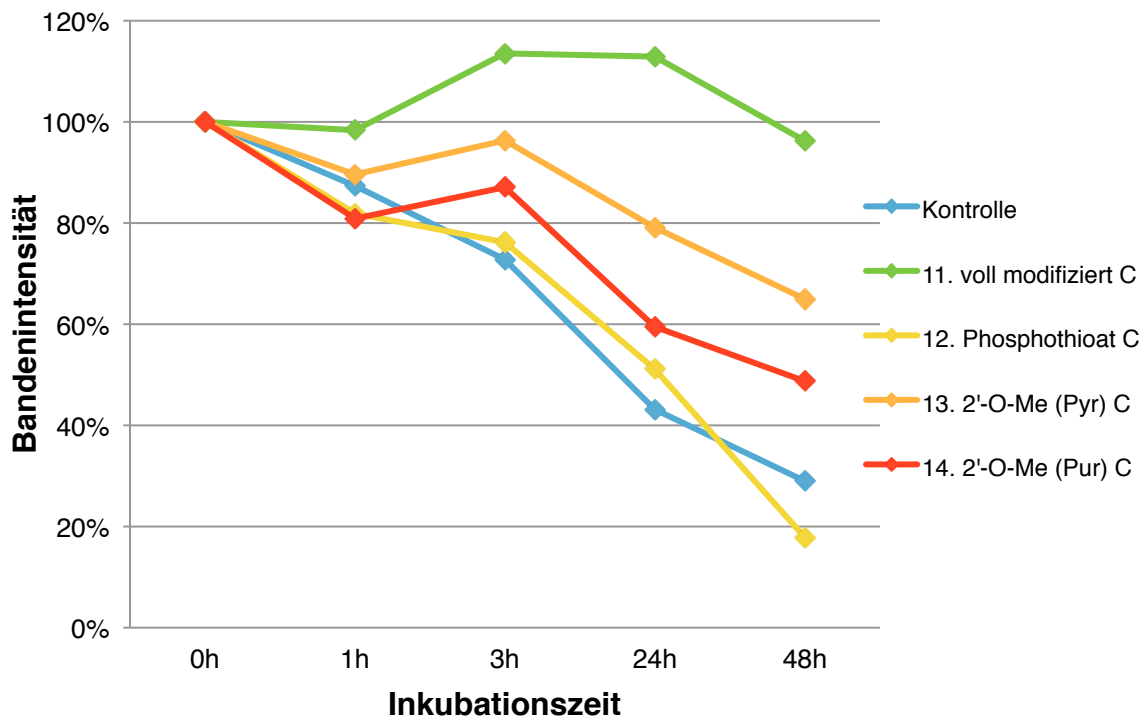
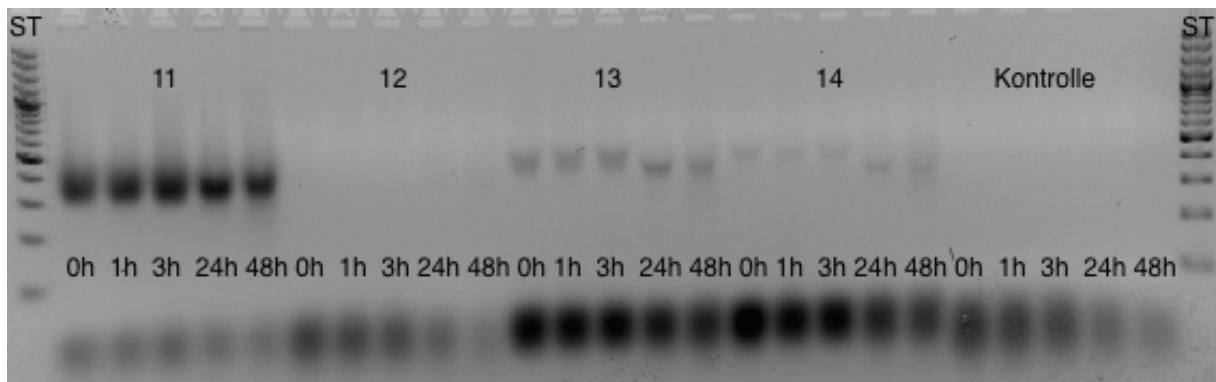


Abb. 4.3.1. zeigt den Scan eines Stabilitätstests von vier der hergestellten siRNA-Duplexe sowie einer unmodifizierten Kontroll-siRNA, die den theoretisch stärksten

Abbau erfahren soll. Bei **11-14** handelt es sich jeweils um Produkte, die über einen 3'-Cholesterin-Rest verfügen. Das Gel zeigt bei den Duplexen **11** (*voll mod. C*), **13** (*2'-O-Me (Pyr) C*) und **14** (*2'-O-Me (Pur) C*) jeweils zwei Reihen von Banden, welche durch eine wahrscheinliche Bindung an Proteine des FBS im Medium herrühren, da sonst keine Nukleinsäuren in solch hoher Masse vorhanden sind. Darunter ist ein Liniendiagramm der Bandenintensitätsmessung dargestellt. Es zeigt eindeutig, dass der voll 2'-O-Me modifizierte Antisense-Strang erwartungsgemäß über eine außerordentlich große Stabilität verfügt. Die 2'-O-methylierten Duplexe zeigen allesamt eine höhere Beständigkeit als die Kontrolle. Die Phosphothioat-Modifikation (**12**) scheint keinen erkennbaren Stabilitätsgewinn zu liefern.

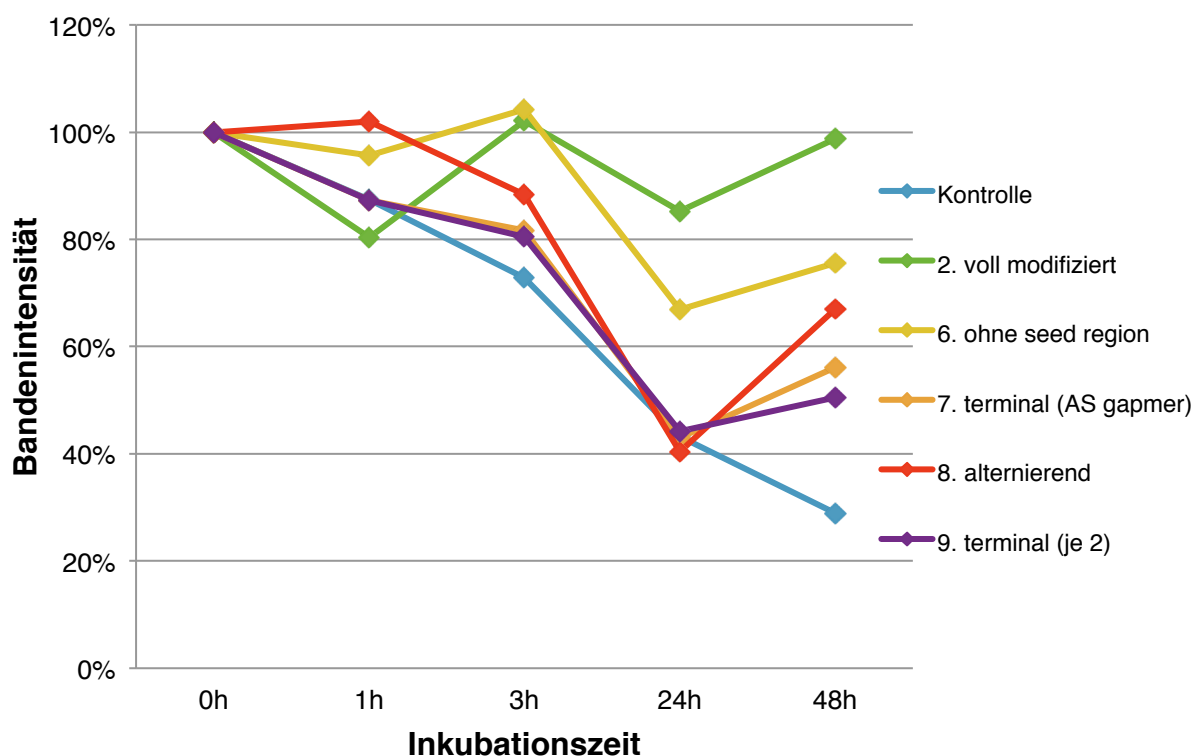
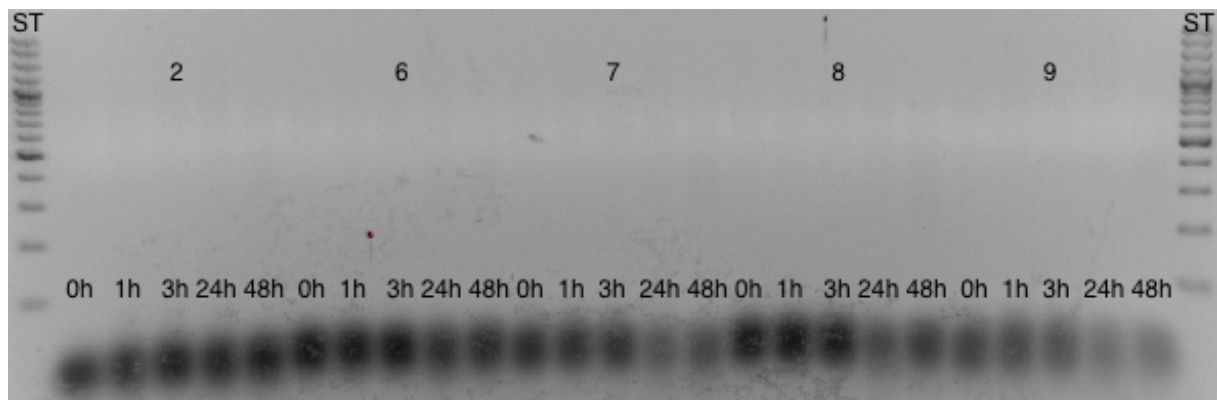


Abb. 4.3.2. zeigt einen Test von weiteren fünf Duplexen. Auf die Kontroll-siRNA wurde hier verzichtet, da deren Daten von einem vorigen Test herangezogen wurden. Optisch und rechnerisch am stabilsten sind die Substanzen **2** (*voll mod.*), **6** (*ohne seed region*) und **8** (*alternierend*). Die Werte sämtlicher 24 h Ansätze können

hier nicht eindeutig bewertet werden, da in diesem Fall einheitlich die tiefsten Werte zu sehen sind, was auf einen Durchführungsfehler hinweist - insbesondere bei Duplex **8** zu erkennen. Auch hier sind die modifizierten siRNAs erwartungsgemäß stabiler als die Kontroll-siRNA.

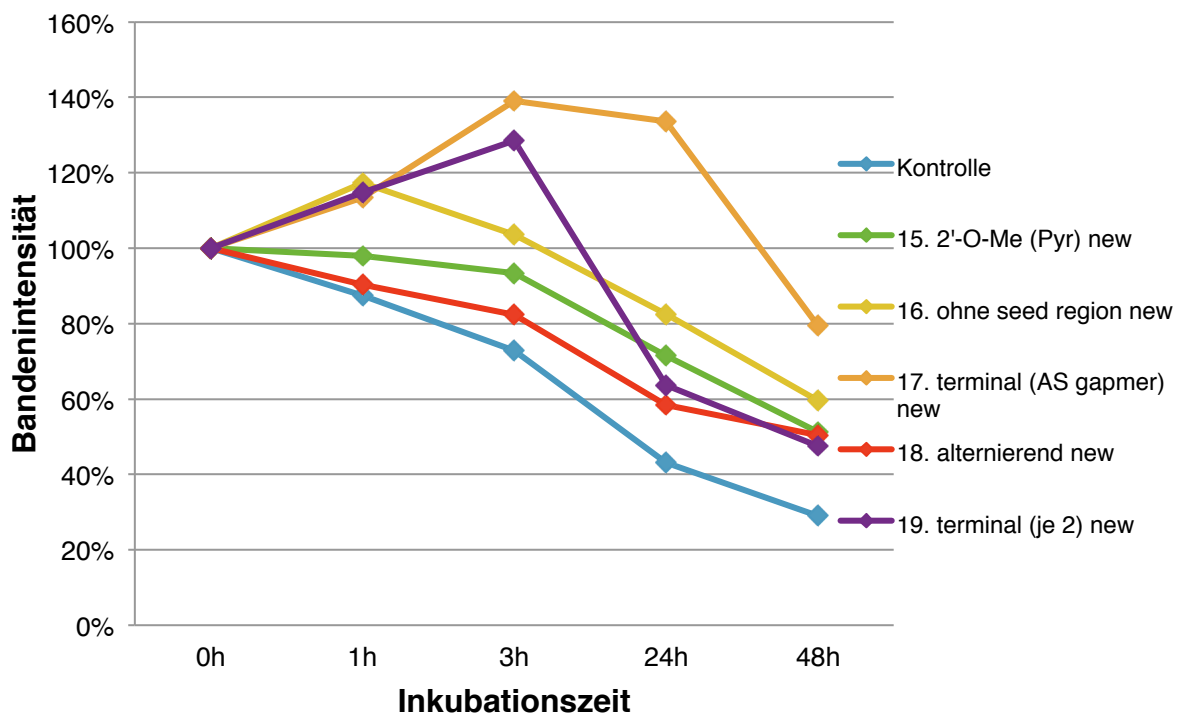
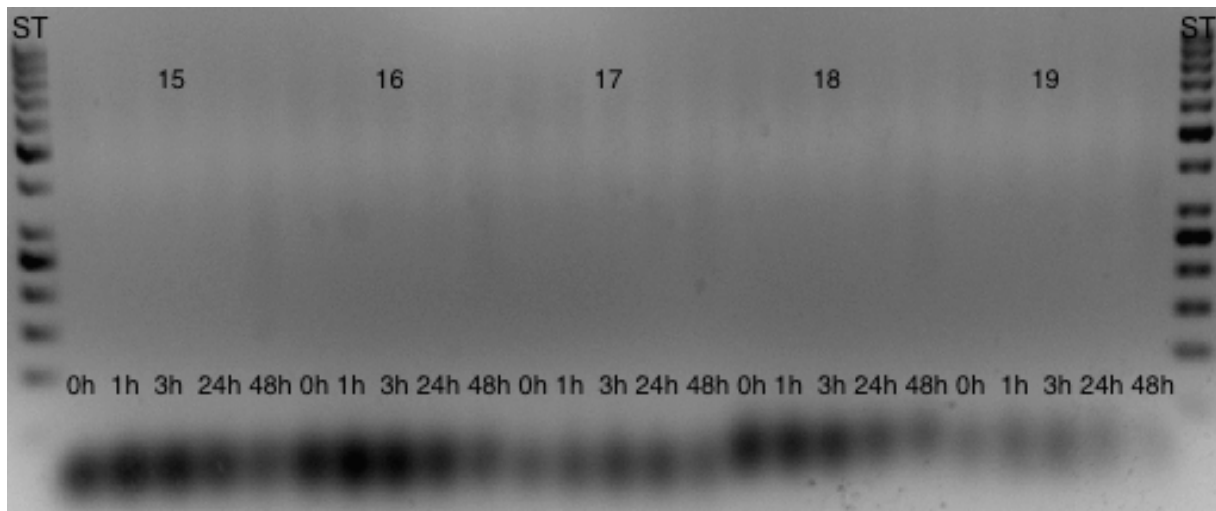


Abb. 4.3.3. zeigt den Test von weiteren fünf Duplexen. Insgesamt zeigt sich hier sowohl optisch am Gel, als auch im Diagramm bei den meisten Substanzen ein kontinuierlicher Abbau. Eine höhere Beständigkeit als bei der Kontrolle ist wiederum der Fall. Die geringere Intensität aller Banden von **17** (*terminal (AS gapmer) new*) und **19** (*terminal (je 2) new*) erschwert die Auswertung und vergrößert die Variabilität zwischen den unterschiedlichen Inkubationen. Es ist unklar, ob zu geringe Mengen eingesetzt wurden, oder die Modifikationsmuster einen Einfluss auf die Bandenintensitäten hatten.

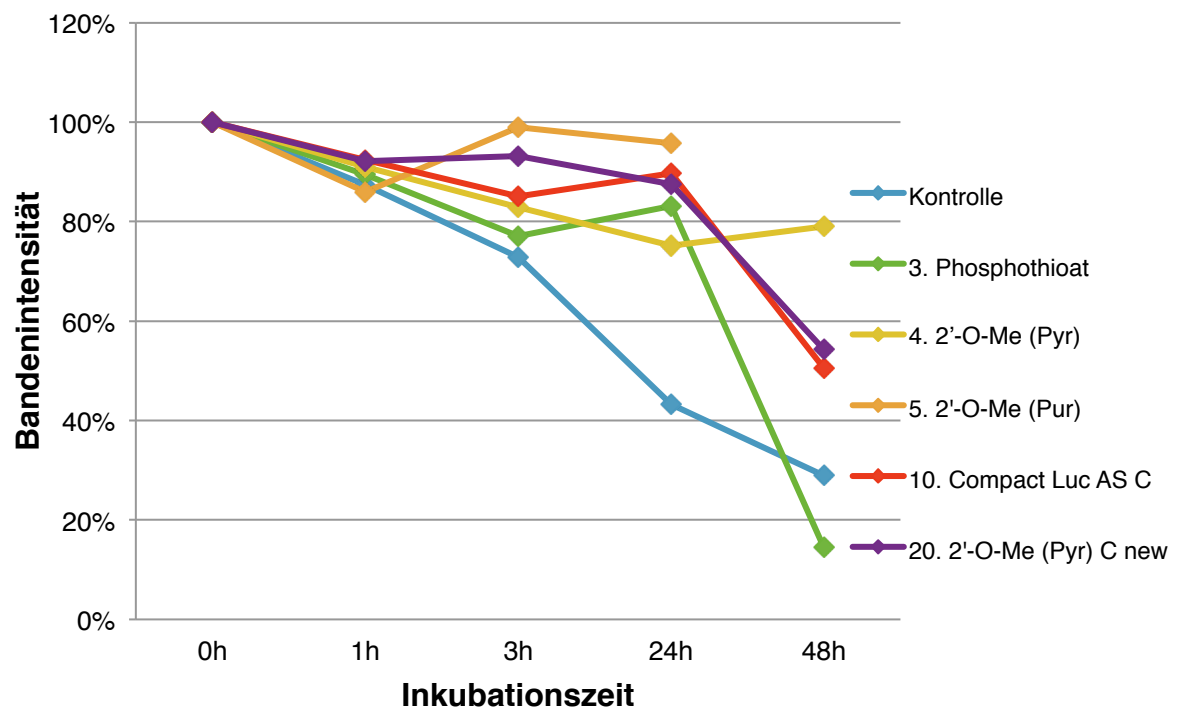
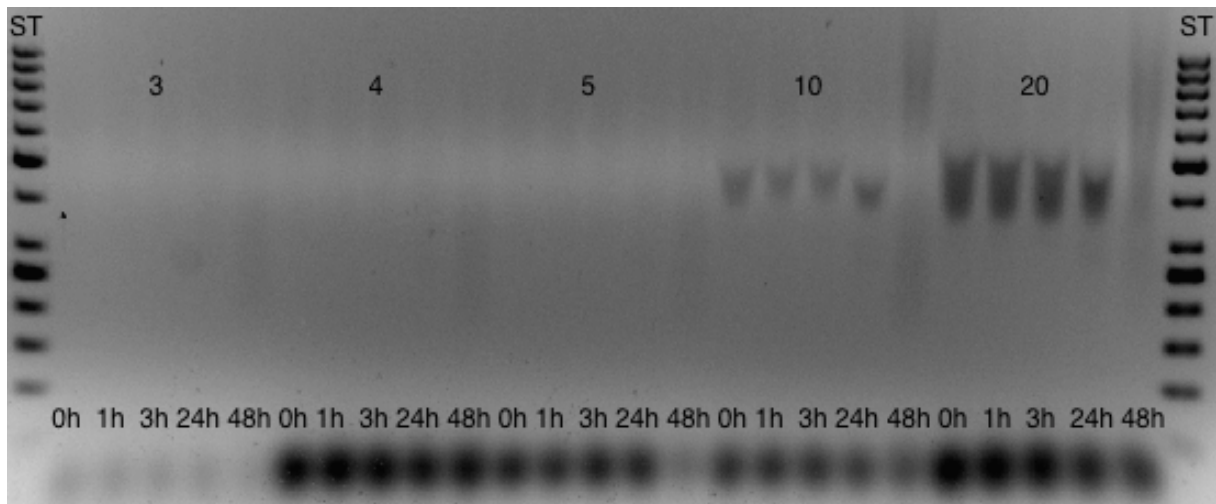


Abb. 4.3.4. zeigt den Test der letzten fünf Duplexe. Die modifizierten sind wieder deutlich beständiger als die Kontroll-siRNA, auch Duplex **10** (*Compact Luc AS C*) ist stabiler, obwohl lediglich im Unterschied zur Kontrolle ein 3'-Cholesterinrest angefügt wurde. Bei Substanz **5** (*2'-O-Me (Pur)*) konnte der 48 h-Zeitpunkt nicht ausgewertet werden. Bei Duplex **3** (*Phosphothioat*) liegt von vornherein schon eine relativ geringe Intensität der Färbung vor, was dazu führt, dass der 48 h-Zeitpunkt zu schwach für die Bandenintensitätsmessung ist, und dieser Wert somit an Genauigkeit einbüßt. Zu sehen sind wieder die höher gelegenen Banden der 3'-Cholesterin-gekoppelten siRNAs und bei beiden verwischte Banden bei 48 h.

4.4 Hochauflösende Massenspektrometrie

AS	exact mass	Messwert	Summenformel	Abweichung
1.	6705,93	6689,93	C ₂₀₂ H ₂₅₁ N ₇₉ O ₁₄₂ P ₂₀ S	-S+O
2.	7275,79	7275,80	C ₂₂₁ H ₂₈₉ N ₇₉ O ₁₂₃ P ₂₀ S ₂₀	
3.	7009,49	7009,51	C ₂₀₂ H ₂₅₁ N ₇₉ O ₁₂₃ P ₂₀ S ₂₀	
4.	6834,03	6832,06	C ₂₁₀ H ₂₆₇ N ₇₉ O ₁₄₁ P ₂₀ S ₂	-2 Da
5.	6876,08	7164,14	C ₂₁₃ H ₂₇₃ N ₇₉ O ₁₄₁ P ₂₀ S ₂	+DMT (5'-terminal) und -S+O
6.	6890,09	6513,06	C ₂₁₄ H ₂₇₅ N ₇₉ O ₁₄₁ P ₂₀ S ₂	-2'-O-Me-G (3'-terminal)
7.	7135,63	7135,64	C ₂₁₁ H ₂₆₉ N ₇₉ O ₁₂₃ P ₂₀ S ₂₀	
8.	6862,06	6846,07	C ₂₁₂ H ₂₇₁ N ₇₉ O ₁₄₁ P ₂₀ S ₂	-S+O
9.	7065,56	7065,57	C ₂₀₆ H ₂₅₉ N ₇₉ O ₁₂₃ P ₂₀ S ₂₀	
10.	7429,37	7109,32	C ₂₄₁ H ₃₁₇ N ₈₀ O ₁₅₁ P ₂₁ S	-320,05 Da
11.	8017,38	8001,21	C ₂₆₀ H ₃₇₃ N ₈₀ O ₁₃₂ P ₂₁ S ₂₀	-S+O
12.	7732,94	nA	C ₂₄₁ H ₃₁₇ N ₈₀ O ₁₃₂ P ₂₁ S ₂₀	nA
13.	7557,48	7541,47	C ₂₄₉ H ₃₃₃ N ₈₀ O ₁₅₀ P ₂₁ S ₂	-S+O
14.	7599,52	7583,53	C ₂₅₂ H ₃₃₉ N ₈₀ O ₁₅₀ P ₂₁ S ₂	-S+O
15.	6806,00	6469,99 / 6789,97	C ₂₀₈ H ₂₆₃ N ₇₉ O ₁₄₁ P ₂₀ S ₂	-U (5'-terminal) -12 Da / -S+O
16.	6820,01	6484,01 / 6803,98	C ₂₀₉ H ₂₆₅ N ₇₉ O ₁₄₁ P ₂₀ S ₂	-U (5'-terminal) -12 Da / -S+O
17.	7107,60	7107,60	C ₂₀₉ H ₂₆₅ N ₇₉ O ₁₂₃ P ₂₀ S ₂₀	
18.	6848,05	6551,02	C ₂₁₁ H ₂₆₉ N ₇₉ O ₁₄₁ P ₂₀ S ₂	- 297,03 Da
19.	7065,56	7065,56	C ₂₀₆ H ₂₅₉ N ₇₉ O ₁₂₃ P ₂₀ S ₂₀	
20.	7529,45	7193,41	C ₂₄₇ H ₃₂₉ N ₈₀ O ₁₅₀ P ₂₁ S ₂	-U (5'-terminal) -12 Da

Abb. 4.4.1. zeigt die auf Basis der Summenformel ermittelten, zu erwartenden Massen sowie die bei der Messung der Antisense-Oligonukleotide tatsächlich erhaltenen Werte. Die rechte Spalte wiederum zeigt die wahrscheinlichen Gründe für Abweichungen, mit denen die Messwerte auf die erwarteten Massen korrigiert werden können.

Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse zeigt insgesamt sehr gute Übereinstimmung mit den Massen, die auf Basis der jeweiligen Summenformel erhalten werden müssten, was für den Syntheserfolg spricht. Bei AS 12 (*Phosphothioat C*) konnte aufgrund eines äußerst schlechten Massenspektrums kein signifikanter Substanzpeak ausgemacht werden. Für Substanz 18 (*alternierend new*) konnte die mögliche Ursache der Abweichung nicht sicher rekonstruiert werden, womöglich aufgrund einer komplexeren Kombination aus Substanzfehlern. AS 6 (*ohne seed region*) weist ein 2'-O-Me-Guanosin 3'-terminal weniger auf,

welches der erste Baustein nach dem 3'-dT-Überhang sein sollte. Grund ist ein Fehler im Syntheseprogramm, wodurch fälschlicherweise angenommen wurde, dass diese Base der Sequenz bereits am Harz gekoppelt vorliegt und als Folge dessen mit übernächsten Baustein weitersynthetisiert wurde. Die Abweichung von Substanz **5** (*2'-O-Me (Pur)*) deutet auf eine unzureichende Abspaltung von DMT vom 5'-Ende hin, wodurch das Produkt eine höhere Masse aufweist als erwartet. AS **10** (*Compact Luc AS C*) könnte aufgrund der Massendifferenz ein Desoxythymidin 3'-terminal weniger aufweisen. Die Produkte **15**, **16**, **18** und **20** weisen Fehlsequenzen auf, wobei bis auf **18** (*alternierend new*) das Fehlen des endständigen Uridins als Ursache angenommen werden kann. Die Analyse ermittelte bei vielen Antisense-Strängen exakt die erwarteten Massen. Die Messung einiger Oligonukleotide lieferte überdies Ergebnisse, welche für Veränderungen im Backbone sprechen, da offensichtlich nicht die korrekte Zahl an Phosphothioat-Modifikationen erreicht wurde, wie im folgenden beschrieben wird. Alle 3'-Cholesterin-modifizierten Sequenzen zeigten die inklusive Cholesterin erwarteten Massen, wodurch die Stabilität der 3'-Cholesterinbindung unter den Bedingungen der Abspaltung vom Harz und der Oligonukleotidisolierung und -lagerung bewiesen werden konnte.

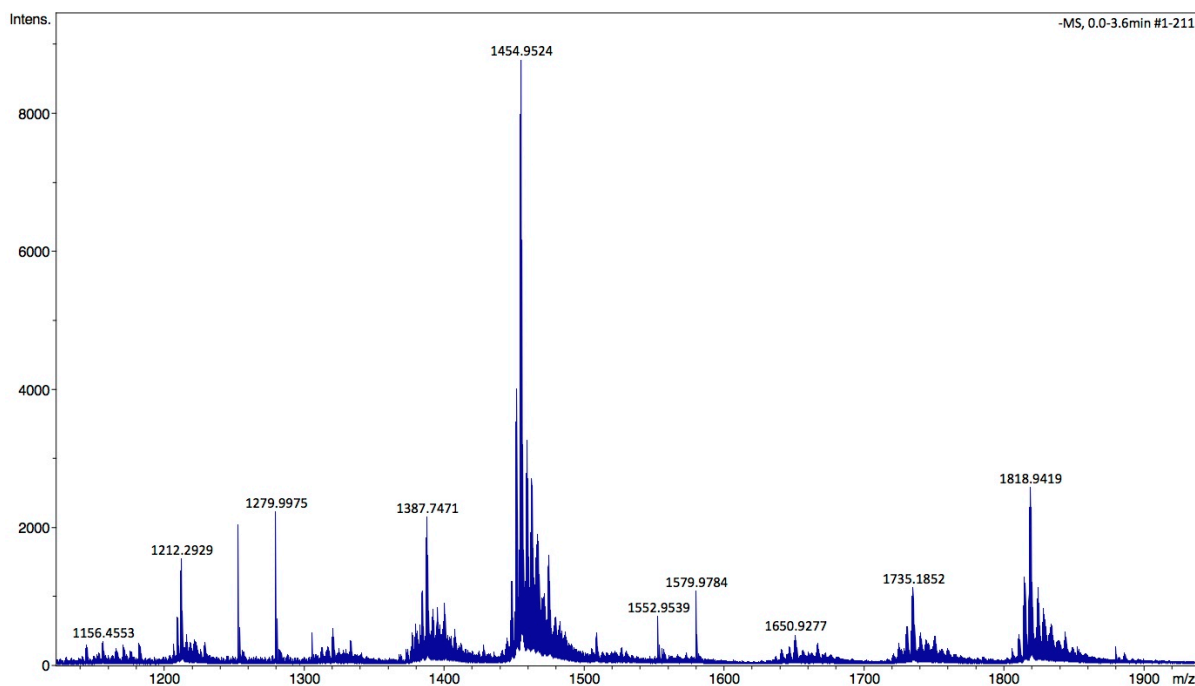


Abb. 4.4.2. zeigt ein Beispiel der erhaltenen Massenspektren, in diesem Fall das Ergebnis von AS **2** (*voll modifiziert*). Deutlich zu sehen ist der fünffach geladene,

große Substanzpeak in der Mitte des Spektrums, welcher aufgrund seiner Ladung bei einem Fünftel der tatsächlichen Masse aufscheint. Das Spektrum zeigt überdies eine ausreichende Entsalzung der Produkte, welche durch die zusätzliche Aufreinigung erreicht wurde. Es scheinen keine markanten Fehlsequenzen des Produkts vorhanden zu sein.

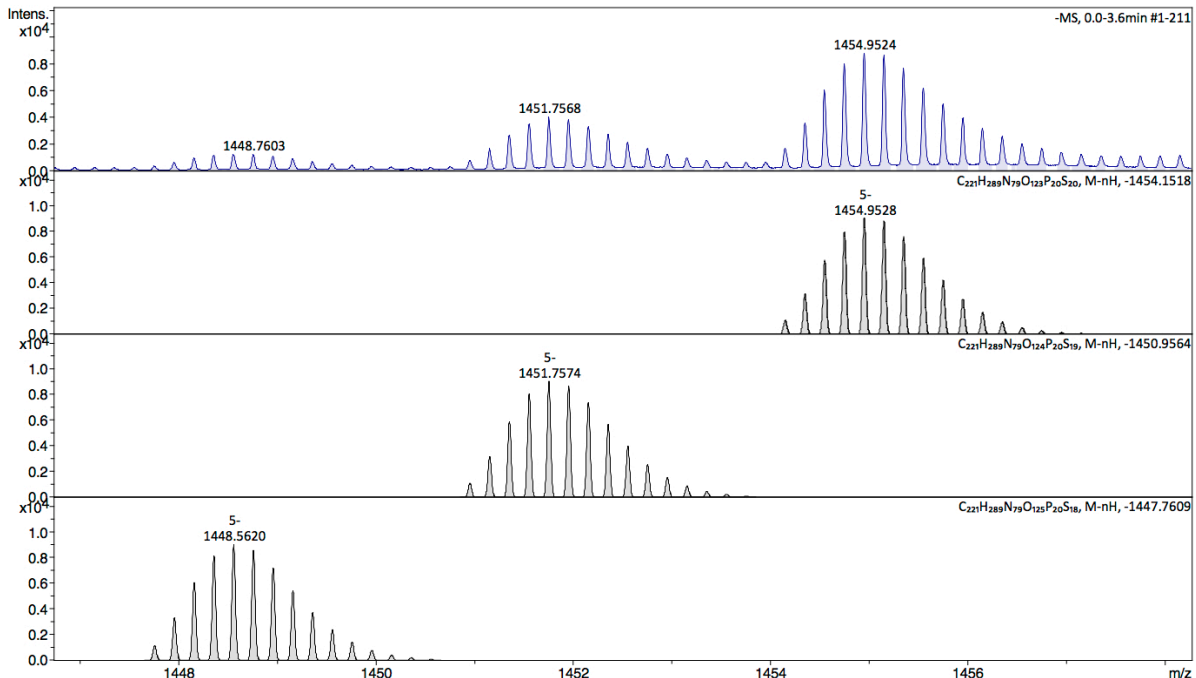


Abb. 4.4.3. zeigt den zum Spektrum Abb. 4.4.2. zugehörigen Versuch die Abweichung der Masse zu rekonstruieren. Dabei wurde auf Basis der Summenformel das zugehörige Spektrum simuliert und mit dem Messergebnis (oberste Spalte) verglichen. Ein typische Muster, welches durch teilweisen Austausch von Schwefel gegen Sauerstoff im Phosphothioat-Backbone zustande kommt, ist zu erkennen. Ein einfacher Austausch wird in Spalte 3 gezeigt, zweifacher in Spalte 4.

Einige Massenspektren weisen ein wiederkehrendes Muster nahe des Substanzpeaks auf, was auf teilweise Austausch der Phosphothioat-Schwefel gegen Sauerstoff zu erklären ist, was in Abb. 4.4.3. dargestellt ist. Dieser Umstand kann in einer nicht vollständigen Oxidation im besagten Schritt der Synthese zugrunde liegen. In dieser Hinsicht auffällige Spektren betreffen die Substanzen **2**, **3**, **5**, **7**, **9**, **10**, **13**, **17** und **19**. Es betrifft hier vorwiegend Sequenzen mit vollständigem PS-Rückgrat, aber auch einzelne, bei denen nur eine oder zwei Phosphatbindungen verändert sein sollten.

4.5. Luciferase-Assay

Über diesen Test sollten die hergestellten Duplexe auf ihre Wirksamkeit im Knock-down der Luciferase untersucht werden. Dabei galt es zu ermitteln, welche Modifikationsmuster den geringsten Wirksamkeitsverlust aufweisen. Die Substanzen sollten hierbei, aufgrund des Knock-downs der Luciferase, das Ausmaß der Lumineszenz bei Zugabe des Substrats Luciferin entsprechend reduzieren. Durch die Verwendung der Kontroll-siRNA wird ein Vergleich der unterschiedlichen Modifikationsmuster, beziehungsweise deren Potenz abzuschätzen ermöglicht. Dabei wurden hauptsächlich stabil transfizierte HeLa PGK EGFPLuc Zellen verwendet, mit Ausnahme der Konjugatversuche, da hier EpCAM-positive Zellen benötigt wurden, wobei man auf stabil transfizierte MCF-7 PGK EGFPLuc Zellen zurückgriff. Jene Antisense-Stränge, welche trotz ihrer Modifikationen die besten Werte lieferten, sollten nach Initialtestung für die rezeptorvermittelte Aufnahme herangezogen werden. Als Positivkontrolle wurde jeweils eine am Antisense-Strang unmodifizierte (abgesehen von einer Phosphothioatbindung) siRNA verwendet, welche von GSK (GlaxoSmithKline) bezogen wurde. Alle Ergebnisse wurden als prozentuelle Lumineszenz, bezogen auf unbehandelte Zellen, angegeben und unter Verwendung eines Bradford-Tests normalisiert, um mögliche Abweichungen der Zellzahl durch toxische Effekte oder andere Ursachen auszugleichen und den Ergebnissen eine höhere Relevanz zu verleihen. Ein zu großer Abfall der Zellzahl würde falsch positive Ergebnisse liefern, da hierbei geringere Lumineszenzwerte resultieren würden.

4.5.1. Versuch unter Verwendung von Lipofectamine

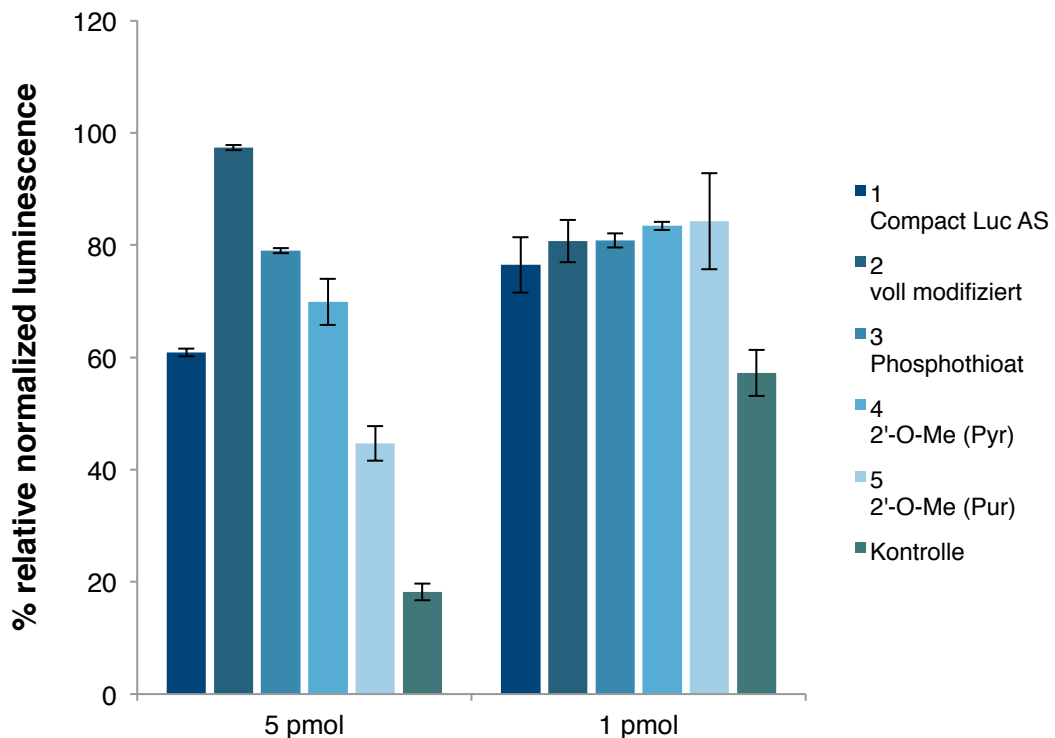


Abb. 4.5.1. zeigt das mithilfe des Bradford-Tests normalisierte Ergebnis des Luciferase-Tests der ersten fünf siRNA-Duplexe, sowie der Positivkontrolle. Der Versuch wurde jeweils in zwei Konzentrationen durchgeführt, das Ergebnis spiegelt die prozentuelle Lumineszenz bezogen auf die der unbehandelten Zellen wieder.

Durch die Normalisierung konnte auf Abweichungen der Zellzahl Rücksicht genommen werden um damit einen Knock-down signifikanter nachweisen zu können. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=3).

Dieser Assay zeigt, dass ein vollständiges Modifizieren des Antisense-Strangs mit Phosphothioaten und 2'-O-Me Nukleotiden einen vollständigen Wirkungsverlust zur Folge hat, zu sehen bei Substanz **2**. Aus nicht bekannten Gründen liefert AS **1** trotz fehlender Modifikationen nur mittelmäßige Effekte.

Die Bradford-Normalisierung hat teils sehr starke Auswirkungen auf das Gesamtergebnis, auf den ersten Blick sehr potent scheinende siRNAs büßen durch die Anpassung auf die Zellzahl stark an Effektivität ein, wie es hier beispielsweise bei Substanz **3** (*Phosphothioat*) der Fall war (nicht-normalisierte Daten nicht gezeigt). Hierbei zeigt sich auch kaum ein Unterschied zwischen beiden Konzentrationen. Bei 5 pmol ist von den modifizierten Duplexen eindeutig siRNA **5** (*2'-O-Me (Pur)*) am wirksamsten. Der Einsatz von 1 pmol weist kaum Unterschiede

zwischen den einzelnen siRNAs und insgesamt schwache Knock-downs auf, wobei die Standardabweichungen beachtet werden müssen.

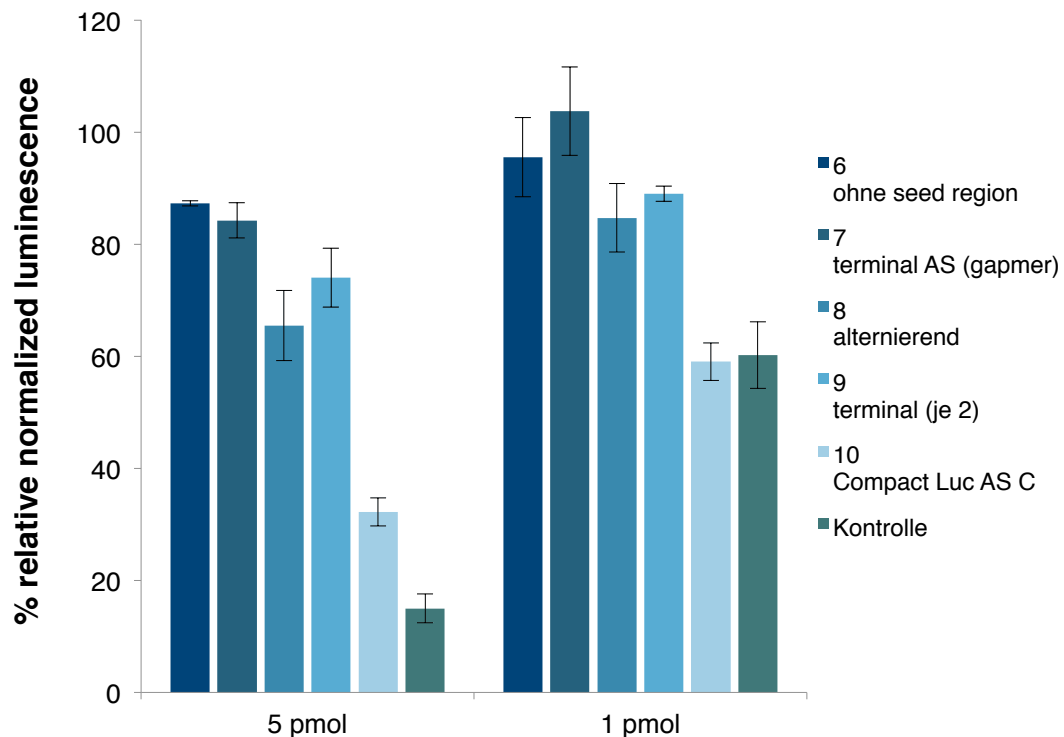


Abb. 4.5.2. zeigt das mit Bradford-Test normalisierte Ergebnis eines weiteren Zellversuchs. In diesem Lumineszenztest wurde erstmals eine Cholesterin-gekoppelte siRNA (**10**) getestet. Wiederum wurden die gleichen Konzentrationen wie vorher herangezogen und eine Kontroll-siRNA als Vergleich verwendet. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=3).

Dieses Testergebnis zeigte wiederum starke Einflüsse der Bradford-Normalisierung, was für die toxischen Effekte im Einsatz mit höheren Konzentrationen von Lipofectamine spricht. Der Großteil der 2'-O-Me modifizierten Stränge scheint in diesem Versuch eher schwache Knock-downs zu liefern, lediglich die alternierend 2'-O-modifizierte siRNA **8** schafft passable Effekte.

Die am 3'-Ende mit Cholesterin-gekoppelte siRNA **10** zeigte verglichen mit der Kontrolle sehr vielversprechende Ergebnisse. Deren Knock-down ist bei 1 pmol vergleichbar mit der Kontrolle, bei 5 pmol etwas schwächer als die Kontroll-siRNA. Das Gesamtmuster zwischen den beiden Konzentrationen ist prinzipiell mit Abweichungen gleich geblieben. Effekte der meisten Substanzen werden in fünffacher Konzentration nur unwesentlich verbessert. Das ist durch eine relativ

geringe Wirksamkeit zu erklären, bei der ein wesentlicher Knockdown erst bei höheren Konzentrationen auftritt.

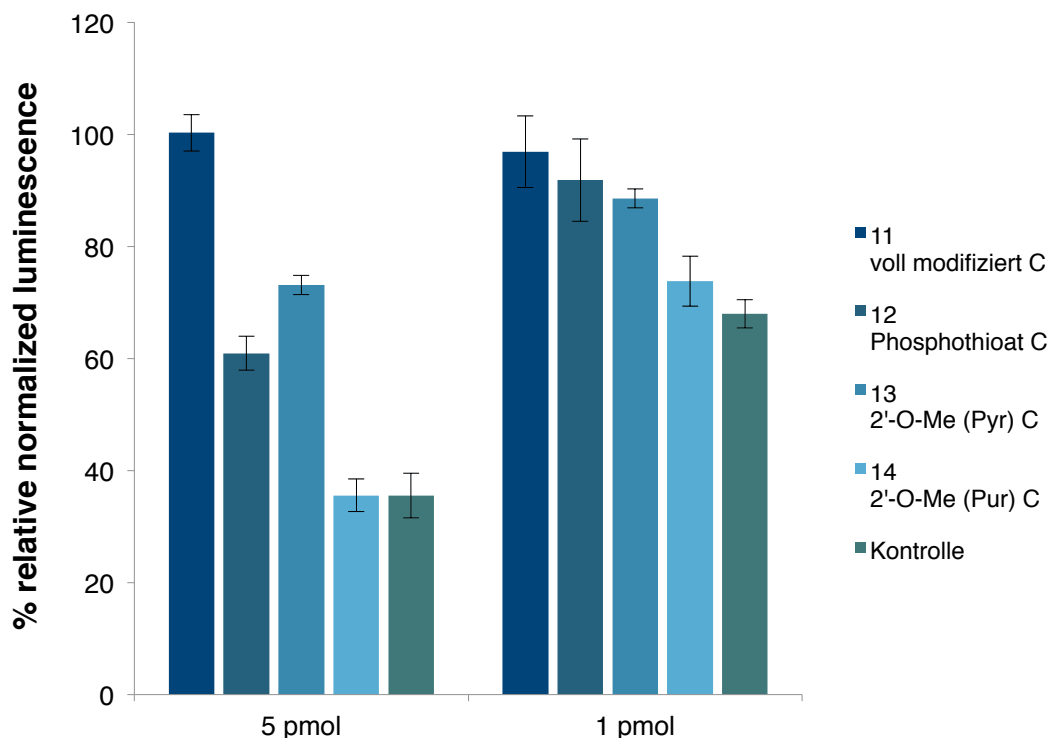


Abb. 4.5.3. zeigt das mit Bradford-Test normalisierte Ergebnis des Luciferase-Assays der letzten vier siRNAs des ursprünglichen Sets von Antisense-Modifikationen, wiederum in den analogen Konzentrationen. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=3).

Dieser Assay beinhaltet mit Ausnahme der Kontrolle ausschließlich Substanzen mit 3'-Cholesterin-Modifikation. Der Versuch zeigt wiederum, dass auch mit Cholesterin-Kopplung ein vollständig 2'-O-modifizierter Antisense-Strang keine Wirkung mehr hat, was auch der Erwartung entspricht. Das Phosphothioat scheint durch die zusätzliche Modifikation etwas besser zu sein als im vorigen Test ohne die Kopplung, Duplex **13** (2'-O-Me (Pyr) C) zeigt wie auch Duplex **4** (2'-O-Me (Pyr)) vorher eher bescheidene Effekte. Der Unterschied liegt in der 3'-Cholesterin-Kopplung bei **13**, in Bezug auf die restlichen Modifikationen sind beide siRNAs ident. Herausstechend ist der sehr starke Knock-down der Substanz **14** (2'-O-Me (Pur) C), welche in etwa gleich große Effekte wie die Kontrolle aufweist. Bei Einsatz von 1 pmol bleibt das Muster gleich, wobei Substanz **12** (Phosphothioat C), ein

Gesamt-Phosphothioat mit 3'-Cholesterin-Modifikation, im Versuch sehr schwache Effekte zeigt, jedoch bei verhältnismäßig großer Standardabweichung.

In weiterer Folge wurde von den siRNAs, die in vorigen Assays schlechte Effekte zeigten, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, ein abgewandeltes Modifikationsmuster erstellt, und die Substanzen ebenfalls getestet. Vor allem wurde angedacht, die 2'-OH-Gruppen der beiden Nucleotide am 5'-Ende unmodifiziert zu lassen, da dieser Umstand einen Unterschied zu den effektiveren Substanzen darstellte. Aufgrund der teils sehr starken toxischen Effekte durch Lipofectamine bei Einsatz von 5 pmol wurden für die folgenden Versuche stattdessen 3 pmol verwendet.

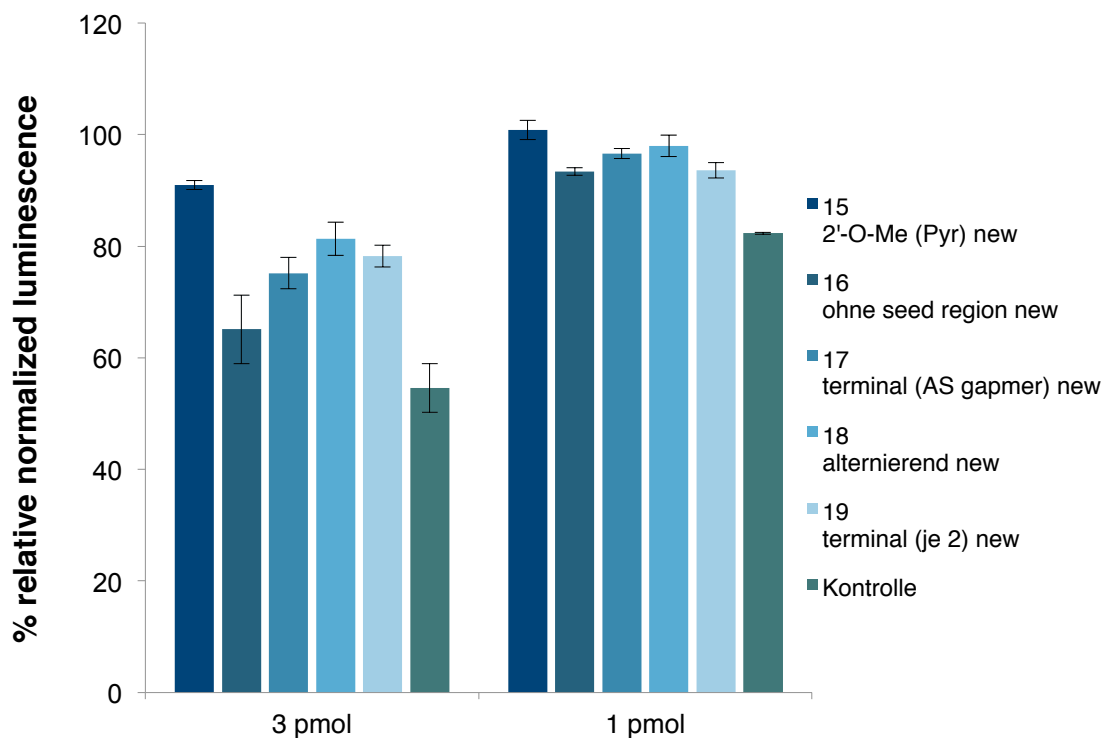


Abb. 4.5.4. zeigt das mit Bradford normalisierte Ergebnis des Lumineszenz-Tests von fünf abgewandelten siRNAs, in den Konzentrationen 3 pmol und 1 pmol inklusive der Kontrolle. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=3).

Die Verwendung von 3 pmol resultiert in einen geringeren Einfluss der Bradford-Normalisierung, da toxische Effekte seitens Lipofectamine geringer ausfallen, dabei bleibt das Muster vorher und nachher größtenteils gleich. Erwartungsgemäß sind bei Verwendung dieser Mengen die Gesamteffekte etwas geringer als bei 5 pmol. Gut erkennbar ist, dass Substanz **15** (*2'-O-Me (Pyr) new*) kaum Wirksamkeit zeigte,

während Duplex **16** (*ohne seed region new*) vergleichsweise sehr gute Effekte im Gene-Silencing erzielte, jedoch in Beachtung einer großer Standardabweichung. Obwohl in diesem Assay eine andere Menge verwendet wurde, kann durch den Vergleich zu den Effekten der Kontroll-siRNA ermittelt werden, inwieweit der Verzicht auf zwei 2'-O-Me-modifizierte Nukleotide am 5'-Ende der AS-Stränge deren Effektivität verbessern konnte: bei Duplex **15** ist trotz der insgesamt schwachen Effekte der Unterschied zur Kontrolle signifikant geringer als es bei der Vorgänger-Substanz **4** der Fall ist. Beide besitzen 2'-O-Methylgruppen jeweils nur an den Pyrimidin-Nukleotiden, mit entsprechender Abwandlung bei **15**. Substanz **16** zeigt diesbezüglich einen massiven Effektgewinn gegenüber **6**. Hier soll jeweils die *seed region* der Antisense-Stränge ohne Methylierungen vorliegen. Das gleiche gilt für die restlichen Substanzen, welche durch die Veränderung ebenfalls besser abschnitten. Die Unterschiede zur Kontrolle sind zwar markant, jedoch muss angemerkt werden, dass diese Ergebnisse durch die Verwendung einer alternativen Konzentration nicht ohne Vorbehalt zu betrachten sind.

4.5.2. Versuch ohne Verwendung von Lipofectamine

Diese Tests sollten dazu dienen, herauszufinden, ob insbesondere die 3'-Cholesterin-gekoppelten siRNAs im Stande sind, auch ohne Verwendung eines Transfektionsreagenz in das Cytosol der Zellen vorzudringen und hierbei zu einem Gene-Silencing zu führen. In vivo Daten mit Cholesterin-siRNA zeigten eine gewisse intrazelluläre Aufnahme und Gene-Silencing Effekt.²⁷ Die dadurch erhöhte Lipophilie, sowie die erhoffte Verbesserung des Entkommens aus dem Endosom dienten als theoretische Grundlage für diese Tests. Klarerweise mussten hier weitaus höhere Konzentrationen verwendet werden als es bei vorigen Versuchen der Fall war, um überhaupt die Möglichkeit eines Effekts zu haben. Zum Vergleich wurden auch die Pendants ohne Cholesterin verwendet, um mögliche Unterschiede herauslesen zu können. Ebenfalls wurde angedacht, die jeweiligen siRNAs unter Verwendung von Lipofectamine als Positivkontrollen im gleichen Assay zu testen.

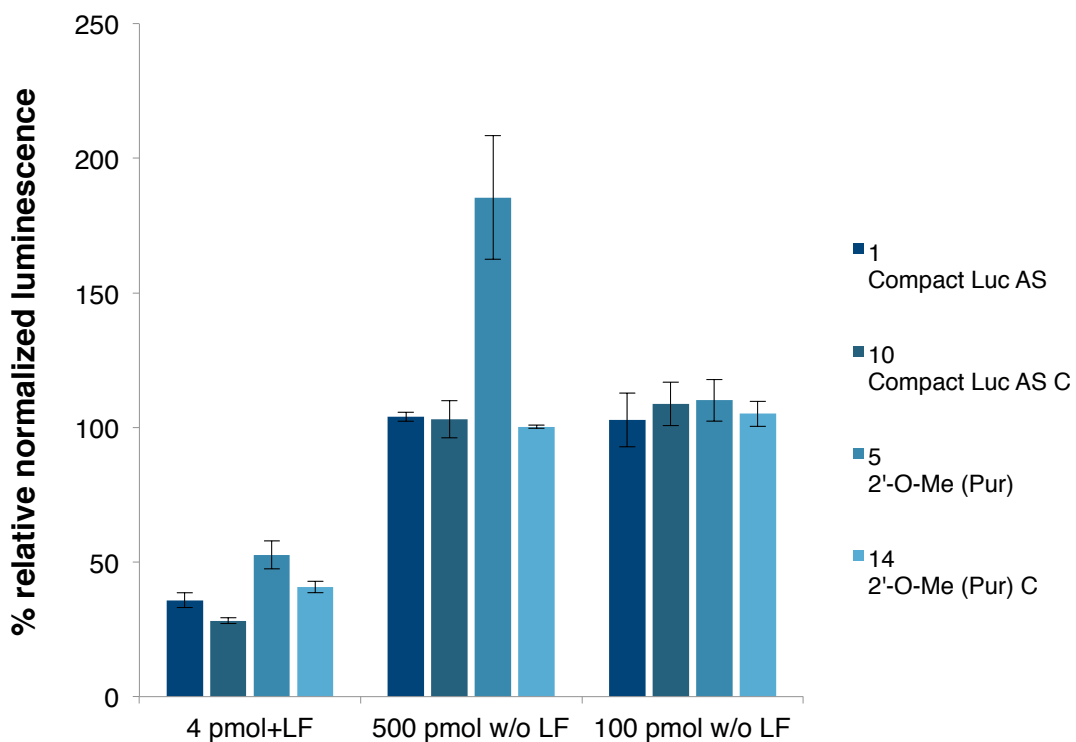


Abb. 4.5.5. zeigt das mit Bradford-Test normalisierte Ergebnis eines Versuchs zweier Cholesterin-gekoppelter siRNAs und ihrer Pendants ohne diesen Rest, jeweils in den Mengen 100 pmol und 500 pmol und mit Lipofectamine zu 4 pmol als Positivkontrollen. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=3).

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass selbst bei außerordentlich hohen Mengen von 500 pmol und trotz der erhöhten Lipophilie durch den Cholesterin-Rest, unter diesen Bedingungen keine Effekte durch die modifizierten siRNAs auftreten. Das Muster der Positivkontrollen mit Lipofectamine entspricht den vorigen Tests, mit Cholesterin sind die Substanzen hier jeweils stärker. Das unnormalisierte Ergebnis zeigte zwar bei Einsatz von 500 pmol der Substanz **5** (*2'-O-Me (Pur)*) eine nur noch sehr geringe Lumineszenz, was jedoch durch die Normalisierung erkennbar, aufgrund von außerordentlich starken toxischen Effekten auftrat. Die nur geringe Zellzahl führt darüber hinaus dazu, dass das jeweilige Ergebnis durch die Normalisierung sehr stark verzerrt wird, da die Lumineszenzwerte auf fast 200 % ansteigen. Offensichtlich scheint bei dieser Substanz etwas enthalten zu sein, was erst bei sehr hohen Konzentrationen die Zellzahl entsprechend dezimiert, da dieser Effekt bei 100 pmol nicht auftrat. Im Übrigen gibt es keine Unterschiede zwischen den Duplexen ohne Einsatz von Lipofectamine.

Da jedoch angenommen werden kann, dass die Cholesterin-gekoppelten siRNAs wie schon in den Stabilitätstests gesehen, teils Bindungen mit Proteinen eingehen können und dieser Umstand eine mögliche Aufnahme erschweren könnte, wurde der Test wiederholt indem FBS erst nach einem Zeitraum von etwa 2,5 h zu den Zellen hinzugefügt wurde.

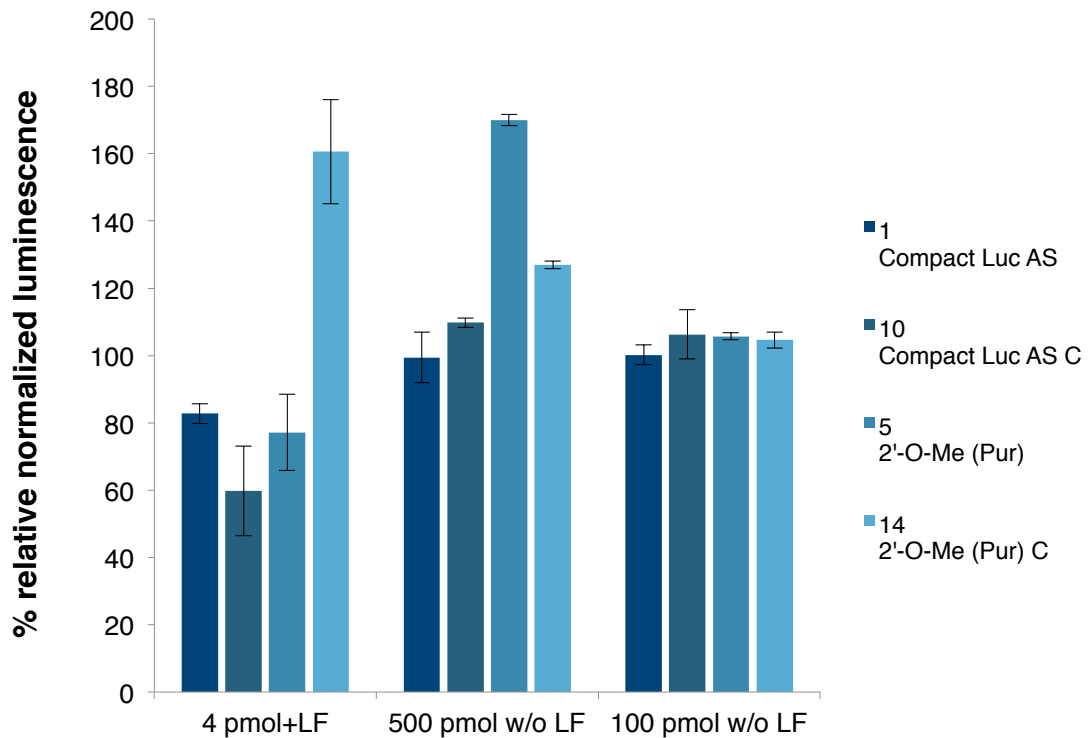


Abb. 4.5.6. zeigt das mit Bradford normalisierte Ergebnis des gleichen Assays, wobei in diesem Fall FBS erst mit Verzögerung hinzugefügt wurde. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=3).

Auch wenn FBS erst mit Verzögerung hinzugefügt wird, zeigen sich, auch bei hohen Konzentrationen der siRNA, keinerlei Effekte. Wiederum trat hier bei Substanz **5**, welche 2'-O-Methylgruppen nur an den Purin-Nukleotiden aufweist, die schon vorher beobachtete Dezimierung der Zellzahl auf. Bei 500 pmol zeigt sich teils sogar eine Hochregulierung der Luciferaseaktivität. Unnormalisiert deckt sich das Muster der Positivkontrollen mit dem vorigen Assay, jedoch wurde das Ergebnis durch den Bradford-Test aufgrund toxischer Effekte, welche offensichtlich aufgrund der FBS-freien Phase verstärkt wurden, deutlich verändert. Insbesondere Substanz **14** (2'-O-Me (Pur) C) weist dadurch keinen Effekt auf und würde eine sehr starke Hochregulierung zeigen, ähnlich wie es bei Substanz **5** der Fall ist. Da die betreffende siRNA in der vorigen Testung hervorragende Werte erzielte, ist dieses Ergebnis mit Vorbehalt zu betrachten. Bei diesen geringen Zellzahlen nimmt aufgrund der Toxizität die Bradford-Normalisierung stark an Relevanz ab.

Das durch diese Tests gezeigte Fehlen einer unspezifischen Zellaufnahme ist wichtig für die folgenden Versuche, bei denen die Rezeptor-medierte Aufnahme untersucht werden soll.

4.5.3. Versuch unter Verwendung von DARPin-Konjugaten für die rezeptorvermittelte Zellaufnahme

Nach Initialtestung der modifizierten siRNAs auf Wirksamkeit und Ermittlung einer eventuellen unspezifischen Zellaufnahme, wurden bestimmte Antisense-Stränge ausgewählt, um als Konjugate mit DARPins ein mögliches verbessertes Gene-Silencing nach rezeptorvermittelter Zellaufnahme zu untersuchen. Frühere Untersuchungen dieser Konjugate zeigten einen verhältnismäßig geringen Knockdown-Effekt, der möglicherweise durch höhere Stabilität und/oder eines verbesserten endosomalen Escape verstärkt werden würde. Hierbei wurden als Zelllinie stabil transfizierte MCF-7 PGK EGFPLuc Zellen herangezogen, welche über den nötigen EpCAM-Rezeptor verfügen. Aufgrund des großen Aufwands der Herstellung und Aufreinigung solcher Konjugate konnten nur bestimmte Antisense-Stränge getestet werden. Vorrangig wurde hier auf diejenigen mit 3'-Cholesterin-Kopplung zurückgegriffen, da hiermit eine mögliche Verbesserung des endosomalen Escape erwartet werden konnte und betreffende Substanzen auch in vorigen Versuchen sehr wünschenswerte Ergebnisse lieferten. Für die Testung wurden zwei verschiedene Konjugattypen herangezogen, wie bereits im Abschnitt Material und Methoden näher erläutert.

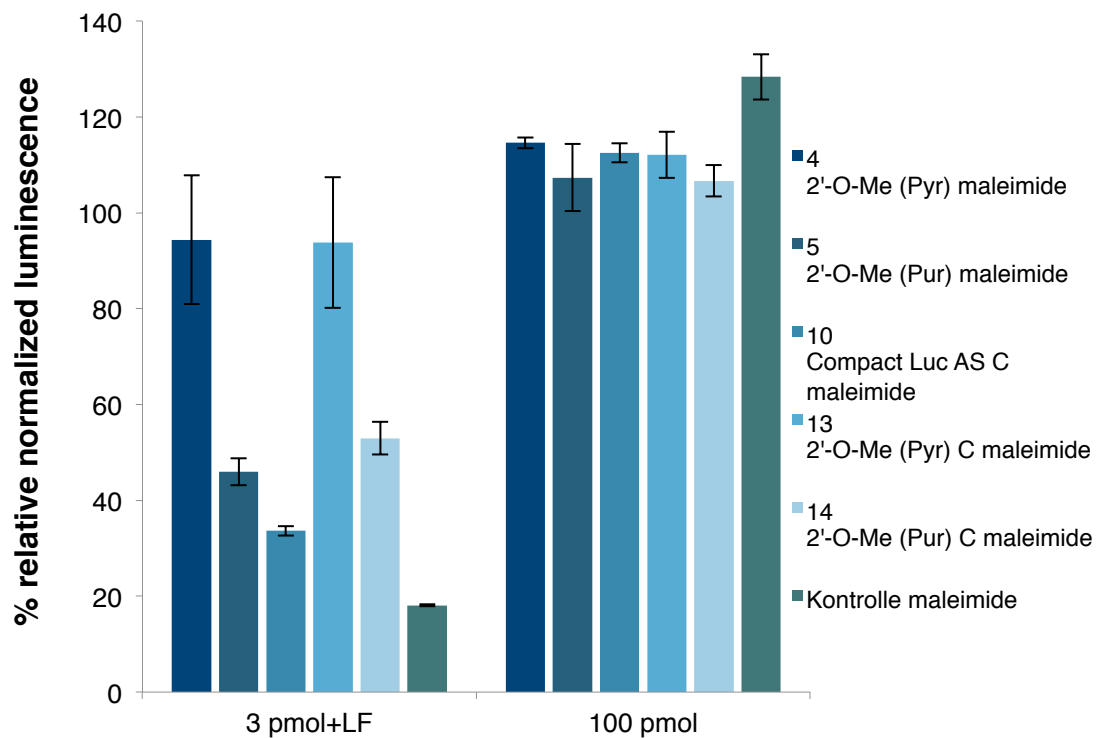


Abb. 4.5.7. zeigt das mit Bradford normalisierte Ergebnis eines Lumineszenz-Tests. Hierbei wurden fünf Substanzen als Maleimid-Konjugat zu 100 pmol getestet. Drei Produkte verfügten über einen 3'-Cholesterin-Rest, ihre Pendanten ohne diesen Rest wurden ebenfalls im selben Versuch getestet um etwaige Unterschiede herauslesen zu können. Als Positivkontrolle wurden sämtliche Konjugate mithilfe von Lipofectamine zu 3 pmol getestet. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=3).

Das Ergebnis zeigt eindeutig, dass in der Konzentration von 100 pmol kein signifikanter Effekt mittels DARPIn-siRNA-Konjugate eingetreten ist. Teils resultiert der Einsatz in einer Hochregulierung der Luciferase-Aktivität, was insbesondere bei der unmodifizierten Kontroll-siRNA der Fall ist. Die Positiv-Kontrollen mit Lipofectamine zeigen zwar die erwartete Wirksamkeit, jedoch gibt es in diesem Fall Unterschiede zu vorigen Versuchen, da Substanz **14** mit Cholesterin-Kopplung schlechtere Effekte zeigt als das Pendant Substanz **5** (beide 2'-O-Me (Pur)) ohne dieser Modifikation. Dies verlief in vorangegangenen Tests mit HeLa-Zellen gegenteilig. Die siRNAs **4** und **13** (beide 2'-O-Me (Pyr)) zeigen als Resultat des Versuchs nur geringe Effekte, jedoch in beiden Fällen mit hoher Standardabweichung.

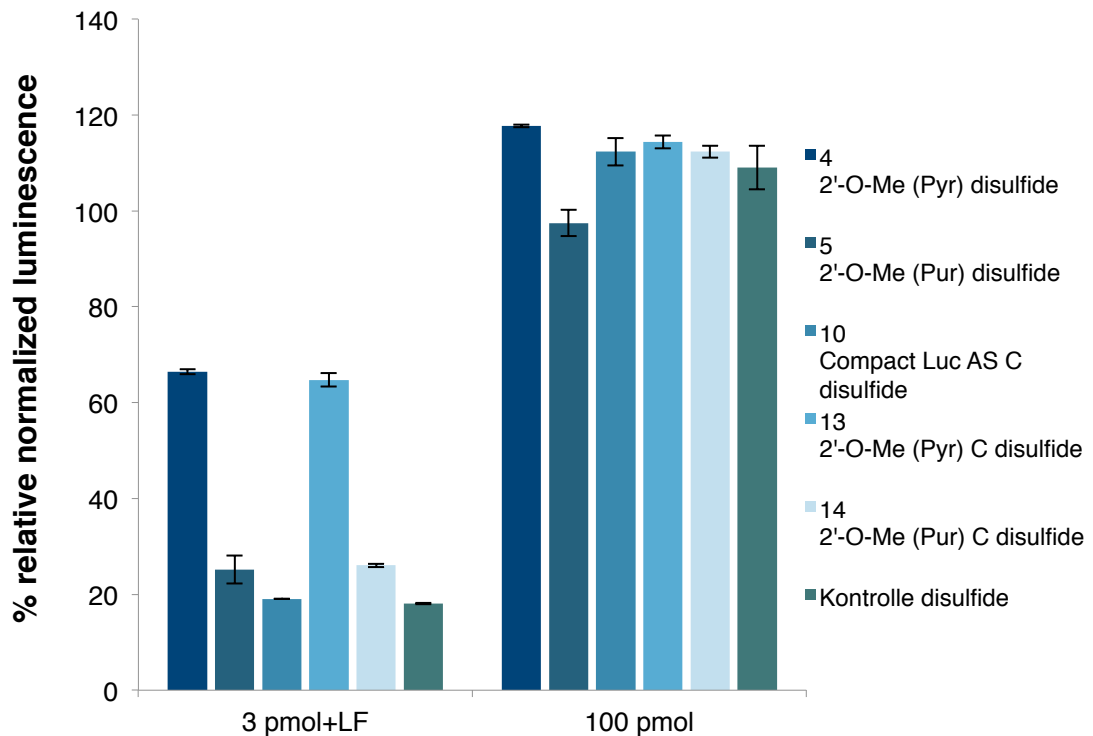


Abb. 4.5.8. zeigt das mit Bradford normalisierte Ergebnis eines weiteren Lumineszenz-Tests, welcher in gleicher Weise wie vorher, aber nun mit dem zweiten Konjugat-Typ durchgeführt wurde. Als Wirkungskontrolle dienten wiederum die Substanzen mit Lipofectamine zu 3 pmol. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=3).

Auch in diesem Versuch zeigte sich keine Wirkung der Konjugate bei 100 pmol. Die schon vorher aufgetretene Hochregulierung der Luciferaseaktivität ist in diesem Test sogar noch höher. Das Muster der Positivkontrollen entspricht dem vorigen Versuch, wobei auch in diesem Lumineszenztest Substanz **14** nicht wesentlich stärkeres Silencing als Substanz **5** aufweist, was im Rahmen des vorigen Versuches bereits beobachtet wurde.

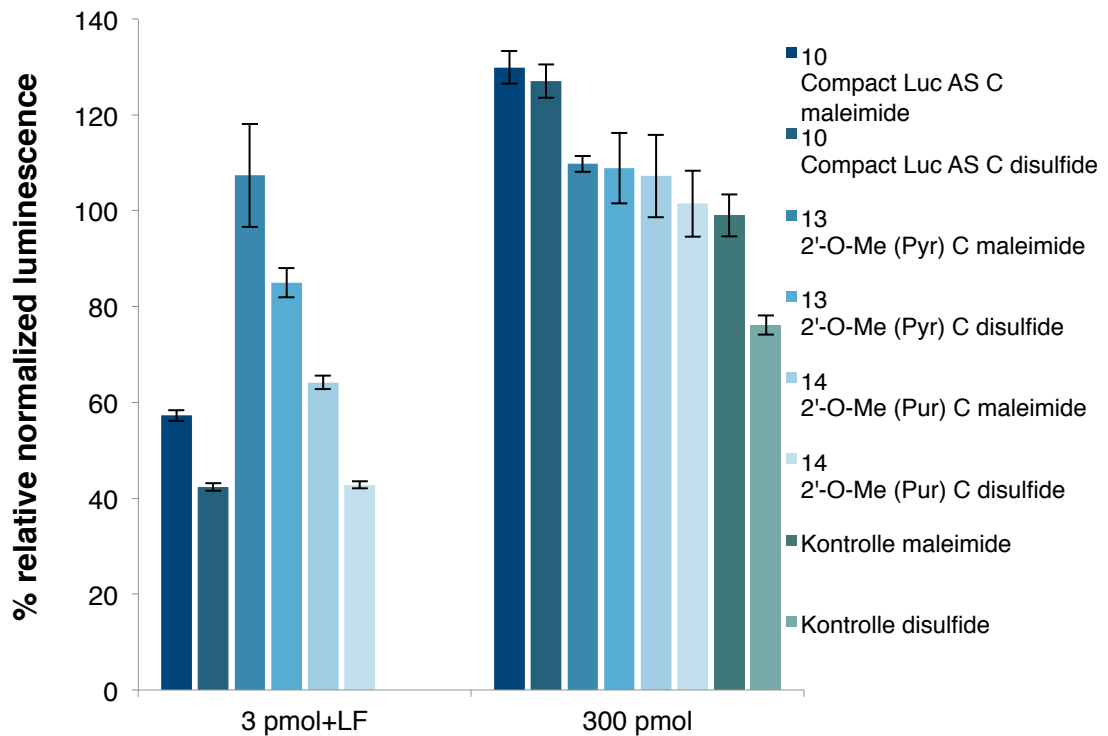


Abb. 4.5.9. zeigt das mit Bradford normalisierte Ergebnis eines weiteren Luciferase-Assays. Hierbei wurden drei verschiedenen modifizierte Antisense-Stränge, sowie die Kontroll-siRNA, jeweils mit beiden Typen des DARPin-Konjugats, herangezogen. Aufgrund der fehlenden Effekte in vorigen Versuchen wurde hier eine Menge von 300 pmol verwendet, wobei in Folge einzelne Proben nur noch als Duplikate vermessen werden konnten. Als Positivkontrollen wurden die Substanzen wiederum mit Lipofectamine zu 3 pmol verwendet. Diese konnten als Triplikate vermessen werden. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=2, mit LF n=3).

Trotz der Verwendung von 300 pmol scheinen sämtliche modifizierte siRNAs als Konjugate wirkungslos zu sein. Es zeigt sich wieder eine signifikante Hochregulierung der Luciferaseaktivität, die insbesondere bei Substanz **10** (*Compact Luc AS C*) sehr hoch ausfällt. Diese siRNA besitzt als Modifikation lediglich eine einzelne Phosphothioat-Einheit und einen 3'-Cholesterin-Rest. Auffallend ist, dass die Lumineszenzwerte stets bei den Disulfid-Konjugaten niedriger ausfallen. Die Kontroll-siRNA resultiert bei Einsatz von 300 pmol in Silencing auf unter 80%. Die Positivkontrollen mit Lipofectamine zeigen ebenfalls, dass die Disulfid-Konjugate auch in diesem Test bessere Effekte liefern. Substanz **13** (*2'-O-Me (Pyr) C*) scheint als Maleimid gänzlich wirkungslos zu sein. Wie auch in vorigen Assays schon gezeigt wurde, ist hier Substanz **14** (*2'-O-Me (Pur) C*) wiederum Substanz **10** ebenbürtig, zeigt aber dennoch keinen Effekt ohne

Transfektionsreagenz. In diesem und in vorigen Versuchen konnte festgestellt werden, dass zwischen Antisense-Strängen ein erheblicher Unterschied im Einfluss der 2'-O-Methylierung besteht, falls ausschließlich die Purine oder Pyrimidine modifiziert sind, da erstere signifikant wirksamer sind.

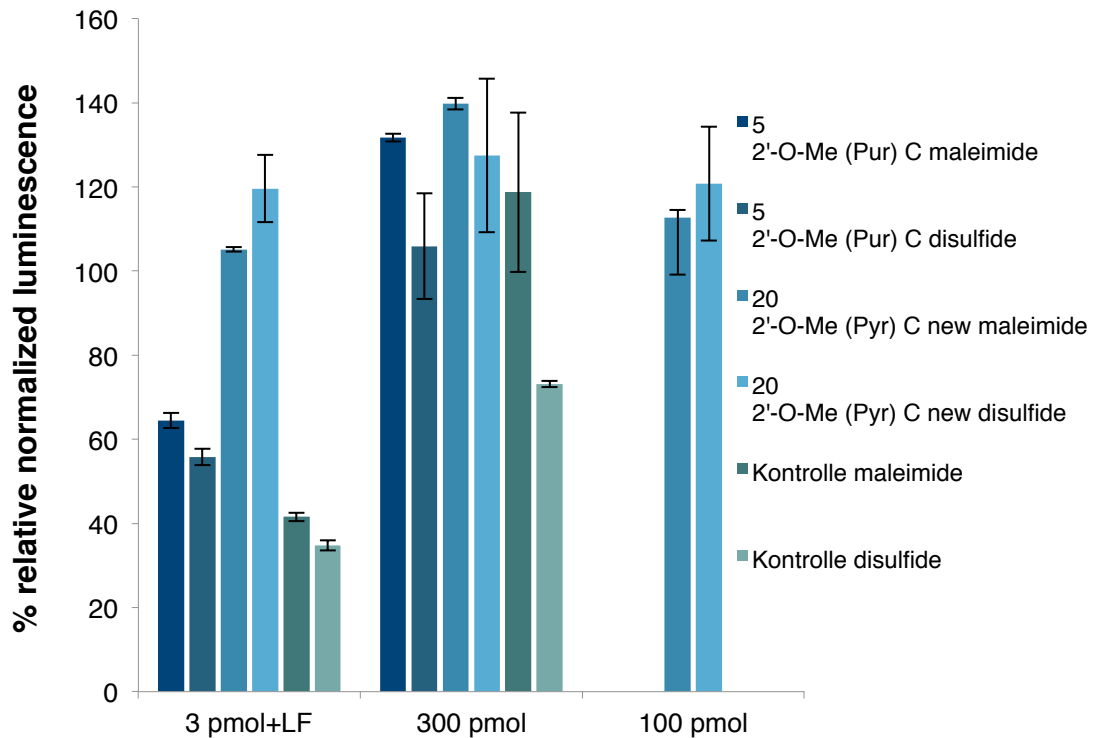


Abb. 4.5.10. zeigt das mit Bradford normalisierte Ergebnis des finalen Luciferase-Tests. Der Assay beinhaltet den noch nicht getesteten Antisense-Strang **20** (*2'-O-Me (Pyr) C new*). Analog wurden beide Konjugat-Typen getestet. Bei Substanz **20** zu 100 pmol und 300 pmol. Als Positivkontrolle wurden sie wiederum mit Lipofectamine zu 3 pmol eingesetzt. Als Fehlerindikatoren sind Standardabweichungen angegeben (n=2, mit LF n=3).

Auch in diesem Versuch ist zu sehen, dass der Einsatz von den modifizierten Antisense-Strängen, insbesondere mit Cholesterin-Kopplung, keine Effekte liefert. Es zeigt sich wiederum eine sehr starke Hochregulierung der Luciferase-Aktivität bei den meisten Substanzen, deren Ursache im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte. Das Disulfid-Konjugat ist wie auch vorher mit niedrigeren Lumineszenz-Werten ausgezeichnet, der Unterschied ist zwar bei Substanz **5** (*2'-O-Me (Pur)*) markant, jedoch ist der Wert zu hoch um von Effekten sprechen zu können. Die Kontroll-siRNA zeigt wie auch vorher bei 300 pmol deutliche Effekte als

Disulfid-Konjugat, stärker als in vorigem Versuch. Beim Maleimid-Konjugat tritt jedoch wieder eine entsprechende Hochregulierung auf. Die Positivkontrollen zeigen insgesamt das gleiche Muster wie vorher. Wiederum ist der Einsatz des Disulfid-Konjugats wesentlich besser mit Lipofectamine. Auffällig ist, dass Substanz **20** (*2'-O-Me (Pyr) C new*) auch mit dem Transfektionsreagenz keinerlei Wirkung zeigt, nachdem das Ergebnis durch den Bradford-Test normalisiert wurde. Der Antisense-Strang unterscheidet sich von **13** durch ein Fehlen von 2'-O-Modifikationen der letzten beiden Bausteine am 5'-Ende.

5. Diskussion

5.1. Synthese der modifizierten Antisense-Stränge

Das Set aus insgesamt 20 unterschiedlich modifizierten Antisense-Strängen wurde mittels automatischer Synthese an einem Polygen-Synthesizer an der Festphase synthetisiert. Insgesamt ergab die Synthese für die meisten Produkte außerordentlich gute Ergebnisse. Die Synthese lieferte mehr als genug Substanz für die nachfolgende Testung. Die Tritylanalyse mit Hilfe des Geräts zeigte zumeist ebenfalls hohe Werte, wodurch gute Kopplungsausbeuten sichergestellt werden konnten. Im Falle von Unregelmäßigkeiten bei dieser In-Prozess-Kontrolle, wie beispielsweise von vornherein niedrige Werte, oder ein Abfall der Absorptionswerte pro Nucleotid wurde das jeweilige Produkt von neuem synthetisiert, um von Anfang an sicherzustellen, dass einwandfreie Produkte generiert werden. Die begrenzte Kapazität der Bausteinplätze des Geräts (es können maximal sechs verschiedene Nukleotidbausteine gleichzeitig verwendet werden) stellte eine gewisse Herausforderung im Rahmen der Planung dar. So sollte pro Lauf der ökonomisch günstigste Weg gefunden werden, um die Produkte in möglichst wenigen Zwischenschritten synthetisieren zu können. Ein häufiger Wechsel der Substanzen würde insofern ein gewisses Risiko darstellen, für den Fall dass ein Zwischenschritt nicht optimal funktioniert und dadurch das Produkt verworfen werden müsste. Das ursprüngliche Set betrug 14 Antisense-Stränge, wobei im Zuge der Arbeit eine Abwandlung gewisser Oligonukleotide vorgenommen wurde und deshalb 6 zusätzliche Stränge synthetisiert werden sollten. Grund war das Vorliegen von eher schwachen Knock-downs von Strängen, bei denen jeweils die letzten beiden Basen am 5'-Ende 2'-O-methyliert waren. Deshalb wurde unter anderem auf diese Modifikation verzichtet. Bei diesen Oligonukleotiden kam es im Zuge der Synthese zu gewissen Problemen, da teils die Tritylwerte sehr früh stark absanken, was wiederum schlechte Kopplungsausbeuten bedeutete und somit die Synthese abgebrochen werden musste. Auch bei den letztlich erfolgreichen Synthesen waren die Werte der In-Prozess-Kontrolle niedriger als bei den 14 ursprünglichen Strängen. Dies lag womöglich am Gerät selbst, dessen Synthesereagenzien oder an den Bausteinen, da diese eventuell durch Lagerungsprobleme oder mehrmaliges Auftauen an Stabilität eingebüßt hatten. Im Fall der Aufreinigung traten keine

markanten Probleme auf. Durch die vorsorgliche Lagerung auf Eis zwischen den einzelnen Schritten wurde eventueller Substanzverlust vermieden. Auch für die Cholesterin-Konjugate konnte trotz der höheren Lipophilie die Standard-Isolierung durch Ethanol-Fällung verwendet werden. Es zeigte sich dabei nur ein minimaler Unterschied zu den anderen Produkten, wodurch jedoch keine Probleme auftauchten. Ein Indiz dafür, dass die Kopplung mit Cholesterin über das dafür vorgesehene Harz erfolgreich war, war ein Schäumen der betreffenden Lösungen, was bei anderen Oligonucleotiden nicht der Fall ist. Die jeweiligen Messungen am NanoDrop ND-1000 zeigten bei allen Produkten die erwünschte Absorptionskurve und den wünschenswerten Absorptionsquotienten, der eine ausreichende Entsalzung der Produkte anzeigte.

Mithilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese sollte im Anschluss überprüft werden, ob die erhaltenen Syntheseprodukte der angeforderten Reinheit gerecht wurden, ob deutliche Fehlsequenzen enthalten waren beziehungsweise sich Produkte im Zuge der Aufreinigung zersetzten. Die Auftrennung der Produkte im Gel verlief problemlos, die Substanzen wurden jeweils an jener Höhe der Migrationsstrecke detektiert, wo sie aufgrund ihrer Masse liegen sollten. Die Gele der ersten 14 Antisense-Stränge bestätigten die größtenteils unproblematische Synthese der Produkte, da relativ scharfe Banden ohne ein eindeutiges Vorhandensein von Fehlsequenzen erhalten wurden. Ebenfalls zeigte sich, dass die Cholesterin-gekoppelten Stränge aufgrund ihrer Masse etwas höher lagen, als jene Oligonukleotide, die nicht über diese zusätzliche Modifikation verfügten. Dieser Umstand ist ebenfalls als Indikator für die erfolgreiche Kopplung über das Syntheseharz anzusehen. Wie vorher erwähnt wurde, kam es bei den abgewandelten 6 neuen Antisense-Strängen zu Problemen in der Synthese, die in der Folge auch in der Gelelektrophorese ersichtlich waren, da in diesem Fall bei einigen Substanzen deutlich Fehlsequenzen detektiert wurden. Auch wenn diese Produkte nicht an die Qualität der ersten Substanzen heranreichten, wurde auf eine Neusynthese verzichtet, da die Verunreinigungen keinen wesentlichen Einfluss auf die Testergebnisse haben würden. Ein Verdacht einer nicht erfolgreichen Synthese besteht nur bei Substanz **20** (*2'-O-Me (Pyr) C new*) die in der Testung keinerlei Effekte zeigte, obwohl hier analog zu den restlichen fünf abgewandelten Strängen eine Effektverbesserung zu erwarten war.

Eine vollständige Bestätigung des Struktur beziehungsweise der Beweis, dass nicht im Zuge der Aufreinigung die 3'-Cholesterin-Modifikation verloren gegangen war, konnte mit diesen Methoden jedoch nicht geliefert werden. Dazu wurde eine Messung sämtlicher Produkte mithilfe hochauflösender Massenspektrometrie herangezogen. Wie das Ergebnis deutlich zeigen konnte, wurden bis auf wenige Abweichungen die korrekten Produkte synthetisiert. Ein Hinweis auf eine möglicherweise nicht erfolgreiche Kopplung der Antisense-Stränge mit Cholesterin am 3'-Ende oder dessen Verlust im Zuge der Aufreinigung konnte nicht gefunden werden, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die Kopplung über ein dafür vorgesehenes Syntheseharz eine zufriedenstellende Methode darstellt.

Die Massenspektrometrie konnte auch zeigen, dass jene Produkte, welche Abwandlungen der ursprünglichen 14 Oligonukleotide sind, wie schon in der gelelektrophoretischen Analyse zu sehen ist, zum Teil von niedrigerer Synthesequalität sind, da bei diesen Produkten häufig das Uridin am 5'-Ende fehlt. Dieser Umstand scheint zumindest am wahrscheinlichsten, es soll jedoch angemerkt bleiben, dass jene AS-Stränge zusätzlich noch um 12 Da zur erwarteten exact mass abweichen, wofür keine Erklärung gefunden werden konnte. Es konnte über diese Analyse kein Hinweis auf das Fehlen von Effekten im Zellkulturversuch für Substanz **20** (*2'-O-Me (Pyr) C new*) gefunden werden, da trotz einem Fehlen des letzten Bausteins davon ausgegangen werden kann, dass dieser Umstand nicht zwangsläufig zum vollständigen Wirkungsverlust führt. Auch Substanz 10 zeigt eine Abweichung, die auf einen fehlenden Baustein hinweist. Die Differenz von 320 Da würde dem Defizit eines 3'-terminalen dT entsprechen, wobei dieses Oligonukleotid in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese diesbezüglich keine Auffälligkeiten in Aussehen und Lage der Bande aufweist. Im Fall von AS **5** (*2'-O-Me (Pur)*) wurde die DMT-Schutzgruppe am 5'-Ende nur ungenügend abgespaltet, was möglicherweise eine Erklärung für die toxischen Effekte bei Einsatz von 500 pmol sein kann. Ein interessanter Aspekt bezieht sich auf das Phosphothioat-Backbone, da es bei etlichen Produkten zu Abweichungen in der Anzahl dieser Modifikationen gekommen ist, was in den Spektren gut rekonstruiert werden konnte. Grund dafür kann eine unterschiedliche Effizienz im entsprechenden Oxidationsschritt der Synthese sein. Es ist bekannt, dass die Phosphitbindung als Zwischenprodukt auch ohne Oxidationsreagenz in geringem Maß (bis zu 5 %) zum Phosphat oxidiert werden kann. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, dass Oxidationsprozesse im

Laufe der Electrospray-Ionisation ablaufen, welche zu teilweisen Austausch von Schwefel des Phosphothioat-Backbones gegen Sauerstoff führt, wodurch es zu Abweichungen von je 16 Da in den erwarteten Massen pro Austausch kommt. Je nach Wahl des Modus (negative oder positive ion mode) können dabei unterschiedliche Prozesse zu diesem Resultat führen wie beispielsweise die Entstehung von ROS durch Elektronen-Transferprozesse an der Schnittstelle zwischen Metall und Flüssigkeit der Elektronenquelle.³⁶

Zusammenfassend bleibt zu erwähnen, dass die Synthese sämtlicher Produkte in überwiegend sehr zufriedenstellendem Ausmaß funktionierte und dass der Großteil der meist kleinen Abweichungen eher geringen Einfluss auf die Effektivität der betreffenden Substanzen haben würde.

5.2. Stabilitätstest

Durch Inkubation der siRNA-Duplexe mit Zellmedium inklusive 10 % FBS sollte ermittelt werden, inwieweit die unterschiedlichen Modifikationsmuster der Antisense-Stränge Einfluss auf die Stabilität der siRNAs gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Serumnukleasen ausüben.

Die Auswertung der erstellten Agarosegele wurde dabei kombiniert über optische Beurteilung und densitometrische Ermittlung der Bandenintensitäten durchgeführt. Diese wurde mithilfe eines free-hand tools in der Software Quantity One erstellt, wobei damit jedoch trotz Sorgfalt gewisse Schwankungen nicht gänzlich zu vermeiden sind. Die Hintergrundfärbung, Variationen in der Ethidiumbromidfärbung, Pipettierabweichungen sowie Unterschiede in der manuellen Definierung der Banden tragen zu einer gewissen Variation bei. Dadurch ist diese Methode als semi-quantitativ zu beurteilen. Einflüsse von Modifikationen auf den Abbau durch Nukleasen sowie deren Einfluss auf die Effektivität wurden schon in früheren Arbeiten genau beschrieben.²³ Erwartungsgemäß sollte deshalb eine hohe Zahl an methylierten 2'-OH-Gruppen eine weitgehende Beständigkeit gegenüber Serumnukleasen vermitteln, was die Tests auch eindeutig zeigen konnten. Als Vergleich wurde eine unmodifizierte siRNA herangezogen, welche dabei relativ schnell abgebaut wurde. Ebenfalls lieferte insbesondere die Densitometrie das Resultat, dass das alleinige Vorhandensein eines Phosphothioat-Backbones nur unwesentlich zur Gesamtstabilität beiträgt. Vor allem erfüllte das vollständige Methylieren aller 2'-OH-Gruppen die Erwartung, dass jene siRNAs über eine bemerkenswerte Serum-Stabilität verfügen, welche jedoch Zulasten der Wirksamkeit auftritt. Doch selbst Duplexe, bei denen nur ein verhältnismäßig kleiner Anteil an Nukleotiden eine 2'-Methylierung aufweist, zeigten einen relativ großen Gewinn an Beständigkeit, was nahe legt, dass sich diese Art von Modifikation besonders nützlich zum Schutz der siRNAs erweist. Die zusätzliche Kopplung mit Cholesterin verleiht wie bei AS 10 (*Compact Luc AS C*) zu erkennen ist, einen signifikanten Schutz gegenüber dem Abbau durch Nukleasen, denn diese Modifikation führt zu besonderen Eigenschaften. Die Ausstattung mit diesem Rest verleiht den siRNAs die Fähigkeit, Bindungen mit Serumproteinen einzugehen, welche wiederum als Schutzmechanismus dienen können, beziehungsweise auch hinsichtlich eines Einsatzes in vivo die pharmakokinetischen Eigenschaften der

siRNA weitreichend ändern könnten, was in der Einleitung beschrieben wurde. Die Fähigkeit, Plasmaproteine wie Albumin oder Proteine der Zelloberfläche zu binden, wurde auch bei Phosphothioat-Oligonukleotiden beschrieben.³⁵ Dieser Aspekt konnte jedoch in der beschriebenen Versuchsanordnung für die betreffenden Duplexe nicht beobachtet werden. Die gebundenen Substanzen zeigen sich im Agarosegel durch Banden, die weit über dem Raum für die siRNAs liegen, was darauf schließen lässt, dass hier Nukleinsäuren mit sehr hoher apparenter Masse vorhanden waren, was sich in diesem Fall nur um Komplexe oder Aggregate der siRNAs mit Proteinen des fetalen Rinderserums handeln konnte. Insbesondere beim voll modifizierten Antisense-Strang (**11**) zeigte sich diese Bindung am deutlichsten, was dadurch erklärt werden kann, dass dieser Duplex die höchste Lipophilie aufweist und daher stärker gebunden werden kann. Antisense-Stränge, welche als Gesamt-Phosphothioat vorliegen, zeigten in den Stabilitätstests Gemeinsamkeiten betreffend der Intensität ihrer Banden am Agarosegel. Sämtliche Substanzen mit Ausnahme der beiden vollständig modifizierten AS-Stränge **2** und **11** lagen am Gel vom Startpunkt weg in schwacher Intensität der Ethidiumbromidfärbung vor, wobei Fehler in der Konzentration oder im Auftragen prinzipiell unwahrscheinlich sind. Möglicherweise scheint das Phosphothioat-Backbone die Interkalation des Detektionsreagenz Ethidiumbromid stark zu behindern und erschwert dabei gleichzeitig die densitometrische Analyse.

Die Auswertung der Bandenintensitäten gestaltete sich als problematisch, da in vielen Fällen nicht wie erwartet eine kontinuierliche Abnahme der Intensitäten zu ermitteln war, sondern diese vielfach sogar ansteigen. Deshalb müssen die Banden auch optisch und in Kombination bewertet werden, da dieser Umstand von der Ungenauigkeit der Methode im Fall von Pipettierfehlern oder sonstigen Einflüssen auf die Konzentration in den Probentaschen wie auch Variationen in der Ethidiumbromidfärbung herrührt. Zusammenfassend zeigte der Stabilitätstest deutlich das zu erwartende Ergebnis. Eine Ausstattung von Ribosen mit methylierten 2'-OH-Gruppen kann auch schon in geringer Zahl eine signifikante Beständigkeit gegenüber Serumnukleasen verleihen.

5.3. Zellkulturversuche

Da sich sämtliche siRNAs gegen die Luciferase-mRNA richteten, konnte dieser Umstand als Weg zur Wirksamkeitsüberprüfung genutzt werden, da im Reporter-gen-Zellkulturmodell bei erfolgreichem Knock-out die Lumineszenz im Vergleich zu unbehandelten Zellen abnimmt. Hierbei wurde jeweils auf zwei mit dem Luciferase-Gen stabil transfizierte Zelllinien zurückgegriffen, was exaktere Ergebnisse lieferte, da ein vorhergehendes Einbringen des Gens für die Versuche nicht nötig war.

Die ersten Versuche sollten durch Einsatz eines Transfektionsreagenz zum Einbringen der siRNA ins Cytosol zeigen, ob die betreffenden Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Modifikationen überhaupt noch eine ausreichende Ausschaltung der Ziel-mRNA bewerkstelligen können. Dabei ist erwähnenswert, dass mit Ausnahme der vollständig modifizierten siRNAs alle eine gewisse Wirksamkeit zeigten, wobei sich deren Ausmaß teils doch massiv unterschied. Dass eine zu große Zahl an modifizierten Bausteinen fatal für die Effektivität sein kann, war nicht überraschend und entspricht auch Theorie: Zwar ist die 2'-OH-Gruppe der Ribose nicht ausschlaggebend für die RISC-mRNA-Interaktion, jedoch kann durch sperrige Reste die dreidimensionale Struktur des AS-Strangs in einer Weise verändert werden, die hinderlich für den RNAi-Mechanismus ist.²³ Jedoch zeigte sich dabei auch, dass nicht nur die Zahl der 2'-O-methylierten Nukleotide ausschlaggebend war, sondern vor allem in welcher Lage am Strang sich diese befanden. Schon die Arbeit von Jesper B. Bramsen *et al.* konnte beweisen, dass die gezielte Auswahl der Nukleotide, welche entsprechende Modifikationen erhalten sollten, einen signifikanten Einfluss auf deren Auswirkungen haben kann.²⁴ Besonders markant erweist sich dieser Aspekt im direkten Vergleich der Pyrimidin- und Purin-modifizierten siRNAs. Beide haben eine ähnliche Anzahl modifizierter Nukleotide, wobei jedoch jene mit den modifizierten Purin-Bausteinen (Substanz **5** und **14**) um ein vielfaches wirksamer als die andere siRNA (**4** und **13** sowie **15** und **20**) war, welche in sämtlichen Tests eher schwache Wirkung zeigte. Auch die Abwandlung der siRNAs, die in ersten Tests geringe Effekte lieferten, durch Weglassen der beiden modifizierten Nukleotide am 5'-Ende verstärkte diese Vermutung, da die Unterschiede zur nicht modifizierten Kontrolle danach wesentlich geringer ausfielen. Ebenfalls interessant erweist sich eine alternierende Abfolge von

2'-O-Me-Modifikationen der Ribose, da in diesem Fall zwar jeder zweite Baustein 2'-O-methyliert ist, aber dennoch eine relativ gute Wirksamkeit erzielt werden konnte. Bemerkenswerte Resultate lieferte das Vorhandensein einer 3'-Cholesterinkopplung, in der die Hoffnung in einer Verbesserung des endosomalen Escape lag. In der Initialtestung zeigte sich dabei im Fall der HeLa-Zellen eine deutliche Verbesserung des Effekts mit Lipofectamine, wobei in erster Linie eine Abschwächung des Gene-Silencing befürchtet wurde. Auch die sonst unmodifizierte siRNA *Compact Luc AS C* zeigte mit Cholesterin Effekte, die denen der Kontrolle ebenbürtig waren. Eine Erklärung dafür kann sein, dass der Cholesterin-Rest die Lipoplexbildung beziehungsweise die Überführung der siRNAs in die Zellen auf diesem Weg verbessern konnte. Dieser Effekt scheint aber nicht allgemein auf alle Versuchszellen übertragbar zu sein, da im Fall der MCF-7 Zellen jene Produkte mit Cholesterin-Kopplung (getestet als Bestandteil eines siRNA Konjugats) etwas schwächer wirksam waren. Dieser Aspekt kann von der unterschiedlichen Beschaffenheit der Zellmembranen verschiedener Zellen herrühren. Da erhofft wurde, dass die Ausstattung von siRNAs mit einem lipophilen Cholesterin-Rest eine Verbesserung des endosomalen Escape bringen würde, wurde auch die Frage aufgeworfen, ob diese dadurch aufgrund der erhöhten Lipophilie geeignet sind, ohne Hilfsmittel wie Lipofectamine in Zellen zu gelangen, also unspezifisch aufgenommen zu werden. Nukleinsäuren gelangen allgemein aufgrund der negativen Ladung des Phosphat-Backbones und ihrer Größe nur schlecht durch die Zellmembranen.¹⁴ Ob daher dieser Rest die schlechten Eigenschaften beeinflussen kann, war von vornherein fraglich. Wie die Resultate eindeutig zeigen konnten, gab es keinerlei Unterschiede ob mit oder ohne Cholesterin-Kopplung, auch bei sehr hohen Konzentrationen. Dieser Aspekt ist insofern aber auch wünschenswert, da dabei eine unspezifische Zellaufnahme vermieden und folglich eine gezielt rezeptorvermittelte Wirkung gewährleistet werden kann.

Schließlich sollte überprüft werden, ob bestimmte siRNAs allein voran durch die 3'-Cholesterin-Kopplung geeignet sind, besser als unmodifizierte Substanzen nach rezeptor-vermittelter Zellaufnahme vom Endosom in das Cytosol der Zellen zu gelangen, um so gezielt in bestimmten Zelltypen ein entsprechendes Silencing hervorzurufen. Auch wenn diese Veränderung theoretisch günstig erscheint und auch in den initialen Zellversuchen sehr positive Resultate lieferte, so zeigte sich dennoch, dass jene siRNAs in Kopplung mit beiden Typen von DARPin-Konjugaten

keine Wirkung hervorrufen konnten. Es scheint, als würde die Cholesterin-Kopplung die Wirkung sogar noch abschwächen, da die Kontrolle *Luc siRNA GSK* im Disulfid-Konjugat deutliche Down-Regulation ausübt, jedoch die Cholesterin-gekoppelte, ansonsten unmodifizierte *Compact Luc AS C (10)* keine Effekte vorweist. Möglicherweise wird das Produkt in irgendeiner Weise im Endosom oder in den Zellen unschädlich gemacht und daran gehindert eine RISC-vermittelte Zerstörung der mRNA zu bewirken. Ein weiterer Aspekt, der wiederholt beobachtet wurde, ist die deutlich erkennbare Hochregulierung der Luciferase-Aktivität. Dieser Umstand wird noch nicht ganz verstanden und könnte beispielsweise durch Aktivierung noch unbekannter zellulärer Pathways oder durch den Überschuss an Nukleotiden hervorgerufen werden. Interessant ist hierbei, dass dieser Aspekt bei den Maleimid-Konjugaten stets etwas stärker ausfällt, was insbesondere bei der Testung modifizierter siRNAs zu 300 pmol auffallend ist. Unter Umständen kann dieser hier doch sehr signifikante Unterschied zwischen den Konjugat-Typen als Wirkung seitens des Disulfid-Konjugats bewertet werden, sodass der Hochregulierung durch geringe Effekte entgegengewirkt wird. Dieser Aspekt würde jedoch dennoch nicht ausreichen um hier von einer Wirksamkeit der betreffenden Substanz sprechen zu können.

5.4. Konklusion

Noch immer stellt der endosomale Escape eines der größten Hindernisse im zielgerichteten und effizienten Einsatz von RNAi dar. Auch die gewählten Modifikationen der 2'-OH-Gruppe der Ribose sowie die Ausstattung ausgewählter Antisense-Stränge mit einer 3'-Cholesterin-Verknüpfung konnten dieses Problem nicht signifikant beeinflussen. Durch die gezielte Auswahl der Lage ist es möglich auch bei hoher Zahl die Effektivität minimal zu beeinflussen. Bereits in geringer Zahl wurde eine signifikant höhere Stabilität erreicht, jedoch konnte dieser Aspekt das Verlassen des Endosoms nach rezeptorvermittelter Zellaufnahme nicht signifikant verbessern. Auch die vielversprechende Kopplung mit einem lipophilen Cholesterin-Rest führte bei dieser Art der Aufnahme wohl sogar zu einer Verschlechterung der Effektivität, da sich im Einsatz bei MCF-7-Zellen selbst unter Verwendung eines Transfektionsreagens gegenteilige Resultate als im Fall der HeLa-Zellen ergaben. Die Effizienz dieser Modifikationen scheint also eine Abhängigkeit in der gewählten Zelllinie aufzuweisen. Ein eindeutiger Nachteil von siRNA-Modifikationen liegt im Effektverlust, der dadurch unweigerlich generiert wird, vor allem wenn der Antisense-Strang, welcher von RISC inkorporiert werden soll, betroffen ist. Ein weiteres Problem, dass durch Einsatz modifizierter Antisense-Stränge ebenfalls nicht beseitigt werden konnte, ist die in Testung aufgetretene Hochregulierung der Zielgen-Aktivität bei Einsatz von DARPin-gekoppelten siRNAs. Unglücklicherweise wird durch diesen Aspekt genau das Gegenteil bewirkt, als durch den Einsatz dieser Substanzen angestrebt wird. Deren Ursache ist derzeit jedoch noch unbekannt. Zusammenfassend kann hervorgehoben werden, dass der Einsatz von in dieser Weise modifizierten Antisense-Strängen zur Erhöhung der Serumstabilität unter gleichzeitigem Erhalt der überwiegenden Wirksamkeit zwar durchaus möglich ist, die essentielle Problematik der Effektverbesserung durch Erhöhung des endosomalen Escape dadurch jedoch kaum beeinflusst wird. Um diesem Hindernis in geeigneter Weise entgegenzutreten zu können, muss deshalb alternativen Strategien Vorrang gegeben werden. Dennoch ist hervorzuheben, dass das mögliche Portfolio an Modifikationen erheblich größer ist, und nur ein Bruchteil der möglichen Optionen ausgeschöpft wurde, was die Frage unbeantwortet lässt, ob nicht eine Alternative das gewünschte Ergebnis bringen könnte.

6. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Antisense
bcl-2	B-cell lymphoma
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
C	3'-Cholesterin
CPG	Controlled Pore Glass
DARPin	Designed Ankyrin Repeat Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FBS	Fetal Bovine Serum
HDL	High Density Lipoprotein
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
KSP	Kinesin Spindle Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LF	Lipofectamine
mRNA	messenger RNA
miRNA	microRNA
PCSK9	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9
PGK	Phosphoglycerat Kinase
Pur	Purin
Pyr	Pyrimidin
RES	Reticuloendotheliales System
RIG1	Retinoic Acid Inducible Gene 1
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
Sid-1	Systemic RNAi Deficient-1
siRNA	Small Interfering RNA
SNALP	Stable nucleic acid lipid particle
ST	Standard
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll Like Receptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Sämtliche Abbildungen und Graphiken wurden mithilfe von Microsoft Powerpoint erstellt. Für Strukturformeln wurde das Programm MarvinSketch von ChemAxon verwendet.

7. Referenzen

- 1 Scott M. Hammond, Amy A. Caudy & Gregory J. Hannon. „Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA“ *Nature Reviews Genetics* 2, 110-119 (February 2001)
- 2 Andrew Fire, SiQun Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver & Craig C. Mello. „Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*“ *Nature* 391, 806-811 (19 February 1998)
- 3 Gregory J. Hannon. „RNA interference“ *Nature* 418, 244-251 (11 July 2002)
- 4 Sayda M. Elbashir, Winfried Lendeckel, and Thomas Tuschl. „RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs“ *Genes & Dev.* 2001. 15: 188-200
- 5 Emily Bernstein, Amy A. Caudy, Scott M. Hammond & Gregory J. Hannon. „Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference“ *Nature* 409, 363-366 (18 January 2001)
- 6 Scott M. Hammond, Emily Bernstein, David Beach & Gregory J. Hannon. „An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells“ *Nature* 404, 293-296 (16 March 2000)
- 7 Witold Filipowicz. „RNAi: The Nuts and Bolts of the RISC Machine“ *Cell.* 2005 Jul 15; 122(1): 17-20
- 8 Martin Jinek & Jennifer A. Doudna. „A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference“ *Nature* 457, 405-412 (22 January 2009)
- 9 Norbert Perrimon, Jian-Quan Ni, and Lizabeth Perkins. „In vivo RNAi: Today and Tomorrow“ *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Aug; 2(8): a003640
- 10 Lars Aagaard and John J. Rossi. „RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges“ *Advanced Drug Delivery Reviews* Volume 59, Issues 2–3, 30 March 2007, Pages 75–86
- 11 João Conde, Natalie Artzi. „Are RNAi and miRNA therapeutics truly dead?“ *Trends in Biotechnology* Volume 33, Issue 3, March 2015, Pages 141–144
- 12 Philip Hair, Fiona Cameron, Kate McKeage. „Mipomersen Sodium: First Global Approval“ *Drugs* (2013), Volume 73, Issue 5, pp 487–493
- 13 D. Haussecker. „Current issues of RNAi therapeutics delivery and development“ *Journal of Controlled Release* Volume 195, 10 December 2014, Pages 49–54
- 14 Jie Wang, Ze Lu, M. Guillaume Wientjes, Jessie L.-S. Au. „Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers“ *The AAPS Journal* December 2010, Volume 12, Issue 4, pp 492–503
- 15 Daniela Castanotto & John J. Rossi. „The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics“ *Nature* 457, 426-433 (22 January 2009)

- 16 Raymond M. Schiffelers, Martin C. Woodle, and Puthupparampil Scaria. „Pharmaceutical Prospects for RNA Interference“ *Pharmaceutical Research*, Vol. 21, No. 1, January 2004
- 17 Aimee L. Jackson¹ & Peter S. Linsley. „Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application“ *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 57-67 (January 2010)
- 18 Aimee L Jackson, Steven R Bartz, Janell Schelter, Sumire V Kobayashi, Julja Burchard, Mao Mao, Bin Li, Guy Cavet & Peter S Linsley. „Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi“ *Nature Biotechnology* 21, 635 – 637 (2003)
- 19 Marjorie Robbins, Adam Judge, and Ian MacLachlan. „siRNA and Innate Immunity“ *Oligonucleotides*. May 2009, 19(2): 89-102
- 20 Adam D. Judge, Vandana Sood, Janet R Shaw, Dianne Fang, Kevin McClintock & Ian MacLachlan. „Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA“ *Nature Biotechnology* 23, 457 - 462 (2005)
- 21 Adam D. Judge, Gurneet Bola, Amy C. H. Lee and Ian MacLachlan. „Design of Noninflammatory Synthetic siRNA Mediating Potent Gene Silencing in Vivo“ *Molecular Therapy* (2006) 13, 494–505
- 22 Jonathan K. Watts, Glen F. Deleavey, Masad J. Damha. „Chemically modified siRNA: tools and applications“ *Drug Discovery Today* Volume 13, Issues 19–20, October 2008, Pages 842–855
- 23 Ya-Lin Chiu and Tariq M. Rana. „siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis“ *RNA* 2003. 9: 1034-1048
- 24 Jesper B. Bramsen, Maria B. Laursen, Anne F. Nielsen, Thomas B. Hansen, Claus Bus, Niels Langkjær, B. Ravindra Babu, Torben Højland, Mikhail Abramov, Arthur Van Aerschot, Dalibor Odadzic, Romualdas Smicius, Jens Haas, Cordula Andree, Jharna Barman, Malgorzata Wenska, Puneet Srivastava, Chuangzheng Zhou, Dmytro Honcharenko, Simone Hess, Elke Müller, Georgii V. Bobkov, Sergey N. Mikhailov, Eugenio Fava, Thomas F. Meyer, Jyoti Chattopadhyaya, Marino Zerial, Joachim W. Engels, Piet Herdewijn, Jesper Wengel and Jørgen Kjems. „A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity“ *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 9 2867–2881
- 25 Christina Lorenz, Philipp Hadwiger, Matthias John, Hans-Peter Vornlocher, Carlo Unverzagt. „Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells“ *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 14, Issue 19, 4 October 2004, Pages 4975–4977
- 26 Calum MacKellar, Duncan Graham, David W. Will, Stephen Burgess and Tom Brown. „Synthesis and physical properties of anti-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups“ *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, No.13 3411-3417

- 27 Jürgen Soutschek, Akin Akinc, Birgit Bramlage, Klaus Charisse, Rainer Constien, Mary Donoghue, Sayda Elbashir, Anke Geick, Philipp Hadwiger, Jens Harborth, Matthias John, Venkatasamy Kesavan, Gary Lavine, Rajendra K. Pandey, Timothy Racie, Kallanthottathil G. Rajeev, Ingo Röhl, Ivanka Toudjarska, Gang Wang, Silvio Wuschko, David Bumcrot, Victor Koteliansky, Stefan Limmer, Muthiah Manoharan & Hans-Peter Vornlocher. „Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs“ *Nature* 432, 173-178 (11 November 2004)
- 28 Christian Wolfrum, Shuanping Shi, K Narayanannair Jayaprakash, Muthusamy Jayaraman, Gang Wang, Rajendra K Pandey, Kallanthottathil G Rajeev, Tomoko Nakayama, Klaus Charrise, Esther M Ndungo, Tracy Zimmermann, Victor Koteliansky, Muthiah Manoharan & Markus Stoffel. „Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs“ *Nature Biotechnology* 25, 1149 - 1157 (2007)
- 29 H Kaspar Binz, Patrick Amstutz, Andreas Kohl, Michael T Stumpp, Christophe Briand, Patrik Forrer, Markus G Grütter & Andreas Plückthun. „High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries“ *Nature Biotechnology* 22, 575 - 582 (2004)
- 30 H. Kaspar Binz, Michael T. Stumpp, Patrik Forrer, Patrick Amstutz and Andreas Plückthun. „Designing Repeat Proteins: Well-expressed, Soluble and Stable Proteins from Combinatorial Libraries of Consensus Ankyrin Repeat Proteins“ *J. Mol. Biol.* (2003) 332, 489–503
- 31 Jean-Philippe Theurillat, Birgit Dreier, Gabriela Nagy-Davidescu, Burkhardt Seifert, Silvia Behnke, Ursina Zürcher-Härdi, Fabienne Ingold, Andreas Plückthun and Holger Moch. „Designed ankyrin repeat proteins: a novel tool for testing epidermal growth factor receptor 2 expression in breast cancer“ *Modern Pathology* (2010) 23, 1289–1297
- 32 Nikolas Stefan, Patricia Martin-Killias, Sascha Wyss-Stoeckle, Annemarie Honegger, Uwe Zangemeister-Wittke, Andreas Plückthun. „DARPs Recognizing the Tumor-Associated Antigen EpCAM Selected by Phage and Ribosome Display and Engineered for Multivalency“ *Journal of Molecular Biology* Volume 413, Issue 4, 4 November 2011, Pages 826–843
- 33 Sajid Hussain, Andreas Plückthun, Theresa M. Allen, Uwe Zangemeister-Wittke. „Chemosensitization of carcinoma cells using epithelial cell adhesion molecule-targeted liposomal antisense against bcl-2/bcl-xL“ *Mol Cancer Ther.* 2006 Dec; 5 (12): 3170-80
- 34 Johannes Winkler, Patricia Martin-Killias, Andreas Plückthun, Uwe Zangemeister-Wittke. „EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins“ *Mol Cancer Ther.* 2009 Sep; 8 (9): 2674-83
- 35 Juliano RL, X Ming, K Carver and B Laing. (2014). „Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides: Implications for oligonucleotide pharmacology“ *Nucleic Acid Ther* 24:101–113.
- 36 Wu, L., White, D. E., Ye, C., Vogt, F. G., Terfloth, G. J. and Matsushashi, H. (2012). „Desulfurization of phosphorothioate oligonucleotides via the sulfur-by-oxygen replacement induced by the hydroxyl radical during negative electrospray ionization mass spectrometry“ *J. Mass. Spectrom.*, 47: 836–844