

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Synthese und Anwendung dendritischer siRNA-Strukturen

Johannes Harder
aus
Burghausen

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsverordnung der LMU vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,

.....
Johannes Harder

Dissertation eingereicht am: 02.12.2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Mündliche Prüfung am: 19.03.2014

Danksagung

Meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* möchte für das mir geschenkte Vertrauen danken. Ein aufregenderes Forschungs-Projekt hätte ich mir nicht wünschen können. Ohne die fantastische Ausstattung deiner Labore und das interdisziplinäre Kollegium wäre eine Arbeit auf diesem Thema undenkbar.

Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei *Frau Gärtner* möchte ich mich für ihre Hilfe in organisatorischen Belangen danken.

Dem *Fonds der chemischen Industrie* danke ich für ein Promotionsstipendium.

Den größten Dank möchte ich *Julian Willibald* und *Korbinian Brunner* aussprechen. Dir *Julian* danke ich insbesondere für die Vorarbeit auf dem Projekt. Ich habe es immer als Privileg betrachtet mit dir zusammen arbeiten zu dürfen. Dir *Korbinian* danke ich für die tolle Zeit seit dem 1. Semester. Danke für deine unermüdliche Unterstützung während des gesamten Studiums, deiner Master-Arbeit und später als Team-Kollege. Euch beiden möchte ich natürlich auch für den Löwenanteil bei der Korrektur meiner Dissertation danken.

Markus Müller möchte für seinen Rat in biologischen Fragestellungen und vor allem auch bei Computer-Problemen danken. Vielen Dank für die deine äußerst wertvollen Beiträge bei der Korrektur der Arbeit.

Meine Studenten *Amrei Deutsch*, *Martin Rossa*, *Frederik Broszeit* und *Andreas Beil* waren eine große Hilfe für mein Forschungsprojekt. Meiner ersten Studentin *Amrei* danke ich für die schöne Mütze, die sie mir zum Abschied gestrickt hat. *Martin* danke ich für sein optimistisches Wesen und dafür, dass er ein Abbrennen unseres Labors verhindert hat. Auch mit *Frederik* hat es sehr viel Spaß gemacht zusammen zu arbeiten. Ja Herr Beil, was soll ich nun sagen? Vielen Dank für deine Unterstützung im letzten Teil meiner Dissertation.

Kerstin Kurz danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und Hilfe bei der HPL-Chromatografie. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei *Korbinian Heil* bedanken. Es war wirklich beeindruckend von dir beim Auseinanderbauen des Synthies oder den HPLCs zu lernen.

Meinen Laborkollegen *Felix Gnerlich*, *Julian Willibald*, *Korbinian Brunner*, *Amrei Deutsch*, *Arne Schröder* und *Edris Parsa* möchte ich für die unvergessliche Zeit danken. Dir *Felix* danke ich für ein offenes Ohr in sämtlichen Belangen. *Arne* und *Edris* waren für unser Labor nicht nur ein wertvoller wissenschaftlicher sondern vor allem auch ein persönlicher Gewinn.

Meinem ehemaligem Kommilitonen *Konstantin Sparrer* danke ich für die tolle Kooperation auf mehreren Projekten. Für den Erfolg meiner Doktorarbeit war dein Rat sehr wichtig. *Tobias Halbach* danke ich für die Zusammenarbeit auf dem Tollwut-Projekt. Danke, für dein schnelles und unermüdliches Testen unserer Verbindungen gegen das Tollwut-Virus. Die Zusammenarbeit mit euch beiden hat mich stets motiviert und mir sehr viel Spaß gemacht.

Meinem Kooperationspartner *Fabio Spada* möchte ich für die fantastische Zusammenarbeit auf dem Stammzellen-Projekt danken. Dein unendlicher Wissensschatz hat mich tief beeindruckt und es hat mich sehr gefreut mit dir zusammenarbeiten zu dürfen.

Auch bei *Dr. Thomas Kirmeier* und *Leonhard Möckl* möchte ich mich für die wahnsinnig spannende Kooperation im Zusammenhang mit den ersten *in vivo* Studien danken.

Gengo Kashiwazaki danke ich für die vielen Stunden, die er meiner musikalischen Erziehung gewidmet hat. Es war großes Glück, dich als Klavier-Lehrer haben zu dürfen. *Sabine Voß* danke ich für den musikalischen Input und die lehrreichen Gespräche über klassische Musik. Natürlich danke ich Ihnen auch, dass ich stets unkompliziert mit Laborbedarf versorgt wurde.

Benjamin Hackner und *Ulrike Lischke* danke ich für die schönen gemeinsam verbrachten Stunden sei es beim Kaffee trinken an einem verregnetem Sonntag oder abends beim Kochen.

Neben *Korbinian Brunner* und *Julian Willibald* haben zur Korrektur beigetragen: *Andrea Künzel*, *Arne Schröder*, *Edris Parsa*, *Ines Thoma*, *Jutta* und *Ursula Harder*, *Markus Müller*, *Stefan Schießler*, *Toni Pfaffeneder* und *Thomas Kirmeier*. Vielen Dank für eure Unterstützung!

Franziska Jung danke ich, dass sie mich fast 9 Jahre begleitet und unterstützt hat.

Meinen Eltern gilt mein größter persönlicher Dank! Danke, dass ihr mich immer bedingungslos unterstützt. Nicht unerwähnt dürfen meine beiden Schwestern *Julia* und *Jutta* bleiben. Danke für den Rückhalt, den ich immer bei euch finden kann.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

J. Willibald*, J. Harder*, K. Sparrer, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330-12333, *Click-Modified Anandamide siRNA Enables Delivery and Gene Silencing in Neuronal and Immune Cells*.

*equal contribution

Patente:

PCT/EP2013/064610, *Click modified siRNA molecules/Anandamide-modified nucleic acid molecules*, Inventors: J.Harder, J. Willibald, T. Carell.

Geplante europäische Anmeldung: *Saccharide modified oligonucleotides for the regulation of protein expression (in plants)*, Inventors: J. Harder, K. Brunner, J. Willibald, T. Carell.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VIII
Summary	XIV
1 Einleitung	1
1.1 RNA-Interferenz.....	1
1.2 Chemische Modifizierung von siRNAs.....	3
1.3 Kommerzielle Aspekte von RNA-Interferenz.....	5
1.4 Hindernisse bei dem Transport von Nukleinsäuren.....	8
1.5 Systeme für den Transport von siRNA.....	8
1.5.1 Lipo- und Polyplexe für den Transport von siRNA.....	9
1.5.2 Liganden-Konjugate für den Transport von siRNA.....	11
1.6 RNA-Interferenz für den therapeutischen Einsatz im Gehirn.....	13
1.6.1 siRNA-Liganden Konjugate für den Transport ins Gehirn.....	14
1.6.2 Das Endocannabinoid-System.....	15
1.7 Klinische Studien basierend auf RNA-Interferenz.....	17
1.8 Tollwut-Viren – Klassifizierung und molekularer Überblick.....	20
1.8.1 Lebenszyklus des Tollwut-Virus.....	22
1.8.2 Replikation und Transkription des Tollwut-Virus.....	23
1.8.3 Pathogene und antivirale Strategien gegen das Tollwut Virus.....	25
2 Aufgabenstellung	27
3 Evaluation von Anandamid modifizierter siRNA	28
3.1 Luciferase-Assay zur Untersuchung der Proteinexpression.....	31
3.2 Anandamid vermittelter Transport im Vergleich zu <i>jetPRIME</i>	33
3.2.1 Regulation einer <i>Renilla</i> -Luciferase in humanen Immunzellen.....	33
3.2.2 Untersuchung der Toxizität von Anandamid-siRNA.....	35
3.3 Vergleich der Anandamid-siRNA mit anderen Ligandensystemen.....	37
3.4 Einbau und Untersuchung von Thioat-Substitutionen.....	39
4 Entwicklung multimerer siRNA Strukturen	43
4.1 Synthese von Triazido-Bausteinen.....	44
4.2 Synthese und Evaluation der trimeren siRNA-Strukturen.....	47
4.3 Entwicklung dendritischer siRNA Strukturen.....	50
4.3.1 Synthese von Anandamid-Hexaazid.....	52

4.3.2	Synthese und Evaluation der dendritischen siRNA-Strukturen	53
4.4	Optimierung der trimeren siRNA-Struktur	56
5	Modifizierung von siRNA mit Zucker-Derivaten	57
5.1	Synthese von Glucose-Derivaten	58
5.2	Synthese und Evaluation von siRNA mit Glucose-Derivaten	62
6	Folsäure vermittelter Transport von siRNA	66
6.1	Das Folat-System zum systemischen Transport in Krebszellen	66
6.2	Synthese und Evaluation von Folsäure-siRNAs	67
7	Anwendung multimerer siRNAs	70
7.1	Regulation epigenetisch relevanter Enzyme in Stammzellen	70
7.2	Regulation von Tollwut-Proteinen mit Anandamid-siRNA	77
7.2.1	Synthese von Anandamid-siRNAs für <i>in vivo</i> Versuche	81
7.2.2	Erste <i>in vivo</i> Studie zu Anandamid-siRNA	83
8	Ausblick	85
9	Experimenteller Teil	86
9.1	Materialien und Methoden	86
9.2	Synthesevorschriften	89
9.3	Oligonukleotidsynthese und Click-Modifikation	112
9.3.1	Festphasensynthese	112
9.3.2	Entschützung und Aufreinigung von Oligonukleotiden	112
9.3.3	Click-Modifizierung von Oligonukleotiden	114
9.4	Zell-, mikro- und molekularbiologisches Arbeiten	117
9.4.1	Zellkultur	118
9.4.2	Amplifizierung von <i>psiCHECK</i> TM -2	119
9.4.3	Duales Luciferase Reportersystem	120
9.4.4	Realtime PCR zur Bestimmung der Expression von Tet-Enzymen	122
	Literaturverzeichnis	124

Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist der Prozess der RNA-Interferenz (RNAi) in den Fokus für therapeutische Ansätze gerückt.^[1] Es handelt sich um einen zellulären Vorgang, bei welchem kurze doppelsträngige RNA-Moleküle (*small interfering RNA*, siRNA) die Expression eines Gens sequenzspezifisch inhibieren können.^[2] Da es sich jedoch bei Oligonukleotiden um mehrfach negativ geladene Makromoleküle handelt, können diese hydrophobe Zellmembranen nur schwer passieren. Der Transport von siRNA in die Zellen des Zielgewebes stellt daher eine der schwierigsten Aufgaben bei der Entwicklung von RNAi für therapeutische Ansätze dar.^[3] Eine besonders vielversprechende Möglichkeit, zellspezifischen Transport zu ermöglichen, besteht in der Kupplung eines Rezeptorliganden an siRNA. Dazu konnte *Julian Willibald* zeigen, dass die kovalente Verknüpfung von Anandamid an siRNA einen Transport in Immunzellen ermöglicht. Dieses System sollte in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert und erweitert werden. Dabei kann die Vorgehensweise in drei Abschnitte untergliedert werden (Abbildung I). Im ersten Schritt wurde ausschließlich siRNA mit Anandamid-Modifizierung eingehend untersucht. Durch die Entwicklung von neuartigen verzweigten siRNAs konnte dann die Effektivität des Anandamid-siRNA-Systems gesteigert werden.

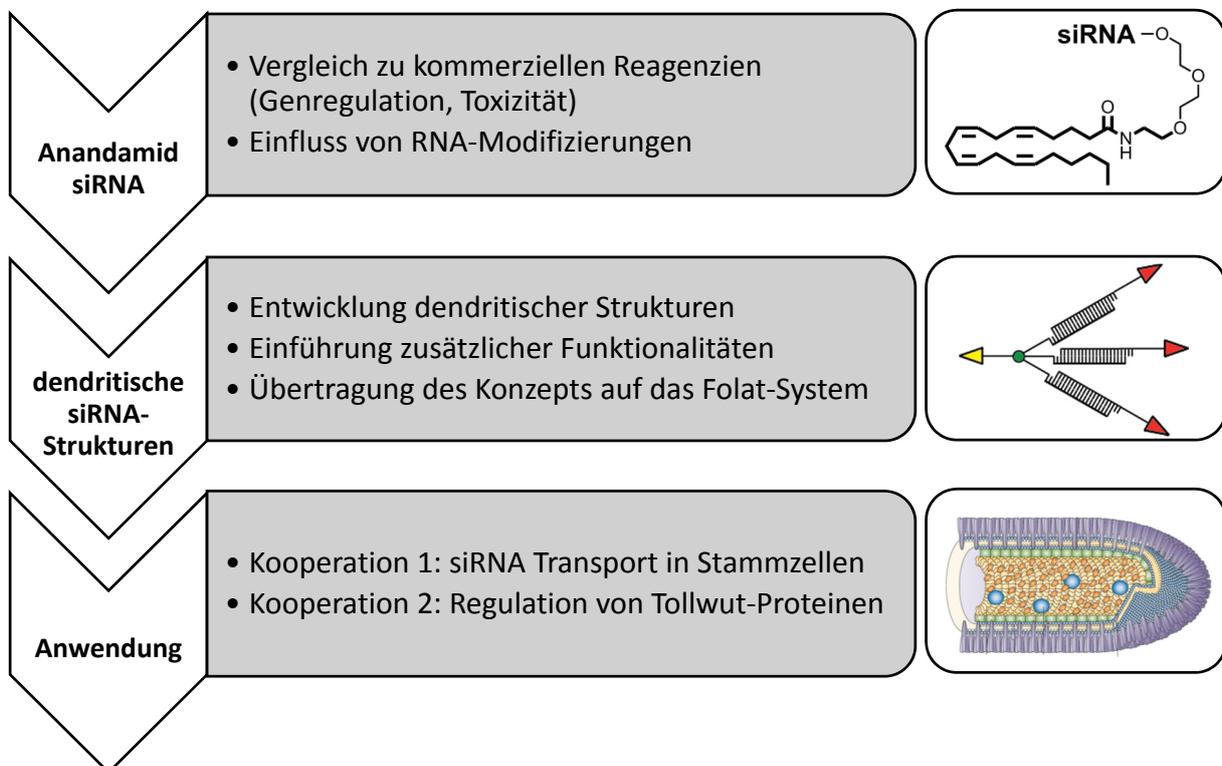


Abbildung I Konzeptionelle Zusammenfassung der Vorgehensweise. Nach Evaluation des Anandamid-Duplexes sollten neuartige siRNA-Strukturen entwickelt werden. Schließlich sollte durch Kooperationen die Anwendung der modifizierten siRNA erweitert werden.

Im letzten Schritt wurde die Anwendbarkeit des Systems aufgezeigt. Dies erfolgte in unterschiedlichen Kooperationen. Dabei wurde in Zusammenarbeit mit *Fabio Spada* ein erfolgreicher Transport der Anandamid modifizierten siRNA in neuronale Stammzellen demonstriert. Dies konnte anhand der Regulation epigenetisch relevanter Tet-Enzyme gezeigt werden. In einer weiteren Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Conzelmann* konnte das therapeutische Potential von Anandamid-siRNA zur Inhibierung von Tollwut in primären Neuronen demonstriert werden.

Zu Beginn des ersten Teils der Arbeit wurden die Eigenschaften der Anandamid-siRNA im Vergleich zu einem kommerziell verfügbaren Transfektionsreagenz (*jetPRIMETM*) näher untersucht. Dabei konnte in humanen Immunzellen (BJAB) gezeigt werden, dass durch den Liganden in Relation zu dem Reagenz vergleichbare Regulationen einer *Renilla*-Luciferase erzielt werden können (Abbildung IIa). Zusätzlich wurden auch die toxikologischen Eigenschaften durch einen ebenfalls Luciferase-basierten Assay näher untersucht. Dabei konnten im Konzentrationsbereich zwischen 10 nM bis 1 µM keine toxischen Effekte von Anandamid modifizierter siRNA detektiert werden (Abbildung IIb). Auch der Einfluss von RNA-Modifizierungen konnte untersucht werden. So wurde durch den erfolgreichen Einbau von Thioat-Substitutionen im Phosphatrückgrad zusätzlich eine Optimierung des siRNA-Systems erzielt.

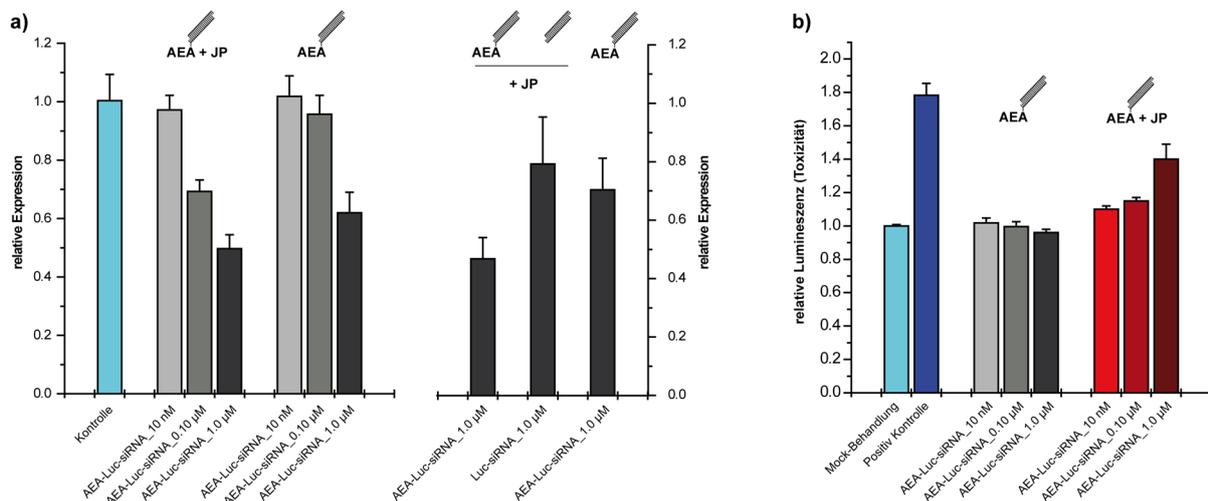


Abbildung II Anandamid-siRNA im Vergleich zu einem kommerziellen Transfektionsreagenz (*jetPRIME*). Verglichen wurden dabei die Effektivität in der Regulation einer *Renilla*-Luciferase (**a**) sowie die toxikologischen Eigenschaften (**b**). Die Arbeiten wurden in Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Conzelmann* durchgeführt. AEA = Anandamid, JP = *jetPRIME*.

Im zweiten Schritt wurde eine neuartige verzweigte siRNA-Struktur entwickelt. Hintergedanke war dabei den Anandamid-vermittelten Transport zu optimieren, was durch Verknüpfung mehrerer siRNA-Duplexe an einen Liganden erfolgen sollte. So sollte mit jeder Liganden-

Aufnahme gleichzeitig mehrere siRNAs in die Zellen transportiert werden. Dazu wurden zunächst Synthesen für Anandamid-Derivate mit mehrfacher Azidfunktionalität entwickelt (Abbildung III, **1** und **2**). Ebenfalls synthetisiert wurde ein Folsäuretriazid **3**, um das Konzept dendritischer Strukturen auf das Folat-System zu übertragen. Folatderivate ermöglichen einen Transport in Krebszellen.^[4]

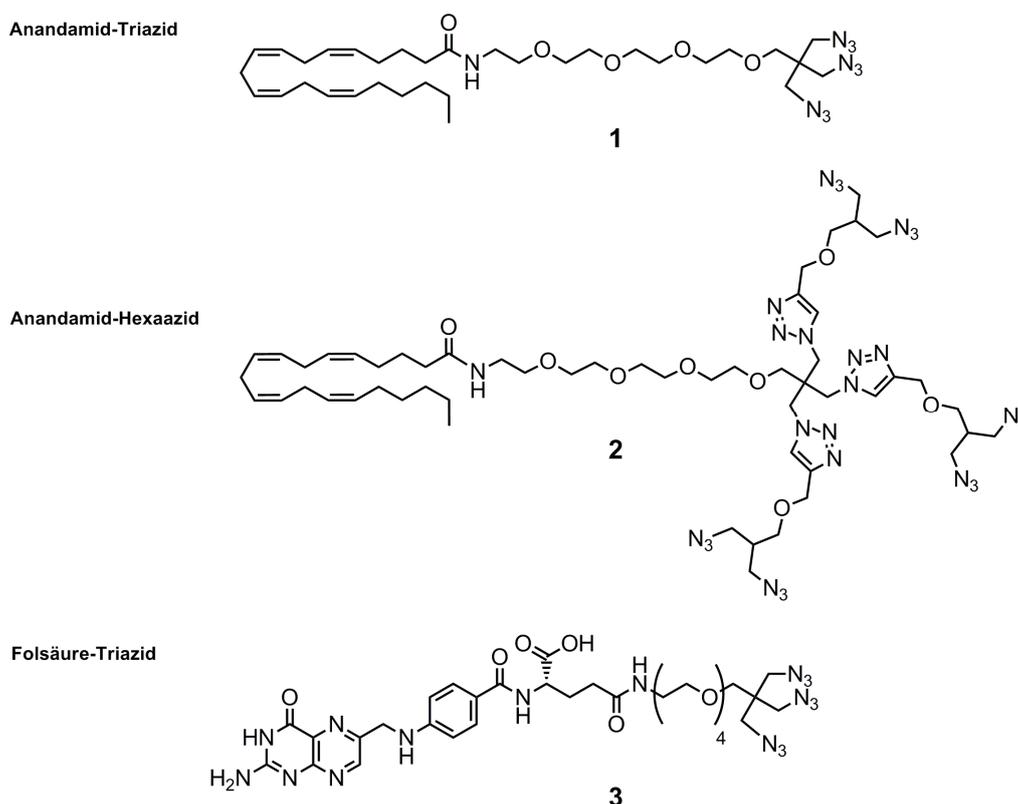


Abbildung III Exemplarisch aufgeführte Liganden mit mehrfacher Azidmodifizierung zur Synthese verzweigter siRNA-Strukturen. Synthetisiert wurde ein Anandamid-Tri- **1** sowie Hexaazid **2**. Auch hergestellt wurde ein Folsäure-Triazid **3** zur Transfektion von Krebszellen.

Unter der Verwendung von Click-Chemie wurden die synthetisierten Azide mit Alkin-modifizierten RNA-Oligonukleotiden umgesetzt. So konnten multimeren Strukturen von drei, sechs bzw. neun siRNAs pro Ligand hergestellt werden. Dabei stellte sich heraus, dass durch die trimere Anandamid-siRNA die besten Regulationen im Vergleich zur monomeren siRNA-Struktur erzielt wurde (Abbildung IVa,b). Durch eine weitere Steigerung der Anzahl der siRNA-Arme konnte keine zusätzliche Steigerung der Suppressionseffizienz erreicht werden. Auch trimere Folat-siRNA führte zu einer gesteigerten Regulation im Vergleich zum monomeren siRNA-Duplex (Abbildung IV4c). Somit konnte das Konzept auch erfolgreich auf ein anderes Liganden System übertragen werden.

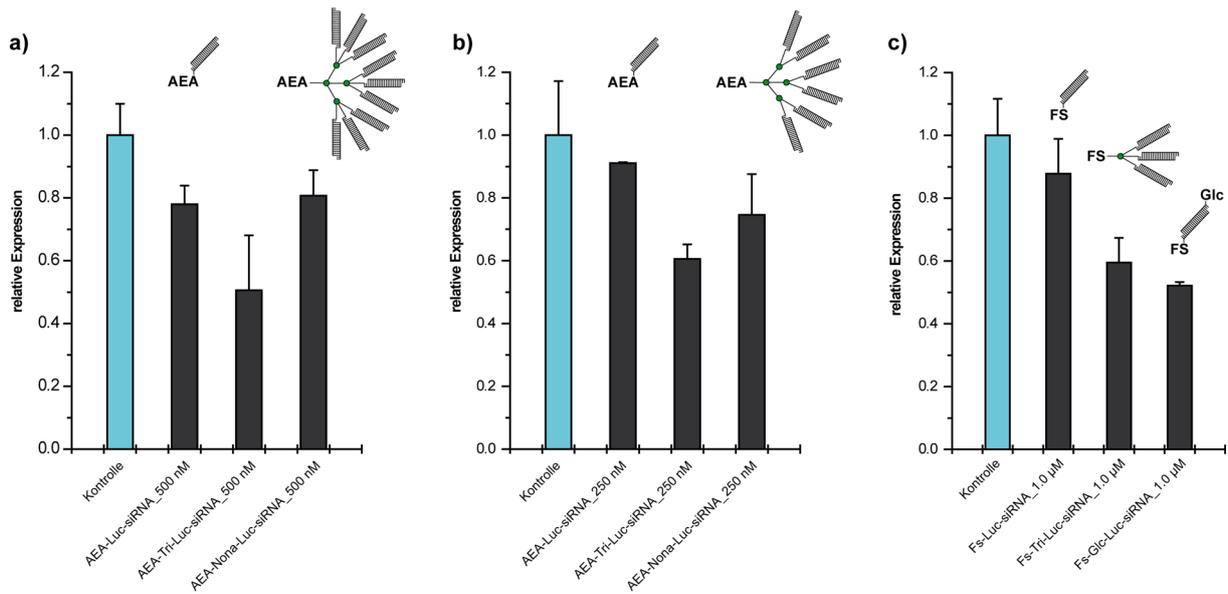


Abbildung IV Regulation einer *Renilla*-Luciferase durch neuartige verzweigte siRNAs. Trimere siRNAs konnten sowohl im Falls von Anandamid (**a, b**) als auch im Fall von Folsäure (**c**) eine gesteigerte Regulation im Vergleich zur monomeren Struktur erzielen. AEA = Anandamid, FS = Folsäure, Glc = Glucose.

Da es sich bei siRNA um einen Doppelstrang handelt, ermöglicht der antisense-Strang die Einführung weiterer Funktionalitäten. *Julian Willibald* konnte zeigen, dass auch die Einführung von Glucose eine gesteigerte Regulation zur Folge hat. Dabei wird ein zweiter Aufnahme-Weg über Glucose bindende Proteine adressiert, was in dieser Arbeit herausgearbeitet werden konnte (Abbildung Vb).

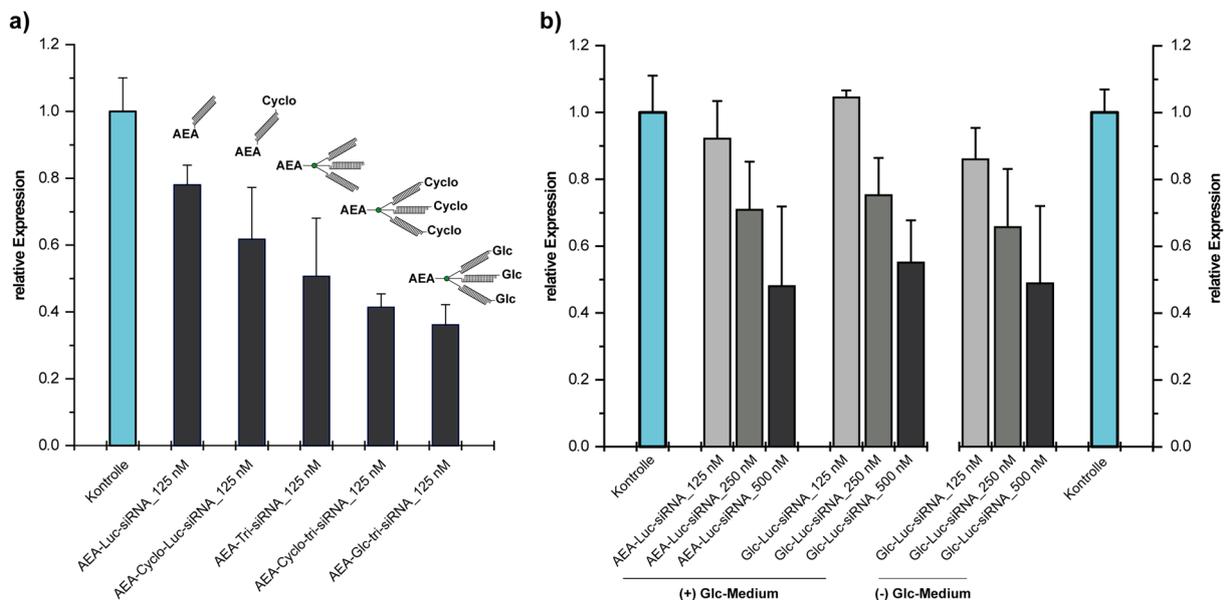


Abbildung V Regulation einer *Renilla*-Luciferase mit unterschiedlich modifizierten siRNAs. Die Einführung von Cyclodextrinen ermöglicht eine weitere Steigerung der Regulationseffizienz (**a**). Glucose-siRNA ohne Anandamid-Modifizierung ermöglicht eine Regulation des Reporter-Enzyms (**b**). Durch Verwendung eines Glucose-freien Mediums ((-)Glc) konnte zusätzlich eine gesteigerte Luciferase-Regulation erzielt und somit eine aktiver Transport der Glucose-siRNA untermauert werden. AEA = Anandamid, Cyclo = Cyclodextrin, Glc = Glucose.

Auch eingesetzt wurde ein Cyclodextrin modifizierter antisense-Strang. Dieser ermöglicht, analog zur Glucose-Modifizierung, eine gesteigerte Regulationsfähigkeit von Anandamid-siRNA ohne einen zusätzlichen Aufnahmeweg zu adressieren (Abbildung Va).^[5]

Nach erfolgreicher Optimierung der Anandamid-siRNA durch neuartige verzweigte Strukturen sollte durch Kooperationen die Anwendbarkeit des entwickelten Systems aufgezeigt werden. Stammzellen besitzen ein hohes Potential im Bereich der regenerativen Medizin, wobei für die gezielte Differenzierung RNA-Interferenz ein wichtiges Werkzeug darstellt. Durch eine interne Kooperation mit *Fabio Spada* konnte ein erfolgreicher Transport von Anandamid-siRNA in neuronale Stammzellen demonstriert werden. Dies wurde anhand der Regulation von Tet1, einem Schlüssel-Enzym in der Kontrolle der zellulären Genexpression,^[6] gezeigt (Abbildung VIa). Auch in diesem System konnte durch die trimere im Vergleich zur monomeren Struktur eine gesteigerte Proteinregulation erzielt werden.

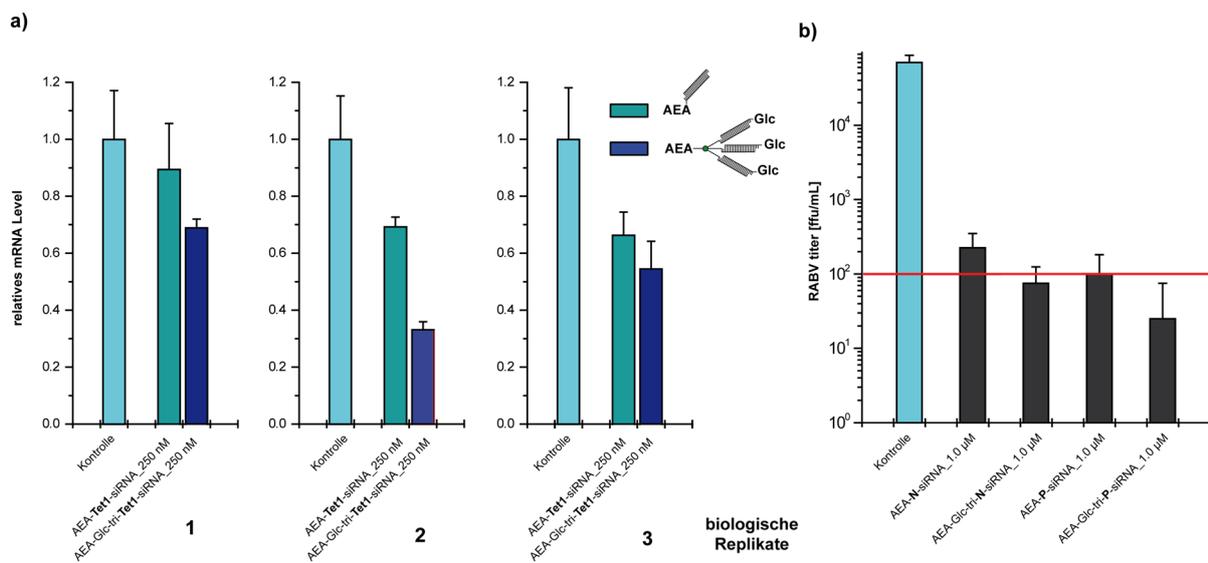


Abbildung VI Regulation von Tet1 in neuronalen Stammzellen (a) sowie Regulation von Tollwut-Proteinen (N,P-Protein) in Jurkats (b). AEA = Anandamid, Glc = Glucose.

In einer weiteren Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Conzelmann* konnte das therapeutische Potential von Anandamid modifizierter siRNA aufgezeigt werden. Im Rahmen dieser Zusammenarbeit wurde die Expression von Tollwut-Proteinen durch Anandamid-siRNA reguliert. Tollwut Infektionen sind nach dem Auftreten erster Symptome bis heute nicht heilbar. In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass trimere Anandamid-siRNA-Strukturen den viralen Titer um bis zu drei logarithmische Stufen reduzieren können (Abbildung VIb). So konnte das Tollwut-Virus zumindest *in vitro* erfolgreich bekämpft werden. Für eine weitere Kooperation (*Prof. Schwemmler*, Freiburg) für *in vivo* Versuche mit Tollwut infizierten Mäusen, konnten auch unterschiedliche Anandamid-siRNAs synthetisiert werden. Ob durch diese

Strukturen eine Heilung der Tollwut infizierten Mäusen erreicht werden kann, ist jedoch noch offen.

Summary

Recently, RNA-interference moved into the focus of therapeutic approaches.^[1] It relies on a cellular process by which short, double-stranded RNA molecules (*small interfering RNA*, siRNA) specifically inhibit the expression of a gen.^[2] As oligonucleotides are multiple charged macromolecules, they cannot easily pass hydrophobic cellular membranes. The transport of siRNAs into cells of the targeted tissue is therefore a tremendous challenge regarding the development of RNAi for therapeutic approaches.^[3] Hence, receptor mediated uptake of ligand conjugated siRNA is a promising methodology to achieve cell specific transport. *Julian Willibald* was able to show that the covalent conjugation of anandamide to siRNA enables transport into immune cells. The subject of this thesis was to characterise and expand this system. This process can be divided into three parts. First, the performance of the anandamide conjugated siRNA was carefully benchmarked. By developing a novel branched structure in the second part of the thesis, the efficacy of the anandamide-siRNA system was increased.

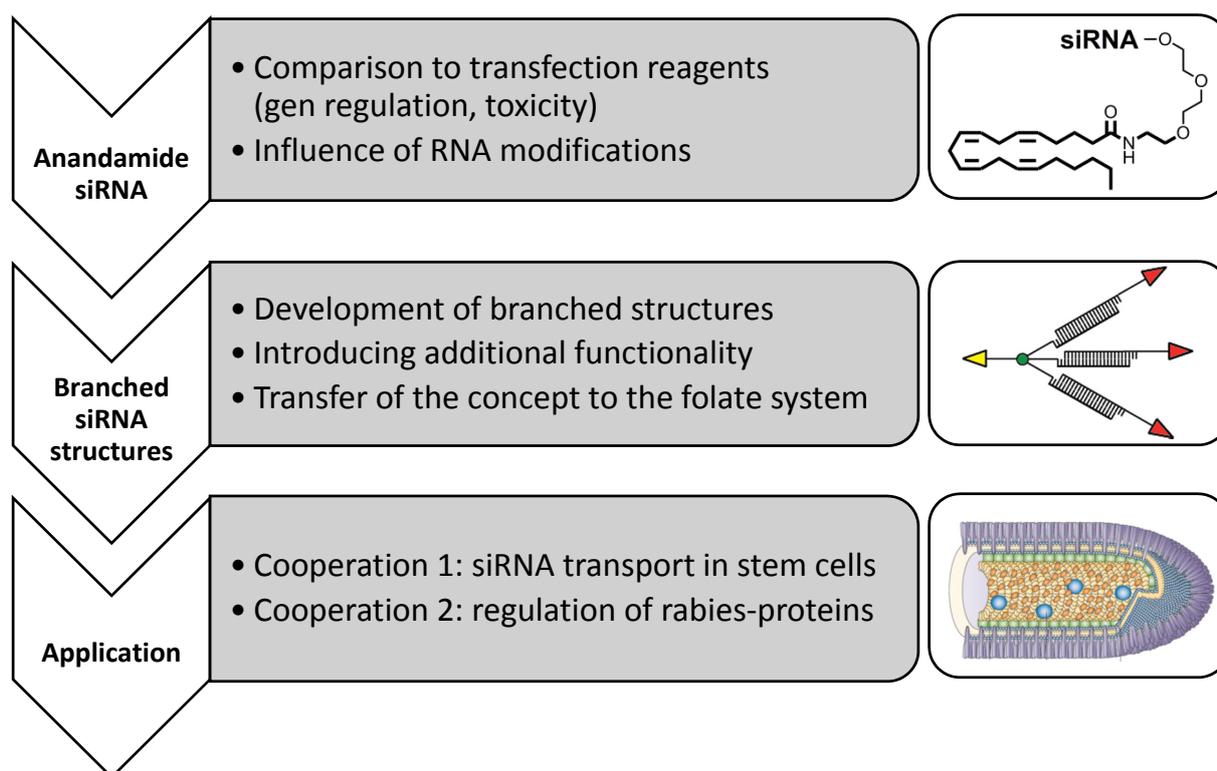


Figure I Summary of the development-process. After evaluation of the anandamide-duplex new branched siRNA structures were synthesized. Finally, the application of the modified siRNAs was extended.

In the last part the applicability of the system was demonstrated in a number of collaborations. Together with *Fabio Spada* a successful transport of anandamide-siRNA in stem cells was demonstrated. This could be shown by suppressing epigenetically relevant Tet enzymes. In
XIV

another cooperation with the group of *Prof. Conzelmann* the therapeutic potential of anandamide-siRNA was demonstrated by the inhibition of the rabies virus in primary neurons. At the beginning of the first part the properties of anandamide-siRNA were examined in comparison to a commercially available transfection reagent (*jetPRIME*TM). It was shown in a human immune cell line (BJAB) that comparable down-regulations of a *Renilla*-luciferase can be achieved by the conjugate in relation to the reagent (Figure IIa). In addition, no toxic effects of anandamide-siRNA were detected in a wide concentration-range between 10 nM and 1 μ M (Figure IIb). Also the influence of stabilizing RNA modifications was examined. By successful incorporation of thioates in the phosphate backbone an optimization of the siRNA system was achieved.

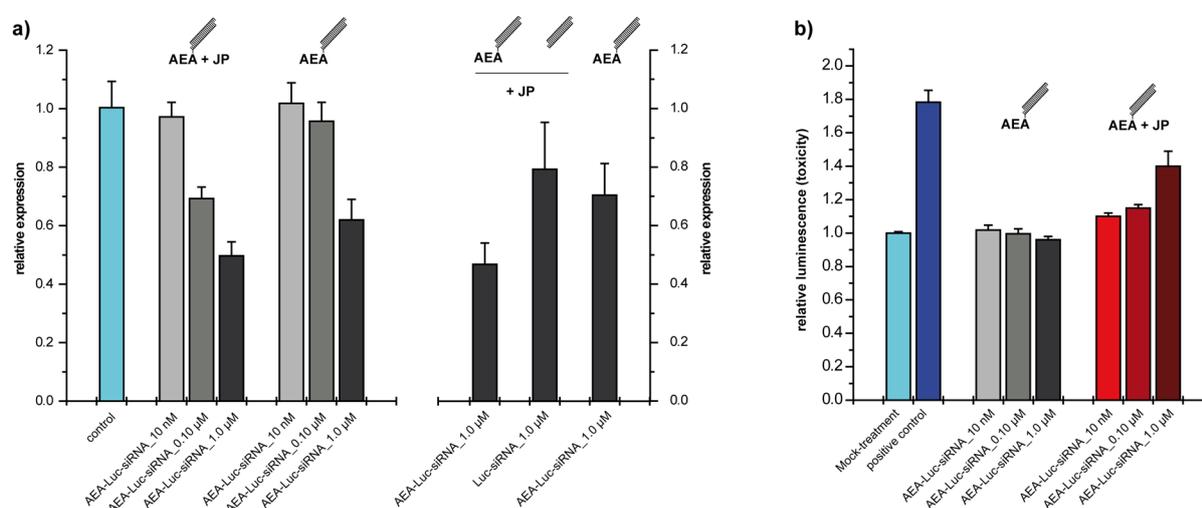


Figure II Anandamide-siRNA in comparison to a commercially available transfection reagent (*jetPRIME*). The efficacy in the down-regulation of a *Renilla*-luciferase was compared (a) together with the toxicological properties. This was done in cooperation with the group of *Prof. Conzelmann* (b). AEA = Anandamide, JP = *jetPRIME*.

In the second part of the thesis, a novel branched siRNA was developed. Thereby, anandamide mediated transport should be optimized by raising the payload of a single ligand. Therefore, anandamide derivatives were synthesized with multiple azide functionalities (Figure III, **1** and **2**). Furthermore, a folic acid triazide **3** was synthesized to transfer the concept of dendritic structures to the folate system. Folate-conjugates allow a specific transport into cancer cells.^[4]

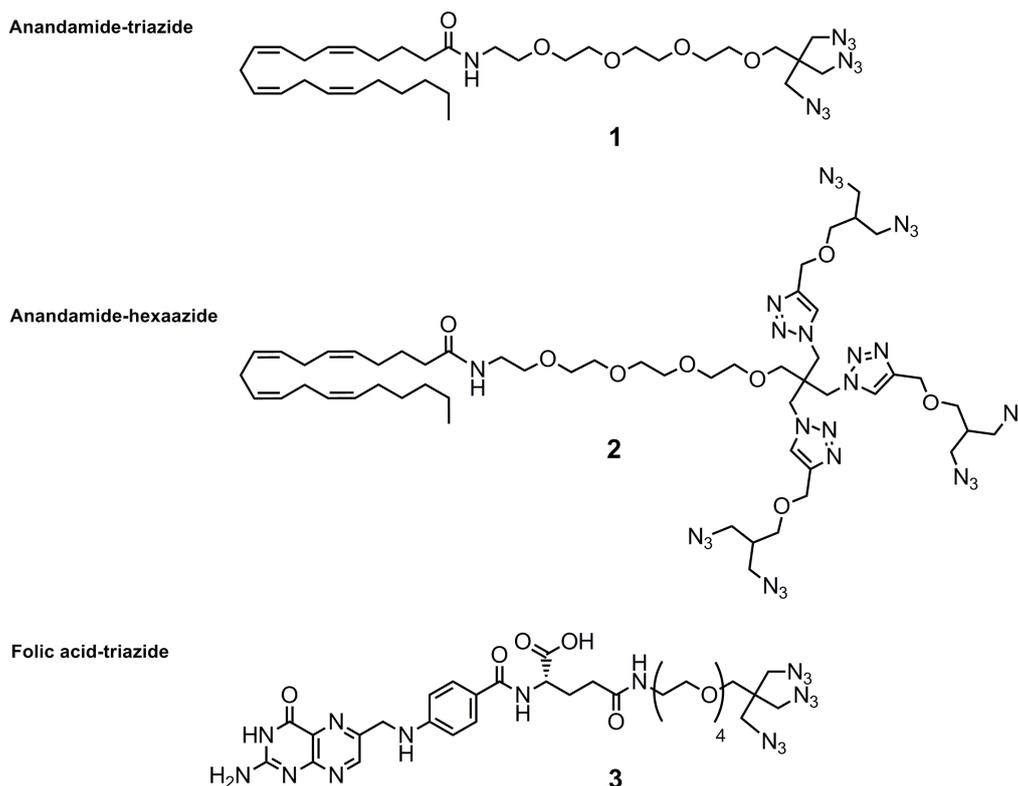


Figure III Ligands with multiple azide functionalities as an anandamide-tri- **1** and hexaazide **2** were synthesized. In addition, a folic acid-triazide **3** was synthesized to enable a transfection of cancer cells.

The synthesized azides were attached to alkyne modified RNA oligonucleotides by click chemistry. Thus, multimeric structures with three, six or nine siRNAs per ligand were synthesized. It turned out, that the trimeric anandamide-siRNA achieved the best down-regulations in relation to the monomeric siRNA structure (Figure IVa,b). By increasing the number of siRNA arms no further optimization of suppression efficiency was observed. Trimeric folate-siRNA also leads to an enhanced regulation in comparison to the monomeric siRNA duplex (Figure IVc). Therefore, the concept of branched structures was successfully transferred to a different ligand system.

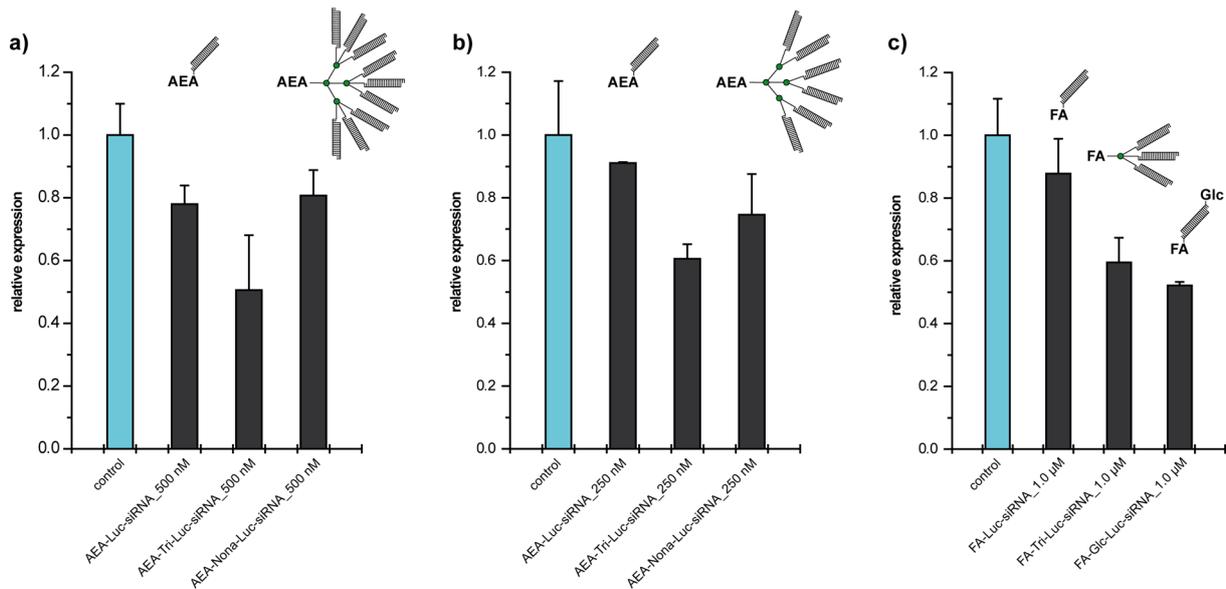


Figure IV Down-regulation of a *Renilla*-luciferase by new branched siRNAs. Trimeric siRNAs achieved enhanced regulations in case of anandamide (**a**, **b**) as well as folic acid (**c**) in relation to the monomeric structure. AEA = Anandamide, FA = Folic acid, Glc = Glucose.

As siRNAs are double stranded structures, the modification of the antisense strand allows the incorporation of further functionalities. *Julian Willibald* showed, that the connection of glucose leads to an increased down-regulation. Thereby, a second way of uptake utilizing glucose binding proteins is addressed, which was investigated within this thesis (Figure V). In addition, a cyclodextrin modified anandamide-siRNA was synthesized. This resulted in an enhanced silencing effect without addressing a second uptake pathway.^[5]

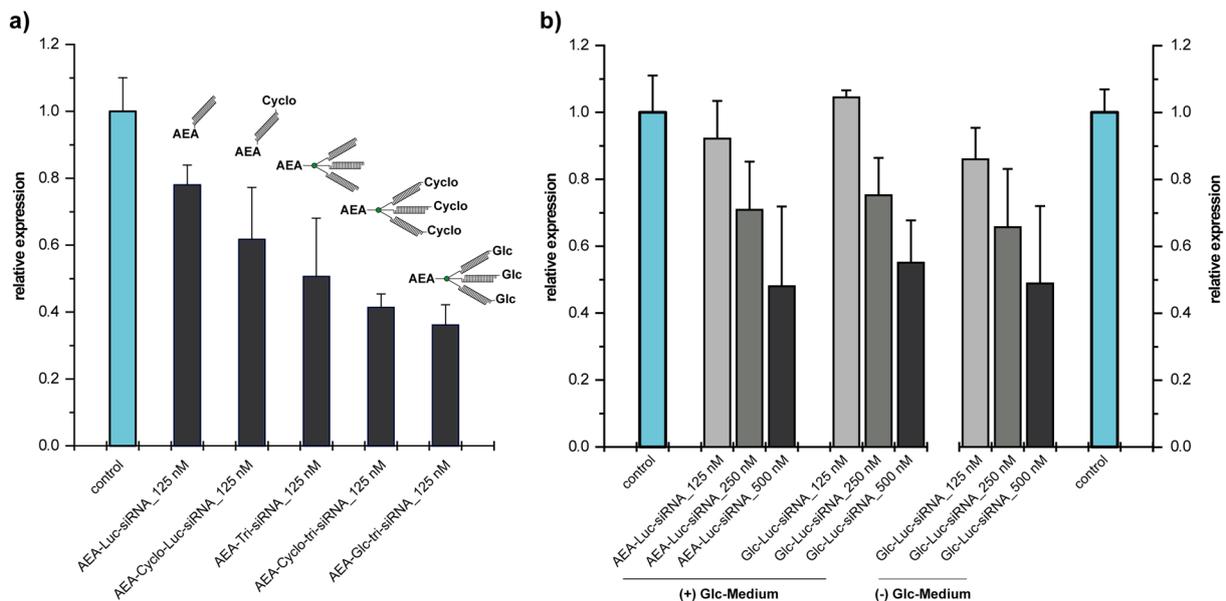


Figure V Down-regulation of a *Renilla*-luciferase with different various siRNAs. The introduction of cyclodextrins resulted in an enhanced silencing effect (**a**). Glucose-siRNA without anandamide modification is able to regulate the reporter enzyme (**b**). This was enhanced by using glucose free medium ((-)Glc) demonstrating an active transport of the glucose-siRNA. AEA = Anandamide, Cyclo = Cyclodextrin, Glc = Glucose.

After successful optimization of the anandamide-siRNA system by novel branched structures, the applicability of the developed system was demonstrated in several collaborations. Stem cells have an enormous potential in the field of regenerative medicine. For the control of differentiation RNA-interference is an important tool. Together with *Fabio Spada* a successful transport of anandamide-siRNA into neural stem cells was demonstrated. This was shown by regulating Tet1, a key-enzyme in the process of DNA-demethylation (Figure VIa).^[6] Consistently with earlier studies, the trimeric structure in relation to the monomeric siRNA achieved an enhanced down-regulation of transcript level.

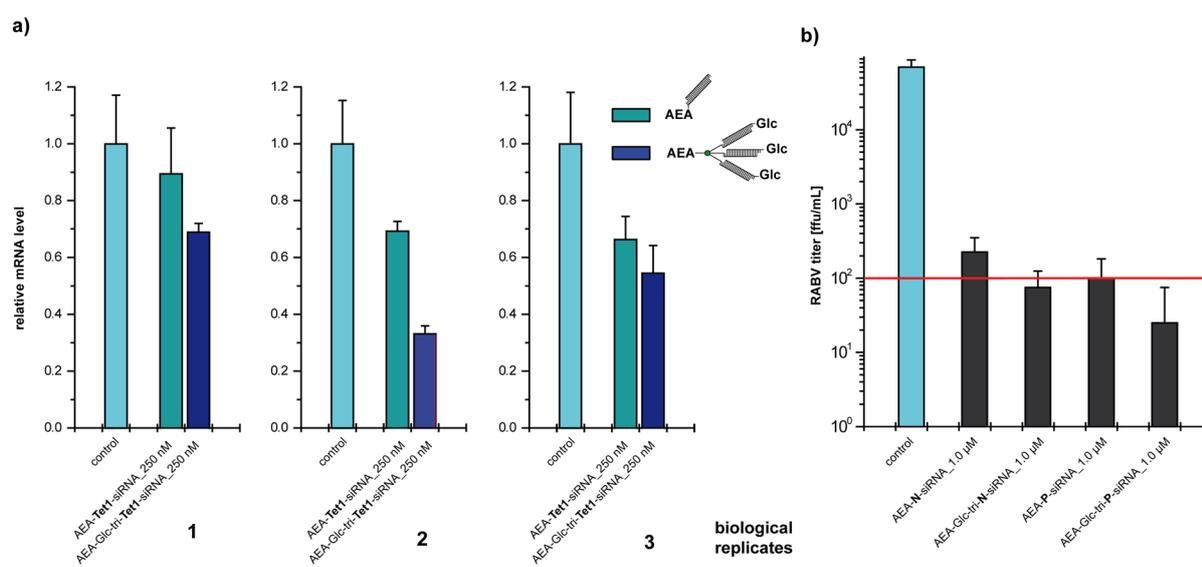


Figure VI Down-regulation of Tet1 in neural stem cells (a) as well as down-regulation of rabies-proteins (N-, P-protein) in Jurkats (b). AEA = Anandamide, Glc = Glucose.

The therapeutic potential of anandamide-siRNA was further emphasized by an additional collaboration together with the group of *Prof. Conzelmann*. Within this cowork, rabies-proteins were suppressed by anandamide-siRNA. The course of the disease is to this date almost exclusively fatal. It was successfully demonstrated that the trimeric siRNA structure reduces the viral titer by three orders of magnitude (Figure VIb). Additionally, different anandamide-siRNAs were synthesized for *in vivo* experiments with rabies infected mice in cooperation with *Prof. Schwemmler* (University of Freiburg). If those structures are able to cure the infected mice remains to be clarified.

1 Einleitung

Die schnelle Identifizierung hochpotenter sowie spezifischer Medikamente stellt für traditionell pharmazeutische Ansätze eine gewaltige Herausforderung dar. In der pharmazeutischen Industrie werden bisher niedermolekulare Wirkstoffe sowie Antikörper eingesetzt. Die Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe ist jedoch mit hohen Kosten und zeitintensiven Screening-Prozessen verbunden, während bei Antikörpern die Produktion eine große Herausforderung darstellt. So ist es oft sehr schwierig akzeptable zelluläre Protein-Produktions-Level zu erreichen.^[7]

Auf Nukleinsäuren basierende Medikamente stellen vielversprechende Kandidaten einer neuen Klasse von biologischen Therapeutika dar. Insbesondere die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) könnte dabei einen erheblichen Beitrag leisten. Es handelt sich um einen zellulären Vorgang, welcher ein spezifisches Stummschalten (*silencing*) von Genen ermöglicht. Durch RNAi kann jedes beliebige Gen inhibiert werden, also nicht nur Zielstrukturen, welche sich durch traditionelle niedermolekulare Wirkstoffe (*drugable Targets*) adressieren lassen.^[8]

Da es sich jedoch bei Oligonukleotiden um mehrfach negativ geladene Makromoleküle handelt, können diese hydrophobe Zellmembranen nur schwer passieren. Der spezifische Transport von Nukleinsäuren in die Zellen des Zielgewebes stellt daher bei der Entwicklung von RNAi für therapeutische Ansätze eine große Herausforderung dar. In folgenden Kapiteln soll die Technik der RNA-Interferenz, Ansätze zum Nukleinsäuren-Transport sowie bereits durchgeführte klinische Studien vorgestellt werden.

1.1 RNA-Interferenz

Bei RNA-Interferenz handelt es sich um einen zellulären Vorgang, bei welchem kurze doppelsträngige RNA-Moleküle die Expression eines Gens sequenzspezifisch, durch Degradation der mRNA, inhibieren können.^[2] Dieser Prozess wurde ursprünglich in Pflanzen entdeckt,^[9] jedoch erst für den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* korrekt beschrieben,^[10] wofür *Andrew Fire*^[2a] sowie *Craig Mello*^[2b] 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden. Es handelt sich um einen in der Natur konservierten Vorgang der wahrscheinlich als Abwehrmechanismus gegen Viren dient.^[11] Bei natürlicher RNA-Interferenz wird lange dsRNA durch die Endonuklease Dicer zu kürzeren Doppelsträngen prozessiert,^[12] welche als siRNAs (*short interfering RNA*) bezeichnet werden. Dabei besteht

der siRNA-Duplex (Abbildung 1.1) aus dem so genannten *antisense*- bzw. *guide*-Strang sowie *sense*- oder *passenger*-Strang mit jeweils 21 Nukleotiden.

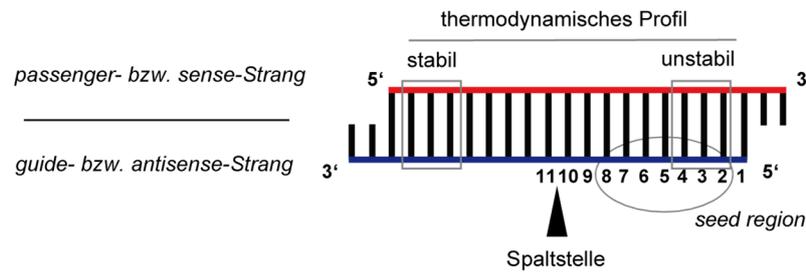


Abbildung 1.1 Struktur einer siRNA. Der Duplex besteht aus zwei Strängen mit jeweils 21 Nukleotiden, wobei 2 Nukleotide an den 3'-Enden einen Überhang bilden. Der *guide*-Strang ist dabei komplementär zur adressierten mRNA, während der *passenger*-Strang zu dieser homolog ist. Dabei werden häufig Desoxythymidine eingesetzt, was zu einer erhöhten Stabilität führt und die Erkennung der mRNA nicht beeinträchtigt. Dargestellt ist auch die Spaltstelle der komplementären Ziel-mRNA. Zusätzlich ist die *seed*-Region gekennzeichnet, welche eine wichtige Rolle bei der Erkennung der mRNA spielt.

In Abbildung 1.2 ist der Mechanismus von RNAi vereinfacht dargestellt der im Folgenden kurz beschrieben wird. Im ersten Schritt von RNAi erfolgt die Bindung der siRNA an den *RNA induced silencing complex* (RISC). Durch einen Gradienten der thermodynamischen Stabilität des Duplexes kann nun zwischen *passenger*- und *guide*-Strang unterschieden werden. Der Strang, welcher im Duplex an seinem 5'-Ende eine geringere thermodynamische Stabilität, also einen hohen A/T-Gehalt aufweist, wird nach *Khvorova et al.* signifikant häufiger als *guide*-Strang ausgewählt.^[13] Schließlich leitet das Protein Argonaut 2 (Ago 2) durch Spaltung des *passenger*-Strangs dessen Freisetzung sowie die Aktivierung des RISC ein.^[14] Durch komplementäre Basenpaarung vermittelt der im Komplex verbleibende Strang (*guide*-Strang) die Erkennung der Ziel mRNA. Dabei hat die so genannte *seed*-Region besondere Bedeutung, da an dieser Stelle vermutlich die Wechselwirkung mit der Ziel-mRNA beginnt.^[15] An einer spezifischen Stelle, zehn Nukleotide vom 5'-Ende des *guide*-Stranges, wird schließlich die mRNA ebenfalls durch Argonaut 2 gespalten.^[16] Diese wird dann durch *RNasen* abgebaut, da an der gespaltenen Stelle stabilisierende Elemente, wie die *Cap*-Struktur am 5'- oder der Poly-A-Schwanz am 3'-Ende fehlen. Anschließend leitet RISC die Spaltung einer weiteren Ziel-mRNA ein.^[1] Es handelt sich somit um einen katalytischen Prozess, wodurch sich RNA-Interferenz von bisherigen Antisense-Techniken unterscheidet, wobei siRNA bis zu 1000 Mal effizienter gegen die Expression eines Zielmoleküls wirken kann.^[17]

Doppelsträngige RNA mit mehr als 30 Nukleotiden führt in Säugerzellen zu einer unspezifischen Interferon-Antwort, wobei es sich um einen natürlichen Abwehrmechanismus insbesondere gegen virale RNA handelt. Es kommt dabei zur Aktivierung der Proteinkinase R (PKR), wodurch ein vollständiger Stopp der Proteinsynthese in den Zellen ausgelöst wird.^[18]

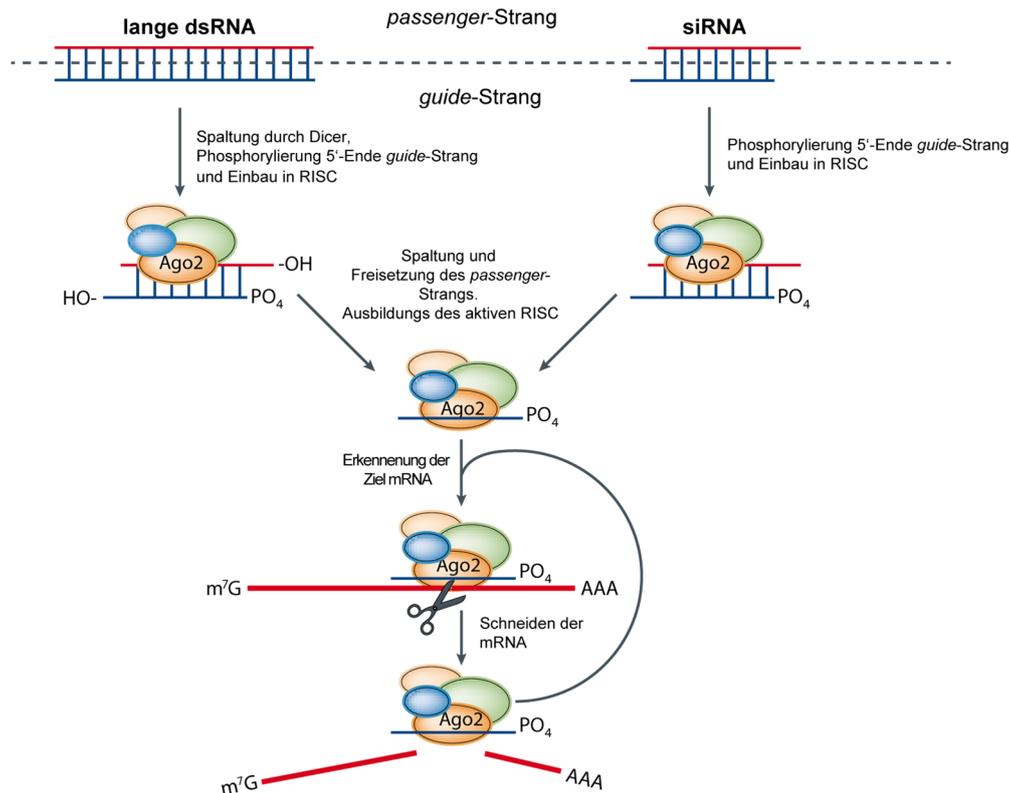


Abbildung 1.2 Vereinfachter Mechanismus von RNA-Interferenz in Säugerzellen. Lange dsRNA wird zunächst durch Dicer zu den typischen siRNA-Strukturen prozessiert. Nach Phosphorylierung des 5'-Endes des *guide*-Strangs spaltet das Protein Argonaut 2 (Ago 2) den *sense*-Strang, wodurch dieser freigesetzt wird und der aktivierte RISC entsteht. Der *antisense*-Strang vermittelt durch komplementäre Basenpaarung die Erkennung der Ziel mRNA, welche ebenfalls von Ago 2 gespalten wird. Nach der Freisetzung dieser mRNA leitet RISC die Spaltung weiterer Ziel-mRNA-Stränge ein. Chemisch synthetisierte siRNA tritt zu einem späteren Zeitpunkt in den geschilderten Mechanismus ein. So muss diese nicht durch das *Dicer*-Protein prozessiert werden, sondern kann nach Phosphorylierung am 5'-Ende des *guide*-Strangs direkt vom RISC gebunden werden. Abbildung nach *Castanotto et al.*^[3]

Daher war es zunächst nicht möglich, das in Eukaryoten wie *C. elegans* oder *D. melanogaster* durchgeführte, spezifische Ausschalten von Genen auf Säugerzellen zu übertragen. Erst *Tuschl et al.* konnten zeigen, dass RNA-Interferenz auch in Säugerzellen durch chemisch synthetisierte 21mere siRNA möglich ist.^[19] Diese wird zunächst durch die Kinase hClp1 (*human Clp1*) am 5'-Ende des *guide*-Strangs phosphoryliert und kann, wie zuvor beschrieben, zur Regulation der Proteinexpression führen.^[20] Zusätzlich lieferte *Davis et al.* 2010 den ersten Nachweis, dass auch Gene in menschlichen Patienten durch RNA-Interferenz reguliert werden können.^[21]

1.2 Chemische Modifizierung von siRNAs

Für die erfolgreiche therapeutische Anwendung von RNAi muss die Stabilität von siRNAs gesteigert werden. So ist es insbesondere für *in vivo* Anwendungen notwendig, die Resistenz gegenüber Nukleasen zu erhöhen.^[22] Die chemische Modifizierung von siRNA liefert daher

entscheidende Vorteile.^[23] So kann durch chemische Modifizierung neben einer gesteigerten Resistenz gegen *RNasen*, eine geringere Immunantwort sowie eine Reduzierung von *off-target* Effekten, also unspezifischen Proteinregulationen, erreicht werden (Abbildung 1.3). Wichtig ist dabei, dass die eingeführten Modifikationen die Aktivität der siRNA nicht beeinträchtigen. Dazu müssen die unterschiedlichen Funktionen der beiden RNA-Stränge der siRNA bedacht werden. Nur der *guide*-Strang wird in den aktiven RISC eingebaut und führt diesen Komplex zu der Ziel-RNA. Der *passenger*-Strang hingegen wird bei der Beladung des RISC verworfen, so dass dieser Modifikationen eher tolerieren sollte.^[8] Von besonderer Bedeutung ist außerdem die Hydroxylgruppe am 5'-Ende des *guide*-Strangs, welche zu Beginn des RNAi-Weges phosphoryliert wird. Somit sollte diese Position nicht chemisch modifiziert werden, um die Initiierung der RNA-Interferenz nicht zu beeinträchtigen.^[24] Innerhalb der in Kapitel 1.1 beschriebenen *Seed*-Region, an welcher die Wechselwirkung mit der Ziel mRNA beginnt, sollten ebenfalls keine Sonderbasen eingeführt werden.^[25]

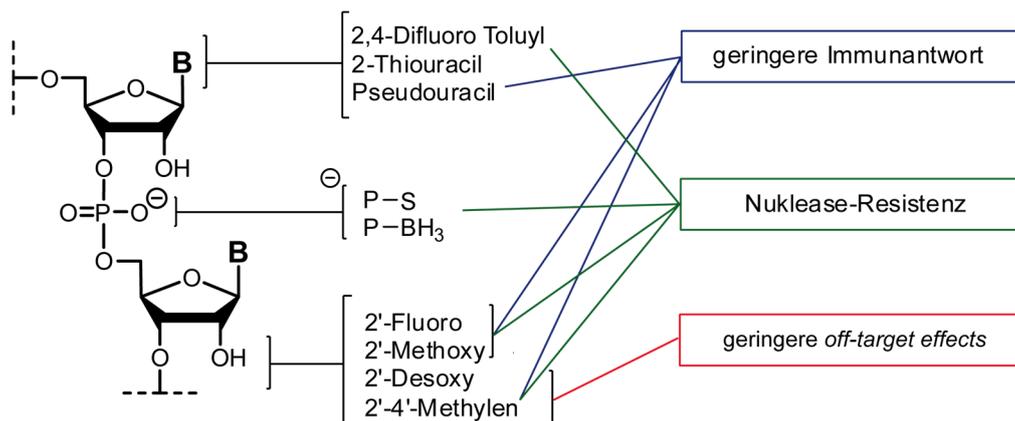


Abbildung 1.3 Ansätze zur Stabilisierung von RNA. Durch Modifizierung der RNA-Basen, dem Phosphat-rückgrad sowie der 2'-OH Position der Ribose kann die Wirksamkeit einer siRNA gesteigert werden. Dabei werden durch die exemplarisch aufgeführten Modifizierungen eine geringere Immunantwort in der Zelle, eine Reduktion der *off-target effects* (unspezifische Proteinregulation) sowie eine erhöhte Nuklease-Resistenz erreicht.

Prinzipiell gibt es zur Modifizierung von siRNA drei Angriffspunkte: So kann das RNA-Rückgrad, die Base sowie die 2'-OH-Gruppe der Ribose chemisch modifiziert werden. Die dabei wichtigsten Ansatzpunkte sind in Abbildung 1.3 zusammengefasst und sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Der Einbau von 2-Thiouracil bzw. Pseudouracil führen zu einer effektiveren Genregulation bzw. zu einer geringeren Immunantwort, während durch das 2,4-Difluoro-Toluy-Motif die Nuklease-Resistenz erhöht wird.^[26] Insgesamt findet jedoch der Einsatz modifizierter Basen nur wenig Aufmerksamkeit.

Eine deutlich höhere Relevanz besitzt die chemische Substituierung der 2'-Position der Ribose. Diese hat sich als vorteilhaft erwiesen, da es sich dabei um kein essentielles Strukturmerkmal

der siRNA für RNA-Interferenz handelt.^[27] In ersten Arbeiten wurde dabei 2'-Methoxy-^[28] sowie 2'-Fluoro-Basen^[29] eingesetzt. Aufgrund des geringen Atomradius von Fluor wird die Funktionalität der siRNA im Gegensatz zu den sperrigen Methoxy-Gruppen nicht gravierend beeinflusst,^[30] während gleichzeitig die Stabilität erhöht wird. So genannte *locked nucleic acids (LNA)* haben sich als besonders resistent gegenüber *RNasen* herausgestellt und werden sehr gut durch RISC erkannt.^[31] Dabei wurde der 2'-Sauerstoff sowie der 4'-Kohlenstoff der Ribose durch eine Methylengruppe verbrückt. Durch *locked nucleic acids* ist desweiteren eine gezielte Steuerung des thermodynamischen Gradienten im Duplex (siehe Abbildung 1.1) möglich. Somit kann die Wahrscheinlichkeit, dass der *guide*- und nicht der *passenger*-Strang in den aktiven RISC eingebaut wird erhöht und dadurch unspezifische Suppression von Genen (*off-target* Effekte), reduziert werden.^[32] Alle drei hier vorgestellten 2'-Zucker-Modifizierungen führen auch zu einer reduzierten Immunantwort innerhalb der Zelle.^[33]

Ein weiterer Ansatzpunkt stellt das Phosphatrückgrat dar. Häufig werden dabei nicht-Brücken-Sauerstoffatome gegen Schwefelatome ausgetauscht.^[34] Diese Modifizierung wird von der RNAi-Maschinerie sehr gut toleriert und erzeugt eine hohe Stabilität gegenüber *RNasen*. Zusätzlich ist deren Einbau im Gegensatz zu RNA-Sonderbasen relativ preisgünstig. Bei einem zu hohen Anteil der Thioate wurden jedoch toxische Nebeneffekte beobachtet.^[28, 35] Des Weiteren entstehen durch den Thioat-Einbau chirale Phosphor-Spezies. Werden somit n-Thioate in das Phosphat-Rückgrat eingebaut, entstehen 2ⁿ diastereomere Oligonukleotide. Es hat sich herausgestellt, dass jedes dieser Diastereomere unterschiedliche Wechselwirkung mit Enzymen eingeht. Allerdings stellt die Synthese stereochemisch definierter Oligonukleotide bisher noch eine sehr große Herausforderung dar.^[36]

1.3 Kommerzielle Aspekte von RNA-Interferenz

Seit der Entdeckung von RNA-Interferenz durch *Fire* und *Mello* 1998 und Arbeiten von *Tuschl et al.* 2001, welche spezifische RNA-Interferenz auch in Säugerzellen ermöglichten, ist diese neuartige Technik auch von hohem kommerziellem Interesse.^[37] So investierte *Merck* 2006 1.1 Mrd. Dollar für die Übernahme von *Sirna Therapeutics* (früher *Ribozyme Pharmaceuticals*, San Francisco), was das erste deutliche Zeichen dafür war, dass auch die Pharma-Industrie der neuen Technologie große Bedeutung beimisst.^[8] Deren Bedeutung wurde durch die Verleihung des Nobel-Preises an *Fire* und *Mello* im selben Jahr unterstrichen. Die Anwendung von RNA-

Interferenz ist durch einige grundlegende Patente geschützt (Tabelle 1.1), welche im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Tabelle 1.1 Zusammenfassung wichtiger Patente zu RNA-Interferenz.^[38] *Alnylam* besitzt Lizenzen für die *Tuschl I* bzw. *II*, *Crooke* und *Kreutzer-Limmer* Patente. *Tuschl I* wurde an *Alnylam*, *Sirna* und *Cytrx* lizenziert.

Patent	Besitzer	Abdeckung
<i>Fire and Mello</i> (US 6.506.559)	<i>Carnegie Institute of Washington</i>	Inhibierung von Genen durch doppelsträngige RNA mit einer Länge von 25 Nukleotiden oder mehr.
<i>Tuschl I</i> (US 8.420.391, US 8.445.237)	<i>UMass Medical School, MIT, MPI, Whitehead Institute</i>	Inhibierung von Genen durch doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden. Beinhaltet Überhänge, chemische Modifizierungen und Daten von menschlichen Zellen.
<i>Tuschl II (Serie)</i> (US 7.056.704, US 7.078.196)	<i>MPI</i>	Kurze RNA Fragmente mit der Länge von 19-23 Nukleotiden ermöglichen eine sequenzspezifische RNA-Interferenz in <i>Drosophila melanogaster</i> . Beschreibung der 3'-Überhänge. Verwendung von siRNA in menschlichen Zellen. Detailliertere Beschreibung der Verwendung von RNAi in menschlichen Zellen.
<i>Crooke (Serie)</i> (US 6.107.094, US 5.898.221)	<i>Isis</i>	Chemische Modifizierungen zur Stabilisierung von RNA.
<i>Kreutzer-Limmer</i> (EP 1.144.623)	<i>Alnylam</i>	RNA-Interferenz ausgelöst durch doppelsträngige RNA mit einer Länge von 15-21 Nukleotiden.

Fire und *Mello* sind Inhaber des so genannten *Carnegie*-Patents, benannt nach dem *Carnegie Institute in Washington*. Dieses Patent beschreibt zwar, wie doppelsträngige RNA Gene in Zellen stilllegen können, es hat jedoch einige grundlegende Limitierungen. So bezieht es sich nur auf RNA-Moleküle mit einer Länge von 25 Nukleotiden oder mehr. Bei dieser Länge wird jedoch in Säugerzellen die so genannte Interferon-Antwort ausgelöst, was zu einem kompletten Stopp der zellulären RNA-Synthese führt und einen klinischen Einsatz verhindert.^[38]

Erst die Arbeiten von *Thomas Tuschl* vom Max Plank Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, *Philip Sharp* am MIT, *Philip Zamore* an der *UMass Medical School* sowie *David Bartel* am *Whitehead Institute* stellten heraus, dass diese Antwort bei dem Einsatz von kürzeren Oligonukleotiden ausbleibt und somit spezifisches *Silencing* ausgelöst werden kann. Diese bahnbrechende Entdeckung ist durch ein fundamentales Patent - *Tuschl I* - geschützt und beinhaltet modifizierte sowie unmodifizierte siRNAs mit 19 bis 23 Oligonukleotiden Länge. Obwohl dieses bereits im Jahr 2000 veröffentlicht wurde, steht die Erteilung noch aus. Die Ursachen dafür werden von dem USPTO (*United States Patent and Trademark Office*) nicht

kommentiert. Drei der vier Forschungseinrichtungen, welche an der Entdeckung beteiligt waren, erklärten sich bereit, *Tuschl I* an die Firma *Alnylam*, welche unter anderem durch *Thomas Tuschl* mitbegründet wurde, zu lizenzieren.

Tuschl führte schließlich weitere Experimente durch, welche zu einer neuen Patentschrift, nämlich *Tuschl II*, führte. Dieses wurde im Gegensatz zu *Tuschl I* bereits erteilt (Juni 2006) und exklusiv an *Alnylam* lizenziert. Dass *Tuschl I* bisher nicht erteilt wurde, führt zu einer komplizierten Situation, da zusätzlich die Tragweite beider Patente als umstritten gilt.^[38]

Von Bedeutung sind des Weiteren die so genannten *Kreutzer-Limmer* Patente. Diese wurden in Europa erteilt, jedoch noch nicht in den USA und beinhalten doppelsträngige RNA mit 15 bis 49 Basenpaaren. Auch wird darin die Verknüpfung der Gegenstränge durch einen Linker geschützt, wodurch die Stabilität gegenüber enzymatischem oder chemischem Abbau gesteigert werden kann. Dieses Strukturmerkmal wird jedoch kaum verwendet und ist daher nicht von kommerziellem Interesse.^[38] Die frühesten Patente, welche Relevanz für RNA-Interferenz besitzen, gehen auf die vorhergehende antisense-Technologie zurück. So beschreiben die *Crooke*-Patente chemische Modifizierungen zur Stabilisierung von RNA. Diese wurden von *Stan Crooke*, dem CEO von *Isis Pharmaceuticals*, entwickelt und sind auch exklusiv an *Alnylam* lizenziert. *Isis Pharmaceuticals* ist das einzige Pharmaunternehmen, welches bereits ein Medikament, basierend auf der antisense-Technologie vermarktet.^[39] Sehr prominente Modifizierungen wie 2'-Methoxy-Gruppen (bereits in den 80er Jahren entwickelt) werden durch die *Crooke*-Patente jedoch nicht abgedeckt.^[38]

Der Nutzen von RNA-Interferenz als therapeutisches Werkzeug steht insbesondere durch das nicht gelöste Transport-Problem in Zellen vor großen wissenschaftlichen Herausforderungen.^[40] Da es sich bei siRNAs um negativ geladene Makromoleküle handelt, sind diese nicht in der Lage Zellmembranen zu passieren. Das Ausmaß dieses Transportproblems ist daran zu erkennen, dass sich Pharma-Konzerne wie *Roche*, *Novartis* und *Pfizer* trotz hoher bereits getätigter Investitionen aus dem Geschäft zurückzogen. *Novartis* machte dabei den Anfang und beschloss einen 5 Jahres-Vertrag für Lizenzen zur Teilhabe an *Alnylam's* geistigem Eigentum nicht zu verlängern. *Roche* gab daraufhin mit der Schließung von *Roche Kulmbach* Ende 2010 bekannt, sich trotz bereits getätigter Investitionen in Höhe von einer halben Milliarde Dollar aus dem Gebiet zurück zu ziehen. Die Oligonukleotid-Abteilung des Konkurrenten *Pfizer* mit rund 100 Mitarbeitern wurde nur ein Vierteljahr danach geschlossen.^[39] Dies macht deutlich, dass letztendlich nicht ausschließlich das geistige Eigentum um RNA-Interferenz entscheidend ist, sondern insbesondere neuartige Ansätze entwickelt werden müssen, um das Transport-

Problem lösen zu können. Die dabei wichtigsten Ansätze sollen im Folgenden vorgestellt werden.

1.4 Hindernisse bei dem Transport von Nukleinsäuren

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, ist trotz des enormen Potentials von RNA-Interferenz der klinische Erfolg siRNA basierender Therapien bisher gering. Gezielt siRNA in die Zellen des betroffenen Gewebes zu transportieren, stellt dabei die größte Herausforderung dar.

Aufgrund ihrer hohen negativen Ladung können siRNAs nicht einfach durch die hydrophoben und an der extrazellulären Seite ebenfalls negativ geladenen Zellmembranen des Zielgewebes diffundieren. Die Oberfläche von menschlichen Zellen kann man sich analog zu einem Wald vorstellen, wobei Phospholipid-Kopfgruppen den Boden und extrazelluläre Domänen von Transmembranproteinen die Krautschicht darstellen. Die Baumschicht besteht aus Oligosaccharid-Einheiten von Glycolipiden und Glycoproteinen, wobei diese Schicht als Glycocalyx bezeichnet wird. Diese besitzt analog zu den Phospholipiden viele negative Ladungen, welche insbesondere durch die Carboxylgruppen von Sialinsäuren sowie Carboxyl- bzw. Sulfatgruppen von Glycosaminoglycanen hervorgerufen werden.^[41] Ebenfalls negativ geladene siRNAs werden somit von dieser Schicht elektrostatisch abgestoßen.

Da die zelluläre Aufnahme von siRNA zusätzlich meist über Endozytose vermittelt wird, muss die siRNA in einem weiteren Schlüsselschritt aus den Endosomen freigesetzt werden, um im Cytoplasma eine Proteinregulation bewirken zu können. Es ist somit leicht ersichtlich, dass für einen effizienten und systemischen Transport unterstützende Systeme notwendig sind, welche im Folgenden vorgestellt werden sollen.

1.5 Systeme für den Transport von siRNA

Prinzipiell unterscheidet man zwischen viralem und nichtviralem Transport. Bei viralen Trägern handelt es sich um äußerst effiziente Gentransfer-Systeme. Sie sind jedoch in ihrer Wirkung schwer berechenbar und können bei gentherapeutischen Anwendungen eine starke Immunantwort hervorrufen.^[42] Somit haben sich nichtvirale Systeme trotz geringerer Transfektionseffizienz als vorteilhafter erwiesen. Nichtvirale Systeme werden in zellspezifischen bzw. unspezifischen Transport untergliedert (Abbildung 1.4).^[8]

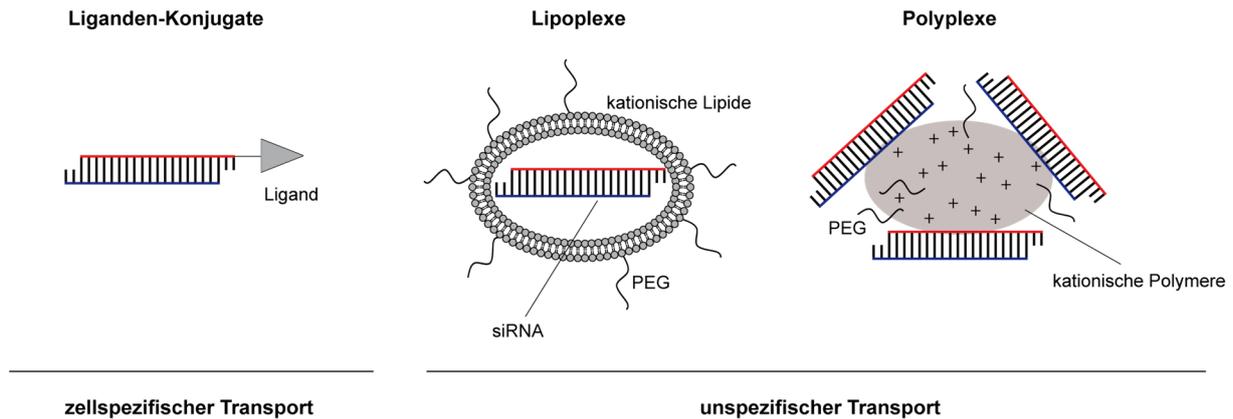


Abbildung 1.4 Strategien für den nichtviralen Transport (zellspezifisch bzw. unspezifisch) von siRNA. PEG = Polyethylenglycol.

Durch direkte, kovalente Konjugation von Liganden an siRNA kann ein zellspezifischer Transport ermöglicht werden. Die Verwendung kationischer Lipide oder Polymere unter der Ausbildung von Lipo- bzw. Polyplexen ermöglicht einen sehr effizienten, jedoch zellunspezifischen Transport.

1.5.1 Lipo- und Polyplexe für den Transport von siRNA

Für den Transport von siRNA kann die molekulare Selbstaggregation positiv geladener Lipide genutzt werden. Diese formen dabei Liposomen, welche wässrige Kompartimente umschließen und Lipid-Nanopartikel (LNP) ausbilden. Solche Formulierungen beinhalten häufig auch so genannte fusogene Lipide (neutrale Helfer-Lipide), welche die Größe, Einheitlichkeit und Stabilität der Partikel beeinflussen.^[43] Die negativ geladenen Nukleinsäuren werden in den Partikeln, unter der Ausbildung von Lipoplexen, eingelagert und können endosomal von den Zellen aufgenommen werden. Für die Assoziation mit der Zellmembran sowie endosomale Freisetzung spielen die kationischen Lipide dieser Partikel eine wichtige Rolle.^[44] So interagieren während der endosomalen Aufnahme die positiv geladenen Lipide der Formulierung mit den negativ geladenen Phospho-Lipiden der Zellmembran. Dies führt zu einem Phasenübergang der lamellaren Lipidstruktur hin zu einer invertierten hexagonalen Struktur (H_{II}).^[45] Während dieses Phasenübergangs kann die siRNA-Fracht freigesetzt werden (Abbildung 1.5). Die kationischen Lipide besitzen typischerweise einen $pK_a < pH 7$, wodurch eine geringe Oberflächenladung bei physiologischem pH von 7.4 im Blut vorliegt. Erst in der sauren Umgebung der Endosomen steigt die positive Oberflächenladung, was die endosomale Freisetzung erleichtert.

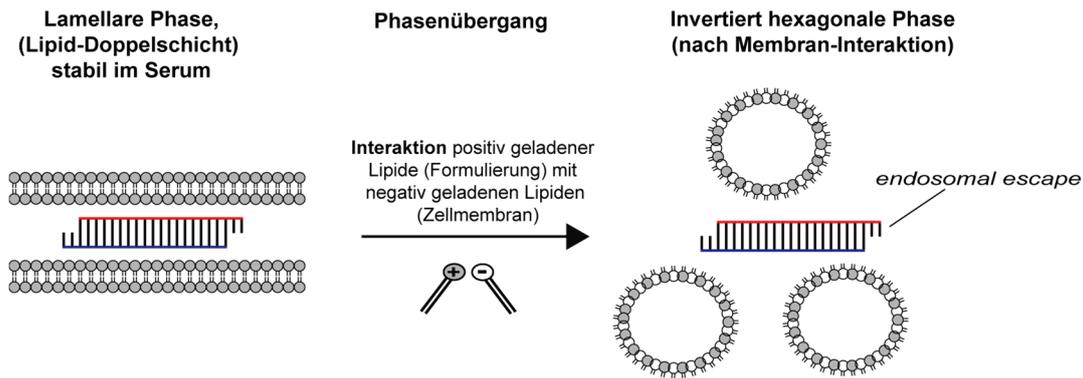


Abbildung 1.5 Vereinfachte schematische Darstellung der endosomal Freisetzung von siRNA formuliert mit kationischen Lipiden. Nach Interaktion mit der Membran und Aufnahme durch Endozytose kommt es zu einer elektrostatischen Interaktion der positiv geladenen Lipide (Formulierung) mit den negativ geladenen Lipiden der Zellmembran. Dies führt zu einem Phasenübergang der im Serum stabilen lamellaren Phase zu einer invertiert hexagonalen Phase (H_{II}), welche den *endosomal escape* der siRNA erleichtert.

Die Kombination aus kationischen bzw. fusogenen Tensiden, partiell modifiziert mit Polyethylenglycolen, führt zu einer Stabilisierung der Lipid-Nanopartikel sowie einer verlängerten Zirkulations-Halbwertszeit im Blut. Diese Partikel werden auch *Stable Nucleic Acid-Lipid Particles*, kurz SNALPs, bezeichnet und wurden insbesondere von *Tekmira* weiterentwickelt. Diese zeichnen sich desweiteren durch eine sehr kleine (ca. 70 nm) und einheitliche Partikelgröße aus und wurden bereits in nicht humanen Primaten sowie in klinischen Studien erprobt.^[46] So konnte in Javaneraffen nach intravenöser Injektion mit einer siRNA Dosis von 2.5 mg/kg die Expression des Apolipoproteins B (ApoB) durch den Einsatz von SNALPs reguliert werden, was zu einem verringerten *low-density* Lipoprotein (LDL) Level im Serum führte.^[47] ApoB kann durch konventionelle Therapie-Methoden nicht adressiert werden und erhöhte ApoB bzw. LDL-Level stehen im Zusammenhang mit Hypercholesterinämie, welche zu Arteriosklerose führen kann.

Für den Nukleinsäuretransport durch polymerbasierte Systeme werden meist lineare oder verzweigte Polyethylenimine (PEI), ebenfalls häufig modifiziert mit Polyethylenglycolen, eingesetzt. Diese sind bereits bei neutralem pH-Wert zu etwa 20 % protoniert und somit positiv geladen.^[48] Mit den negativ geladenen siRNAs können diese Polymere daher so genannte Polyplexe eingehen, welche die negative Ladung der siRNA kompensieren. Diese bisher nur schlecht charakterisierten Aggregate können elektrostatisch mit der extrazellulären Seite der Zellmembran interagieren, wodurch eine endozytotische Aufnahme ausgelöst wird. Es kommt zur typischen Azidifizierung des Endosoms, wobei die Protonen durch das Polyethylenimin, welches wie ein „Protonen-Schwamm“ wirkt, abgefangen werden. Da die Protonen so dem Gleichgewicht entzogen werden, kommt es zu einem kontinuierlichen Protonenfluss in das Endosom. Um einen Ladungsausgleich zu bewirken, werden Chlorid-Ionen in das

Kompartiment gepumpt und somit ein starker osmotischer Druck erzeugt. Dieser wird durch den Zufluss von Wasser verringert, was letztendlich zu einem Anschwellen und Platzen des Endosoms führt, so dass die siRNA ins Cytoplasma freigesetzt werden kann.

Trotz der hohen Transfektionseffizienz der kationischen Lipo- und Polyplexe ist jedoch die Toxizität und fehlende Zellspezifität vor allem in Hinblick auf klinische Anwendungen problematisch.^[49]

1.5.2 Liganden-Konjugate für den Transport von siRNA

Zellspezifischer Transport von siRNA kann durch die direkte Verknüpfung von Nukleinsäuren mit einem Rezeptor-Liganden erfolgen. Zellen, welche den entsprechenden Rezeptor überexprimieren, unterscheiden dabei nicht zwischen dem Ligand und dem Ligand-Konjugat. Dies ermöglicht eine Aufnahme des Konjugats meist durch Rezeptor-vermittelte Endozytose, ohne die bei Lipo- bzw. Polyplexen auftretenden toxischen Effekte. Dabei wurden die unterschiedlichsten Stoffklassen (Lipide, Vitamine, Saccharide sowie Peptide und Nukleinsäuren) für den zellspezifischen Transport eingesetzt. Im Folgenden soll ein Überblick über die bisher eingesetzten, kovalenten siRNA-Konjugate gegeben werden (Abbildung 1.6). Mit Cholesterol modifizierte siRNA, erstmals vorgestellt durch *Vornlocher* und *Unverzagt*, ist dabei bisher der erfolgreichste Ansatz und wurde für die Regulation von Genen *in vivo* eingesetzt.^[50] Die so modifizierte siRNA aggregiert zunächst mit *low-density* Lipoproteinen (LDL) sowie *high-density* Lipoproteinen (HDL). Diese dirigieren zum einen den Transport im Serum und zum anderen den Zell-Import durch Wechselwirkung mit LDL-Rezeptoren.^[51] Diese Rezeptoren werden insbesondere in der Leber, jedoch auch von Zellen unterschiedlicher Gewebe exprimiert, und können eine endozytotische Aufnahme von LDL-Partikel einleiten.^[52] Intravenös injizierte Cholesterol-siRNA führte in Mäusen zu einer Anreicherung insbesondere in der Leber sowie im Leerdarm. Dabei konnte die Expression des Proteins ApoB um bis zu 68 % herunterreguliert werden.^[50b] Die siRNA war in dieser Studie am 3'-Ende mit Cholesterol modifiziert (Abbildung 1.6), was zu einer 16fach höheren Halbwertszeit (95 min vs. 6 min) im Vergleich zu nicht konjugierter siRNA führte. Um jedoch einen optimalen Transport der Cholesterol-siRNA zu erreichen, musste diese vor der intravenösen Injektion mit Lipoproteinen präinkubiert werden.^[51] Bei der Modifizierung von siRNA mit Lipiden, sollte nicht vergessen werden, dass dabei invers tensidartige Strukturen aufgebaut werden. So bestehen klassische Tenside aus einer kleinen polaren Kopfgruppe und einem langen hydrophoben Abschnitt. Ein Oligonukleotid (18mer) als polare Komponente besitzt beispielsweise eine Konturlänge von

etwa 8 nm, während Cholesterol (hydrophober Abschnitt) eine Konturlänge von etwa 1.6 nm besitzt.^[52] Die durch diese siRNA-Lipid-Konjugate ausgebildeten supramolekularen Strukturen sowie deren Einfluss auf die biomedizinische Anwendung sind bisher nur schlecht charakterisiert.

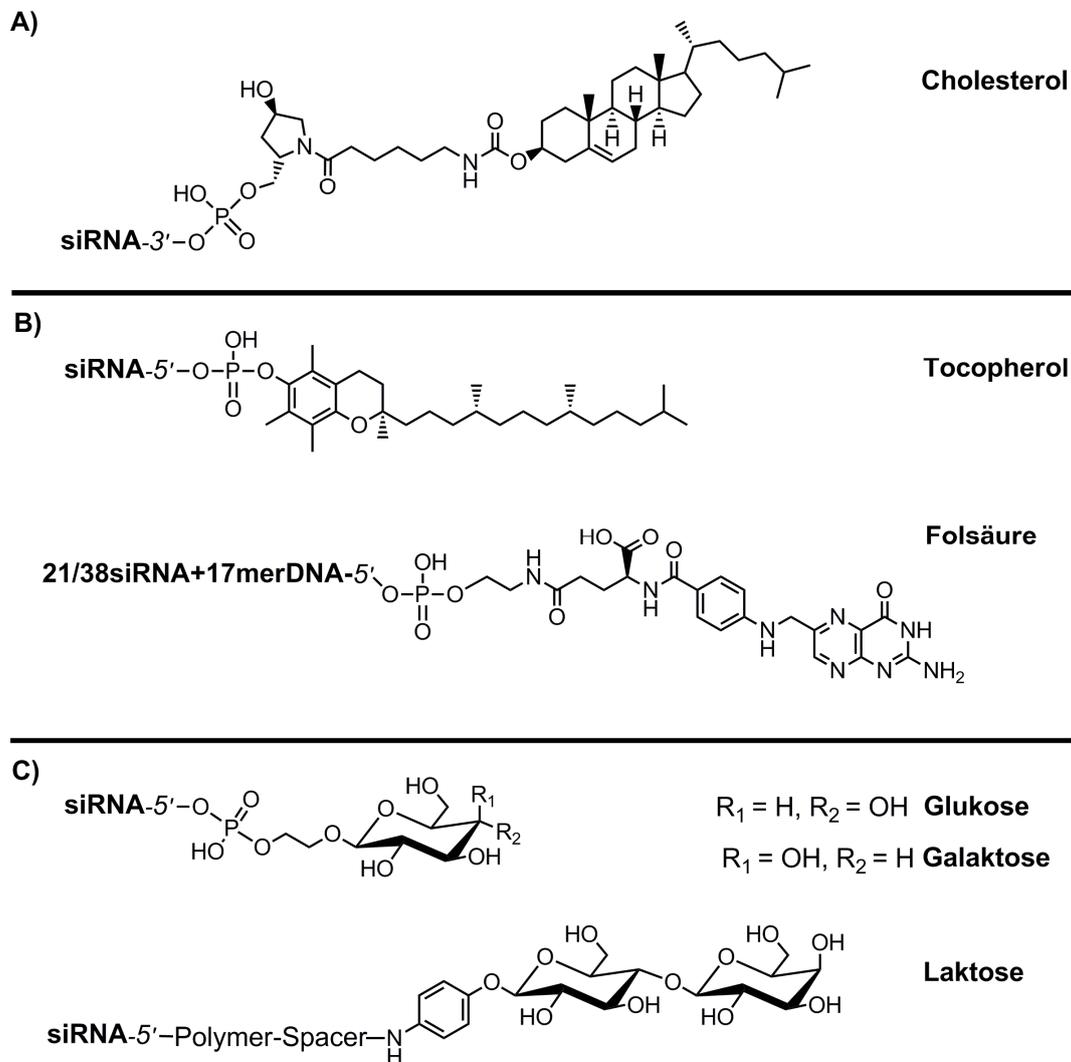


Abbildung 1.6 Exemplarische Zusammenfassung der wichtigsten kovalenten siRNA-Liganden-Konjugate. Als Liganden wurden dabei die unterschiedlichsten Stoffklassen wie Steroide (A), Vitamine (B) sowie Zucker (C) eingesetzt. Die Aufnahme von Cholesterol^[50b] sowie Tocopherol-siRNA^[53] wird von LDL-Rezeptoren vermittelt. Während im Fall von Folsäure^[54] der Folat-Rezeptor und im Fall von Galactose^[55] und Lactose^[56] der Asialoglycoprotein-Rezeptor für die zelluläre Aufnahme verantwortlich ist. Für Glucose-siRNA^[55] wurde bisher nur eine zelluläre Aufnahme jedoch keine Proteinregulation beobachtet. Desweiteren wurden Mannose^[57] sowie N-Acetylglucosamin^[58] für den Transport von siRNA eingesetzt.

Auch durch Konjugation von siRNA mit Vitaminen kann ein zellspezifischer Transport ermöglicht werden. So konnte Vitamin E (α -Tocopherol) an das 5'-Ende von siRNA kovalent geknüpft werden. Nach intravenöser Injektion in Mäusen wurde durch dieses Konstrukt die Expression von ApoB in der Leber um 80 % reduziert.^[53] Das Vitamin Folsäure hat sich als besonders effektiver Ligand für den systemischen Transport in Krebszellen erwiesen.^[59] Für

den Transport von siRNA konnten auch Folate an siRNA konjugiert werden, was aufgrund der äußerst geringen Löslichkeit, der hohen Polarität sowie den zwei ähnlich reaktiven Carboxyl-Gruppen der Glutaminsäure-Einheit herausfordernd ist. Sämtliche Folat-siRNA Konjugate sowie die dabei adressierten Proteine sind in der Masterarbeit des Autors zusammengefasst.^[60] Auch Zucker (Galactose sowie Mannose,^[55, 57] N-Acetyl-Galactosamin,^[58] Lactose^[56]) wurden kovalent mit siRNA verknüpft. Dabei werden in jedem Fall (außer bei Mannose) Asialoglycoprotein-Rezeptoren adressiert, welche auf der Zelloberfläche von Hepatocyten (Leber-Epithelzellen) exprimiert werden. Auffällig ist dabei, dass der einfachste Zucker, nämlich Glucose, bisher nur für den Transport von DNA-Oligonukleotiden in HeLa-Zellen beschrieben wurde.^[61] Nach einer Studie von *Eritja et al.* misslang der Versuch ein Protein, durch Glucose modifizierte siRNA, zu regulieren.^[55] *Alnylam* stellte in einem kürzlich erschienen Patent (US 8,450,467, B2) mehrere Zucker-siRNA Konjugate vor. Dabei wurde unter anderem ein Glucose-CholesterolsiRNA Konjugat beschrieben, welches zu einer Regulation von ApoB in der Leber sowie dem Jejunum führte.

Eine besonders große Herausforderung stellt der Transport von siRNA in das zentrale Nervensystem dar. Dessen Adressierung mittels RNA-Interferenz besitzt jedoch ein hohes Potential zur Behandlung neurodegenerativer oder viraler Erkrankungen.^[62] Daher soll im Folgenden auf den Transport von siRNA insbesondere durch kovalente Liganden-Konjugate näher eingegangen werden.

1.6 RNA-Interferenz für den therapeutischen Einsatz im Gehirn

Die meisten Ansätze konzentrieren sich auf den systemischen Transport in die Leber, da es sich dabei um ein zentrales Stoffwechselorgan handelt und leicht durch intravenöse Injektion adressiert werden kann. Eine deutlich größere Herausforderung stellt der Transport in das Gehirn dar.^[63] Dabei stellt insbesondere die Blut-Hirn-Schranke ein großes Hindernis dar. Dazu kommt die Schwierigkeit innerhalb des Gehirns spezifisch bestimmte Zelltypen zu adressieren. Die meisten Ansätze, ein Gen im Gehirn durch RNA-Interferenz auszuschalten, basieren auf viralem Transport von *short hairpin* RNAs (shRNA).^[64] Bei dem viralen Transport ist jedoch keine Kontrolle über die zeitliche Wirkung sowie die tatsächlich verabreichte Menge möglich. So interferiert die meist sehr starke Expression von shRNAs mit dem natürlich stattfindenden miRNA-Weg, was zu toxischen Effekten führen kann.^[65] *Wang et al.* konnte durch direkte Injektion von siRNA, komplexiert mit *Lipofectamin*, das Chorea Huntington-Protein

regulieren.^[66] Mit kationischen Transfektions-Reagenzien sind jedoch stets toxische Effekte verbunden.^[49] In Hinblick auf diese Nachteile ist die direkte Konjugation von Liganden an die siRNA ohne zusätzliche Formulierung vorteilhaft. Dazu sollen im Folgenden exemplarisch die wichtigsten Arbeiten für den siRNA-Transport in das Gehirn vorgestellt werden.

1.6.1 siRNA-Liganden Konjugate für den Transport ins Gehirn

Die Injektion unmodifizierter siRNA in einer Elektrolyt-Lösung führt zur Aufnahme in Oligodendrocyten, welche zu den nicht neuronalen Zellen (Gliazellen) zählen.^[67] Diese Aufnahme kann durch Konjugation mit Cholesterol verstärkt werden,^[64] was vermutlich mit der Expression von LDL-Rezeptoren im Zusammenhang steht.^[68] *Aronin et al.* konnten in Maus-Modell-Systemen zeigen, dass ein siRNA-Cholesterol-Konjugat eine Regulation des Huntington-Proteins bewirken kann.^[69] Die modifizierte siRNA wurde dabei direkt in das Striatum des Gehirns injiziert und zeigte einen positiven Effekt auf den krankheitstypischen Phenotyp im Vergleich zu nicht behandelten Mäusen. Nachteilig ist dabei, dass die Expression des Chorea Huntington-Gens nicht ausschließlich auf das Striatum beschränkt ist.^[70] Um eine breitere Verteilung der siRNA im Gehirn zu erreichen, wurde von *Stiles et al.* eine kontinuierliche Injektion von unmodifizierter siRNA durchgeführt.^[71] Diese Methode der Injektion wird als *convection enhanced delivery* (CED) bezeichnet, wobei durch einen Druckgradienten ein größeres Distributionsvolumen im adressierten Gewebe erreicht wird.

Desweiteren wurde intravenös injizierte Cholesterol-siRNA nicht in neuronale und Gliazellen transportiert, sondern von Endothelien der Gehirnkapillaren (*BCEC – brain capillar endothel cells*) der wichtigsten funktionalen Komponente der Blut-Hirn-Schranke aufgenommen. Die Expression bestimmter Proteine steht im pathologischen Zusammenhang mit einer Vielzahl an neurodegenerativen Krankheiten sowie multipler Sklerose.^[72]

Desweiteren konnten auch durch direkte Konjugation von α -Tocopherol an siRNA LDL-Rezeptoren im Gehirn adressiert und die Expression eines Zielproteins im Parietallappen sowie im Hippocampus um 64 % bzw. 36 % reduziert werden.^[73] Es wurde dabei gezeigt, dass die Aufnahme der siRNA, inkubiert mit *high-density* Lipoproteinen, ebenfalls durch den LDL-Rezeptor erfolgt. Der Transport wird dabei durch das Protein ApoE als endogener Ligand für diesen Rezeptor vermittelt.

Auch Peptide wurden zum Transport von siRNA ins Gehirn eingesetzt. *Kumar et al.* verknüpften ein Peptid (29 Aminosäuren), abgeleitet von dem G-Protein des Tollwut-Virus (siehe auch Kapitel 1.8), an siRNA, um einen Transport durch die Blut-Hirn-Schranke ins

zentrale Nervensystem zu ermöglichen.^[74] Die Autoren nutzten die Strategie des Tollwut-Virus aus, sich im Gehirn zu verteilen und in neuronale Zellen zu gelangen. Die Verknüpfung des Peptids mit der siRNA erfolgte dabei elektrostatisch durch zusätzliche Fusion eines Nona-Arginin-Abschnitts an das Peptid. Durch kompetitive Studien konnte gezeigt werden, dass für diese spezifische Aufnahme Nicotin-Acetylcholin-Rezeptoren verantwortlich sind. Das Peptid-siRNA-Konjugat konnte so intravenös verabreicht und spezifisch durch die Bluthirnschranke transportiert werden. Dabei wurde keine Aufnahme in die Leber oder Milz beobachtet und es konnte ausschließlich im Gehirn eine Regulation von GFP um 50 % erreicht werden. Auch konnte eine entsprechende siRNA, gerichtet gegen das japanische Encephalitis-Virus, die Überlebensrate um 80 % steigern. Die hier vorgestellte Methodik der elektrostatischen Konjugation vermittelt durch ein Nona-Arginin-Peptid, wurde auch zur Knüpfung eines Antikörpers an siRNA genutzt. Dadurch konnte ein Transport in T-Zellen vermittelt und Gene des HIV-Virus reguliert werden.^[75] Da jedoch eine elektrostatische Verknüpfung des Peptid- bzw. Antikörper-Liganden erfolgte, handelt es sich um eine undefinierte Hybridstruktur und nicht um ein klassisches kovalentes Liganden-Konjugat.

Zusammenfassend stellt das Gehirn eine große Herausforderung für den therapeutischen Einsatz von siRNA dar. Insbesondere in Kombination mit der Schwierigkeit einen Transport in unterschiedliche Zelltypen zu ermöglichen. Bisher gibt es dazu nur zwei definierte siRNA-Liganden-Konjugate, welche beide LDL-Rezeptoren für den Transport nutzen. Daher ist es notwendig neuartige Ansätze zu entwickeln, wozu in dieser Arbeit durch Ansteuerung des Endocannabinoids-Systems ein Beitrag geleistet werden soll. Dieses wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

1.6.2 Das Endocannabinoid-System

Das Endocannabinoid-System^[76] ist ein vielversprechender Weg, um einen Transport von siRNA in neuronale und Immunzellen zu ermöglichen. Cannabinoid-Rezeptoren werden von Zellen des Nerven- und Immunsystems exprimiert. So wurden hohe Expressionslevel des Cannabinoid-Rezeptors 1 (CB1)^[77] insbesondere im Hippocampus, der Großhirnrinde, den Basalganglien und dem Kleinhirn nachgewiesen.^[78] Arachidonylethanolamid (AEA, Anandamid) ist ein endogener Ligand dieses Rezeptors und wurde 1992 erstmals von *Devane et al.* aus dem Schweinehirn isoliert.^[79]

Julian Willibald konnte diesen Liganden kovalent mittels Click-Chemie an siRNA knüpfen und einen Transport in Immunzellen demonstrieren,^[80] welche den Cannabinoid-Rezeptor 2 (CB2) exprimieren.^[81] Dieser Rezeptor wird jedoch auch mit geringerem Expressionslevel als CB1 im

Gehirn (Großhirnrinde, Kleinhirn, Hirnstamm und Zwischenhirn) in neuronalen sowie Gliazellen exprimiert.^[82] Die genaue Rolle beider G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ist sehr komplex und noch nicht vollständig geklärt. Sie besitzen neuroprotektive Eigenschaften^[83] und spielen im Zusammenhang mit Fortpflanzung und Fruchtbarkeit eine wichtige Rolle.^[84] Desweiteren führt die Aktivierung beider Rezeptoren zur Stimulation der so genannten Cannabinoid-Tetrade, was unter anderem zu Schmerzunempfindlichkeit führt.^[85] Die am besten charakterisierte Rolle von Endocannabinoiden im Gehirn ist ihre Funktion als retrograde Neurotransmitter.^[86]

Neben Anandamid wurden 2-Arachidonglycerol (2-AG),^[87] 2-Arachidonylglycerylether (2-AGE)^[88] sowie O-Arachidonylethanolamine (Virodhamin)^[89] als körpereigene Agonisten der Cannabinoid-Rezeptoren identifiziert (Abbildung 1.7). Diese endogenen Cannabinoide zählen zur Klasse der Eicosanoide. Zu den exogenen Agonisten zählen klassische Cannabinoide (beispielsweise THC (Δ^9 -Tetrahydrocannabinol) und Analoga), charakterisiert durch eine trizyklische Struktur, sowie nichtklassische Cannabinoide, welche keine trizyklische Struktur besitzen.^[90]

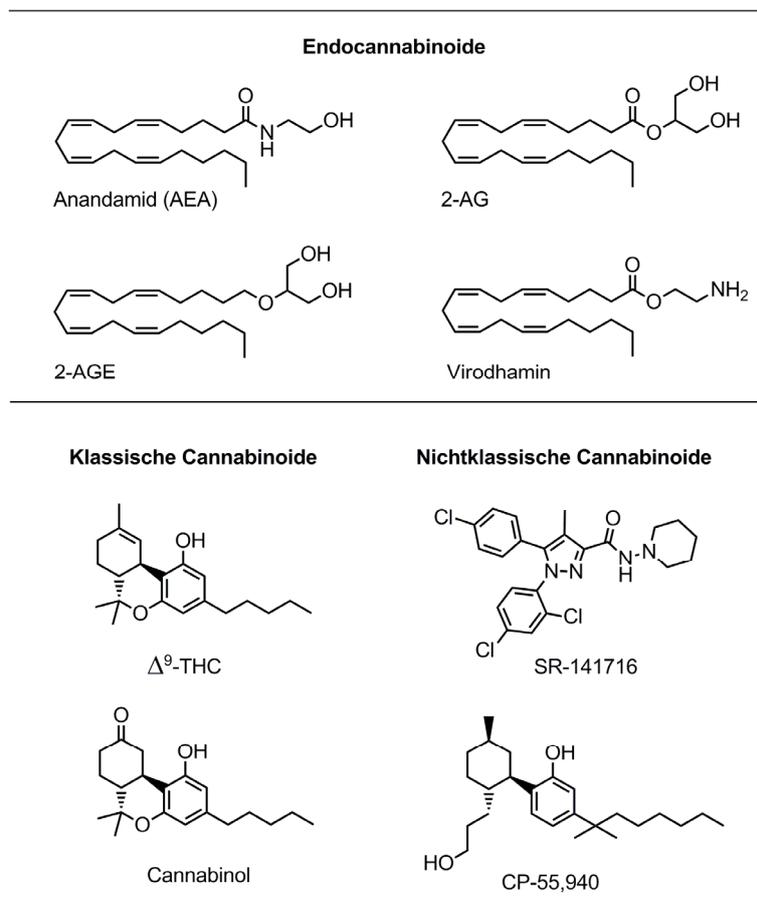


Abbildung 1.7 Exemplarische Zusammenstellung der Strukturformeln von Endocannabinoiden (AEA = Arachidonylethanolamid, 2-AG = 2-Arachidonglycerol, 2-AGE = 2-Arachidonylglycerylether) sowie klassischer (Δ^9 -THC = Tetrahydrocannabinol) und nichtklassischer Cannabinoide.

Anandamid hat ähnliche pharmakologische und verhaltensändernde Eigenschaften wie THC,^[91] wobei die Wirkung von deutlich kürzerer Dauer ist.^[92] Dies ist Resultat einer sehr raschen Aufnahme in die Zelle, gefolgt von hydrolytischem Abbau zu Arachidonsäure und Ethanolamin.^[93] So zeigten kinetische Studien mit ³[H]-Anandamid in corticalen Neuronen sowie Astrozyten, dass die Hälfte des Aufnahme-Maximums bereits nach 4 min erreicht wurde.^[94] Der Abbau erfolgt am endoplasmatischen Retikulum durch die *fatty acid amide hydrolase* (FAAH),^[95] wodurch der Konzentrationsgradient zwischen extra- und intrazellulärem Bereich aufrechterhalten bleibt. Anandamid kann auch oxidativ, vermittelt durch Cyclooxy- bzw. Lipoxygenasen, abgebaut werden, wobei jedoch der hydrolytische Stoffwechselweg dominiert.

Der genaue Mechanismus der raschen Anandamid-Aufnahme wird in der Literatur kontrovers diskutiert^[96] und soll im Folgenden kurz erläutert werden. Allgemein konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Anandamid sättigungsfähig, inhibierbar, temperaturabhängig sowie unabhängig von Energiezufuhr beispielsweise in Form von ATP ist.^[93a, 94, 97] Dies ist prinzipiell im Einklang mit einer Protein-unterstützten Aufnahme, wobei gegenwärtig drei Mechanismen diskutiert werden. Neben einer in der Literatur beschriebenen endozytotischen Aufnahme^[98] wird insbesondere ein Carrier-Protein vermittelter Transport^[94] favorisiert.^[99] Die Aufnahme könnte jedoch auch über erleichterte passive Diffusion^[100] erfolgen. Ein Gradient der intra- und extrazellulären Anandamid-Konzentration, aufrechterhalten durch FAAH vermittelte Hydrolyse zu Arachidonsäure und Ethanolamin, begünstigt diesen Vorgang.^[100b, 101] Im Widerspruch dazu wird die Aufnahme von Anandamid auch in neuronale Zellen beobachtet, welche FAAH nicht exprimieren.^[102]

Unabhängig von dem kontrovers diskutierten Mechanismus der Anandamid-Aufnahme bietet das Endocannabinoid-System ein bisher ungenutztes Potential für den Transport von siRNA in schwer zu transfizierende neuronale Zellen. So könnte das Adressieren dieser Zelltypen den therapeutischen Einsatz von RNA-Interferenz auf Erkrankungen des Immunsystems sowie neuronale Erkrankungen erweitern. Im Folgenden sollen nun die bisher wichtigsten klinischen Studien im Zusammenhang mit RNA-Interferenz vorgestellt werden.

1.7 Klinische Studien basierend auf RNA-Interferenz

Zu den wichtigsten bereits in klinischen Studien adressierten Krankheiten zählen Erkrankungen des Auges, Krebs sowie virale Erkrankungen. Trotz der enormen Probleme, welche mit dem Oligonukleotid-Transport verbunden sind, kommt es zu einem Anstieg von klinischen Studien,

basierend auf der RNAi-Technologie. So stieg von 2008 bis 2012 die Anzahl der siRNA-Kandidaten in klinischen Studien von 8 auf 18.^[37] Interessant ist dabei insbesondere, dass ein Großteil der neu dazu gekommenen Kandidaten nicht durch lokale Injektion sondern durch systemischen Transport verabreicht werden. Im Folgenden sollen exemplarisch einige Ansatzpunkte bzw. klinische Studien zur Behandlung mittels RNA-Interferenz vorgestellt werden.

Als relativ einfaches Target erwies sich zu Beginn das Auge, da es sich um ein räumlich begrenztes Organ mit nur geringer zellulärer Nuklease-Aktivität handelt. Desweiteren ist ein relativ einfaches Injizieren direkt in den Glaskörper möglich. Adressiert wurde dabei beispielsweise die altersbedingte Degeneration der Macula (AMD), welche bei älteren Menschen als eine der häufigsten Erblindungskrankheiten gilt. Dabei kommt es zu einem abnormalen Wachstum von Blutgefäßen hinter der Retina und Macula, so dass durch Blutungen oder durch Austreten von Flüssigkeiten aus diesen Gefäßen irreversible Schäden entstehen können. Durch Inhibierung des *vascular endothelial growth factors (VEGF)* kann das Wachstum der Blutgefäße eingedämmt werden. So versuchte beispielsweise *Sirna Therapeutics* in der ersten klinischen Studie mit chemisch modifizierter siRNA (Sirna-027, bzw. AGN-745, unter anderem modifiziert mit Phosphorthioaten) den entsprechenden Rezeptor (VEGF-R) zu regulieren. Es stellte sich jedoch heraus, dass es sich bei den beobachteten Regulationen nicht um einen spezifischen RNAi-Effekt handelte. Stattdessen führte die Bindung von siRNA sequenzunabhängig zu einer Aktivierung des *toll-like receptors 3 (TLR3)*, welcher letztendlich die Expression von VEGF bzw. VEGF-R beeinflusst.^[103]

Es liegt nahe, dass insbesondere die Krebsforschung große Hoffnung in den therapeutischen Einsatz von RNA-Interferenz setzt.^[104] So können Onkogene inhibiert werden, wodurch das Wachstum von Krebszellen eingedämmt werden kann. Ein weiterer Ansatzpunkt besteht darin Faktoren zu inhibieren, welche die Nähr- und Sauerstoffversorgung des Tumors sicherstellen (Angiogenese). Wie bereits beschrieben, konzentrieren sich sehr viele Ansätze zum systemischen Transport von siRNA auf die Leber. So entwickelt *Alnylam* ein RNAi-Therapeutikum, welches zwei, mit dem Krankheitsbild von Leberkrebs verknüpfte Proteine, adressiert. Dies ist zum einen das *kinesin spindle protein (KSP)*, verantwortlich für die Proliferation von Krebszellen sowie der *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, verantwortlich für die Angiogenese des Tumors. Dieser Ansatz konnte bereits erfolgreich die erste klinische Phase durchlaufen und ist zusätzlich das erste systemische RNAi-Programm von *Alnylam*. Dabei wurden etwa Mengen zwischen 0.1 und 1.5 mg/kg verabreicht, wobei sich als Empfehlung für die zweite klinische Studie eine optimale Dosis von 1.0 mg/kg herausgestellt

hat. Die Formulierung der eingesetzten siRNA erfolgte durch SNALPs (Kapitel 1.5.1), welche von *Tekmira* stammen.

Auch Virusinfektionen wurden bereits mit RNA-Interferenz adressiert, da virale Krankheiten ein immer akuterer Problem darstellen.^[105] Bisher gibt es im Vergleich zum enormen Bedarf von Virus-hemmenden Agentien nur wenig erfolgreich zugelassene Medikamente zur Behandlung. Da RNA-Interferenz die mRNA eines Ziel-Proteins reguliert, kann diese Technik an jede beliebige Variante von Viren oder Virentypen adaptiert werden. Dies steht im starken Kontrast zum Einsatz von niedermolekularen Wirkstoffen, welche stets mit aufwendigen Optimierungs- bzw. Screening-Prozessen verbunden sind.^[8] Ein Kernproblem liegt in der relativ hohen Mutationsrate von Viren. So kann trotz anfänglichem Absenken des viralen Titers nach Behandlung mit einer siRNA eine weitere Inhibierung des Virus durch Ausbildung von Mutationen ausbleiben.^[106] Daher sollte die siRNA stets gegen möglichst konservierte Regionen des viralen Genoms gerichtet werden. Desweiteren könnte der Einsatz von einem Pool, bestehend aus mehreren siRNAs zu einer gesteigerten antiviralen Aktivität führen. Das *respiratorische Syncytial-Virus* (RSV) war eine der ersten viralen Infektionen, welche mit RNA-Interferenz adressiert wurden.^[107] Es handelt sich dabei um eine hoch ansteckendes Virus, welches bei Säuglingen sowie Patienten nach einer Lungen-Transplantation zu schweren Lungenentzündungen führen kann. Bisher sind nur symptomatische Behandlungen möglich, so dass dringend neuartige Behandlungsmöglichkeiten benötigt werden. *Alnylam* konnte bereits erfolgreich in einer Phase-II-Studie signifikante antivirale Aktivität, kombiniert mit einer hohen Toleranz der eingesetzten siRNAs, nachweisen. Dabei wurde eine siRNA gerichtet gegen das Nukleokapsid-Protein (N-Protein) des RSV Genoms eingesetzt.

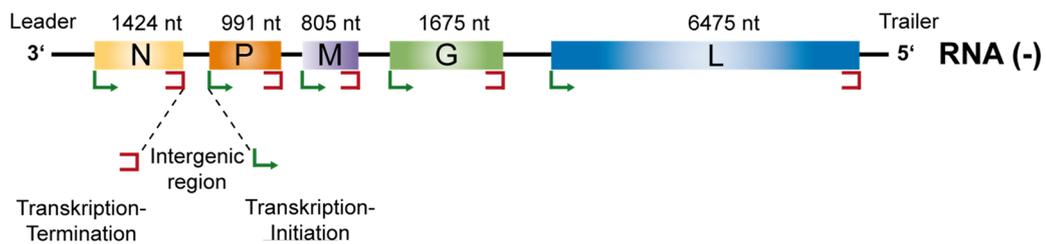
Des Weiteren wurden eine Vielzahl an unterschiedlichsten viralen Pathogenen mittels RNA-Interferenz adressiert. Diese beinhalten das *human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)*^[108], *hepatitis C Virus (HCV)*^[109], *hepatitis B virus (HBV)*^[110] sowie das *influenza A virus*^[111].

Eine der tödlichsten Krankheiten wird durch die Infektion mit dem Tollwut-Virus ausgelöst. Gegen diese virale Infektion gibt es nach Auftreten erster Symptome bisher keine Behandlungsmöglichkeit. In dieser Arbeit wurde unter anderem versucht Tollwut-Proteine mittels Anandamid vermitteltem Transport von siRNAs zu adressieren.

1.8 Tollwut-Viren – Klassifizierung und molekularer Überblick

Das Tollwut-Virus (RABV, *rabies virus*) verursacht eine der weltweit tödlichsten Krankheiten. Es handelt sich um ein neurotropes Virus mit fatalem Krankheitsbild. Nach offiziellen Schätzungen sterben jedes Jahr zwischen 40000 bis 70000 Menschen an dieser viralen Infektion. Einer kürzlichen Studie zufolge könnte diese Zahl jedoch um den Faktor 100 höher liegen.^[112] Das Tollwut-Virus gehört zu dem Genus der *Lyssaviren* in der Familie der *Rhabdoviridae*. Diese gehören zur Ordnung der *Mononegavirales*, wobei alle Vertreter dieser Ordnung ein nicht-segmentiertes, einzelsträngiges RNA Genom besitzen (Abbildung 1.8A). Dieses Genom hat eine negativ-Strang-Orientierung und kann daher nicht direkt als mRNA verwendet werden.

A)



B)

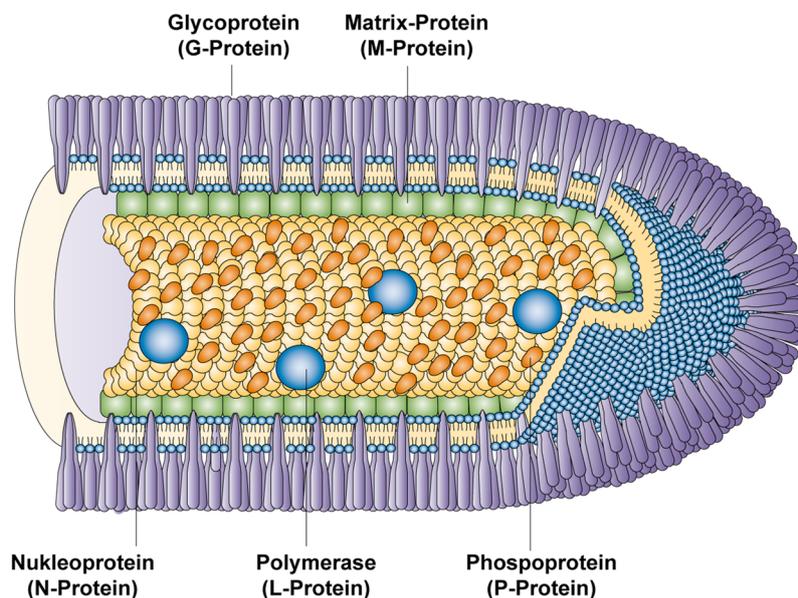


Abbildung 1.8 A) Organisation des Tollwut-Virus-Genoms. Eingezeichnet sind alle fünf Gene kodierend für das N-, P-, M-, G- und L-Protein. Das Transkription-Terminations- sowie Initiations-Signal werden durch die *Intergenic Region* getrennt. Nichtkodierende Bereiche werden als *Leader* (3'-Ende) bzw. *Trailer* (5'-Ende) bezeichnet. Nt = Nucleotide B) Schematische Darstellung eines Tollwut-Virus Partikes. Das N-Protein gebunden an die virale RNA bildet zusammen mit dem P- bzw. L-Protein das Nukleocapsid. Die virale Membran ist an der Außenseite mit G-Proteinen und an der Innenseite mit M-Proteinen bedeckt. Abbildungen nach *Albertini*^[113] bzw. *Schnell et al.*^[112]

Während RABV-Infektionen ein breites Wirtsspektrum besitzen, werden andere Mitglieder des *Lyssavirus-Genus* wie das *Lagos-Fledermausvirus* oder das europäische *Fledermaus-Lyssavirus* hauptsächlich in Fledermäusen gefunden.

Die Tollwut-Viruspartikel (Virionen) sind projektilartige Nano-Strukturen mit einem Durchmesser von 75 nm und einer Länge von 100-300 nm sowie einem flachen bzw. kegelförmigen Ende (Abbildung 1.8B). Das Genom des Tollwut-Virus besitzt eine Länge von 12 kb und kodiert für fünf virale Proteine in der Reihenfolge 3'-N-P-M-G-L-5'. Jedes Gen wird von einem Transkriptionsinitiations- sowie einem Transkriptions-Polyadenylierungs-Signal, verantwortlich für die Transkriptions-Termination, flankiert. Zwischen diesen kodierenden Einheiten liegen so genannte *intergenic regions*, welche eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Expressionsniveaus der fünf viralen Proteine spielen.^[114] Diese erfüllen eine Vielzahl an Funktionen und sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

Die virale RNA wird von dem **Nukleoprotein N** (N-Protein, 450 Aminosäuren) ummantelt, wodurch ein helikales **Nukleocapsid** gebildet wird. Ein Nukleoprotein umfasst dabei jeweils 9 Nukleotide.^[115] Das N-Protein schützt das virale Genom vor der Interaktion mit zellulären Faktoren und somit der Erkennung durch das zelluläre Immunsystem. Nur virale RNA ummantelt mit N-Protein kann als Templat für die virale Transkription und Replikation dienen. Beide Aufgaben erfüllt ein viruseigener RNA-abhängiger RNA-Polymerase-Komplex. Dieser besteht aus dem großen Protein (*large protein*, **L-Protein**) und dem **P-Protein**, der nichtkatalytischen Untereinheit des Polymerase-Komplexes. Das **P-Protein** dient zugleich als Chaperon für das N-Protein, wodurch dessen Oligomerisierung und unspezifische Wechselwirkung mit zellulärer RNA verhindert wird.^[116] Es handelt sich außerdem um ein Schlüsselenzym in der Unterdrückung der zellulären Immunantwort.^[117] Zusammenfassend besteht das **Nukleocapsid** aus viraler RNA ummantelt mit Nukleoproteinen, welche mit P- und L-Proteinen assoziiert sind. Das **Matrix-Protein (M-Protein)** ist verantwortlich für die Assemblierung des Virus^[118] und dient auch zur Regulation der viralen Transkription und Replikation.^[119]

Bei dem **Glycoprotein (G-Protein)** handelt es sich um ein Transmembran-Protein, welches auf der viralen Lipidmembran lokalisiert ist. Im Laufe der Infektion mit dem Tollwut-Virus assembliert das G-Protein an der Wirts-Plasma-Membran und verstärkt die Freisetzung des Virus, wofür es jedoch nicht essentiell ist.^[120] Wichtig ist das G-Protein insbesondere für die zelluläre Aufnahme in die Wirtszellen.^[121] Des Weiteren sind transsynaptische Übergänge von der Anwesenheit der G-Proteine abhängig.^[121] Im Folgenden soll nun der Lebenszyklus des Tollwut-Virus näher beschrieben werden.

1.8.1 Lebenszyklus des Tollwut-Virus

Der Lebenszyklus eines Tollwut-Virus kann, wie für die meisten Viren, in mehrere Phasen unterteilt werden (Abbildung 1.9B). In der ersten Phase bindet das Virus über das G-Protein an die Wirtszell-Rezeptoren, worauf die Aufnahme mittels Endozytose erfolgt.^[122] Der genaue Mechanismus der Internalisierung in diese Kompartimente konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Ebenfalls unklar ist, mit welchen Wirtszell-Rezeptoren das G-Protein dabei für den Transport des Virus in die Zellen interagiert.^[112] Es wird vermutet, dass das G-Protein durch Wechselwirkung mit dem Nicotin-Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) an der neuromuskulären Synapse angereichert wird, was eine effizientere Infektion des peripheren Nervensystems ermöglicht (Abbildung 1.9A).^[123] Weitere Rezeptoren wie das *neuronal cell adhesion molecule* (NCAM) sowie der p75 Neurotrophin Rezeptor (p75NTR) spielen bei dem Transport des Virus eine Rolle.^[124]

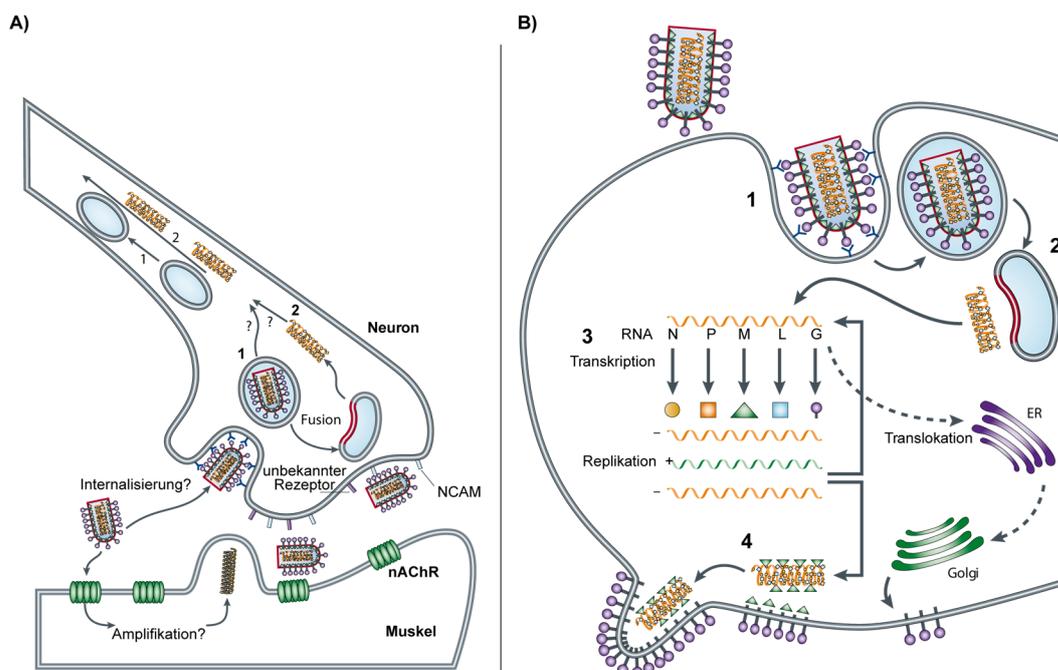


Abbildung 1.9 Neuronale Aufnahme des Tollwut-Virus an der neuromuskulären Spalte (A) sowie vereinfachte Zusammenfassung des viralen Lebenszyklus (B). A) Der Nicotin-Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) ist an der neuromuskulären Verbindung angereichert, wodurch eine effizientere Infektion des peripheren Nervensystems ermöglicht wird. Oberflächenproteine wie das *neuronal cell adhesion molecule* (NCAM) und noch unbekannte Rezeptoren spielen bei der neuronalen Aufnahme eine Rolle. Innerhalb der Axone wird in der Literatur ein Transport des kompletten Virions (1) oder des Nukleocapsids (2) diskutiert. Im Falle des kompletten Virions erfolgt der Transport über endosomale Vesikel. B) Nach der Rezeptor-Bindung kommt es zur endozytotischen Aufnahme des Tollwut-Partikels gefolgt von der Freisetzung des Nukleocapsids. Nach Trans- und Replikation erfolgt die Assemblierung der viralen Komponenten und die Freisetzung des Virions (Ausknospung). Abbildungen nach Schnell *et al.*^[112]

Innerhalb der Axone der Nervenzelle kann keine Biosynthese der viralen Proteine stattfinden. Somit muss das Virus zunächst in den Zellkörper transportiert werden. Dabei werden in der

Literatur zwei Mechanismen beschrieben (Abbildung 1.9A). So kann entweder das komplette Virion oder das Nukleocapsid alleine transportiert werden. Im Falle des kompletten Virions erfolgt der Transport über endosomale Vesikel.^[125] Durch Absenkung des pHs innerhalb der Vesikel wird eine Konformationsänderung des G-Proteins ausgelöst, wodurch die Virus- mit der Vesikel-Membran fusioniert und das Nukleocapsid freigesetzt werden kann. Bei dem zweiten Mechanismus erfolgt, nach der vesikulären Freisetzung, ein axonaler Transport über Dynein-Motor-Proteine.^[126]

In der nun beginnenden zweiten Phase werden die viralen Komponenten innerhalb der Wirtszelle produziert. Dabei dient die N-Protein ummantelte negativsträngige RNA als Templat für die virale Genexpression und Replikation durch die virale RNA-Polymerase (L-P Polymerasekomplex). Sowohl die Transkription als auch die Replikation finden im Cytoplasma innerhalb spezialisierter viraler Fabriken, den Negri-Körpern statt.^[127] Diese Einschlusskörperchen sind charakteristisch für Tollwut-Infektionen des Gehirns und werden als eindeutig histologischer Beweis für die virale Infektion verwendet.

Die letzte Phase des Lebenszyklus beinhaltet die Assemblierung der viralen Komponenten, deren Transport zur Wirtszellmembran sowie der Freisetzung des Virions (Ausknospung). Dabei muss das Nukleocapsid, über einen bisher nicht verstandenen Mechanismus, zunächst zur Plasmamembran transportiert werden. Dieses interagiert dort über das Matrix-Protein mit Regionen der Cytoplasmamembran, welche Anreicherungen mit G-Proteinen besitzen. Das G-Protein ist zwar nicht essentiell für die Ausknospung, führt allerdings zu einer 30fach effizienteren Freisetzung.^[128] Das Virion kann nun den Infektionszyklus erneut durchlaufen. Im Folgenden soll die Replikation sowie Transkription des Tollwutvirus näher erläutert werden.

1.8.2 Replikation und Transkription des Tollwut-Virus

Die Transkription beginnt am 3'-Ende der genomischen RNA und resultiert in einer kurzen nicht *gecappten* sowie nicht polyadenylierten *leader* RNA (leRNA, 55-58 bp). Daraufhin beginnt die sequentielle Synthese 5'-gecappter bzw. 3'-polyadenylierter mRNAs, welche für die viralen Proteine kodieren (Abbildung 1.10). Dies geschieht dabei nach dem so genannten Stop-Start-Model.^[129] Demnach stoppt der Polymerase-Komplex die Transkription an einer konservierten Terminationssequenz. Der darauf folgende Abschnitt, die *intergenic Region*, wird ignoriert, woraufhin die Transkription an der Transkriptions-Start-Sequenz erneut initiiert wird. Entscheidend ist dabei, dass die Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Initiierung in 3'-5' Richtung abnimmt, was in einem Transkriptionsgradienten resultiert.^[114] Die Reihenfolge der

Gene auf dem negativ-RNA-Strang bestimmt somit das Transkriptionslevel der viralen mRNAs. Es resultiert daher ein hohes Expressionslevel des N-Protein-Gens sowie ein niedriges Expressionslevels des L-Protein-Gens. Zusätzlich wird dieser Gradient durch die Länge der intergenic Region (IGR) reguliert, welche ebenfalls in 3'-5'-Richtung ansteigt (1, 5, 5, 24-29 Nukleotide).^[130] Im Gegensatz zur Transkription ist für die Replikation ein Ablesen der negativsträngigen viralen RNA ohne Unterbrechung notwendig.

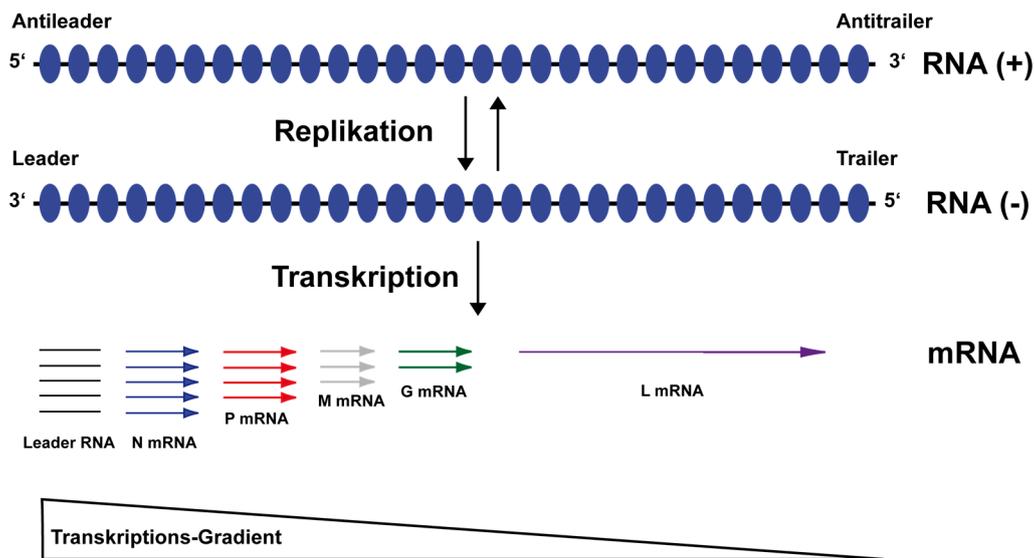


Abbildung 1-10 Übersicht der RNA-Synthese zur Transkription und Replikation während des Tollwut-Infektionszyklus. Virale mRNA ist nicht mit dem N-Protein bedeckt. Reinitiation der Transkription erfolgt mit abnehmender Wahrscheinlichkeit in 3'-5' Richtung, woraus ein Transkriptions-Gradient in der Proteinsynthese resultiert. Somit liegt am meisten *leader*-RNA und am wenigsten L mRNA vor. Abbildung nach *Albertini et al.*^[113]

Das Startsignal für den Wechsel von Transkription zu Replikation ist durch das Vorhandensein einer bestimmten Menge an N-Protein gegeben.^[131] Das P-Protein in seiner Funktion als Chaperon verhindert dabei eine unspezifische Wechselwirkung des N-Proteins mit zelleigener RNA.^[116] So führt die Expression von N-Protein alleine zu einer unspezifischen Bindung an RNA.^[131] Dieser Prozess wird durch das Matrix-Protein unterstützt, welches die Transkription hemmt und zu einer Stimulation der Replikation führt.^[119] Somit kann ein durchgängiges RNA-Molekül in Positivstrang-Orientierung entstehen, welches dann das Templat für das negativsträngige RNA-Genom darstellt. Der so replizierte Strang assembliert sofort mit den N-/P-/L- Proteinen unter Ausbildung des Ribonukleocapsids. Dieser kann entweder erneut als Templat für die Transkription bzw. Replikation dienen oder den Knospungsvorgang einleiten.^[132]

1.8.3 Pathogene und antivirale Strategien gegen das Tollwut Virus

Nach einer Infektion mit einem Tollwut-Virus gelangt dieses an den neuromuskulären Kontaktstellen in das Nervensystem, wobei es retrograd von dem peripherem zum zentralen Nervensystem wandert.^[133] Um das zentrale Nervensystem zu erreichen, hat das Tollwut-Virus zahlreiche Strategien entwickelt, welche die Erkennung durch das humane Immunsystem verhindern. So kann das P-Protein die Interferon-Antwort blockieren.^[117b, 134] Die Induktion von Apoptose als zelluläre Antwort auf Tollwut-Infektionen wird in der Literatur kontrovers diskutiert.^[112] Es verdichten sich jedoch die Hinweise, dass das Tollwut-Virus keine Apoptose auslöst, wodurch die Integrität des neuronalen Netzwerkes aufrechterhalten bleibt.^[135] Dies erleichtert die Ausbreitung des neuroinvasiven Virus durch das zentrale Nervensystem ins Gehirn. Nach der Amplifizierung im Hirn breiten sich die Virus-Partikel in periphere Organe, insbesondere in die Speicheldrüsen aus.

Die ersten Symptome des Virus treten in Erscheinung, wenn sich dieses im zentralen Nervensystem zu replizieren beginnt. Diese Symptome beinhalten in humanen Patienten zunächst Fieber schließlich Hyperaktivität, Paranoia, Paralyse und Koma. In diesem Stadium zeigen nachträgliche Impfungen keine Wirkung mehr und die Infektion verläuft in nahezu jedem Fall tödlich.^[136] Während der Virus-Infektion kommt es nur zu einer leichten Immunantwort durch den Körper.^[137] Antikörper gegen das G-Protein werden erst produziert, wenn sich die Infektion bereits in einem fortgeschrittenem Stadium befindet und nur noch schwer einzudämmen ist.^[138]

Zur Behandlung des Tollwut-Virus wurden Strategien entwickelt, welche entweder das Wirt-Immunsystem unterstützen oder spezifisch bestimmte Stadien des viralen Lebenszyklus hemmen. Die Verabreichung von Interferon (IFN) stimuliert die Immunantwort, welche die Replikation und Ausbreitung des Virus verhindern sollte. Dies konnte jedoch bisher nur in Zellkultur und Tiermodellen nachgewiesen werden, während im Menschen keine antivirale Wirkung aufgezeigt werden konnte.^[139] Durch *Ribavirin*, einem Nukleosid-Analagon, wird beispielsweise die *Inosin 5'-Monophosphat Dehydrogenase*, verantwortlich für die Produktion von GTP, gehemmt. Dies führt zu einer Blockade der zellulären RNA-Synthese, so dass die Expression viraler Proteine herunterreguliert wird.^[140] Allerdings konnte *Ribavirin* bisher nur antivirale Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden und es zeigte keine Wirkung in Tiermodellen.^[141] Die Entwicklung zukünftiger antiviraler *Biologics* konzentriert sich gegenwärtig auf das Inhibieren der viralen Replikation, insbesondere durch spezifisches Adressieren des P- bzw. N-Proteins.^[139b] Das P-Protein interagiert mit zwei weiteren viralen

Proteinen, nämlich dem N-Protein, welches die Tollwut-RNA umhüllt sowie der RNA-Polymerase (L-Protein). Da es zusätzlich für den retrograden Transport der Virionen eine Schlüsselrolle einnimmt, ist es ein besonders attraktives Target zur Inhibierung der viralen Replikation und Transkription. Das N-Protein ist außerdem innerhalb der *Lyssaviren* am stärksten konserviert.^[142]

In einem Ansatz von *Castel et al.* konnte ein vom P-Protein abgeleitetes Peptid durch Wechselwirkung mit den viralen N- bzw. L-Proteinen eine Inhibierung der Replikation *in vitro* erreichen.^[143] Desweiteren wurden vier Peptide mit antiviraler Aktivität identifiziert, welche durch Wechselwirkung mit unterschiedlichen Domänen des P-Proteins eine Inhibierung der viralen Replikation erreichen konnten.^[144] Ein neuartiger Ansatz von *Wunner et al.* verwendete eine willkürliche Bibliothek kurzer cDNA-Fragmente, abgeleitet vom Tollwut-Genom. Dadurch konnten zwei Nukleotid-Fragmente identifiziert werden deren Expression zu einer Inhibierung des P- bzw. N-Proteins führen.^[145] Auch RNA-Interferenz wurde als Werkzeug zur Behandlung von Tollwut-Viren eingesetzt. In einer ersten Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl miRNAs^[146] als auch siRNAs^[147] das N-Protein *in vitro* regulieren können. Der Transport der Nucleinsäuren erfolgte dabei durch das kommerziell erhältliche Transfektionsreagenz *Lipofectamin*. Nach einem anderen Ansatz von *Sonwane* bzw. *Gubta et al* wurde ein Adenovirus für den Transport von siRNAs gegen das N- bzw. L-Protein eingesetzt.^[148] Dabei konnte die Überlebensrate Tollwut infizierter Mäuse um bis zu 66 % erhöht werden. Plasmide mit der genetischen Information für drei unterschiedliche siRNAs gegen das N-Protein wurden auch prophylaktisch *in vivo* eingesetzt und liposomal transfiziert.^[142] Dabei konnte die Überlebensrate um bis zu 56 % erhöht werden.

Trotz dieser Erfolge gibt es bisher keine Tollwut spezifische antivirale Methode mit signifikanter und reproduzierbarer Aktivität in Tiermodellen.^[139b] Dies macht deutlich, dass weitere Anstrengungen notwendig sind, um ein verlässliches Medikament zur Behandlung von Tollwut zu entwickeln. Dazu sollen die in dieser Doktorarbeit neu entwickelten siRNA-Strukturen zusammen mit dem neurospezifischem Liganden Anandamid einen Beitrag leisten.

2 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Teile. Ziel des ersten Abschnitts war es zunächst den Anandamid modifizierten siRNA-Duplex näher zu charakterisieren. Mittels Luciferase basierenden Assays sollte dabei die Toxizität sowie die Effizienz der Protein-Regulation untersucht werden. Dies erfolgte in Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Conzelmann* (Max von Pettenkofer- Institut München) in humanen Immunzellen (BJAB), wobei ein kommerziell erhältliches Transfektionsreagenz (*jetPRIMETM*) als Vergleichssystem eingesetzt wurde. Schließlich sollte der Einfluss von RNA-Modifizierungen näher betrachtet werden. Zusammen mit *Julian Willibald* wurden dabei 2'-Fluoro-Basen in den siRNA Duplex integriert, was zu keiner deutlichen Steigerung der Regulationseffizienz führte. Daher sollte auch der Einfluss von Thioat-Modifizierungen am Phosphat-Rückgrad untersucht werden.

Zentrale Aufgabe innerhalb dieser Arbeit war es im zweiten Teil neuartige dendritische siRNA-Strukturen zu entwickeln. Dazu wurde ein Anandamid mit bis zu neun siRNAs kovalent modifiziert. Der Grundgedanke war dabei, dass durch einen Liganden gleichzeitig mehrere siRNAs ins Cytoplasma transportiert werden können, wodurch eine bessere Protein-Inhibition erreicht werden sollte. *Julian Willibald* konnte zeigen, dass diese Nanostrukturen durch zusätzliche Zuckerfunktionalität zu einer gesteigerten Protein-Regulation führen. Dies sollte im nächsten Schritt durch Synthese von Zuckerderivaten näher untersucht werden. Abschließend sollten die dendritischen Strukturen auf das Folsäure Liganden-System übertragen werden, wodurch auch Krebszellen adressiert werden können.

Die Anwendbarkeit der modifizierten siRNAs sollte im dritten Teil der Arbeit im Rahmen von Kooperationen aufgezeigt werden. Ziel war es innerhalb einer ersten Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Conzelmann* Proteine des Tollwut Virus zu regulieren. Dies sollte durch Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Schwemmler* auch in Tollwut infizierten Mäusen durchgeführt werden. In einer internen Kooperation mit *Fabio Spada* sollte schließlich gezeigt werden, dass Anandamid auch einen Transport in Stammzellen ermöglicht. Dies sollte durch Regulation epigenetisch relevanter Tet-Enzyme gezeigt werden.

3 Evaluation von Anandamid modifizierter siRNA

Zu Beginn der Doktorarbeit sollte die von *Julian Willibald* entwickelte Anandamid-siRNA eingehender untersucht werden. Die Synthese erfolgte dabei über Click-Chemie ausgehend von Alkin modifizierten RNA-Oligonukleotiden sowie einem entsprechenden Anandamid-Monoazid **4** (Abbildung 3.1).

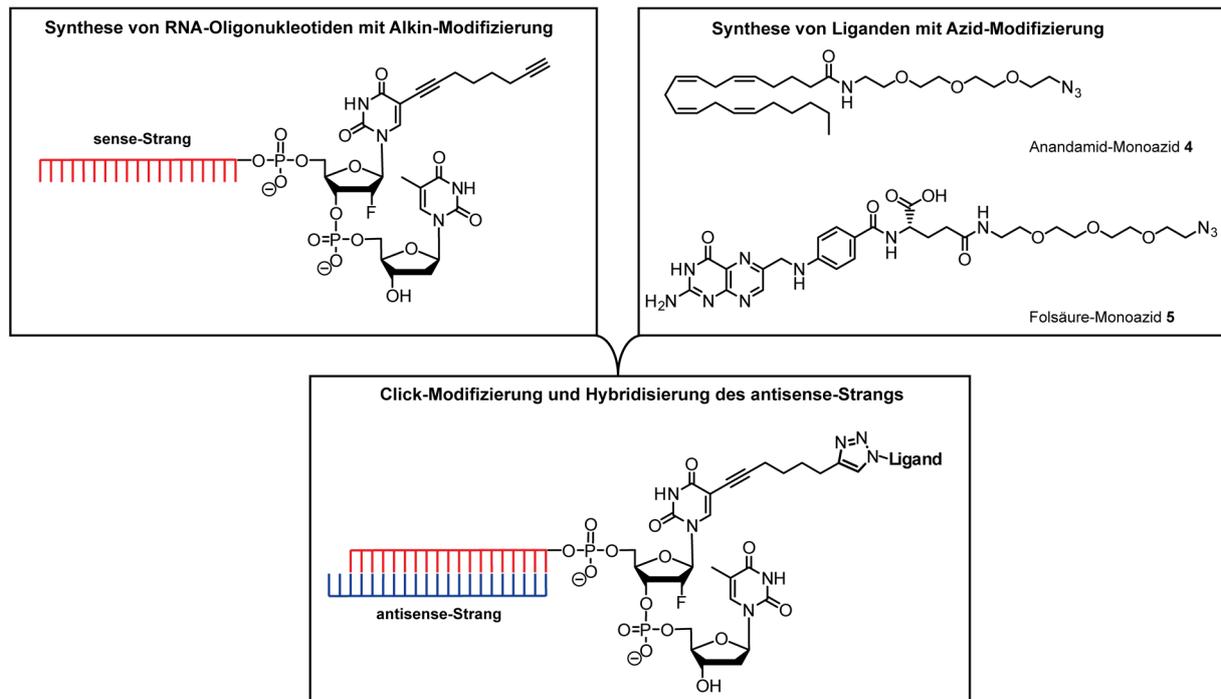


Abbildung 3.1 Liganden-Modifizierung von siRNA mittels Click-Chemie. Zu Beginn wurden RNA-Oligonukleotide mit Alkin-Modifizierung hergestellt. Parallel dazu erfolgte die Synthese eines Anandamid- sowie Folsäuremonoazids. Durch Click-Chemie wurden die so hergestellten Liganden-Azide mit einem Alkin modifizierten sense-Strang verknüpft. Der antisense-Strang wurde abschließend an die RNA-Struktur hybridisiert.

Es wurden daher zunächst sehr große Mengen von RNA-Oligonukleotiden mit Alkin-Funktionalität benötigt, weshalb die RNA-Festphasensynthese optimiert werden musste. Nach erfolgreicher Synthese der Stränge erfolgte die Einführung der Liganden-Funktionalität durch Kupfer katalysierte 1,3-dipolarer Cycloaddition. Dazu wurde neben dem Anandamid-Azid **4** auch ein Folsäureazid **5** eingesetzt. Folsäure-Konjugate ermöglichen den Transport in Krebszellen und wurde unter anderem als Referenz-System eingesetzt. Im Folgenden soll die Synthese von Liganden modifizierter siRNA näher beschrieben werden. Dies beinhaltet neben der Synthese der Oligonukleotide und dem Anandamid- bzw. Folsäureazid auch deren Verknüpfung mittels Kupfer katalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition (Click-Chemie).

3.1 Synthese Liganden-modifizierter siRNA

Für RNAi-Experimente mit Anandamid-modifizierter siRNA wurden verschiedene RNA-Oligonukleotide mit Alkin-Ankergruppe synthetisiert, welche eine postsynthetische Liganden-Modifizierung erlaubt. Mittels Festphasensynthese wurde dafür 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin-Phosphoramidit **6** in RNA-Oligonukleotide integriert. Die Synthese des Alkin-Phosphoramidits erfolgte in sechs Stufen ausgehend von 2'-Fluorouridin **7**.^[149]

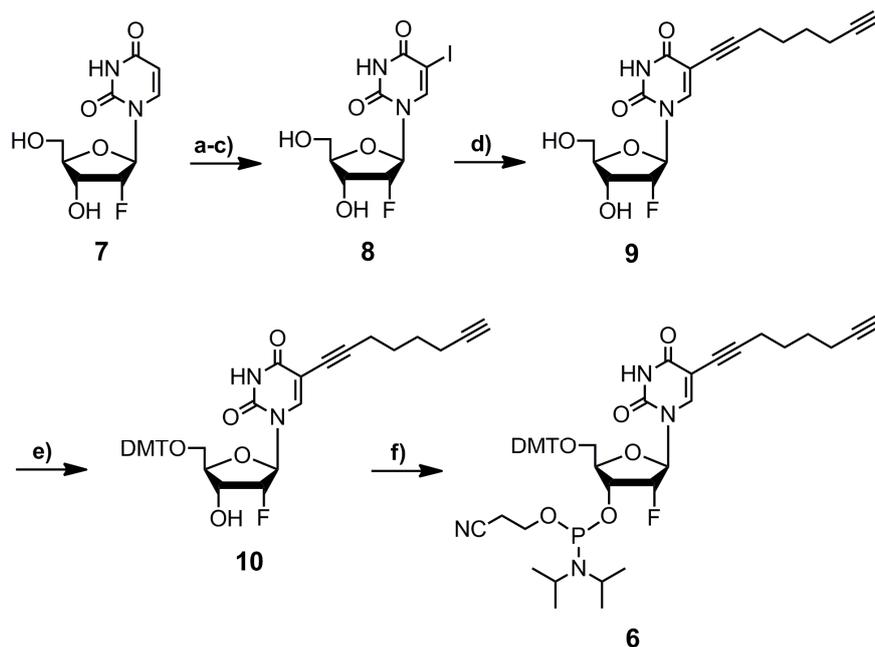


Abbildung 3.2 Synthese von 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin-Phosphoramidit. a) Ac_2O , 0 °C, 97 %, b) I_2 , CAN, 90 °C, 55 %, c) NH_3/MeOH 7N, RT, quant., d) Oktadiin, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI, DIPEA, DMF, RT, 89 %, e) DMTCl, DMAP, Pyridin, 0 °C \rightarrow RT, 70 %, f) CEDCI, DIPEA, DCM, RT, n.b.

Zu Beginn wurde dieses in quantitativer Ausbeute acetyliert und schließlich an der C5-Position iodiert. Das mittels Ammoniak in Methanol entschützte Iodouridin **8** wurde dann mit Oktadiin durch eine Palladium katalysierte *Sonogashira*-Kreuzkupplung umgesetzt. Im Anschluss erfolgte die Schützung der 5'-OH Gruppe des Uridins **9** mit Dimethoxytritylchlorid. Das geschützte Nukleosid **10** wurde dann mit 2-Cyano-ethyl-*N,N*-diisopropyl-chlorophosphor-diamidit (CEDCI) zum entsprechenden Phosphoramidit **6** umgesetzt. Dieser Schritt erfolgte stets unmittelbar vor der RNA-Festphasensynthese.

Für die RNA-Festphasensynthese wurden zunächst 2'-Thio-morpholin-4-carbothioat RNA-Phosphoramidite eingesetzt. Diese besitzen laut Hersteller höhere Kupplungsausbeuten als 2'-*tert*-Butyldimethylsilylether RNA-Phosphoramidite (TBDMS-Chemie). Zusätzlich können die entsprechenden Oligonukleotide in einem Schritt entschützt werden. Dabei wurde jedoch zu einem erheblichem Anteil (bis zu 50 %) ein nicht identifiziertes Nebenprodukt gebildet,

welches sich von der berechneten Produktmasse um 20 Dalton unterschied. Aufgrund des damit verbundenen Ausbeuten-Verlusts wurden schließlich 2'-TBDMS geschützte Phosphoramidite zur RNA-Synthese eingesetzt. Diese mussten jedoch für eine hohe Kupplungseffizienz während der Festphasensynthese (> 95 %) mit einer höheren Konzentration (0.20 – 0.15 M statt 0.10 M) angelöst werden. Die Kupplungszeit betrug 10 min, während typischerweise bei Standard DNA Synthesen 30 sec eingesetzt werden. Dadurch wurde eine hohe Kupplungseffizienz erreicht. Das 2'-Fluoroalkin-Phosphoramidit wurde dabei stets an der zweiten Position des 3'-Überhangs eingebaut. Sämtliche Synthesen wurden unter Verwendung eines dT-CPG Trägermaterials im 1 μ Mol bzw. 2 μ Mol Maßstab durchgeführt, wobei die Entschützung mit Ammoniak/Methylamin bzw. Triethylamin \cdot 3HF in zwei Schritten erfolgte. Die Aufreinigung und Charakterisierung erfolgte mittels präparativer *reversed phase* HPLC sowie MALDI-TOF. Es konnten dabei Ausbeuten von bis zu 25 % erreicht werden, so dass durch einen Synthesedurchlauf bis zu 500 nMol eines RNA-Oligonukleotids gewonnen werden konnten. Parallel zur Herstellung der RNA-Oligonukleotide erfolgte die Synthese von Anandamid bzw. Folsäure mit Azid-Funktionalität (Abbildung 3.3). Folsäure-Konjugate ermöglichen das Adressieren von Krebszellen, welche Folsäure-Rezeptoren überexprimieren. Dieses Rezeptor-Liganden-System ist in Kapitel 6 näher beschrieben.

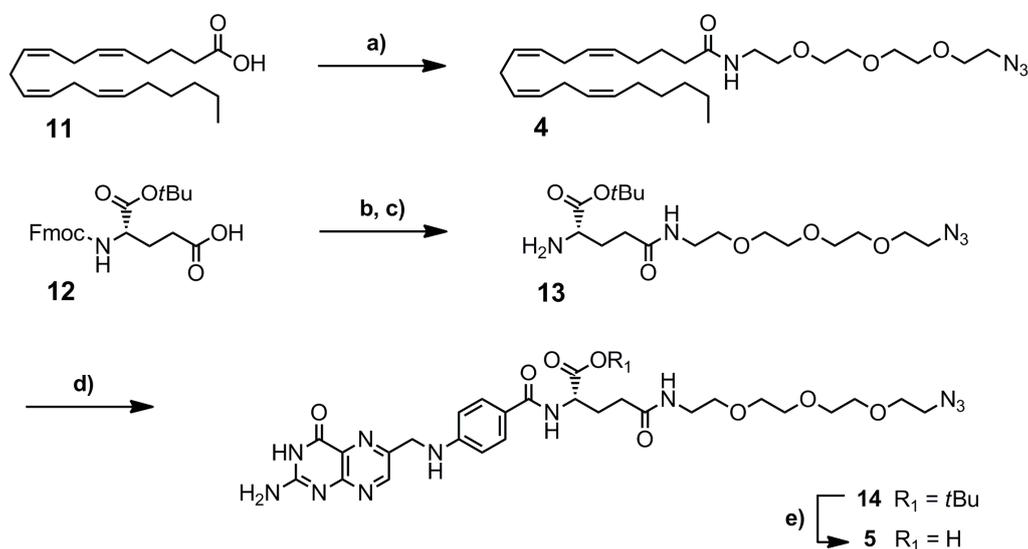


Abbildung 3.3 Synthese von Anandamid-Monoazid (4) sowie Folsäure-Monoazid (5). a) 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin, PyBOP, DIPEA, DMF, RT, 79 %, b) 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin, TBTU, DIPEA, DMF, RT, 82 %, c) DBU, DCM, RT, 83 %, d) Pteroisäure, TBTU, DIPEA, DMSO/DMF 1/1, RT, e) TFA, CHCl₃, RT, quant.

Das Anandamidmonoazid 4 wurde durch eine PyBOP vermittelte Amid-Kupplung ausgehend von Arachidonsäure 11 sowie kommerziell erhältlichem 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin hergestellt.^[80] Die Synthese von Folsäuremonoazid 5 erfolgte in 4 Schritten.^[80] Zu Beginn

wurde dabei doppeltgeschütztes Glutamat **12** zunächst TBTU vermittelt mit 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin umgesetzt, was mit einer Ausbeute von 82 % gelang. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte schließlich durch DBU in DCM, wodurch der entsprechende Aminobaustein **13** mit 83 % Ausbeute erhalten werden konnte. Dieser wurde schließlich mit ungeschützter Pteroinsäure ebenfalls TBTU vermittelt zur Reaktion gebracht. Das Kupplungsprodukt **14** konnte trotz der hohen Polarität mittels Chromatografie an Kieselgel aufgereinigt werden und war ausreichend rein für weitere Umsetzungen. Im letzten Schritt wurde die *tert*-Butylgruppe der Glutamat-Einheit durch TFA in CHCl₃ abgespalten, was mit quantitativer Ausbeute gelang. Durch mehrere Waschschrte unter anderem mit Aceton konnte das ausschließlich in DMSO lösliche Folsäuremonoazid **5** in sehr hoher Reinheit gewonnen werden.

Die so hergestellten Liganden-Azide wurden dann mittels Kupfer katalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition an die RNA-Oligonukleotide geknüpft. Nach erfolgter Synthese unterschiedlich modifizierter siRNAs mussten diese auf ihre biologische Aktivität untersucht werden. Dies erfolgte hauptsächlich durch einen Luciferase basierten *Assay*, welcher in folgendem Kapitel näher erläutert wird.

3.1 Luciferase-Assay zur Untersuchung der Proteinexpression

Die Evaluation der biologischen Aktivität der in dieser Arbeit synthetisierten siRNAs erfolgte durch einen Assay basierend auf zwei Luciferasen (Abbildung 3.4). Dieser wurde in der Masterarbeit des Autors im Arbeitskreis von *Prof. Carell* etabliert. Der Assay basiert auf einem Reporter-Vektor (*psiCHECK*TM-2) mit der genetischen Information für zwei Luciferase-Reporterenzyme (duales Reportersystem). Es handelt sich zum einen um die Luciferase der *Firefly* sowie zum anderen um die Luciferase der *Renilla reniformis*. Der Reporter-Vektor *psiCHECK*TM-2 wurde durch chemisch-kompetente *E. coli* Zellen amplifiziert, wobei die Transformation der Zellen durch Hitze-Schock erfolgte. Durch das Enzym der *Firefly* wird dabei eine ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Freisetzung von Licht der Wellenlänge 560 nm katalysiert. Die *Renilla*-Luciferase hingegen katalysiert eine ATP-unabhängige oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin, wodurch Licht der Wellenlänge 482 nm emittiert wird. Zellen werden zunächst mit dem Reporter-Vektor transfiziert, was die Expression beider Enzyme zur Folge hat. Schließlich kann nach Lyse der Zellen durch Messung der emittierten Lichtquanten auf das Ausmaß der Expression der jeweiligen Luciferase geschlossen werden.

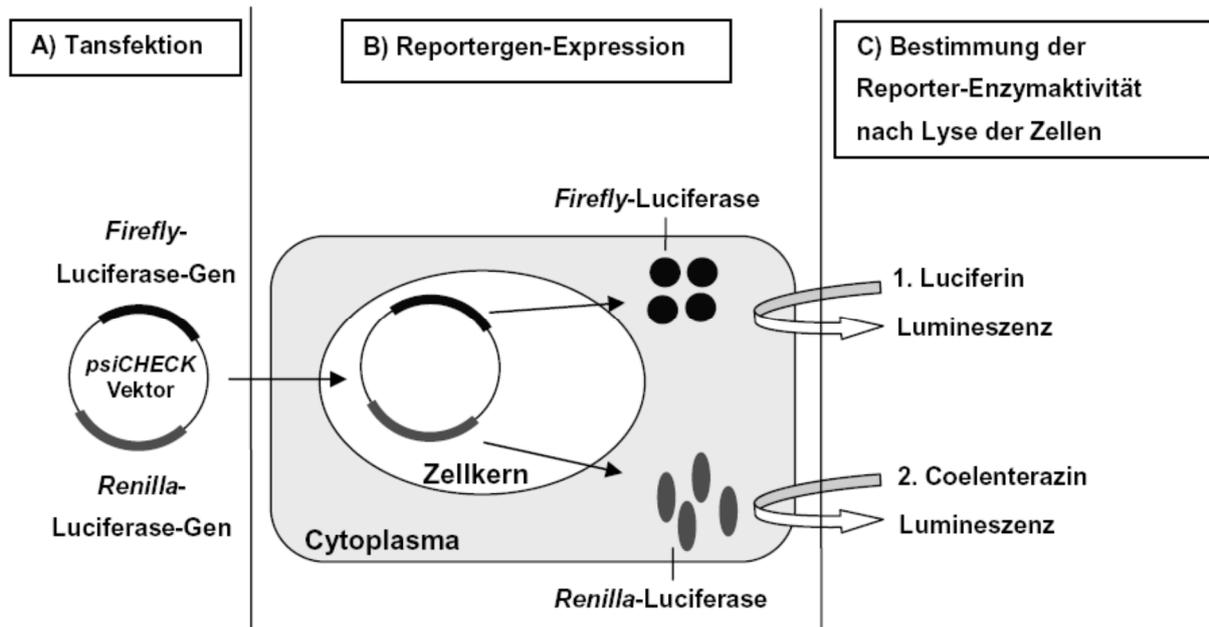


Abbildung 3.4 Prinzip des dualen Luciferase-Reporter Modellsystems. Ein Reporter-Vektor (*psiCHECK*TM-2) mit der genetischen Information für zwei Luciferasen wird zunächst in Zellen transfiziert, was zu der Expression beider Enzyme führt. Nach Lyse der Zellen kann die Expression der *Firefly*- sowie *Renilla*-Luciferase durch Lumineszenz-Messungen bestimmt werden. Dazu wird das Lysat zunächst mit dem Substrat der *Firefly*-Luciferase (Luciferin) versetzt und die dabei freigesetzte Lumineszenz quantifiziert. Diese wird dann gezielt inhibiert, das Substrat der *Renilla*-Luciferase (Coelenterazin) zugegeben und die dabei freigesetzte Lumineszenz gemessen. In einem *RNAi*-Experiment, wird einer der beiden Reporter („experimenteller“ Reporter) durch siRNA reguliert, während der andere Reporter zur Normalisierung eingesetzt wird. Dadurch können experimentelle Schwankungen (z. B. unterschiedliche Transfektionseffizienzen) ausgeglichen werden.

Da beide Enzyme eine unterschiedliche Substratspezifität besitzen, kann die Biolumineszenz beider Enzyme unterschieden werden. Zunächst wird die Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase bestimmt, diese gehemmt und gleichzeitig die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase durch entsprechende Substratzugabe ausgelöst. In einem *RNAi*-Experiment, wird einer der beiden Reporter durch siRNA reguliert, während der andere Reporter eine interne Kontrolle der Transfektionseffizienz darstellt. Nach Empfehlung von *Promega* wurde die *Renilla*-Luciferase als experimenteller Reporter und die *Firefly*-Luciferase als Kontroll-Reporter verwendet. Zusammenfassend führt somit eine effektive siRNA zu einer Abnahme der Expression der *Renilla*-Luciferase, was durch die Abnahme der durch dieses Enzym ausgelösten Lumineszenz quantifiziert werden kann. Letztere wird durch die Lumineszenz der zusätzlich exprimierten *Firefly*-Luciferase normalisiert, wodurch experimentelle Schwankungen ausgeglichen werden können. Man ist somit nicht auf Zelllinien mit stabil-transfizierten Reportergenen angewiesen. Experimentell wurde dabei stets im 96-*well* gearbeitet, was die Durchführung sehr vieler Experimente mit gleichzeitig niedrigem Materialverbrauch erlaubte. Alle Experimente wurde dabei im Triplikat durchgeführt und pro *well* je nach Experiment 10.000 bis 30.000 Zellen eingesetzt. Nach dem Aussähen der Zellen wurde der Vektor *psiCHECK*TM-2, vermittelt durch

ein Transfektionsreagenz (*jetPRIME*) in die Zellen eingebracht. Die zu untersuchende siRNA kann schließlich nach einem Mediumwechsel zugegeben werden. Zwischen der siRNA-Zugabe und dem Auslesen der Lumineszenz hat sich ein Zeitraum von 48 h als vorteilhaft erwiesen. Für die Auswertung wurde die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase gegen den internen Standard (*Firefly*-Luciferase) normalisiert. Das Lumineszenz-Verhältnis beider Luciferasen innerhalb eines Experiments ohne Zugabe von siRNA ermöglicht eine Quantifizierung der Protein-Regulation verursacht durch Zugabe der einzelnen siRNA-Konstrukte. Die entsprechenden Werte werden in dieser Arbeit als relative Expressionen bezeichnet und in Prozent angegeben.

3.2 Anandamid vermittelter Transport im Vergleich zu *jetPRIME*

Zu Beginn sollte die breite Anwendbarkeit des Anandamid-siRNA-Systems untermauert werden. Dazu wurde zunächst die Effizienz der Anandamid vermittelten Aufnahme mit der Effizienz, erzielt durch ein kommerziell verfügbares kationisches Transfektionsreagenz, (*jetPRIME*) verglichen. Wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben bilden kationische Reagenzien so genannte Lipo- oder Polyplexe mit negativ geladener siRNA aus und führen zu einer Aufnahme mittels Endozytose. Als Maß für die Transporteigenschaften wurde die Regulation einer *Renilla*-Luciferase verwendet, was durch den im vorherigen Kapitel beschriebenen Assay quantifiziert werden kann. Durch einen ebenfalls Luciferase basierten Assay wurden außerdem die toxischen Eigenschaften der *jetPRIME* sowie Anandamid vermittelten Aufnahme bestimmt. Beide Experimente sollen im Folgenden beschrieben werden und wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Conzelmann durchgeführt.

3.2.1 Regulation einer *Renilla*-Luciferase in humanen Immunzellen

Bisherige Experimente mit Anandamid-siRNA wurden stets in RBL-2H3-Zellen also Ratten-Mastzellen durchgeführt. Es sollte nun untersucht werden, ob Anandamid eine Aufnahme in einer humanen Immunzell-Linie (BJAB) vermitteln kann und die Transport-Effizienz mit dem kommerziell verfügbaren Transfektions-Reagenz *jetPRIME* verglichen werden. Dies sollte durch den im vorherigen Kapitel beschriebenen Luciferase-Assay erfolgen. Synthetisiert wurden dafür zwei gegen die *Renilla*-Luciferase gerichtete siRNAs mit sowie ohne Anandamid-Modifizierung (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Zusammenfassung der synthetisierten Anandamid-siRNAs zur Regulation der Renilla-Lucifase in humanen Immunzellen (BJAB). Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. X = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
Luc-siRNA (ORN1/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Luc-siRNA1 (ORN1+4/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> (+4)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	

In einem ersten Experiment wurde der AEA-Duplex in drei unterschiedlichen Konzentrationen, sowohl mit als auch ohne Transfektionsreagenz auf das Zellmedium gegeben und nach 48 h die Expression der Renilla-Luciferase bestimmt. Wie in Abbildung 3.5A erkennbar, wurde in beiden Fällen eine dosis abhängige Regulation des Reporter-Enzyms erreicht. Anandamid ist somit in der Lage einen effizienten siRNA-Transport in BJAB-Zellen zu vermitteln. Dabei stellte sich heraus, dass bei einer Duplex-Konzentration von 1 μ M in beiden Fällen vergleichbare Regulationseffekte erzielt werden konnten. So wurde die Renilla-Luciferase in der Anwesenheit von *jetPRIME* um 50 % sowie ohne *jetPRIME* um 40 % reguliert.

Zusätzlich wurde der Einfluss des Anandamid-Liganden in der Anwesenheit von Transfektionsreagenz untersucht. Dazu wurde ein Duplex mit, sowie ein Duplex ohne Anandamid-Ligand *jetPRIME*-vermittelt in die Zellen transfiziert. Wie in Abbildung 3.5B erkennbar erhöht der Ligand in Anwesenheit von *jetPRIME* die Protein-Regulation um einen Faktor 2. Somit scheint der Anandamid-Ligand auch in Kombination mit dem kationischen Reagenz einen dirigierenden Effekt in die Zelle zu erfüllen. Wie außerdem erkennbar, führt der mit *jetPRIME* transfizierte siRNA-Duplex ohne Anandamid zu einer geringeren Regulation als Anandamid modifizierte siRNA.

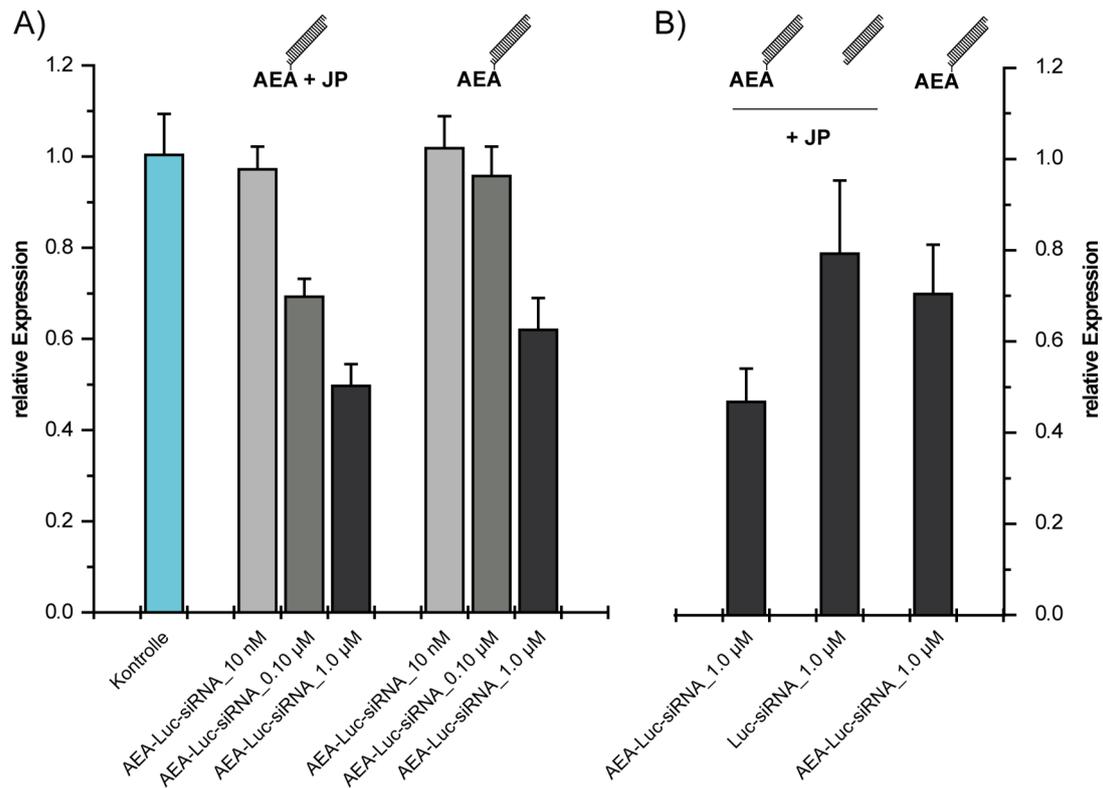


Abbildung 3.5 Luciferase-Assay in einer humanen Immunzelllinie (BJAB). A) Die AEA-siRNA wurde mit sowie ohne Transfektionsreagenz in die Zellen transfiziert. B) Es wurde der Einfluss des AEA-Liganden in der Anwesenheit von *jetPRIME* untersucht. Dazu wurde Anandamid sowie unmodifizierte siRNA durch *jetPRIME* in die Zellen transfiziert.

Zusammenfassend ist Anandamid in der Lage einen effizienten siRNA-Transport vergleichbar mit kommerziellen Transfektionsreagenzien in humane Immunzellen (BJAB) zu vermitteln. Durch kationischen Transfektionsreagenzien ist jedoch keine zellspezifische Aufnahme möglich. Durch einen ebenfalls Luciferase basierten Assay sollte im nächsten Schritt die toxischen Eigenschaften der Anandamid sowie *jetPRIME* vermittelten Aufnahme verglichen werden.

3.2.2 Untersuchung der Toxizität von Anandamid-siRNA

Für potentielle *in vivo* Anwendungen der Anandamid-siRNA musste auch untersucht werden, ob die Anandamid vermittelte Aufnahme mit toxischen Effekten für Zellen verbunden ist. Dazu wurde ein ebenfalls Luciferase basierter Assay von *Promega* gewählt, welcher in Kooperation mit *Konstantin Sparrer* (Arbeitsgruppe Prof. *Conzelmann*) durchgeführt wurde. Grundlage für diesen Assay ist ein Luciferin-Peptid Konjugat, welches einfach auf das Zellmedium gegeben werden kann (Abbildung 3.6). Dieses Konjugat kann die Zellmembran intakter Zellen nicht passieren. Gleichzeitig führen tote Zellen zu einer Freisetzung von Proteasen, wodurch das

Konjugat gespalten und natives Luciferin freigesetzt wird. Dieses führt in der Anwesenheit von Luciferase sowie entsprechenden Kofaktoren zur Freisetzung von Lumineszenz, welche somit ein direktes Maß zur Quantifizierung von toten Zellen darstellt. Auch für dieses Experiment wurde die humane B-Zelllinie *BJAB* verwendet.

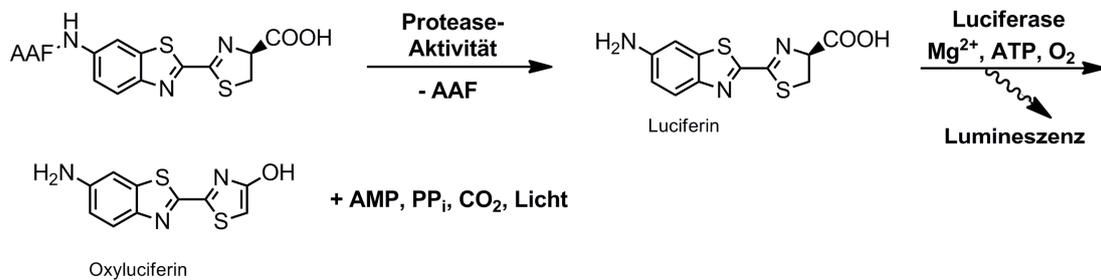


Abbildung 3.6 Luciferase basierter Assay zur Untersuchung der Toxizität (*Promega*). Ein Luciferin-Peptid Konjugat kann durch Proteasen, freigesetzt von toten Zellen, gespalten werden. Das dabei freigesetzte Luciferase-Substrat kann durch ATP abhängige Decarboxylierung unter der Emission von Licht quantifiziert werden. Die Lumineszenz ist somit ein direktes Maß für Proteasen, welche von toten Zellen freigesetzt werden und kann somit zur Quantifizierung von Toxizitäten verwendet werden.

Um die Größenordnung der Lumineszenz-Werte einordnen zu können, wurden zunächst zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Zu Beginn wurde dazu die Lumineszenz im Fall von unbehandelten Zellen gemessen. Der erhaltene Lumineszenz-Wert wurde auf eins normalisiert, so dass alle gemessenen Lumineszenz-Werte auf dieses Kontroll-Experiment bezogen werden (Abbildung 3.7).

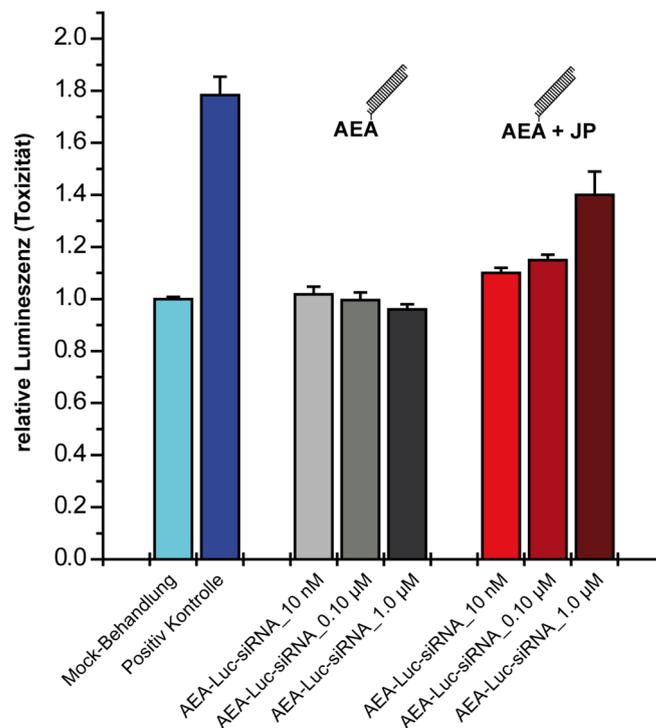


Abbildung 3.7 Untersuchung der Toxizität von Anandamid modifizierter siRNA durch einen Luciferase basierten Assay (*Konstantin Sparrer, AK Prof. Conzelmann*). Anandamid-siRNA führt im betrachteten Konzentrationsintervall zu keinem Anstieg der Toxizität. Mock behandelte Zellen wurden nicht mit siRNA transfiziert. Bei der positiv Kontrolle wurden die Zellen mit überproportional viel Transfektionsreagenz inkubiert.

Im zweiten Kontrollexperiment wurden die Zellen durch Zugabe von überproportional viel Transfektionsreagenz Stress ausgesetzt. Dabei ist bereits im Vergleich zu nicht behandelten Zellen ein deutlicher Anstieg der Lumineszenz erkennbar. Zusätzlich wurden drei unterschiedliche Anandamid-Duplex-Konzentrationen mit sowie ohne Transfektionsreagenz zugegeben. Im Fall der Anandamid vermittelten Aufnahme kam es im betrachteten Konzentrations-Intervall zu keinem Anstieg der gemessenen Lumineszenzen. Somit konnte in Bezug auf unbehandelte Zellen keine Toxizität von Anandamid-siRNA gemessen werden. Im Fall der Transfektionreagenz vermittelten Aufnahme stieg der Toxizitätswert bei einer Duplexkonzentration von 1 μ M auf 1.4 an.

Zusammenfassend kann mit dem Anandamid-Duplex in der hier verwendeten humanen B-Zelllinie (*BJAB*) im Vergleich zu unbehandelten Zellen kein Toxizitätseffekt beobachtet werden. Gleichzeitig können, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, mit dem Liganden-Konjugat ähnliche Regulationen, wie durch das Transfektions-Reagenz erreicht werden.

3.3 Vergleich der Anandamid-siRNA mit anderen Ligandensystemen

Um die Anandamid-siRNA weiter zu charakterisieren, wurde diese auch mit zwei weiteren Liganden-Systemen verglichen. Dies war zum einen Cholesterol, welches über LDL-Partikel mit LDL-Rezeptoren in Zellen aufgenommen werden kann.^[51] Zum anderen wurde Folsäure-siRNA zum Vergleich eingesetzt, wobei für die Aufnahme der Folat-Rezeptor verantwortlich ist. Dieser Vergleich wurde in HeLa-Zellen durchgeführt, welche laut Literatur mit allen drei Rezeptor-Systemen ausgestattet seien sollten.^[150] In Tabelle 3.2 ist die Bibliothek der dazu eingesetzten Liganden-siRNAs zusammengefasst. Die Cholesterol-siRNA wurde freundlicherweise von *Julian Willibald* zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.2 Zusammenfassung der Liganden-siRNAs zur Regulation der *Renilla*-Luciferase. Als Liganden wurden Anandamid (AEA), Cholesterol (Chol) sowie Folsäure (FS) eingesetzt. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. \underline{X} = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
AEA-Luc-siRNA (ORN1+4/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	 AEA
Chol-Luc-siRNA (ORN1+Chol/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+Chol)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	 Chol
FS-Luc-siRNA (ORN1+5/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+5)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	 FS

Die Evaluation der unterschiedlichen Liganden siRNAs erfolgte durch einen Luciferase-Assay (Kapitel 3.1). Dabei wurden die Zellen mit allen drei Konjugaten in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0.25 bzw. 0.50 μ M) behandelt und nach 48 h die Expression der *Renilla*-Luciferase detektiert. Durchgeführt, wurde auch eine positiv Kontrolle, wobei die siRNAs mit *jetPRIME* transfiziert wurden. Dies sollte die allgemeine Funktionalität der eingesetzten siRNAs aufzeigen.

In jedem Fall konnte ein dosisabhängiger Effekt erzielt werden, wobei die größte Protein-Regulation von Folat- gefolgt von Anandamid- und schließlich Cholesterol-siRNA gemessen wurde (Abbildung 3.8). Die durchgeführte positiv Kontrolle zeigt in allen Fällen, dass die drei eingesetzten siRNAs funktional sind. Unterschiede in der Regulation sind somit auf das Liganden-System zurückzuführen.

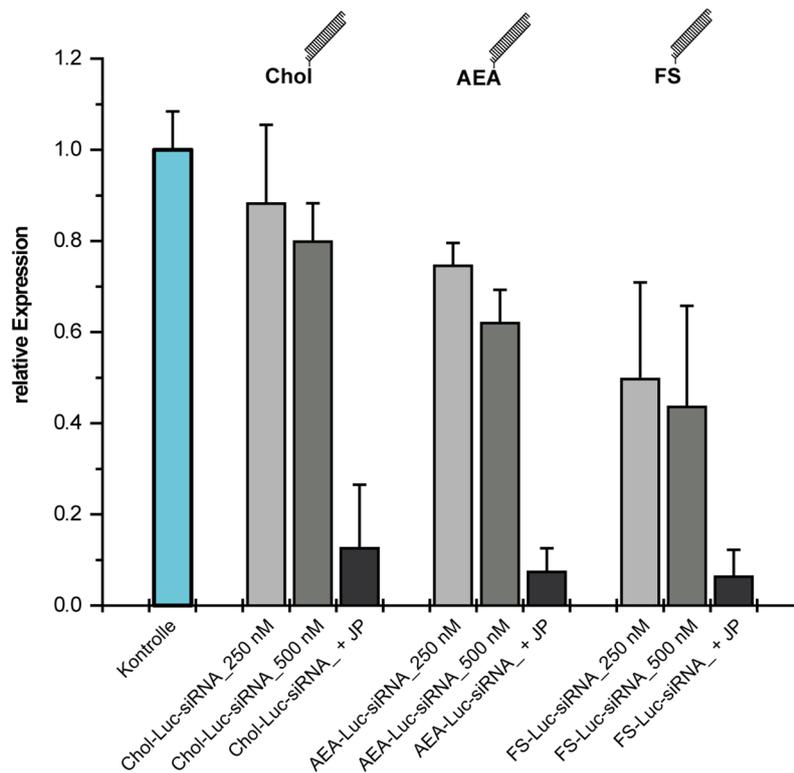


Abbildung 3.8 Regulation der Renilla-Luciferase durch siRNAs mit unterschiedlicher Liganden-Modifizierung in HeLa-Zellen. Verglichen wurden Cholesterol, Anandamid sowie Folsäure modifizierte siRNA (Tabelle 3.2) auf die Regulation der *Renilla*-Luciferase. Für die positiv Kontrolle wurden diese siRNAs mit *jetPRIME* in die Zellen transfiziert.

Da HeLa-Zellen ein Standard-System für die Aufnahme von Folsäure-Konjugaten sind,^[150b] ist die dominierende Wirkung der Folsäure-siRNA nicht verwunderlich. Anandamid-siRNA zeigt jedoch im betrachteten Konzentrationsbereich auch in HeLa-Zellen eine größere regulative Wirkung als Cholesterol modifizierte siRNA, das in der Literatur bisher am besten charakterisierte Liganden-Konjugat. Im nächsten Schritt sollte Anandamid-siRNA durch Stabilisierung der RNA-Oligonukleotide optimiert werden. Dies wird im nächsten Kapitel beschrieben.

3.4 Einbau und Untersuchung von Thioat-Substitutionen

Für potentielle *in vivo* Anwendungen ist die Stabilität der eingesetzten siRNAs eine essentielle Eigenschaft, um die Resistenz gegenüber Nukleasen zu erhöhen.^[34a] Zusammen mit *Julian Willibald* wurde bereits der Einbau von 2'-Fluoro-Basen auf die Effektivität der Anandamid-siRNA untersucht. Dabei ergab sich zumindest *in vitro* keine deutliche Steigerung der Regulation einer Renilla-Luciferase. Es sollte daher der Einfluss weiterer RNA-Modifizierungen näher untersucht werden. Der Einbau von Thioat-Modifizierungen in das Phosphatrückgrad stellt dabei einen weiteren Ansatzpunkt dar.^[34b, 34c, 36] Im Gegensatz zu 2'-

Fluorobasen ist der Thioat-Einbau zusätzlich sehr preisgünstig. Diese Modifizierung wird von der RNAi-Maschinerie sehr gut toleriert und erzeugt eine hohe Stabilität gegenüber *RNasen*.^[35, 151] Während der RNA Synthese wird im Oxidationsschritt anstelle eines nicht-Brücken-Sauerstoffatoms ein Schwefelatom eingebaut. Verwendet wurde dazu das *Sulfurizing Reagent II* von *Glenn Research* (Abbildung 3.9A) gelöst in Pyridin/Acetonitril (60:40), welches anstelle von der Iod-Oxidationslösung im entsprechenden Synthesesyklus eingesetzt wurde. Der Einbau erfolgte mit sehr hoher Effizienz, führt jedoch zu diastereomerisomeren Oligonukleotiden, was die Aufreinigung mittels HPLC deutlich erschwerte (Abbildung 3.9B).

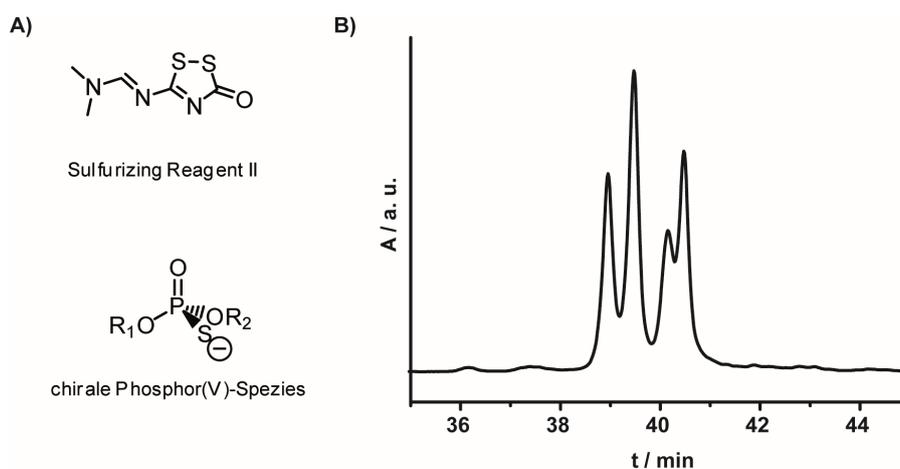


Abbildung 3.9 A) *Sulfurizing Reagent II* zum Einbau von Thioaten in das Phosphat-Rückgrat durch Festphasensynthese. B) HPLC-Eluogramm eines RNA-Oligonukleotids mit 2 Thioat-Modifizierungen unmittelbar nach der Festphasensynthese.

Als Position für die Thioat-Substitutionen wurden die 3'-Überhänge gewählt, um die Stabilität gegenüber Exonukleasen zu erhöhen.^[25] Die Überhänge sind zudem ein typisches Strukturmotiv einer siRNA. Daher wurde in dieser Studie, die in jeder siRNA vorhandenen Desoxythymidin-Überhänge als Position für Thioatmodifizierungen gewählt, was eine sequenzunabhängige Aussage ermöglicht. Prinzipiell müsste der Einbau von RNA-Modifizierungen für jede Sequenz neu untersucht werden.^[152] Dies ist jedoch mit einem hohen Material und Zeitaufwand verbunden.

Es wurden siRNA-Duplexe mit einem bzw. zwei Thioaten in den sense- bzw. antisense-Strang hergestellt. Der sense-Strang wurde dabei stets zusätzlich mit einer Alkin-Reportergruppe synthetisiert, um eine postsynthetische Modifizierung mit Anandamid-Monoazid zu ermöglichen. Die Bibliothek der sich daraus ergebenden Anandamid-siRNAs ist in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3 Zusammenfassung der Anandamid-siRNAs gegen die *Renilla*-Luciferase mit unterschiedlicher Thioat-Modifizierung. Diese wurde in das Rückgrat des sense- und den antisense-Strangs eingebaut. Die Position der Thioat-Modifizierung ist durch ein hoch gestelltes **S** gekennzeichnet. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. \underline{X} = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin. Δ = schematische Position der Thioat-Modifizierung im Phosphatrückgrad.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
AEA-Luc-siRNA (ORN1+4/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Luc-siRNA2 (ORN3+4/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4) ^S T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Luc-siRNA3 (ORN1+4/ORN4)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4)T 3'-T ^S T ^S ccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Luc-siRNA4 (ORN3+4/ORN4)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4) ^S T 3'-T ^S T ^S ccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	

Mit der so erhaltenen siRNA-Bibliothek wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt (Abbildung 3.10). Die Einführung einer Thioat-Modifizierung in den sense-Strang der siRNA führte zu keiner gesteigerten Regulation der *Renilla*-Luciferase in Bezug auf die unmodifizierte Anandamid-siRNA. Werden jedoch zwei Thioate in den antisense-Strang eingebaut, so kann bei Konzentrationen zwischen 125 und 500 nM eine durchschnittliche Steigerung der Regulation um 20 % erreicht werden. Die Kombination aus Thioat-modifiziertem sense- und antisense-Strang führt jedoch nicht zu einer weiteren Steigerung der siRNA-Effizienz. Somit kann durch die Einführung von nur 2 Thioaten in den 3'-Überhang des antisense-Strangs eine gesteigerte Regulationseffizienz erreicht werden. Da der antisense-Strang stets im *RIS-Complex* verbleibt und somit eine wesentlich größere Rolle im Verlauf der RNA-Interferenz spielt, hat dessen Stabilisierung vermutlich einen größeren Einfluss auf die Effektivität der Genregulation.

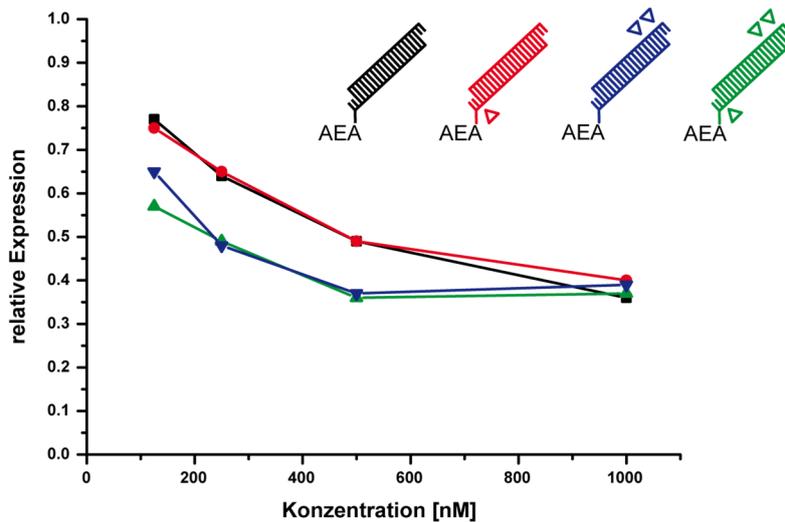


Abbildung 3.10 Regulation der Renilla-Luciferase durch siRNAs mit unterschiedlicher Thioat-Modifizierungen des Phosphatrückgrads in HeLa-Zellen. Die Thioat-Modifizierung wurde dabei sowohl in den sense- als auch den antisense-Strang eingebaut. Die Anzahl und Position der Thioat-Modifizierungen sind innerhalb des siRNA-Duplexes schematisch dargestellt und in Tabelle 3.3 genau beschrieben. Δ = schematische Position der Thioat-Modifizierung im Phosphatrückgrad.

Denkbar ist natürlich die Anzahl der Thioat-Modifizierungen weiter zu steigern, was jedoch aufgrund der Bildung von Diastereomeren zu einem äußerst schwierigem chromatografischen Trennproblem führt. Zusätzlich ist der Einbau von Thioate in das Phospharrückgrad mit toxischen Effekten verbunden.^[28, 35] Um die Effizienz des siRNA Liganden-Systems weiter zu steigern, wurde im nächsten Schritt eine neuartige verzweigte siRNA-Stukturen entwickelt. Dies soll im folgenden Kapitel beschrieben werden.

4 Entwicklung multimerer siRNA Strukturen

Ausgehend von dem bisher beschriebenen kovalenten siRNA Liganden-Konstrukt, sollte eine neuartige siRNA-Struktur entwickelt werden. Dazu sollte an einen Rezeptor-Liganden mehrere siRNA-Duplexe verknüpft werden. Grundgedanke war dabei die Menge an siRNA-Molekülen, welche mit einem Aufnahme-Zyklus in die Zellen eingeschleust werden zu erhöhen. Dadurch sollte eine gesteigerte Protein-Regulation erzielt werden. Eine derart artifizielle Struktur sollte zusätzlich eine erhöhte Stabilität gegenüber *RNasen* besitzen und auch *in vivo* durch den größeren räumlichen Anspruch bessere pharmakologische Eigenschaften zeigen. So wurde in der Literatur durch eine tetramere siRNA-Struktur basierend auf DNA-Origami die Blutzirkulationszeit ($t_{1/2} = 6 \text{ min}$ vs. $t_{1/2} = 24.2 \text{ min}$) um den Faktor 4 erhöht.^[153]

Das Vorgehen zur Entwicklung der verzweigten Strukturen soll im Folgenden kurz erläutert werden (Abbildung 4.1). Zunächst wurde, basierend auf einem Anandamid-Triazid, mittels Click-Chemie eine Trimere-siRNA (Tripod) synthetisiert. Wobei bei diesem System der Einfluss des Spacers zwischen Verzweigungs-Ursprung und den siRNAs untersucht wurde. Auch wurde dieses Konzept auf ein anderes Liganden-System (Folsäure) übertragen und zusammen mit *Julian Willibald* zusätzliche Funktionalitäten eingeführt.

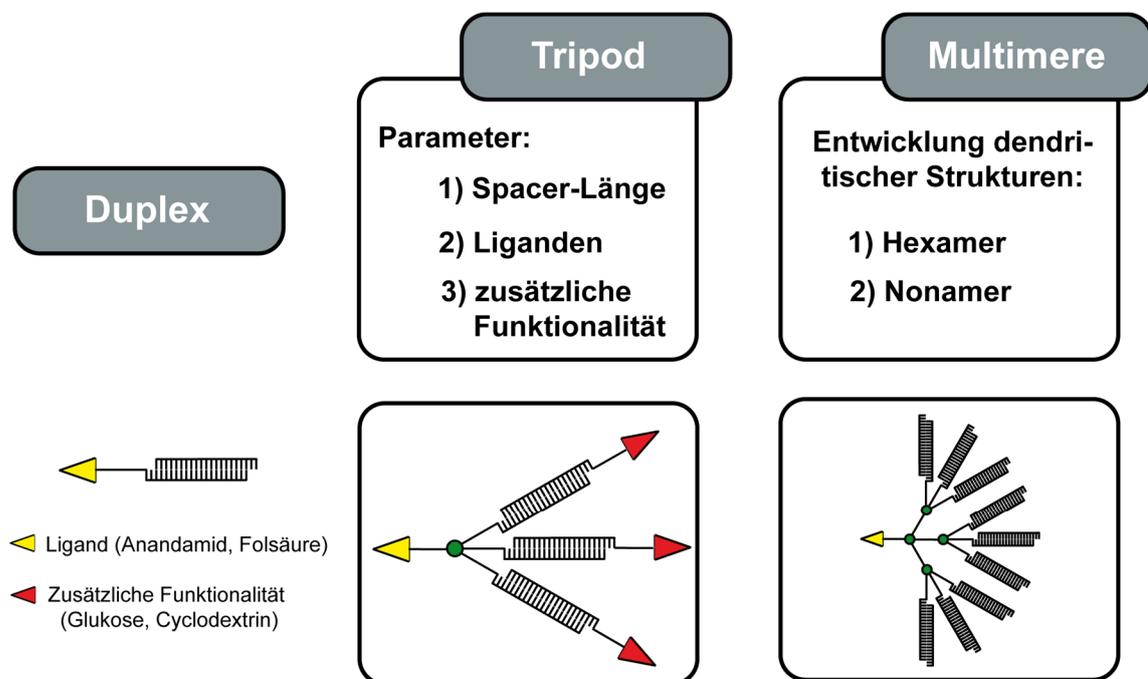


Abbildung 4.1 Konzept der Entwicklung dendritischer siRNA-Strukturen.

Schließlich wurde das Trimere-System auf dendritische Strukturen mit sechs bzw. neun siRNA-Armen erweitert. In allen Fällen erfolgte die Evaluation der neuen Strukturen durch einen Luciferase-Assay (Kapitel 3.1). Im Folgenden soll die hier zusammengefasste Vorgehensweise genauer erläutert werden. Ausgangspunkt der Entwicklung war die Synthese von Anandamid-Triaziden.

4.1 Synthese von Triazido-Bausteinen

Die neu hergestellten Anandamid-Triazide sollten strukturell ähnlich zu dem bisherigen Anandamid-Monoazid **4**, entwickelt von *Julian Willibald*, gewählt werden (Abbildung 4.2). Daher sollte der Tetraethylenglycol-Spacer beibehalten und Pentaerythritol als Kern für die verzweigten Strukturen verwendet werden. In einer ersten Anandamidgerüststruktur **1** wurden die drei Azide für die Verzweigung direkt am Pentaerythritol-Kern eingeführt. Durch die direkte Verknüpfung von drei RNA-Strängen entstehen sterisch stark belastete Strukturen. Unklar war, ob diese noch in den RISC eingebaut bzw. von diesem prozessiert werden können. Eine wichtige Rolle ist daher die Länge des Spacers zwischen dem Verzweigungs-Kern und der siRNA.

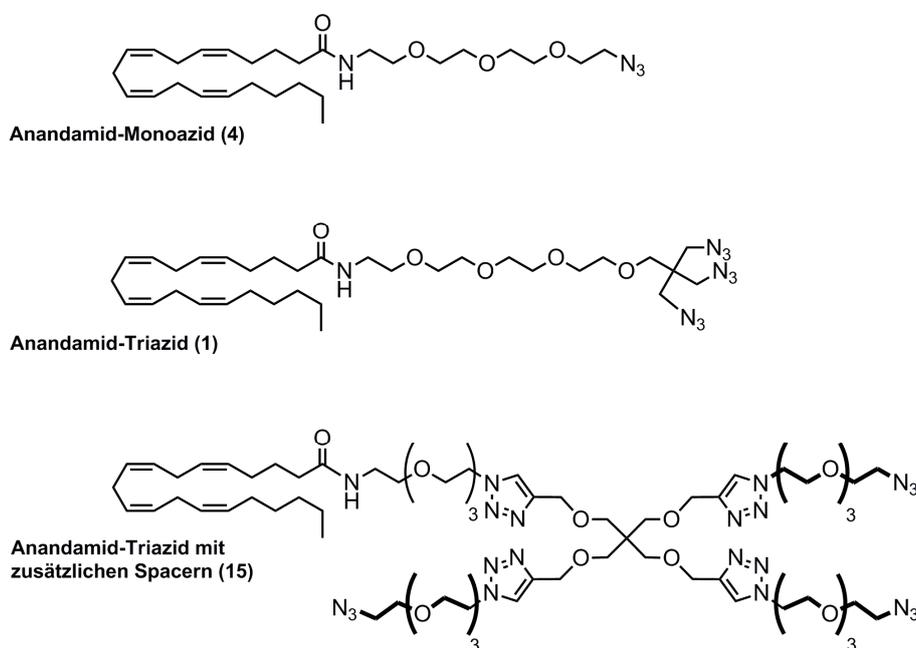


Abbildung 4.2 Bibliothek unterschiedlicher Anandamid Azide. Die Strukturen **1** bzw. **15** tragen jeweils drei Azidofunktionalitäten und unterscheiden sich in der Spacer-Länge.

Um diesen Parameter untersuchen zu können, wurde auch die Verbindung **15** synthetisiert, wobei die drei Azide über drei entsprechend modifizierte Tetraethylenglycol-Spacer eingeführt wurden. Im Folgenden soll die Synthese beider Triazide vorgestellt werden.

Zu Beginn wurde Pentaerythritol **16** mit drei Äquivalenten Tosylchlorid umgesetzt und nach chromatografischer Aufreinigung das Pentaerythritol-Tritosylat **17** erhalten (Abbildung 4.3). Dieses wurde mit einem Überschuss an Natriumazid zu dem entsprechenden Pentaerythritol-Triazid **18** umgesetzt. Aufgrund der potentiellen Explosionsgefahr^[154] wurde das Triazid mit besonderer Vorsicht gehandhabt.

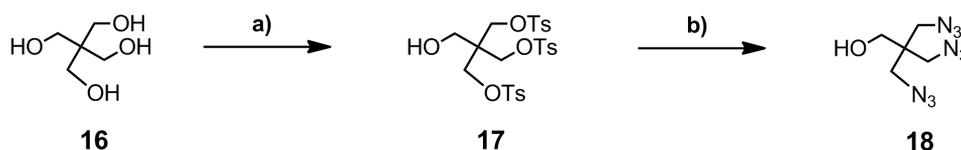


Abbildung 4.3 Synthese eines Pentaerythritoltriazids **18** als Verzweigungskern. a) TsCl, Pyridin, RT, 50 %, b) NaN₃, DMF, 110 °C, 97 %.

Parallel dazu wurde die *Spacer*-Einheit **19** zwischen Liganden und Pentaerythritol Kern synthetisiert werden. Hierbei wurde Tetraethylenglycol **20** in zwei Schritten in das entsprechende Tetraethylenglycolmonoazid **21** überführt (Abbildung 4.4), gefolgt von einer Tosylierung zu dem entsprechenden Monotosylmonoazid **22**. Dieses wurde dann mittels Wasserstoff, katalysiert durch Palladium auf Kohle in der Anwesenheit von Boc-Anhydrid, zur entsprechenden *Spacer*-Einheit **19** umgesetzt.^[155]

In einer S_N2-Reaktion wurde diese Einheit **19** mit dem zuvor hergestellten Pentaerythritoltriazid **18** zu dem Triazido-Carbamat **23** verknüpft. Eine abschließende Trifluoressigsäure vermittelte Boc-Entschützung beendet die Synthese des Triazido-Linkers **24**.

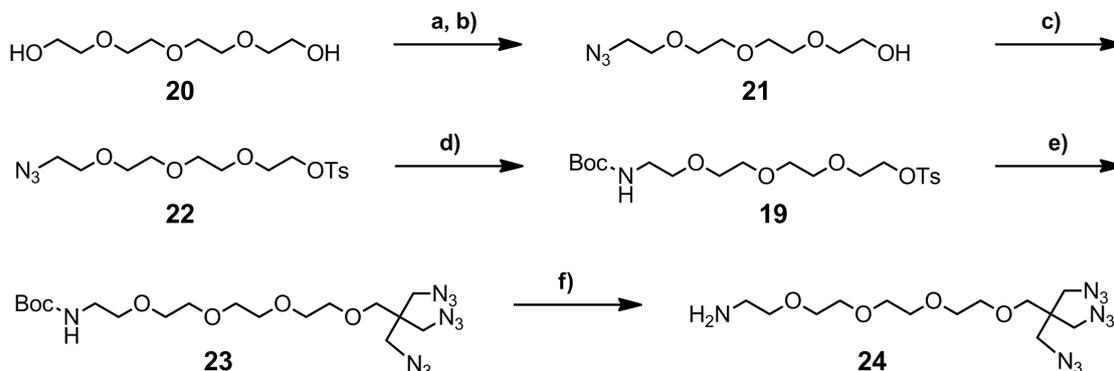


Abbildung 4.4 Synthese des Triazido-Linkers **24**. a) TsCl, NEt₃, THF, RT, 39 %, b) NaN₃, DMF, 110 °C, quant., c) TsCl, NEt₃, DCM, RT, 86 %, d) H₂, Pd/C, Boc₂O, NEt₃, MeOH, RT, 63 % e) **18**, NaH, DMF, RT, 46 %, f) TFA, CHCl₃, RT, 94 %.

Dieser Linker wurde anschließend von *Julian Willibald* durch eine TBTU-vermittelte Amidkupplung mit Arachidonsäure zum Anandamid-Triazid **1** umgesetzt (Abbildung 4.5).

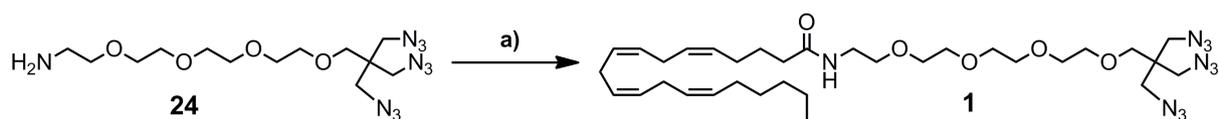


Abbildung 4.5 Synthese des Anandamid-Triazids **1**. a) Arachidonsäure, TBTU, DIPEA, DMF, RT, 95 %.

Um weitere Tetraethylglycol-Spacer für eine sterisch weniger anspruchsvolle Struktur einzuführen, hätte das Anandamid-Triazid **1** entsprechend modifiziert werden können. Dies würde jedoch zu einer sehr langen Synthesesequenz führen. Daher wurde eine andere Synthesestrategie entwickelt um das Triazid **15** herzustellen, welche im Folgenden erläutert werden soll (Abbildung 4.6).

Dazu wurde zunächst das Tetraalkin **25** nach einer Vorschrift von *Zhu et al.* synthetisiert.^[156] Im folgenden Schritt wurde das Monotosylmonoazid **22** über Kupfer katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition eingeführt, was mit guter Ausbeute gelang (69 %). Die dafür eingesetzten Bedingungen zur Synthese des so entstandenen Tetratosylats **26** wurden in Anlehnung an *Boudreau et al.* gewählt.^[157]

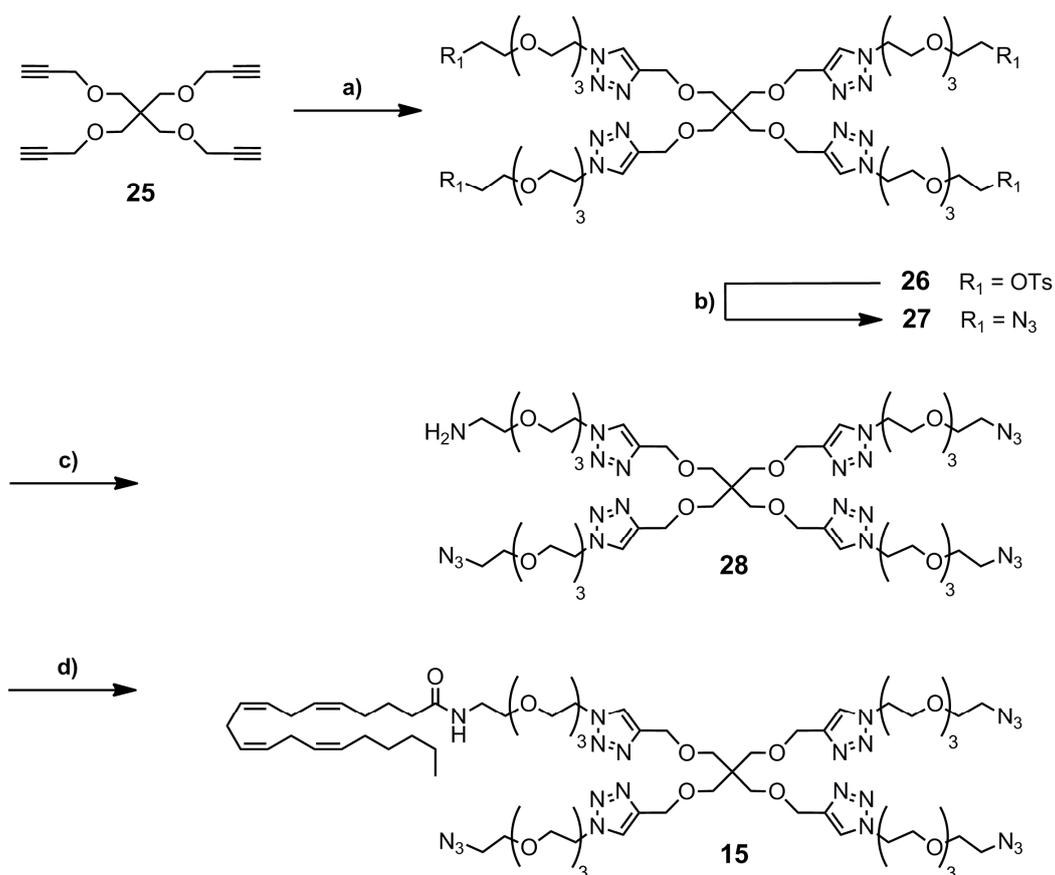


Abbildung 4.6 Synthese des Anandamidtriazids mit zusätzlichem Tetraethylglycol-Spacer zwischen der Azidofunktionalität sowie dem Pentaerythritolkern. a) **22**, CuSO₄, Natriumascorbat, H₂O/THF (1:1), RT, 69 %, b) NaN₃, DMF, 105 °C, 64 %, c) PPh₃, Et₂O/H₂O (1:1), RT, 40 %, d) Arachidonsäure, PyBOP, DIPEA, DMF, RT, 81 %.

Schließlich wurden die vier Tosylgruppen in einer S_N2 -Reaktion mit Natriumazid zum entsprechenden Tetraazid **27** substituiert. Die Synthese des Aminodendrimerkerns **28** wurde durch einfache Staudinger-Reduktion durchgeführt, was nach einem modifizierten Protokoll von *Iyer et al.* geschah.^[158] Das Edukt wurde in Wasser vorgelegt und das Reduktionsmittel Triphenylphosphin gelöst in Ether langsam zugetropft. Es lag somit ein Zweiphasensystem vor, so dass die Reduktion nur an der Grenzfläche zwischen wässriger und organischer Phase stattfinden konnte. Dadurch sollte der Anteil von Mehrfachreduktionen des Tetraazidoedukts **27** erniedrigt werden. Der entsprechende Aminodendrimerkern **28** konnte so mit einer Ausbeute von 40 % isoliert werden. Die abschließende Kupplung des erhaltenen Amins mit Arachidonsäure konnte mit sehr guter Ausbeute (81 %) durchgeführt werden. Nach der erfolgreichen Synthese der Triazide wurden diese mittels Click-Chemie mit der *Renilla*-siRNA verknüpft und ein Luciferase Assay durchgeführt. Dies soll in folgendem Kapitel näher beschrieben werden.

4.2 Synthese und Evaluation der trimeren siRNA-Strukturen

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Azide sollten mit RNA-Oligonukleotiden durch Click-Chemie verknüpft werden. Dazu wurde der sense-Strang der *Renilla*-siRNA (ORN1) gewählt. Dieser Strang wird vor der Entstehung des aktiven RISC gespalten und freigesetzt. Daher sollten die drei antisense-Stränge der trimeren Struktur sukzessive freigesetzt werden. Um einen möglichst quantitativen Umsatz bei der Click-Modifizierung zu gewährleisten, wurde stets das Alkin-RNA-Oligonukleotid (ORN1) in einem leichten Überschuss (3.3 äq.) in Bezug auf die Triazide eingesetzt. In Abbildung 4.7 ist exemplarisch die Charakterisierung des Click-Produkts der Reaktion zwischen dem Anandamidtriazid **1** sowie dem sense-Strang des RNA-Oligonukleotids (ORN1) aufgeführt. Die Aufreinigung sowie Analytik erfolgte dabei durch HPL-Chromatografie bzw. MALDI-TOF. Aufgeführt sind die HPL-Chromatogramme unmittelbar nach der Ethanol-Fällung bzw. nach der Aufreinigung mittels HPL-Chromatografie. Insbesondere das im leichten Überschuss eingesetzte RNA-Oligonukleotid ORN1 musste dabei abgetrennt werden. Das dreifach-Click-Produkt **1+(ORN1)₃** konnte so in sehr hoher Reinheit gewonnen und mittels MALDI-TOF der berechneten Masse von 20506 zugeordnet werden.

Nach der vollständigen Charakterisierung wurde der antisense-Strang in äquimolarer Menge zugegeben und durch Erhitzen auf 90 °C gefolgt von langsamen Abkühlen an das trimere

Konstrukt hybridisiert. Im Rahmen einer Masterarbeit, betreut durch den Autor, konnte mittels UV-VIS-Spektroskopie gezeigt werden, dass diese trimere siRNA-Struktur das gleiche Hybridisierungsverhalten wie die monomere siRNA besitzt. Der interessierte Leser wird an die Masterarbeit von *Andreas Beil* verwiesen.

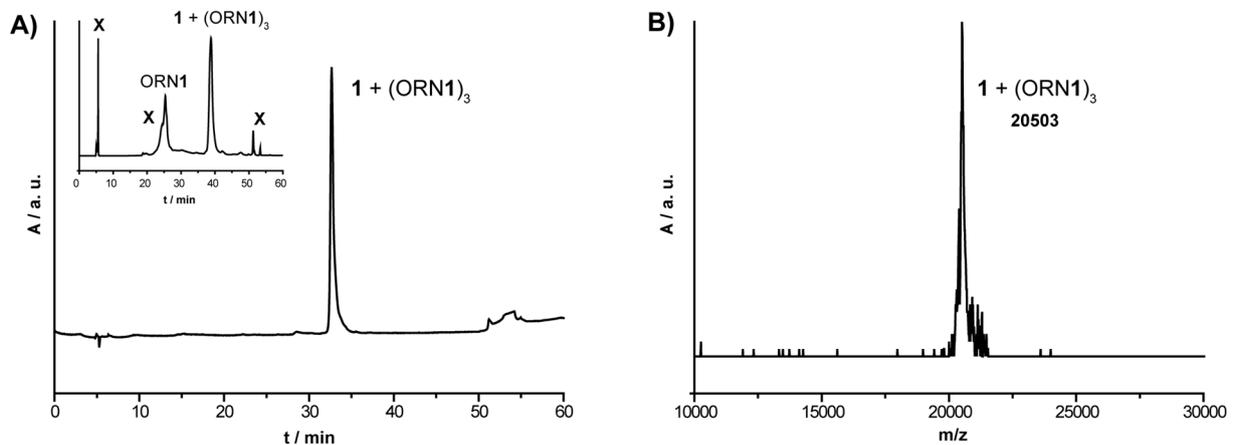


Abbildung 4.7 Charakterisierung der Click-Reaktion zwischen ORN1 sowie dem Anandamidtriazid **1**. **A)** Exemplarisch dargestellt ist das HPLC-Chromatogramm des HPLC aufgereinigten dreifach-Clickprodukts **1 + (ORN1)₃**. Zusätzlich ist das Chromatogramm des Click-Produkts unmittelbar nach der Ethanol-Fällung in klein aufgeführt. Wie in diesem Chromatogramm erkennbar, musste das dreifach-Click-Produkt von dem im Überschuss eingesetzten RNA-Oligonukleotid ORN1 sowie nicht identifizierten Verunreinigungen (**X**) abgetrennt werden. **B)** Die mittels MALDI-TOF bestimmte Masse des aufgereinigten Click-Produkts konnte der zu erwartenden Masse des dreifach Click-Produkts (ber. 20506) zugeordnet werden.

Das Anandamid-Monoazid **4** und beide Triazide (**1** bzw. **15**) wurden wie beschrieben mit dem sense-Strang der Renilla-siRNA verknüpft. Nach vollständiger Charakterisierung der Click-Produkte wurden diese mit entsprechende antisense-Strang der Renilla-siRNA in äquimolarer Menge Zugabe hybridisiert. Die so hergestellte Bibliothek ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der Anandamid-siRNAs gegen die *Renilla*-Luciferase. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. **X** = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
AEA-Luc-siRNA1 (ORN1+4/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c X (+4)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Tri-Spac.- Luc-siRNA1 ((ORN1) ₃ +15/ (ORN2) ₃)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c X T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Tri- Luc-siRNA2 ((ORN1) ₃ +1/ (ORN2) ₃)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c X T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	

Alle in dieser Arbeit eingesetzten siRNAs wurden mit einer Konzentration von 10 μM angelöst. Um eine besserer Vergleichbarkeit mit der monomeren siRNA zu schaffen, bezieht sich die Molarität dabei stets auf den siRNA-Duplex. Die Stocklösungs-Konzentration in Bezug auf die trimeren Konstrukte betrug somit stets 3.33 μM . Mit dieser siRNA-Bibliothek wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt (Abbildung 4.8). Dabei wurden die siRNAs in drei unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 125 und 500 nM auf die Zellen in 96-well Platten gegeben und nach 48 Stunden die Expressionslevel bestimmt.

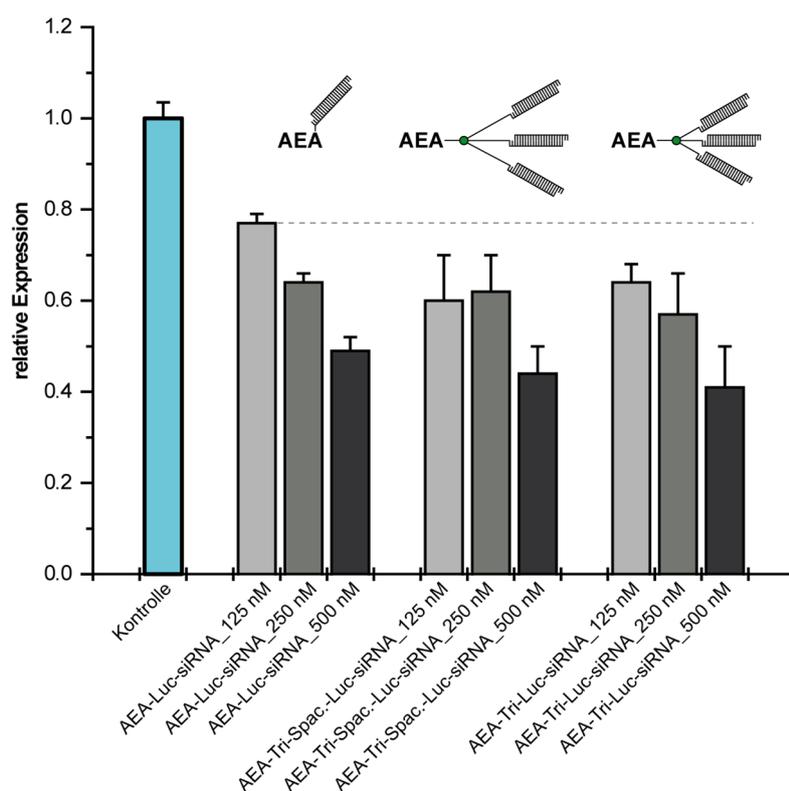


Abbildung 4.8 Regulation einer *Renilla*-Luciferase durch monomere sowie trimere siRNA. Dabei wurden die trimeren Strukturen basierend auf den Anandamidtriaziden **1** sowie **15** verwendet.

In allen drei Fällen nimmt das Expressionslevel mit zunehmender siRNA-Konzentration ab. Die monomere siRNA-Struktur lieferte dabei stets niedrigere Regulations-Werte als die trimeren Strukturen. Dieser Unterschied ist bei der kleinsten eingesetzten Konzentration von 125 nM am ausgeprägtesten. Auffällig ist außerdem, dass die trimere siRNA basierend auf dem Anandamid-Azid **15** ohne zusätzliche Tetraethylglycol-Spacer insgesamt die größten Regulationen der *Renilla*-Luciferase erzielte. Die Tetraethylglycol-Einheiten wurden mit dem Hintergedanken eine bessere Prozessierbarkeit des trimeren Konstrukts durch den RIS-Komplex zu ermöglichen integriert. Dieser scheint jedoch sehr gut in der Lage zu sein die sterisch sehr belastete trimere Struktur basierend auf dem Triazid **1** zu prozessieren. Die

Struktur mit zusätzlichen Tetraethylenglycol-Spacern erzeugt eine höhere Flexibilität, was mit einer Verdrillung der Verknüpften siRNAs einhergehen könnte.

Zusammenfassend führte die trimere siRNA aufgebaut durch das Anandamidtriazid **1** zu einer erhöhten Aktivität der siRNA im Vergleich zu monomerer Anandamid-siRNA bei gleicher Duplex-Konzentration. Ursachen dafür könnten eine optimierte Aufnahme, jedoch auch eine gesteigerte Resistenz gegenüber *RNasen* sein.

4.3 Entwicklung dendritischer siRNA Strukturen

In einem weiteren Schritt sollte nun dendritische Strukturen entwickelt werden, welche noch mehr siRNAs pro Rezeptorliganden enthalten. Dendritische Strukturen zeichnen sich durch eine repetitive Einheit aus. Abgeleitet von den beschriebenen trimeren Strukturen sollten so siRNA-Dendrimere mit sechs bzw. neun siRNA-Armen synthetisiert werden. Nachdem die kompaktere Anandamid-Triazidostruktur **1** ohne zusätzliche Tetraethylenglycol-Spacer zu höheren Regulationsraten führte, sollte diese Ausgangspunkt für die hexa bzw. nonamere siRNA-Struktur sein.

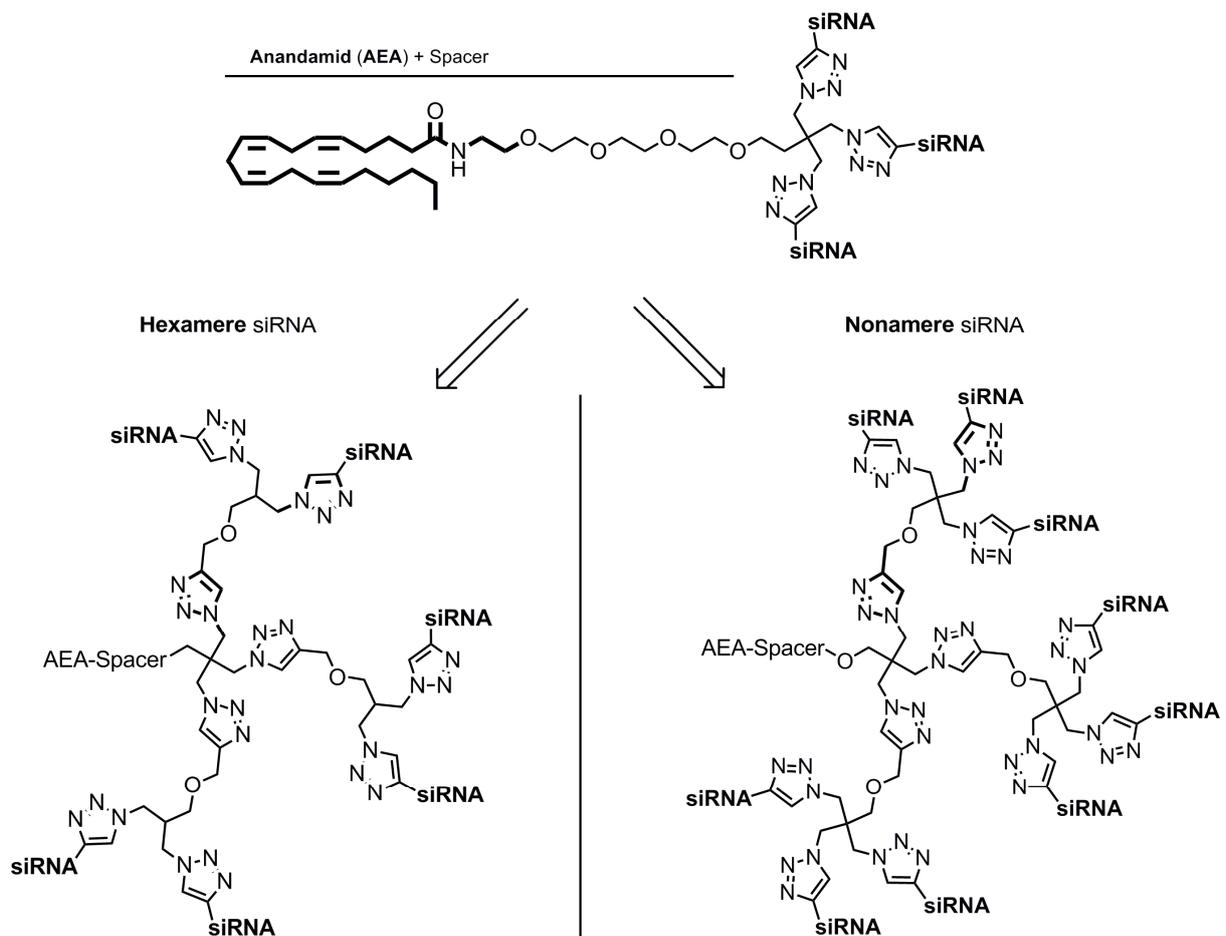


Abbildung 4.9 Konzept dendritischer siRNA-Strukturen.

Dafür wurden zwei bzw. drei gliedrige Verzweigungseinheiten synthetisiert, welche durch Click-Chemie eine Erweiterung der trimeren Struktur ermöglichen sollten. 2-Hydroxy-1,3-propandiol **29** bzw. erneut Pentaerythritol **16** wurden dabei als weitere molekulare Verzweigung gewählt. Die so angestrebten dendritischen RNA-Strukturen sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Beide Verzweigungseinheiten (Abbildung 4.10) tragen jeweils eine Alkin-Funktionalität, welche die Erweiterung durch Click-Chemie ermöglicht. Sie sind außerdem mit 2 bzw. 3 Tosylgruppen, als latente Azidofunktionalität, modifiziert. Die Azide können so im späteren Verlauf der Synthese durch S_N2 Reaktion mit Natriumazid eingeführt werden.

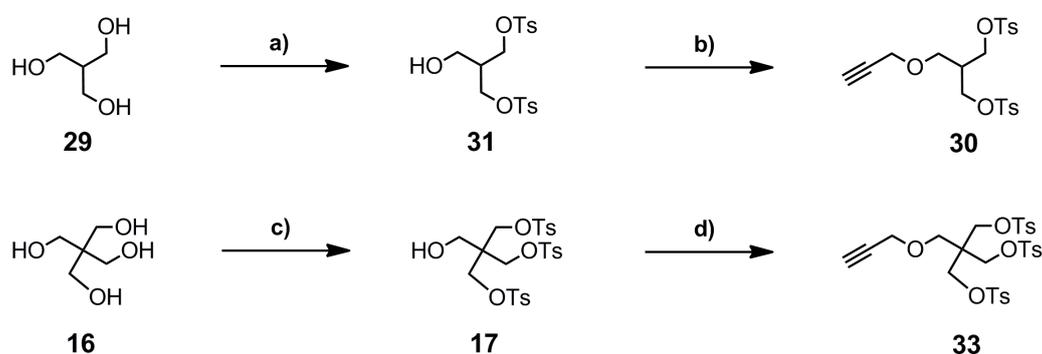


Abbildung 4.10 Synthese der Alkin-modifizierten Verzweigungseinheiten **30** bzw. **33**. a) TsCl, Pyridin, RT, 29 % b) Propargylbromid, Cs_2CO_3 , MeCN, RT, 64 %, c) TsCl, Pyridin, RT, 50 %, d) NaH, THF, 15-Krone-5 Propargylbromid, RT, 86 %.

Für die Synthese des Anandamid-Hexaazids **2** musste zunächst die entsprechende Verzweigungseinheit **30** synthetisiert werden. Dazu wurde 2-Hydroxy-1,3-propandiol **29** zunächst mit zwei Äquivalenten Tosylchlorid zum Ditosylat **31** umgesetzt. Anschließend wurde die Alkinfunktionalität durch eine S_N2 Reaktion mit Propargylbromid eingeführt, wobei sich die milde Base Cäsiumcarbonat als vorteilhaft erwiesen hat. Dadurch können kompetitiv zur S_N2 Reaktion ablaufende E2-Eliminierungen vermieden werden. Für das Anandamid-Nonaazid **32** wurde die Verzweigungseinheit **33** synthetisiert. Dafür wurde Pentaerythritoltritosylat **17** mit Propargylbromid in der Gegenwart von Natriumhydrid und 15-Krone-5 als Phasentransferkatalysator umgesetzt. Das entsprechende Tritosylmonoalkin **33** konnte so in sehr guter Ausbeute (86 %) erhalten werden. Zunächst soll im Folgenden die Synthese des Anandamid-Hexaazids **2** beschrieben werden.

4.3.1 Synthese von Anandamid-Hexaazid

Die im vorherigen Kapitel beschriebene Verzweigungseinheit **30** wurde schließlich mit dem Boc geschützten Triazid **23** (Kapitel 4.1) durch Kupfer(I) katalysierte 1,3 dipolare Cycloaddition umgesetzt (Abbildung 4.11). Das daraus resultierende Hexatosylat **34** wurde dann mit einem Überschuss an Natriumazid unter Ausbildung des Hexaazids **35** zur Reaktion gebracht. Es folgte die Spaltung des Boc-Carbamats mit Trifluoessigsäure, wodurch das Hexaazidoamin **36** erhalten werden konnte. Diese wurde in einer HATU vermittelten Amidkupplung mit Arachidonsäure umgesetzt.

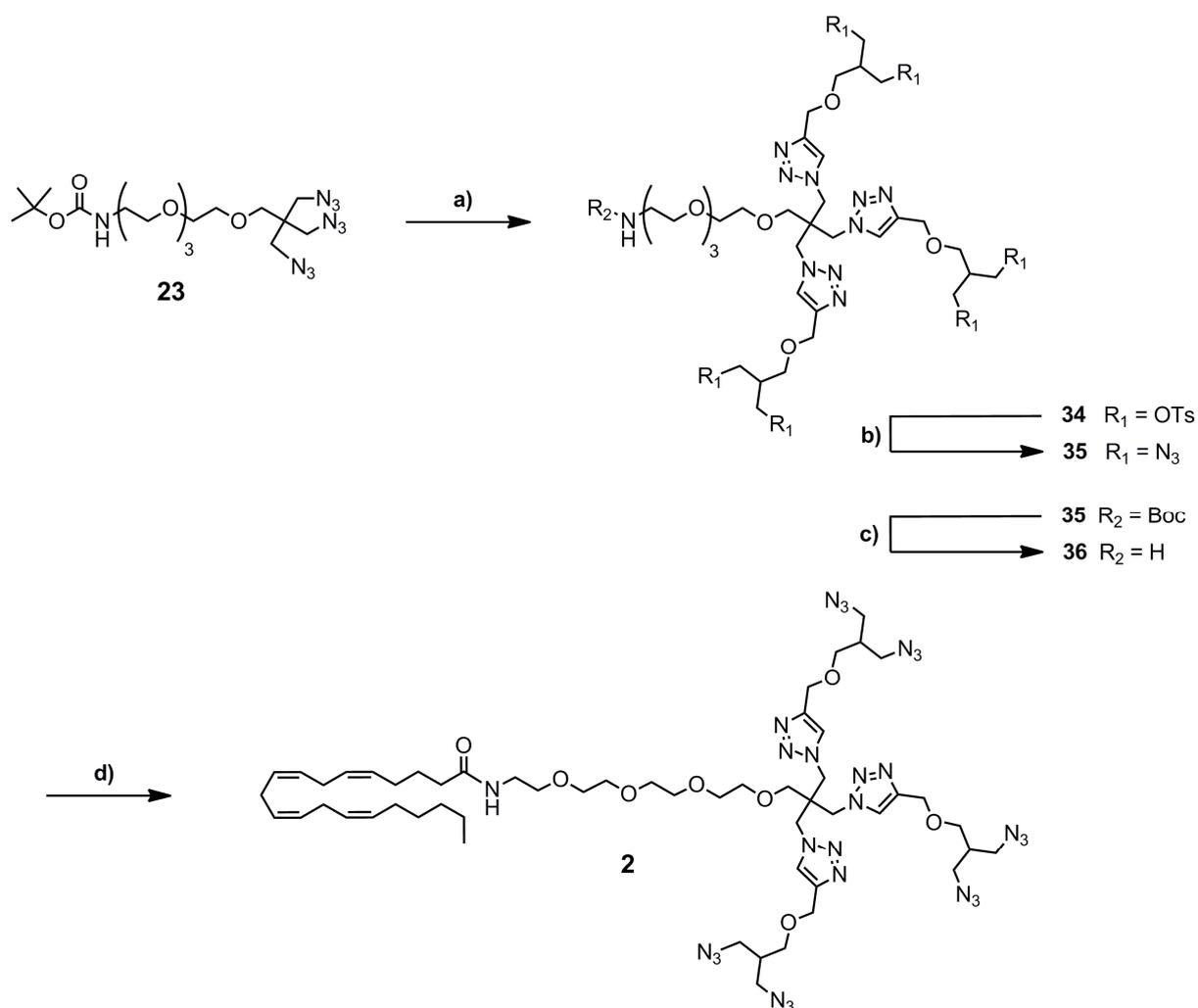


Abbildung 4.11 Synthese von Anandamid-Hexaazid **2**. a) **30**, CuSO_4 , Natriumascorbat, $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1), RT, 80 %, b) NaN_3 , DMF, 110 °C, 85 % c) TFA, CHCl_3 , RT, 71 % d) Arachidonsäure, HATU, DIPEA, DMF, RT, 81 %.

Das entsprechende Anandamid-Nonaazid **32** (Abbildung 4.12) wurde analog zu dieser Synthesestrategie von *Korbinian Brunner* im Rahmen einer Masterarbeit synthetisiert.

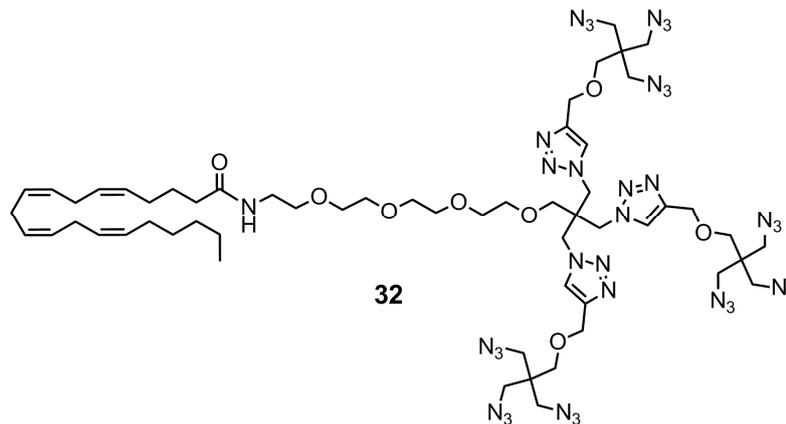


Abbildung 4.12 Durch *Korbinian Brunner* synthetisiertes Anandamid-Nonaazid **32**.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Anandamid-Azide wurden schließlich mit dem sense-Strang der siRNA gerichtet gegen die *Renilla*-Luciferase verknüpft und die biologische Aktivität der entsprechenden dendritischen Strukturen evaluiert.

4.3.2 Synthese und Evaluation der dendritischen siRNA-Strukturen

Das Anandamid-Hexaazid bzw. -Nonaazid wurde mittels Click-Chemie an den sense-Strang einer *Renilla*-siRNA (ORN1) geknüpft. Dabei wurde der sense-Strang im Überschuss gewählt um einen möglichst quantitativen Umsatz zu gewährleisten. Das im Überschuss vorhandene Oligonukleotid (ORN1) kann wieder reisoliert werden. Zusätzlich wurden in diesen Click-Reaktionen das Alkin-RNA Oligonukleotid mit höherer Konzentration (2.0 mM vs. 6.0-8.0 mM) angelöst. Durch diese Bedingungen konnte das Hexaazid erfolgreich mit dem sense-Strang der *Renilla*-siRNA verknüpft werden (Abbildung 4.13, A).

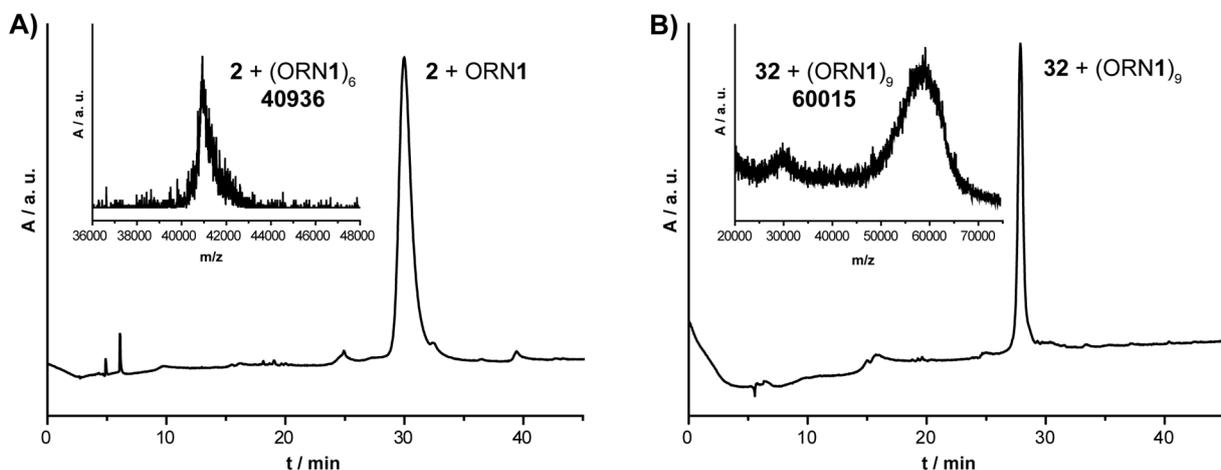
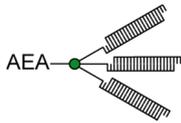
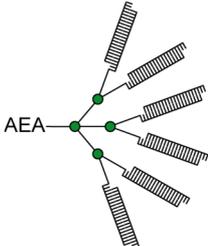
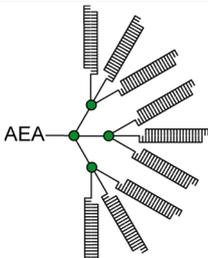


Abbildung 4.13 Charakterisierung der Click-Reaktion zwischen ORN1 sowie dem Anandamid-Hexaazid **2** (A) bzw. Anandamid-Nonaazid **32** (B) mittels HPLC bzw. MALDI-TOF. Die mittels HPLC aufgereinigten Click-Produkte konnten den berechneten Massen von **2** + (ORN1)₆ (ber. 40920) bzw. **32** + (ORN1)₉ (ber. 60892) zugeordnet werden. Die Synthese des neunfach-Click-Produkts **32** + (ORN1)₉ erfolgte durch *Korbinian Brunner*.

Die Synthese und Charakterisierung des neunfach-Click-Produkts **32** + (ORN1)₉ erfolgte dabei durch *Korbinian Brunner*. Dies stellte aufgrund des sehr hohen Molekulargewichts von etwa 60 kDa eine große Herausforderung dar. In Abbildung 4.13 ist exemplarisch die Charakterisierung der Click-Reaktion zwischen ORN1 sowie dem Anandamid-Hexaazid **2** bzw. dem Anandamid-Nonaazid **32** mittels HPLC bzw. MALDI-TOF dargestellt.

Der antisense-Strang wurde nach erfolgreicher Synthese beider Multimere stöchiometrisch zugegeben und durch Erhitzen auf 90 °C, gefolgt von langsamen Abkühlen an das Konstrukt hybridisiert. Für die Evaluation der multimeren Strukturen mussten als Bezugssystem sowohl die monomeren als auch die trimeren siRNA-Strukturen synthetisiert werden. In Tabelle 4.2 sind alle eingesetzten siRNA-Strukturen zusammengefasst.

Tabelle 4.2 Zusammenfassung der Anandamid-siRNAs gegen die *Renilla*-Luciferase. Synthetisiert wurde die mono, tri, hexa und nonamere Struktur. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. X = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
AEA-Luc-siRNA (ORN1+4/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> (+4)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Tri-Luc-siRNA ((ORN1) ₃ +1/ (ORN2) ₃)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Hexa-Luc-siRNA ((ORN1) ₆ +2/ (ORN2) ₆)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Nona-Luc-siRNA ((ORN1) ₉ +32/ (ORN2) ₉)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	

Nach erfolgreicher Synthese der Bibliothek mit unterschiedlichen siRNA-Strukturen wurde deren Aktivität durch einen Luciferase-Assay evaluiert. Die so gemessenen Regulationen beinhalten dabei stets zum einen die Fähigkeit einen Transport in die Zellen zu bewirken und

zum anderen mittels der RNAi-Maschinerie eine Protein-Regulationen zu vermitteln. Die Evaluation des Nonamers erfolgte durch *Korbinian Brunner*. Für den Luciferase-Assay wurde stets die Aktivität des Hexamers bzw. des Nonamers im Vergleich zu der monomeren und trimeren Anandamid-siRNA-Struktur betrachtet. Die dabei erhaltenen Daten sind in Abbildung 4.14 zusammengefasst.

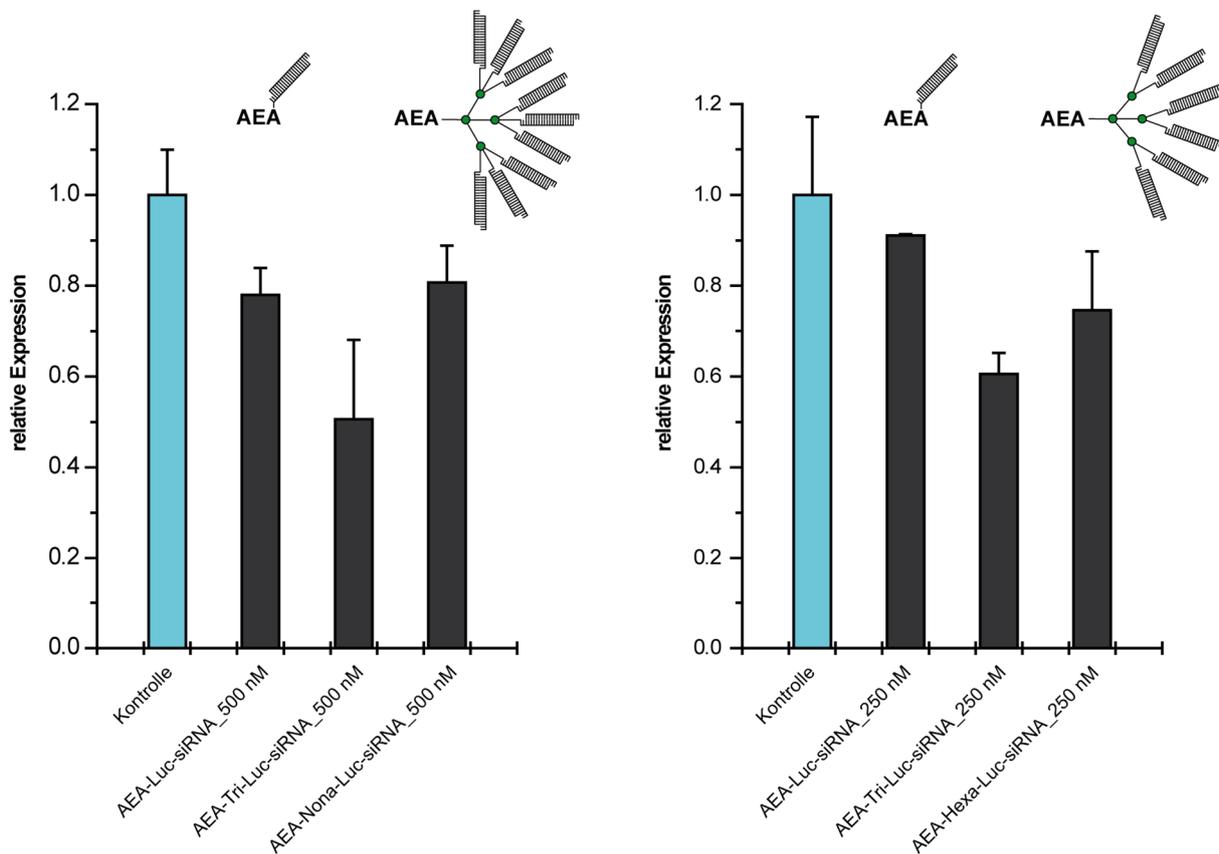


Abbildung 4.14 Regulation einer *Renilla*-Luciferase durch dendritische Anandamid-siRNA-Strukturen. Die genaue Struktur der dabei eingesetzten siRNA-Konstrukte ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Evaluation der nonameren siRNA-Struktur erfolgte durch *Korbinian Brunner*.

Zunächst wurde der in Kapitel 4.2 beschriebene Trend reproduziert, wonach die trimere siRNA-Struktur im Vergleich zu der monomeren siRNA zu einer gesteigerten Regulation der Renilla Luciferase führte. Dies konnte hierbei erneut in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt werden. Betrachtet man nun die trimere Struktur in Bezug auf das Hexamer bzw. Nonamer, so konnte durch beide Strukturen keine weitere Optimierung der Protein-Regulation erreicht werden. So kam es in beiden Fällen zu einem Anstieg der Proteinexpression der Renilla-Luciferase um 15 % im Fall der hexameren sowie um 20 % Prozent im Falle der nonameren Struktur.

Die Ursache für diesen beschriebenen Trend könnte in dem starken sterischen Anspruch der hexa bzw. nonameren Struktur liegen. Für die trimere Struktur wurde durch *Andreas Beil*, ein

im Vergleich zur monomeren siRNA-Struktur quantitativer Hybridisierungsprozess gezeigt. Der durch die hexa bzw. nonamere Struktur deutlich gesteigerte sterische Anspruch bzw. die erhöhte Wahrscheinlichkeit zu einer Verdrillung der sense-Oligonukleotid-Arme könnten eine quantitative Hybridisierung mit dem antisense-Strang erschweren. Dadurch würde die effektive siRNA-Konzentration herabgesetzt und somit eine geringere Protein-Regulation erreicht. Dieser beschriebene Anspruch könnte auch die Prozessierbarkeit durch den RISC-Komplex herabsetzen, was ebenfalls eine geringere Protein-Regulation zur Folge hätte. Denkbar ist außerdem, dass der Rezeptor-Ligand Anandamid durch die dendritischen Strukturen seine dirigierende Wirkung nicht im vollen Ausmaß zur Geltung bringen kann. Unabhängig von den genauen Ursachen des hier beschriebenen Trends hat sich die neu entwickelte trimere-Struktur als sehr effektiv herausgestellt. Daher war diese Struktur Ausgangspunkt für weitere Optimierungen, was in folgendem Kapitel beschrieben werden soll.

4.4 Optimierung der trimeren siRNA-Struktur

Durch Modifizierung des antisense-Strangs können weitere Funktionalitäten in die trimere siRNA eingebracht werden. Dazu sollen zwei Ansatzpunkte vorgestellt werden (Abbildung 4.15). Zum einen wurde ein antisense-Strang mit zwei Thioat-Substitutionen am Phosphatrückgrad eingesetzt. Zum anderen wurde ein antisense-Strang mit Alkin-Modifizierung synthetisiert, welcher mittels Click-Chemie die Einführung weiterer Funktionalitäten erlaubt.

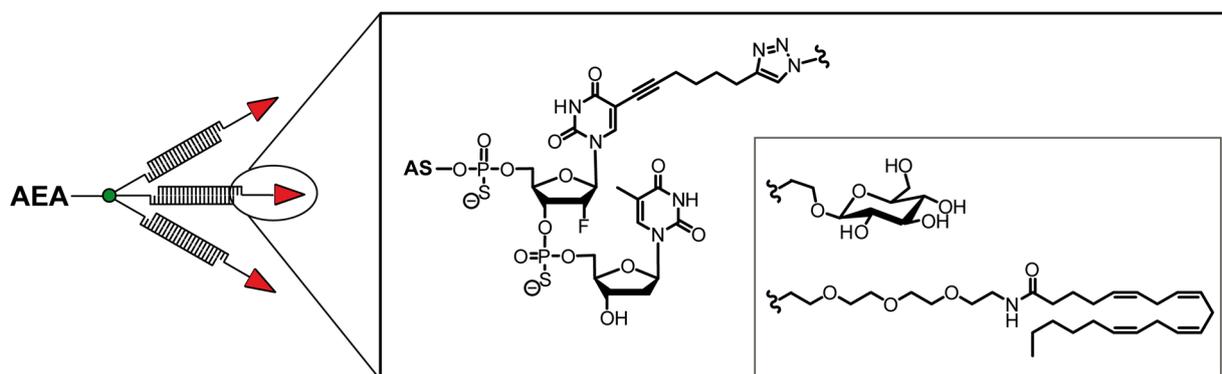


Abbildung 4.15 Optimierung trimere Anandamid-siRNA durch unterschiedlich modifizierte antisense-Stränge. Eingesetzt wurde unter anderem ein antisense-Strang mit Thioat-Modifizierungen. Auch verwendet wurden antisense-Stränge, welche durch Click-Chemie mit Zucker oder zusätzlicher Anandamid-Funktionalität ausgestattet wurden.

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben hatte dabei die Einführung von zwei Thioaten in den 3'-Überhang des antisense-Strangs eine Steigerung der Regulationseffizienz von bis zu 20 % in

Bezug auf die unmodifizierte siRNA zur Folge. Daher wurde dieser Thioat-antisense-Strang (ORN4) in Kombination mit der trimeren siRNA-Struktur eingesetzt. Überraschenderweise konnte dadurch jedoch keine gesteigerte Protein-Regulation erzielt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die verbesserte Wirkung der trimeren im Vergleich zur monomeren Struktur bereits in der Stabilität begründet liegt. Eine weitere Erhöhung der Stabilität könnte daher zumindest *in vitro* keinen zusätzlichen Effekt erzielen.

Im Rahmen der Masterarbeit von *Korbinian Brunner* wurde auch untersucht, ob durch eine Erhöhung des Liganden-Anteils in der trimeren Struktur eine weitere Steigerung der Regulationseffizienz erzielt werden kann. Dazu wurde auch der antisense-Strang mit dem Anandamid-Monoazid **4** modifiziert. Es stellte sich heraus, dass eine kontinuierliche Zunahme des Ligandenanteils in der trimeren Struktur zu einer Abnahme der Protein-Regulation führt. Denkbar ist, dass ein trimeres Konstrukt mit vier Liganden gleichzeitig mehrere Rezeptoren bindet, was durch eine beschleunigte Rezeptor-Absättigung in einer geringeren Transporteffizienz resultieren könnte. Denkbar sind jedoch auch negative Auswirkungen auf die Löslichkeit bzw. erhöhtes Interagieren des hohen Anandamid-Anteils mit dem polymeren Material des *96-wells*,^[159] wodurch die Verfügbarkeit des Konstrukts für die Zellen abnehmen sollte.

Julian Willibald konnte zeigen, dass die Einführung von drei Äquivalenten eines Glucose-modifizierten antisense-Strangs in die trimere Struktur eine gesteigerte Protein-Regulation zur Folge hat. Diese gesteigerte Effektivität sollte durch Synthese von Glucose-Derivaten näher untersucht werden.

5 Modifizierung von siRNA mit Zucker-Derivaten

Die von *Julian Willibald* beobachtete gesteigerte Regulationseffizienz von Glucose-siRNA könnte auf zwei Sachverhalte zurückzuführen sein. Zum einen ist eine Wechselwirkung mit Zucker bindenden Proteinen auf der Zelloberfläche denkbar. Dies könnte die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der siRNA an der Zelloberfläche erhöhen bzw. einen sogar zu deren Internailisierung führen. In der Literatur wurden bereits unterschiedlichste Zucker wie Mannose,^[57] Galactose,^[55] Lactose^[160] oder *N*-Acetyl-Galactosamin^[58] mit siRNA verknüpft und für einen Transport hauptsächlich in Leberzellen beschrieben. Über kovalent ausschließlich mit Glucose modifizierte siRNA ist bisher ein Transport in HeLa-Zellen beschrieben, jedoch keine Regulation eines Proteins.^[55, 61] Auch denkbar ist, dass die Zucker-Modifizierung am 3'-

Ende des antisense-Strangs eine erhöhte Stabilität der siRNA zur Folge hat. So könnte die Zugänglichkeit für Exonukleasen erschwert und dadurch die Stabilität gesteigert werden.

5.1 Synthese von Glucose-Derivaten

Durch Synthese von zwei Glucose-Derivaten (Abbildung 5.1), nämlich einer trimeren-Glucose-Struktur **37** sowie einem β -Cyclodextrin-Monoazid **38**, sollte dies näher betrachtet werden.

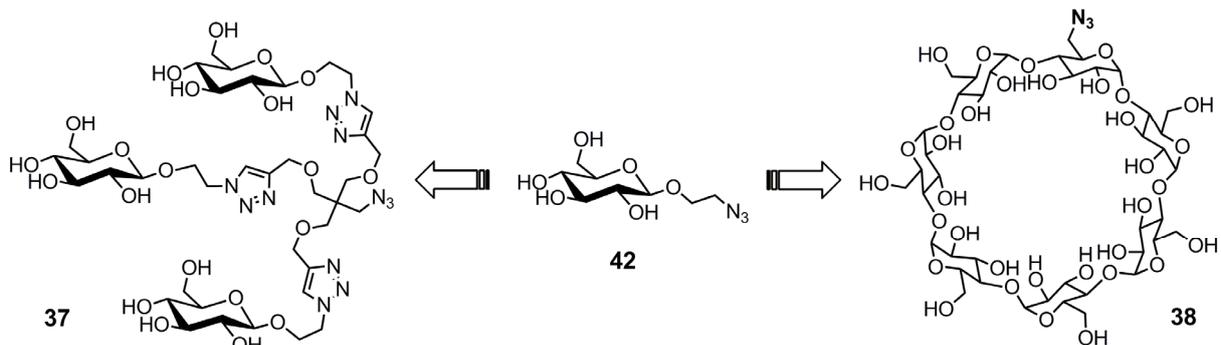


Abbildung 5.1 Glucosederivate für die Modifizierung von siRNA. Synthetisiert wurden ein Tri-Glucose- **37** sowie ein β -Cyclodextrin-Monoazid **38**.

Die Triglucose **37** zielte dabei auf eine mögliche Wechselwirkung mit Glucose bindenden Proteinen auf der Zelloberfläche ab. Es wurde dadurch eine in der Natur häufig angewendete Strategie nachgeahmt. So werden in der Natur Saccharid Lektin Interaktionen gewöhnlich durch Saccharid-Clustern gesteigert, da die Wechselwirkungen mit einer Saccharid-Einheit nur schwach ausgeprägt sind (*glycocluster effect*).^[161] Beim *glycotargeting* werden daher meist verzweigte Saccharid-Strukturen eingesetzt,^[61, 162] wodurch die Interaktion der Konjugate mit Zucker bindenden Proteinen gesteigert werden kann. Als verzweigendes Element wurde bei dieser trimeren Glucose-Struktur ebenfalls Pentaerythritol gewählt.

Die Verknüpfung von β -Cyclodextrin **39** an siRNA erschien aus mehreren Gründen vielversprechend. Zunächst soll dieses Zucker-Oligomer näher beschrieben werden. β -Cyclodextrin besteht aus 7 Glucose-Einheiten, welche über glycosidische Bindungen zu einem ringförmigen Oligomer verknüpft sind (Abbildung 5.2). Es ergibt sich somit eine organische Struktur mit großer räumlicher Ausbreitung, welche strukturell mit einem hohlen Kegelstumpf (Torus) vergleichbar ist.

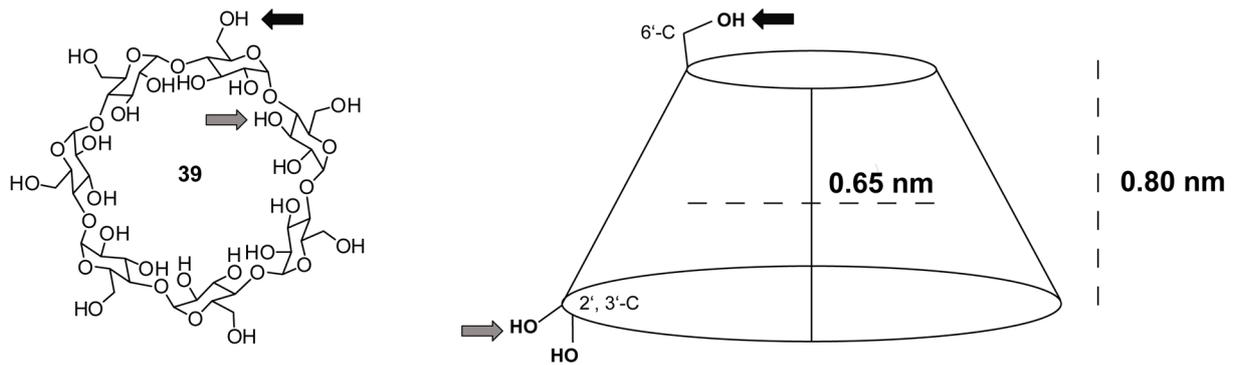


Abbildung 5.2 Schematische Darstellung von β -Cyclodextrin **39**. Durch Pfeile sind die primären sowie sekundären OH-Gruppen markiert. Vereinfacht ist außerdem die kegelförmige Struktur dargestellt, wobei die primären sowie sekundären OH-Gruppen nur exemplarisch aufgeführt sind. Angegeben ist außerdem der Innendurchmesser (0,65 nm) sowie die Höhe (0,80 nm) des Kegelstumpfes.

Der Innendurchmesser liegt bei 6,5 Å während die Höhe 8,0 Å beträgt.^[163] Dabei befinden sich die Hydroxyl-Gruppen der Glucose-Einheiten an den Ringkanten des Kegels. Die primären Hydroxyl-Gruppen (6'-C-OH) sind an der schmalen Kante lokalisiert, weswegen diese auch als primäre Seite bezeichnet wird. An der gegenüberliegenden sekundären Kante befinden sich die OH-Gruppe am 2' bzw. 3' Kohlenstoff der Glucose. Interessanterweise besitzt die Kavität des Cyclodextrin-Kegels eine hohe Hydrophobizität. Daher kann Cyclodextrin mit hydrophoben Molekülen Einschlussverbindungen eingehen und somit deren Löslichkeit in wässrigem Medium erhöhen.^[164] In der Literatur wurden Cyclodextrine häufig auch zur Ausbildung supramolekularer Strukturen verwendet.^[165]

Im Zusammenhang mit gentherapeutischen Ansätzen wurden Cyclodextrine bisher hauptsächlich zur Synthese verzweigter Polykationen eingesetzt, welche einen Transport von Oligonukleotiden bewirken können.^[166] Die Aktivität von siRNA kovalent modifiziert mit Cyclodextrinen wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Durch Modifizierung der 3'-Enden einer siRNA mit diesem sterisch anspruchsvollen molekularen Kegel könnte deren Zugänglichkeit erschwert werden.^[167] Dies könnte zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Exonukleasen führen und somit die Stabilität einer siRNA sequenzunabhängig gesteigert werden. Zusätzlich können Cyclodextrine als PEG-Analoga betrachtet werden, wodurch die Biokompatibilität und die Eigenschaften von siRNA *in vivo* optimiert werden könnten.^[166a] Cyclodextrine wurden des Weiteren in der Literatur eingesetzt, um die Lösungseigenschaften von freiem Anandamid zu verbessern.^[168] So könnte die zusätzliche Modifizierung von Anandamid-siRNA mit Cyclodextrinen einen dispergierenden oder löslichkeitssteigernden Effekt erzielen. Dadurch könnte die Bioverfügbarkeit der Liganden-siRNA gesteigert werden. Gleichzeitig ergibt sich das Risiko, dass die Komplexbildung von Anandamid durch Cyclodextrin die Wechselwirkung mit Cannabinoid-Rezeptoren herabsetzt.

Im Folgenden soll zunächst die Synthese beider Glucose-Derivate sowie deren Verknüpfung mit RNA-Oligonukleotiden beschrieben werden.

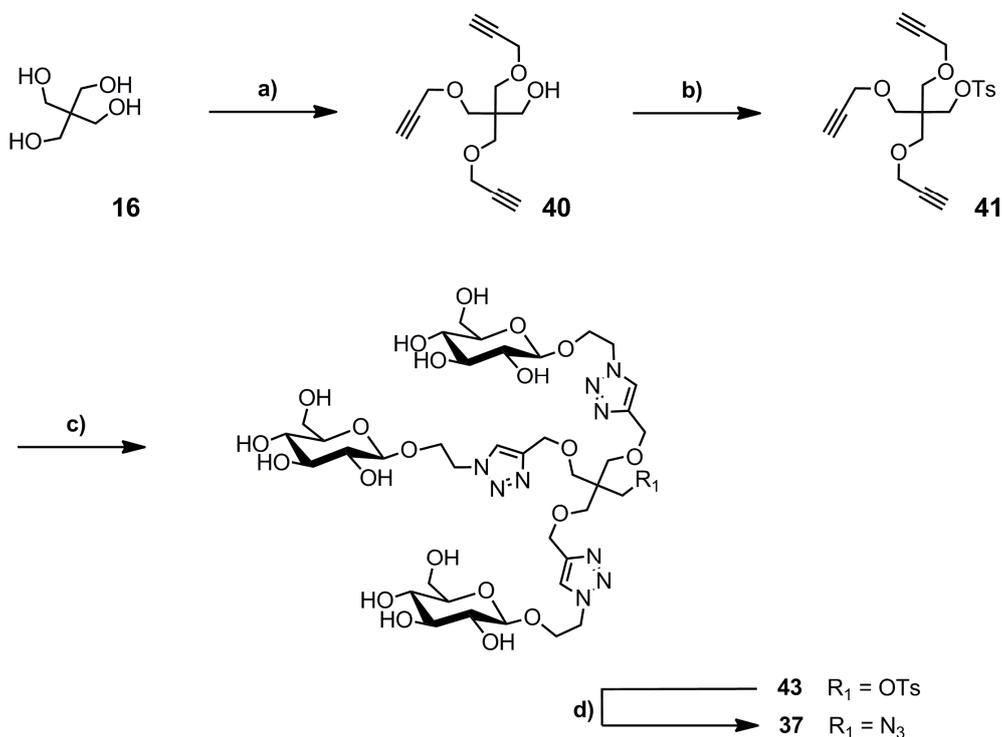


Abbildung 5.3 Synthese von Triglycose-Monoazid **37**. a) Propargylbromid, NaOH, DMSO/H₂O (1:1), RT 33 % b) TsCl, Pyridin, RT, 99 % c) **42**, Natriumascorbat, CuSO₄ THF/H₂O (1:1) 46 % d) NaN₃, DMF, 100 °C, 42 %.

Für das Triglycose-Monoazid wurde Pentaerythritol **16** als Grundgerüst gewählt (Abbildung 5.3). Dieses wurde zunächst mit Propargylbromid nach *Zhu et al.* umgesetzt,^[156] wobei hauptsächlich das entsprechende Tetraalkin **25** entstand, welches zur Synthese des Anandamid-Triazids **15** (Kapitel 4.1) eingesetzt wurde. Als Nebenprodukt entstand dabei jedoch auch das entsprechende Trialkin **40**, dessen freie OH-Gruppe anschließend zum entsprechenden Monotosylat als latente Azidgruppe umgesetzt wurde. Schließlich wurde das tosylierte Trialkin **41** mit einem von *Felix Gnerlich* freundlicherweise zur Verfügung gestellten Glucosemonoazid **42**, mittels kupfer-katalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition zur Reaktion gebracht. Die entsprechende Triglycose **43** konnte nach HPLC-Aufreinigung mit 46 % Ausbeute erhalten werden. Im letzten Schritt erfolgte eine S_N2-Reaktion mit Natriumazid, wobei diese Reaktion aufgrund des hohen sterischen Anspruchs des Moleküls sehr langsam verlief. So wurde die Reaktion bei 100 °C mit einer Reaktionszeit von 48 h durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte erneut mittels präparativer HPLC, wodurch das Triglycosemonoazid **37** in sehr hoher Reinheit mit 42 % Ausbeute erhalten werden konnte.

Das Cyclodextrinmonoazid **38** wurde nach einer Vorschrift von *Defaye et al.* synthetisiert (Abbildung 5.4).^[169]

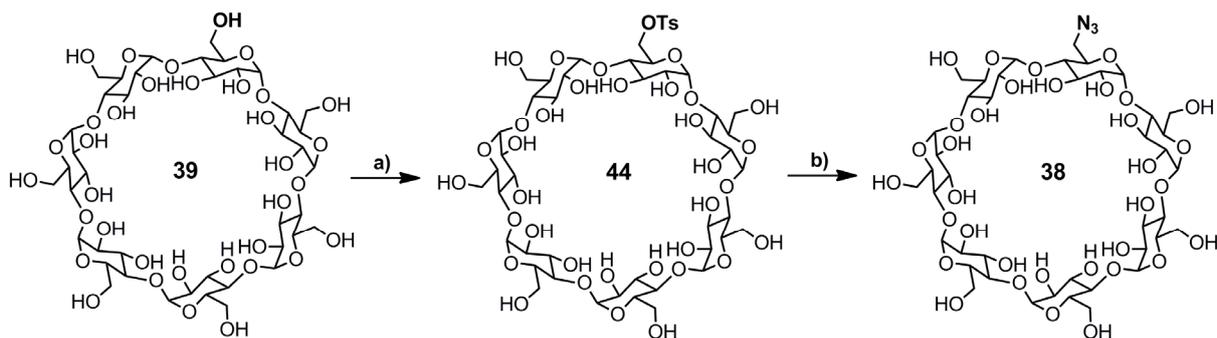


Abbildung 5.4 Synthese von Cyclodextrinmonoazid **38**. a) TsCl, CuSO₄·5H₂O, NaOH, H₂O, MeCN, RT, n.b. b) NaN₃, DMF, 90 °C, Sep-Pak[®], 36 %.

Dazu wurde β-Cyclodextrin **39** zunächst in wässriger Natronlauge mit Tosylchlorid in der Anwesenheit von Kupfersulfat umgesetzt. Die Kupfer-Ionen bilden dabei zunächst mit zwei deprotonierten β-Cyclodextrinen einen sandwichartigen Mehrkernkomplex. Hierbei komplexieren die sekundären Hydroxylgruppen des Cyclodextrins vier Kupfer(II)-Ionen mit einer verzerrt quadratisch-planarer Geometrie.^[170] Die 14 Hydroxylgruppen der sekundären Kante sind daher blockiert, so dass die Tosylierung mit höherer Regioselektivität an den primären Hydroxylgruppen der primären Seite erfolgt. Die in der Reaktion entstehenden Mehrfachtosylate konnten nicht, wie in der Literatur beschrieben durch Umkristallisieren in Wasser abgetrennt werden, weshalb eine zusätzlich Aufreinigung mittels HPLC vorgenommen wurde. Das so erhaltene β-Cyclodextrin-Monotosylat **44** wurde dann durch S_N2 Reaktion mit Natriumazid zu dem entsprechenden β-Cyclodextrin-Monoazid **38** umgesetzt. Dabei wurden die bei der Reaktion anfallenden Salze (Natriumazid sowie Natriumtosylat) durch Beladung der Rohsubstanz auf eine Sep-Pak[®] Säule und anschließendem Spülen mit deionisiertem Wasser entfernt.

5.2 Synthese und Evaluation von siRNA mit Glucose-Derivaten

Nach erfolgreicher Synthese beider Glucose-Derivate wurde eine Bibliothek von Anandamid-siRNAs mit unterschiedlicher Glykosylierung hergestellt. Dazu wurde der antisense-Strang der Renilla-siRNA (ORN2) mit dem Glucosemonoazid **42** bzw. Triglucosemmonoazid **37** sowie dem Cyclodextrinmonoazid **38** umgesetzt. In Abbildung 5.5 ist exemplarisch die Charakterisierung der Click-Reaktion zwischen ORN2 sowie dem Triglucosemmonoazid **37** bzw. dem Cyclodextrinmonoazid **38** mittels HPLC bzw. MALDI-TOF dargestellt. Beide Produkte konnte wie in den Elugrammen erkennbar mit sehr hoher Reinheit gewonnen werden.

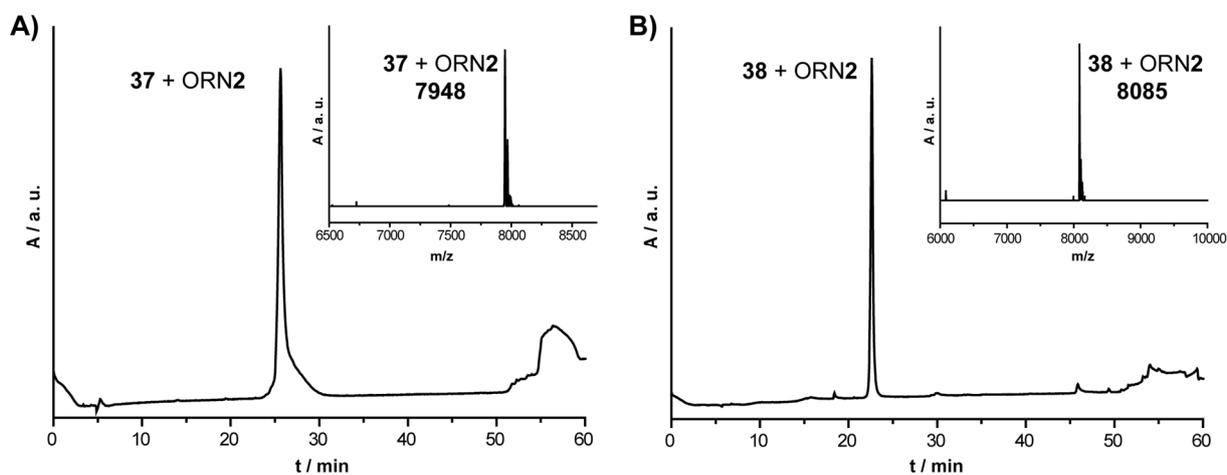
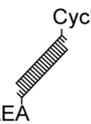
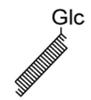
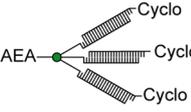
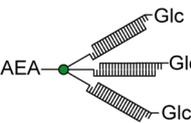


Abbildung 5.5 Charakterisierung der Click-Reaktion zwischen ORN2 sowie dem Triglucosemmonoazid **37** (A) bzw. Cyclodextrinmonoazid **38** (B) mittels HPLC bzw. MALDI-TOF. Die mittels HPLC aufgereinigten Click-Produkte konnten eindeutig den berechneten Massen von **37 + ORN2** (ber. 7947) bzw. **38 + ORN2** (ber. 8083) zugeordnet werden.

Der sense-Strang wurde mit dem Anandamidmonoazid **2** modifiziert. Die sich daraus ergebende Bibliothek von Anandamid-siRNAs mit unterschiedlicher Zuckerderivat-Modifizierung ist in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Diese beinhaltet eine Anandamid-siRNA mit zusätzlicher Monoglucose, Triglucosem und Cyclodextrinmodifizierung am antisense-Strang. Die Bibliothek beinhaltet auch eine siRNA, welche ausschließlich eine Glucose-Modifizierung ohne zusätzlichen Anandamid-Liganden besitzt. Dadurch sollte ein möglicher Transport von siRNA durch Glucose bindende Proteine untersucht werden. Desweiteren wurde die trimere Anandamid-Struktur mit unmodifiziertem antisense-Strang sowie mit drei Cyclodextrin bzw. Glucose antisense-Strängen eingesetzt. Mit dieser Bibliothek wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt, um die Aktivität der einzelnen Anandamid-Zucker-siRNAs zu untersuchen.

Tabelle 5.1 Zusammenfassung der Anandamid-siRNAs mit unterschiedlicher Zucker-Modifizierung zur Regulation der Renilla-Luciferase. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. \underline{X} = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
AEA-Luc-siRNA (ORN1+4/ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Glc-Luc-siRNA (ORN1+4/ ORN2+42)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4)T 3'-T \underline{X} (+42)ccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-TriGlc-Luc-siRNA (ORN1+4/ ORN2+37)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4)T 3'-T \underline{X} (+37)ccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Cyclo-Luc-siRNA (ORN1+4/ ORN2+38)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4)T 3'-T \underline{X} (+38)ccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
Glc-Luc-siRNA (ORN1/ORN2+42)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+42)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-Cyclo-Tri-Luc-siRNA ((ORN1) ₃ +1/ (ORN2) ₃ +38)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} T 3'-T \underline{X} ccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g +38	
AEA-Glc-Tri-Luc-siRNA ((ORN1) ₃ +1/ (ORN2) ₃ +42)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} T 3'-T \underline{X} ccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g +42	

Die Protein-Regulationen durch sämtliche in Tabelle 5.1 aufgeführten Anandamid-Glucose-siRNAs ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Zunächst konnte die von *Julian Willibald* beschriebene Steigerung der Regulation durch Anandamid-siRNA durch eine Glucose-Modifizierung reproduziert werden. Durch Einführung des Glucose-Triazids wurde eine weitere, wenn auch nur sehr geringe Steigerung erzielt. Dies könnte über den Glyocluster-Effekt^[161] und somit

durch eine bessere Wechselwirkung mit Zucker bindenden Proteinen auf der Zelloberfläche erklärt werden.

Interessanterweise führt die Modifizierung des antisense-Strangs mit einem Cyclodextrin analog zur Glucose-Modifizierung ebenfalls zu einer gesteigerten Protein-Regulation in Relation zu Anandamid-siRNA. Auch eingesetzt wurde die trimere siRNA-Struktur mit drei Cyclodextrin bzw. Glucose antisense-Strängen. Mit diesen komplexen Strukturen wurden die besten Protein-Regulationen innerhalb dieses Experiments erreicht. Somit konnten die in dieser Arbeit entwickelten trimeren Strukturen erneut als sehr effektiv für die Regulation von Proteinen herausgestellt werden.

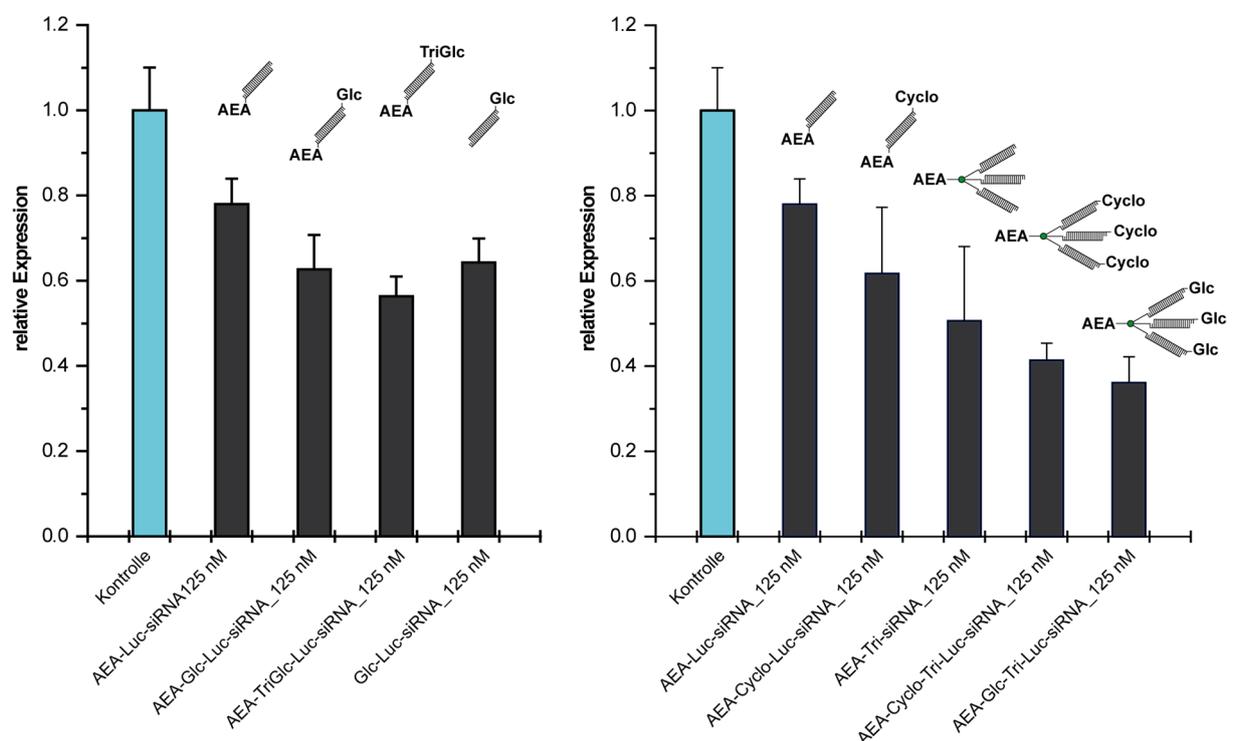


Abbildung 5.6 Luciferase-Assay mit unterschiedlichen Anandamid-Zuckerderivat-siRNA-Strukturen (Tabelle 5.1). Die Experimente wurden in RBL-2H3-Zellen durchgeführt.

Wurde eine siRNA mit ausschließlich einer Glucose-Modifizierung eingesetzt, so konnte überraschenderweise ebenfalls eine Regulation der Renilla-Luciferase gemessen werden (Abbildung 5.6). Glucose ist daher auch ohne die Anwesenheit von Anandamid in der Lage einen Transport in das Cytoplasma von RBL-2H3-Zellen zu bewirken. Gleichzeitig ist es nun naheliegend, dass die von *Julian Willibald* beobachtete gesteigerte Protein-Regulation durch Glucose modifizierte Anandamid-siRNA, durch einen zusätzlichen Aufnahmeweg mittels Glucose bindender Proteine begründet werden kann.

Dies sollte abschließend durch eine Konzentrationsreihe genauer untersucht werden. Dabei wurde der Anandamid-Duplex (**AEA-Luc-siRNA**) sowie die Glucose-siRNA (**Glc-Luc-**

siRNA) in drei Konzentrationen (125, 250, 500 nM) eingesetzt. Zusätzlich wurde die Glucose-siRNA auf Zellen, inkubiert mit Glucose freiem Medium, gegeben. Gewöhnliche Zellmedien besitzen eine Konzentration von 11 mM an freier Glucose. Freie Glucose sowie die Glucose gebunden an siRNA stehen somit im Wettbewerb, in der Bindung an einen Glucose-Transporter oder Rezeptor. Durch den Einsatz eines Glucose freiem Mediums sollte daher einer gesteigerte Proteinregulation erreicht werden.

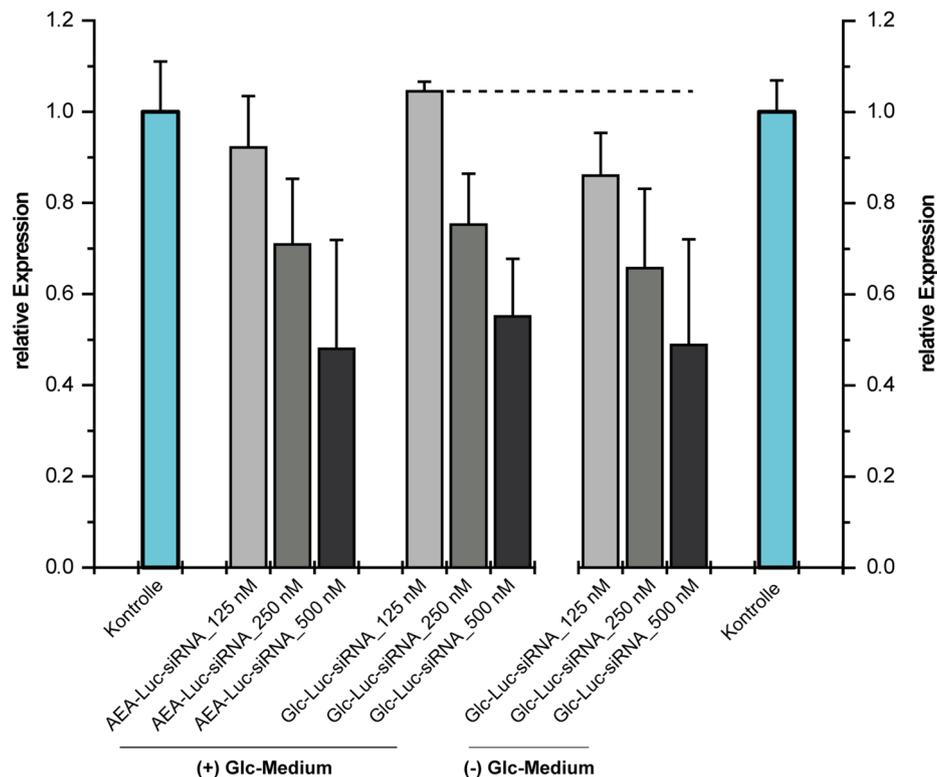


Abbildung 5.7 Luciferase-Assay mit Anandamid (AEA-Luc-siRNA) sowie Glucose (Glc-Luc-siRNA) modifizierter siRNA in RBL-2H3-Zellen. Die Glucose-siRNA wurde dabei auch auf Zellen inkubiert mit glucosefreiem ((-)-Glc) gegeben.

In Abbildung 5.7 sind die Ergebnisse dieses Luciferase-Assays dargestellt. Im Fall der Anandamid- oder Glucose-siRNA wurde stets ein konzentrationsabhängiger Effekt erreicht. Dabei führte die Anandamid-siRNA stets zu einer geringfügig höheren Protein-Regulation als die Glucose-siRNA. Diese wurde auch auf Zellen, inkubiert mit Glucose freiem Medium, gegeben. Dadurch konnte im Vergleich zur Glucose-siRNA in Glucose haltigem Medium eine Steigerung der Proteinregulation erzielt werden. Somit scheint freie Glucose im Medium die Aufnahme der Glucose-siRNA zu beeinträchtigen. Dies ist ein starker Hinweis, dass die Anwesenheit von Glucose zu einer Hemmung der Aufnahme der Glucose-siRNA führt und diese somit aktiv durch ein Glucose bindendes Protein in die Zelle transportiert wird.

Dies wurde in Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Bräuchle* bestätigt, wobei nicht nur eine Aufnahme in RBL-2H3-Zellen sondern auch eine Aufnahme in HeLa-Zellen detektiert wurde.

Dabei konnte die Aufnahme der Glucose-siRNA durch ansteigende Konzentration an freier Glucose im Medium gehemmt werden. Gleichzeitig konnte durch einen GFP markierten Glucose Transporter 1 sowie durch eine Fluorophor markierte Glucose-siRNA deren Interaktion herausgestellt werden. Dies wurde durch Colokalisation des Fluorophors sowie der GFP-Markierung gezeigt. Zusammenfassend konnte deutlich demonstriert werden, dass Glucose einen aktiven Transport von siRNA in Zellen vermitteln kann.

Soll in späteren Experimenten die Spezifität von Anandamid-siRNA *in vivo* gezeigt werden, muss die hier beschriebene Glucose vermittelte Aufnahme berücksichtigt werden. In derartigen Experimenten ist es daher nicht sinnvoll eine siRNA sowohl mit Glucose als auch mit Anandamid zu modifizieren, da beide Moleküle in der Lage sind eine Aufnahme in Zellen zu bewirken. Das in diesem Kapitel beschriebene Cyclodextrin zur Modifizierung von siRNA stellt eine artifizielle Struktur dar, welche keine Membranpermeabilität besitzt.^[5] Gleichzeitig wurde jedoch durch diese Modifizierung die gleiche Steigerung der Protein-Regulation analog zu Glucose beobachtet. Daher ist für derartige *in vivo* Experimente eine Modifizierung mit dem hier vorgestellten Cyclodextrinmonazid sinnvoller.

6 Folsäure vermittelter Transport von siRNA

Fast man die bisher gewonnenen Ergebnisse zusammen, so konnte durch Entwicklung einer trimeren siRNA-Struktur und Zucker-Modifizierungen eine gesteigerte Protein-Regulation erreicht werden. Diese Konzepte sollten nun auch auf ein anderes Liganden-System nämlich das Folat-System übertragen werden. Durch dieses System wurde bisher insbesondere ein Transport von Chemotheapeutika in Krebszellen beschrieben.^[4]

6.1 Das Folat-System zum systemischen Transport in Krebszellen

Das Vitamin B9 bzw. Folsäure (Pteroylglutaminsäure) hat sich als besonders vielversprechender Ligand zur gezielten Krebstherapie erwiesen.^[4, 59] So ist Folsäure günstiger, stabiler und leichter zu modifizieren als beispielsweise monoklonale Antikörper.^[171] In eukaryotischen Zellen spielt Folsäure eine wichtige Rolle bei C1-Übertragungen für die

Nukleotid-Biosynthese, wobei 5,6,7,8-Tetrahydropteroylglutaminsäure das eigentliche Cosubstrat ist. Das Überleben sowie die Zellteilung der Zellen hängen also stark von deren Fähigkeit ab, dieses essentielle Vitamin aufzunehmen.^[172] Unter physiologischen Bedingungen liegt das Vitamin hauptsächlich als Anion vor, so dass keine passive Diffusion durch Zellmembranen möglich ist. Somit müssen Folate durch aktiven Transport von Zellen aufgenommen werden. Dafür sind im Wesentlichen der *Reduced Folate Carrier*,^[173] ein Protonen gekoppelter Folat Transporter^[174] und der Folat-Rezeptor verantwortlich.^[175] Letzterer wird nur in geringem Maß von gesunden Zellen, jedoch häufig von Krebszellen exprimiert.^[176] Zusätzlich sind Folat-Rezeptoren, exprimiert von gesunden Zellen, für Folsäurekonjugate in der Blutbahn nicht zugänglich, was zu einer weiteren Steigerung der Spezifität des zielgerichteten Transports dieser Konjugate führt.^[177] Nach der Bindung dieser Konjugate an den Folsäure-Rezeptor von Krebszellen erfolgt der Transport in das Innere der Zelle durch Rezeptor vermittelte Endozytose.^[178]

Um einen Transport von siRNA durch den Folat-Rezeptor zu ermöglichen, musste Folsäure zunächst kovalent mit RNA verknüpft werden. Dazu konnte die Synthese eines Folsäuremonoazids entwickelt (Kapitel 3) und dieses durch Click-Chemie mit dem sense-Strang einer Renilla-siRNA verknüpft werden.^[80] Wie in Kapitel 3.3 gezeigt, kann diese siRNA eine Regulation des Reporterenzym bewirken. Es sollte nun untersucht werden, ob das Prinzip der dendritischen Strukturen sowie Glucose-Modifizierungen auch in diesem Liganden-System zu einer gesteigerten Effektivität von Folat-siRNA führt.

6.2 Synthese und Evaluation von Folsäure-siRNAs

Die Synthese von Folatderivaten stellt aufgrund von zwei Sachverhalten eine Herausforderung dar. Zum einen sind Folate in sämtlichen Lösungsmitteln außer DMSO nur sehr schlecht löslich. Desweiteren besitzt Folsäure zwei Carboxylgruppen, welche sich in ihrer Reaktivität nicht derart unterscheiden, dass eine regioselektive Modifizierung möglich ist. Daher wurde das Triazid **3** ausgehend von Pteroinsäure und doppelt geschütztem Glutamat hergestellt (Abbildung 6.1).

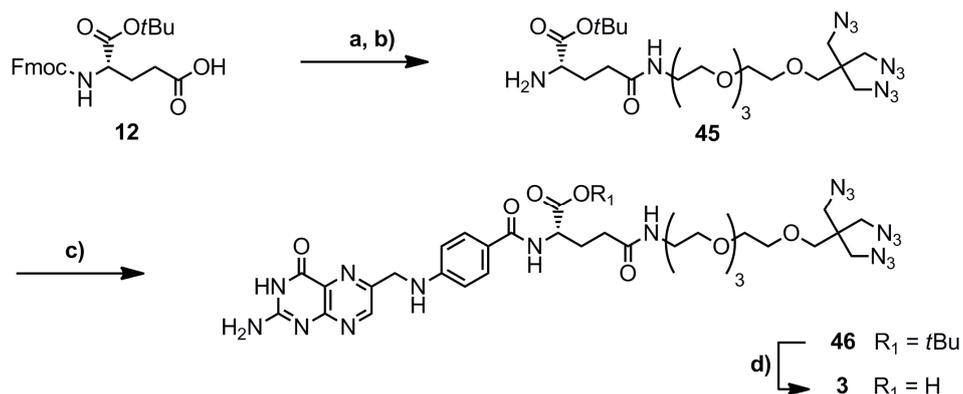
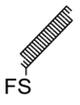
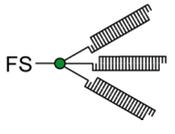
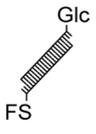


Abbildung 6.1 Synthese des Folsäuretriazids **3**. a) **24**, TBTU, DIPEA, DMF, 50 °C, 92 % b) DBU, DCM, RT, 92 %, c) Pteroinsäure, TBTU, DIPEA, DMF/DMSO (1:1), 50 °C, 24 %, d) TFA, CHCl₃, RT, quant.

Im ersten Schritt der Synthesesequenz wurde dabei zunächst die γ -Carboxylgruppe von doppelt geschützter Glutaminsäure **12** mit dem primären Amin des Triazido-Linkers **24** gekuppelt. Diese Amid-Kondensation erfolgte mit TBTU in basischem Milieu (DIPEA), wobei die Reaktion in sehr guter Ausbeute (92 %) verlief. Die anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 17 % DBU in DCM. Der so in guter Ausbeute (92 %) erhaltene, triazido-modifizierte Glutaminbaustein **45** wurde schließlich erneut TBTU vermittelt mit ungeschützter Pteroinsäure umgesetzt. Das Produkt **46** konnte trotz der bereits sehr hohen Polarität mittels Silica-Chromatografie aufgereinigt werden. Im letzten Schritte erfolgte die quantitative Entschützung des *tert*-Butylesters mittels TFA in Chloroform. Die Aufreinigung konnte in diesem Fall aufgrund der Unlöslichkeit des Produkts durch mehrere Waschriffe mit Diethylether erfolgen, wodurch das Folat-Triazid **3** in sehr hoher Reinheit gewonnen werden konnte. Dies ist Voraussetzung für eine quantitative Mehrfach-Click-Reaktion mit Alkin modifizierter RNA.

Das so hergestellte Triazid **3** wurde durch Click-Chemie mit dem sense-Strang der Renilla-siRNA verknüpft und mit drei Äquivalenten des entsprechenden antisense-Strangs hybridisiert. Zusätzlich wurde auch eine monomere Folsäure-siRNA mit Glucose-Modifizierung synthetisiert, um auch hier einen Effekt des Zuckermoleküls zu untersuchen. Als Bezugssystem wurden für beide Fälle Folsäure-siRNA ohne weitere Modifizierung eingesetzt. Alle drei siRNAs sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1 Zusammenfassung der Folsäure-siRNAs gegen die *Renilla*-Luciferase. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. X = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
FS-Luc-siRNA (ORN1+5/ ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> (+5)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
FS-Tri-Luc-siRNA ((ORN1) ₃ +3/ (ORN2) ₃)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> T ⁺³ 3'-T <u>X</u> ccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
FS-Glc-Luc-siRNA (ORN1+5/ ORN2+42)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> (+5)T 3'-T <u>X</u> (+42)ccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	

Mit diesen Folsäure siRNAs wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt, wobei die Ergebnisse in Abbildung 6.2 vorgestellt sind. Wie im Diagramm erkennbar, ergab die Folsäure-siRNA mit Glucose-Modifizierung die stärkste Protein-Regulation. Wie in Kapitel 5.2 beschrieben kann Glucose auch einen Transport von siRNA in HeLa-Zellen bewirken. Somit ist durch Adressierung eines zweiten Aufnahme-Weges eine Optimierung von Folsäure-siRNA möglich.

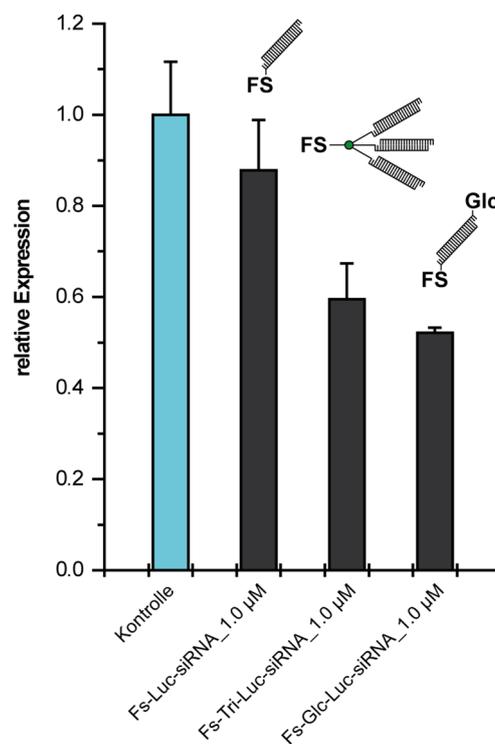


Abbildung 6.2 Luciferase Assay durchgeführt mit Folsäure modifizierten siRNAs in HeLa-Zellen. Die dabei eingesetzten Duplexe sind in Tabelle 6.1 näher beschrieben.

Durch die trimere Folsäure siRNA-Struktur wurde außerdem eine deutliche Steigerung der Protein-Regulation im Vergleich zur monomeren Folsäure siRNA erreicht. Wichtig ist, dass in jedem Fall die gleiche Konzentration an siRNA-Duplexen vorlag. Die Konzentration des trimeren Konstrukts betrug somit ein Drittel der monomeren Folsäure-siRNA. So wurde mit dem Duplex eine Regulation von 14 % und durch die trimere Struktur eine Regulation von 41 % erreicht. Das Konzept der dendritischen Strukturen konnte somit erfolgreich auf das Folsäure-System übertragen werden.

7 Anwendung multimerer siRNAs

Im nächsten Schritt sollte die Anwendbarkeit multimerer siRNAs durch Kooperationen aufgezeigt werden. Als Ligand wurde dabei Anandamid eingesetzt. Zusätzlich wurden je nach Anwendung Glucose- oder Cyclodextrin-Modifizierungen verwendet. In einer internen Kooperation mit *Fabio Spada* sollte ein Transport der trimeren Anandamid Konstrukte in Stammzellen untersucht werden. Dies sollte durch Regulation epigenetisch relevanter Tet-Enzyme erfolgen. In einer weiteren Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Conzelmann* sollte durch die siRNA-Konstrukte Tollwut-Proteine in primären Neuronen reguliert werden. Beide Kooperationen werden im Folgenden beschrieben.

7.1 Regulation epigenetisch relevanter Enzyme in Stammzellen

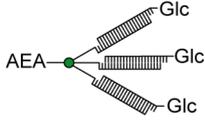
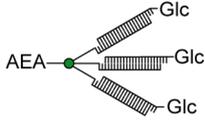
Stamm-Zellen besitzen aufgrund ihrer Fähigkeit sich in nahezu jeglichen spezialisierten Zelltyp zu differenzieren ein sehr großes Potential im Bereich der regenerativen Medizin.^[179] Allgemein unterscheidet man zwischen embryonalen sowie adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen können sich in sämtliche Zelltypen differenzieren, während adulte Stammzellen ein eingeschränktes Potential zur Differenzierung besitzen. Demnach sind beispielsweise neuronale Stammzellen nur in der Lage sich in Neuronen oder Astrozyten zu differenzieren, jedoch nicht in andere Zelltypen. Eine der kritischen Barrieren das volle Potential von Stammzellen auszuschöpfen, liegt in der Entwicklung einfacher, effektiver und nicht toxischer Methoden die Differenzierung in bestimmte Zelltypen zu steuern.^[180] Diese Kontrolle kann durch Modulation der Genexpression oder Signal-Transduktions-Wege innerhalb der Zelle erfolgen. RNA-Interferenz ist daher ein wichtiges Werkzeug in der Stammzellbiologie.^[181] Für eine erfolgreiche Manipulation der Genexpression in Stammzellen muss jedoch deren Viabilität

über einen Zeitraum, welcher gegebenenfalls mehrere siRNA-Transfektionen beinhaltet, erhalten werden. Eine Vielzahl an derzeit für die Transfektion zur Verfügung stehenden Reagenzien und Methoden wie kationische Poly- oder Lipoplexe, virale Vektoren oder Elektroporation sind mit signifikanten zytotoxischen und anderen unerwünschten Nebeneffekten verbunden.^[182] Somit stellt ein robuster sowie verlässlicher Transport in Stammzellen eine große Herausforderung dar. Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, konnte durch Anandamid-siRNA keine toxischen Effekte beobachtet werden, weshalb diese Methode ein vielversprechender Weg für die Transfektion von Stammzellen darstellt. Der erfolgreiche Transport von siRNA in Stammzellen sollte dabei durch Regulation epigenetisch relevanter Proteine erfolgen.

So wird die Differenzierung von Stammzellen epigenetisch kontrolliert und ist Folge gewebespezifischer Expressionsmuster von Genen.^[183] Die molekularen Einzelheiten dieses Vorgangs liegen insbesondere in der chemischen Veränderung des Chromatins^[184] sowie dem Methylierungsmuster der DNA.^[185] Die Methylierung von Cytosin innerhalb von Promotor-Regionen führt in der Regel zur Inhibierung der Expression des entsprechenden Gens.^[186] Daher muss die Methylgruppe für eine Reaktivierung der Genexpression wieder entfernt werden.^[187] In diesem Zusammenhang spielen eine Gruppe von Enzymen, nämlich Tet 1-3 (*Ten eleven Translocation*) eine wichtige Rolle.^[6, 188] Diese können 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethyl-,^[189] 5-Formyl-^[190] sowie 5-Carboxylcytosin^[190a, 191] oxidieren, was als aktiver Demethylierungs-Weg diskutiert wird. Der genaue Einfluss dieser Enzyme auf die epigenetische Steuerung sowie Differenzierung von Stammzellen ist Gegenstand aktueller Forschung.^[6, 192] Aufgrund dieser unklaren Rolle der Tet-Enzyme ist deren Regulation ein relevantes Target für RNA-Interferenz. Anhand der Regulation dieser Enzyme sollte daher der erfolgreiche Transport von Anandamid modifizierter siRNA in embryonale als auch neuronale Stammzellen demonstriert werden. Insbesondere in neuronalen Stammzellen wurde die Regulation von Tet Proteinen durch siRNA kaum beschrieben.

Im ersten Schritt mussten die unterschiedlichen siRNAs gegen Tet1 bzw. Tet2 synthetisiert werden (Tabelle 7.1). Die entsprechenden Sequenzen wurden der Literatur entnommen und von shRNAs abgeleitet.^[193] Dabei erfolgte die Festphasensynthese durch den Verfasser, während die Modifizierung mittels Click-Chemie durch *Andreas Beil* sowie *Korbinian Brunner* erfolgte.

Tabelle 7.1 Zusammenfassung der Anandamid-siRNAs zur Regulation von Tet1 und Tet2. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. X = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
Tet1-siRNA (ORN5/ORN6)	5'-gaa-uua-cag-uug-uua-cgg-a <u>X</u> T 3'-T <u>X</u> cuu-aau-guc-aac-aau-gcc-u	
AEA-Tet1-siRNA (ORN5+4/ ORN6)	5'-gaa-uua-cag-uug-uua-cgg-a <u>X</u> (+4)T 3'-T <u>X</u> cuu-aau-guc-aac-aau-gcc-u	
AEA-Glc-Tri-Tet1-siRNA (ORN5+1/ ORN6+42)	5'-gaa-uua-cag-uug-uua-cgg-a <u>X</u> T 3'-T <u>X</u> cuu-aau-guc-aac-aau-gcc-u +1 +42	
Tet2-siRNA (ORN7/ORN8)	5'-acu-acu-aac-ucc-acc-cua-a <u>X</u> T 3'-T <u>X</u> uga-uga-uug-agg-ugg-gau-u	
AEA-Tet2-siRNA (ORN7+4/ ORN8)	5'-acu-acu-aac-ucc-acc-cua-a <u>X</u> (+4)T 3'-T <u>X</u> uga-uga-uug-agg-ugg-gau-u	
AEA-Glc-Tri-Tet2-siRNA (ORN7+1/ ORN8+42)	5'-acu-acu-aac-ucc-acc-cua-a <u>X</u> T 3'-T <u>X</u> uga-uga-uug-agg-ugg-gau-u +1 +42	

Hergestellt wurden siRNAs gegen Tet1- bzw. Tet2 ohne Liganden-Funktionalität, wobei die der Literatur entnommene siRNA-Sequenzen überprüft werden sollten. Synthetisiert wurden desweiteren **AEA-Tet1-siRNA** bzw. **AEA-Tet2-siRNA** mit Anandamid-Modifizierung sowie die entsprechenden trimeren Strukturen **AEA-Glc-Tri-Tet1-siRNA** bzw. **AEA-Glc-Tri-Tet2-siRNA**. Diese waren zusätzlich mit einer Glucose-Funktionalität modifiziert, welche zu einer weiteren Steigerung der Regulationseffizienz führen sollte.

Nach erfolgreicher Synthese dieser Bibliothek wurden die unterschiedlichen siRNAs mit Stammzellen inkubiert, was von *Fabio Spada* durchgeführt wurde. Dabei wurde das relative Expressionslevel der Tet-Enzyme 72 h nach der Transfektion mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmt. Die Isolation der mRNA sowie die darauffolgende Quantifizierung durch *realtime* PCR erfolgte durch den Verfasser. In Analogie zu dem beschriebenen Luciferase-

Assay (Kapitel 3.1) ist dabei ein interner Standard zur Normalisierung notwendig. Dafür werden nicht regulierte Gene (*housekeeping genes*) eingesetzt, welche ein konstantes Expressionsniveau unabhängig von externen Einflüssen besitzen sollten. Es wurde dazu nach *Leonhardt et al.* das mRNA Level von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) gewählt.^[194] Dieses Enzym katalysiert innerhalb der Glycolyse die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Somit wird die Expression der Tet-Enzyme stets in Relation zu GAPDH betrachtet. Die Referenzierung der mRNA-Regulationen erfolgte durch ein Kontroll-Experiment, in welchem das relative mRNA Level von Tet1 bzw. TET2 in der Abwesenheit von siRNA bestimmt wurde. Erste Experimente wurden in embryonalen Stammzellen durchgeführt (Abbildung 7.1).

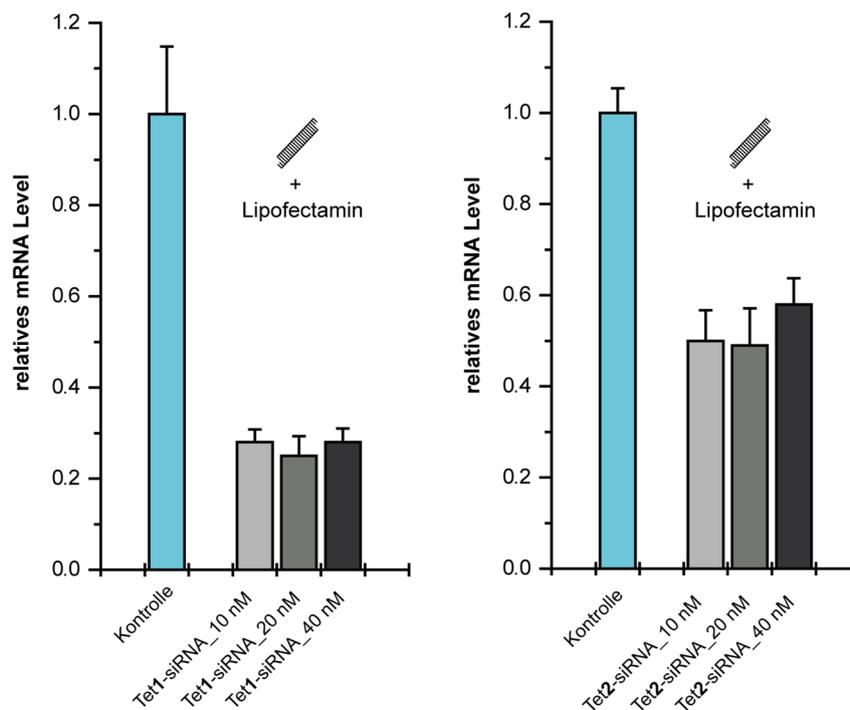


Abbildung 7.1 Regulation der Proteine Tet1 und Tet2 in embryonalen Stammzellen durch Tet1-siRNA bzw Tet2-siRNA, welche mittels Lipofectamin 2000 transfiziert wurden. Die relative Expression wurde über das relative mRNA-Level mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmt. Die eingesetzten siRNAs sind in Tabelle 7.1 näher beschrieben.

Da die siRNA-Sequenz von einer shRNA abgeleitet wurde, musste zunächst ihre biologische Aktivität untersucht werden. Dazu erfolgte in erster Instanz eine *Lipofectamin 2000* vermittelte Transfektion der **Tet1**-siRNA bzw. **Tet2**-siRNA ohne Liganden-Modifizierung. Dabei wurden drei unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt (10, 20 sowie 40 nM).

Wie in Abbildung 7.1 erkennbar konnten beide siRNAs eine deutliche Regulation von Tet1 bzw. Tet2 erzielen. Auffällig ist, dass in beiden Fällen bereits durch die niedrigste Konzentration (10 nM) der maximale Effekt erzielt wurde. So konnte das Expressionslevel der

mRNA von Tet1 um etwa 72 % bzw. von Tet2 auf etwa 50 % reduziert werden. Dies zeigte, dass die gewählten siRNA-Sequenzen erfolgreich für Protein-Regulationen eingesetzt werden können. Warum die siRNA-Sequenz gerichtet gegen Tet2 eine geringere Effektivität zur Regulation besitzt, kann nur schwer festgestellt werden. Prinzipiell ist die Effektivität einer siRNA stets von ihrer Sequenz und somit dem adressierten Bereich auf der mRNA abhängig.^[195] Adressiert eine siRNA beispielsweise mRNA-Bereiche, welche durch andere Proteine oder RNA-Sekundärstrukturen blockiert sind, ist keine effektive Regulation möglich.^[196]

Im nächsten Schritt wurden die embryonalen Zellen mit den Anandamid modifizierten siRNAs **AEA-Tet1**-siRNA sowie **AEA-Tet2**-siRNA ohne Transfektionsreagenz inkubiert. Dabei konnte jedoch keine Regulation beider Enzyme erreicht werden. Um dies näher zu untersuchen, wurden in einem orthogonalen Experiment embryonale Stammzellen mit Anandamid-siRNA mit Fluorophor Markierung inkubiert. Dabei konnte mittels *laser scanning* konfokal Mikroskopie keine Aufnahme der siRNA detektiert werden. Somit scheinen die in diesen Experimenten eingesetzten embryonalen Stammzellen entgegen der Literatur keine Cannabinoid-Rezeptoren zu exprimieren,^[197] so dass keine Aufnahme der Anandamid modifizierten siRNAs möglich ist. Daher wurden darauf folgende Experimente mit neuronalen Stammzellen durchgeführt. Wie in Kapitel 1.6.2 beschrieben sollten insbesondere neuronale Zellen Cannabinoid-Rezeptoren exprimieren.^[198]

In erster Instanz wurden diese Zellen mit Anandamid modifizierter **AEA-Tet1**-siRNA inkubiert, welche wie in vorherigem Abschnitt beschrieben die größte Effektivität aufwies. Diese wurde in zwei Konzentrationen (125 nM sowie 250 nM) mit neuronalen Stammzellen inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Transfektion in der Gegenwart von *Lipofectamin 2000*. Wie in Abbildung 7.2 erkennbar, konnte die **AEA-Tet1**-siRNA ohne Transfektionsreagenz eine Regulation von Tet1 in neuronalen Zellen erreichen. Dabei wurde ein konzentrations-abhängiger Effekt erzielt, wobei die Expression der mRNA durch eine siRNA-Konzentration von 250 nM um 42 % reduziert wurde. Innerhalb neuronaler Stammzellen ist somit eine Aufnahme Anandamid modifizierter siRNA möglich. Durch konfokal mikroskopische Studien von *Leonhard Möckl* (Arbeitskreis *Prof. Bräuchle*) konnte dies bestätigt werden. *Lipofectamin 2000* vermittelte Aufnahme dieser siRNA führte jedoch zu einer Regulation von etwa 58 %.

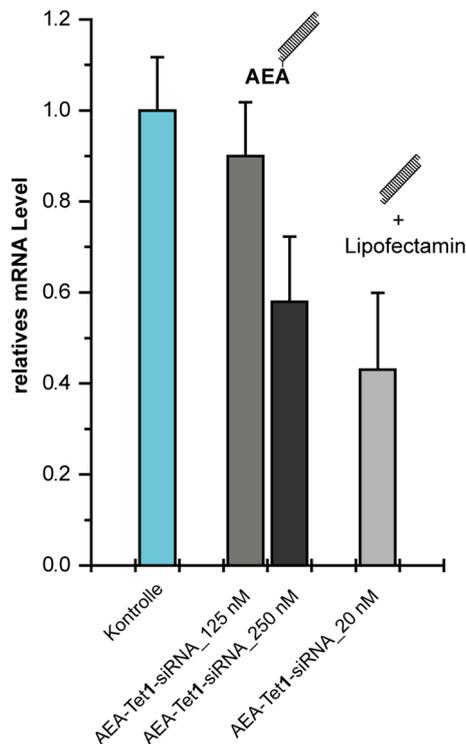


Abbildung 7.2 Regulation von Tet1 in neuronalen Stammzellen durch AEA-Tet1-siRNA. Diese wurde mit sowie ohne *Lipofectamin 2000* transfiziert. Die relative Expression wurde über das relative mRNA-Level mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmt. Die eingesetzte siRNA ist in Tabelle 7.1 näher beschrieben.

Im nächsten Schritt sollten die optimierten trimere Strukturen mit Glucose-Modifizierung auf die Regulation von Tet1 untersucht werden. Eingesetzt wurde dabei **AEA-Tet1-siRNA** sowie die entsprechende trimere Struktur **AEA-Glc-Tri-Tet1-siRNA** (Tabelle 7.1). In drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden beide siRNAs mit neuronalen Stammzellen inkubiert und die relative Expression von Tet1 mittels quantitativer *realtime* PCR 72 h nach der Transfektion bestimmt.

Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 7.3 zusammengestellt. In allen Fällen konnte dabei eine Regulation von Tet1 detektiert werden, wobei durch die trimere Strukturen stets größere Regulationen erzielt werden konnten. Die relativen Regulationen sowie das Verhältnis der relativen Regulationen erreicht durch die monomere bzw. die trimere siRNA waren dabei jedoch gewissen Schwankungen unterworfen. So wurden durch die **AEA-Tet1-siRNA** Regulationen zwischen 10 % und 34 % erzielt. Die trimere **AEA-Glc-Tri-Tet1-siRNA** erzielte demgegenüber Regulationen zwischen 31 % bzw. 67 %. So war die trimere siRNA 1.2 bzw. 2.1 mal effektiver als die monomere siRNA. Diese Schwankungen könnten auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Da es sich um voneinander unabhängige Experimente handelt, befanden sich die neuronalen Stammzellen stets in unterschiedlichen Passagen. Zusätzlich wird innerhalb eines Experiments stets nur ein *well* von Zellen transfiziert und dabei das mRNA-Level von TET bzw. GAPDH jeweils im Triplikat gemessen. So wird beispielsweise innerhalb

des Luciferase Assays stets die relative Expression beider Luciferasen in drei *wells* gemessen, da der *Read Out* nach der Zellyse durch entsprechende Substrat-Zugabe leicht durchführbar ist.

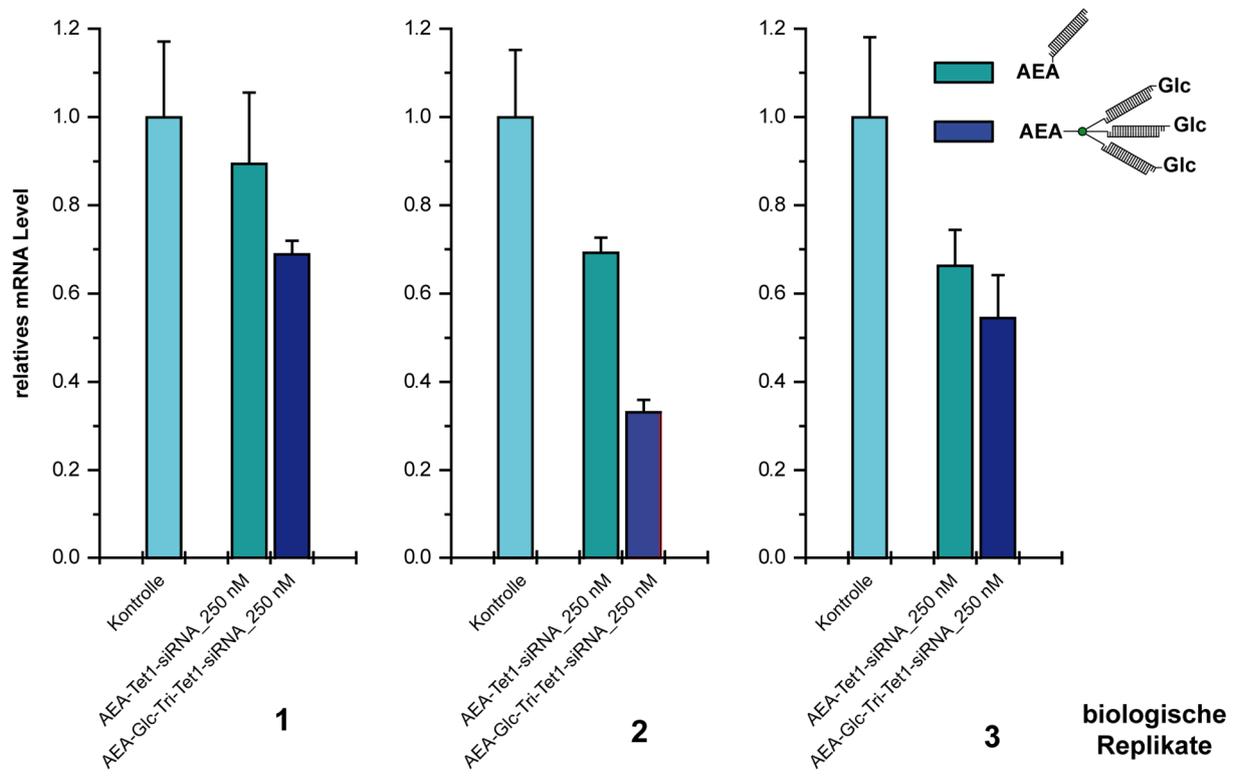


Abbildung 7.3 Regulation von Tet1 in neuronalen Stammzellen durch AEA-Tet1-siRNA sowie AEA-Glc-Tri-Tet1-siRNA. Dargestellt sind drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die angegebene Konzentration bezieht sich auf den siRNA Duplex. Die relative Expression wurde über das relative mRNA-Level mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmt. Die eingesetzten siRNAs sind in Tabelle 7.1 näher beschrieben.

Bei einer *realtime* PCR hingegen müssen dafür jedoch vier kommerziell verfügbare Kits (Isolation der mRNA, Verdau genomischer DNA, reverse Transkription sowie quantitative *realtime* PCR) durchlaufen werden, weshalb ein *well* als technisches Triplikat gemessen wird. Der Fehler innerhalb eines Experiments berücksichtigt somit kein inhomogenes Wachstum oder unterschiedliche Konfluenz der Zellen. Zusätzlich wurde in der Literatur beschrieben, dass Anandamid mit dem Plastik der *wells* interagieren kann, wodurch ebenfalls experimentelle Schwankungen entstehen.^[159]

Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass Anandamid in neuronalen Stammzellen einen Transport von monomerer bzw. trimerer siRNA bewirken kann. Dabei wurden durch die entwickelten trimeren Strukturen stets größere Regulationen von Tet1 erreicht. Es konnte somit ein Beitrag zur Transfektion von neuronalen Stammzellen geleistet und das Potential von

Anandamid vermitteltem Transport im Zusammenhang mit den verzweigten trimeren Strukturen unterstrichen werden.

In einer weiteren Anwendung sollte die Regulation von zwei Tollwut-Proteinen in primären neuronalen Zellen untersucht werden. Dies erfolgte in Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Conzelmann* (Max von Pettenkofer-Institut München) und soll in folgendem Kapitel beschrieben werden.

7.2 Regulation von Tollwut-Proteinen mit Anandamid-siRNA

Bei Tollwut handelt es sich um ein neurotropes Virus.^[112] Treten nach einer Infektion mit diesem Virus erste Symptome auf, so verläuft die Infektion bis heute in nahezu allen Fällen tödlich.^[112] Das Virus erschien daher als ein attraktives System um die Anwendbarkeit des Anandamid- vermitteltem Transports von siRNA in Neuronen zu untermauern. Im Rahmen einer Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Conzelmann* wurde daher versucht Tollwut-Proteine durch die hier entwickelten Konstrukte zu regulieren. Die Kooperation erfolgte dabei mit den Doktoranden *Tobias Halbach* und *Konstantin Sparrer*. In der Literatur eingesetzte Wirkstoffe konzentrieren sich insbesondere auf das P- und N-Protein.^[139b] Das P-Protein nimmt im viralen Lebenszyklus eine Schlüsselrolle ein, da es mit zwei Tollwut-Proteinen in Wechselwirkung steht. In Bezug auf das N-Protein fungiert es als Chaperon und ermöglicht dabei eine selektive Wechselwirkung des N-Proteins mit der viralen und nicht der zellulären mRNA.^[116] Gleichzeitig dient es als Cofaktor für die virale RNA-Polymerase (L-Protein).^[199] Wichtig ist außerdem, dass das P-Protein die Interferon-Antwort und somit einen natürlichen Abwehrmechanismus der Zelle unterdrückt.^[117b, 134] Das N-Protein bildet eine Schutzhülle um die virale RNA und verhindert somit auch die Erkennung durch Immunsensoren sowie zellulärer RNasen.^[113, 115]

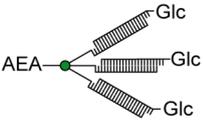
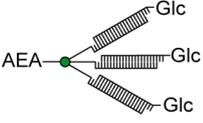
Die Experimente wurden mit dem Virus Stamm SAD L16^[200] zunächst in Immunzellen (*Jurkats*) durchgeführt. Zunächst mussten möglichst effektive siRNA-Sequenzen gegen das P- und N-Protein gefunden werden. Dazu wurde eine Bibliothek mit einer Vielzahl an Sequenzen auf die Genregulationseffizienz untersucht. Das antivirale Potential der siRNAs wurde dabei durch die *Conzelmann-Gruppe* (*Tobias Halbach*) mittels *realtime* PCR, Western-Plots und Wachstumskurven ermittelt.

Im nächsten Schritt wurden die sich dabei am potentesten herausgestellten siRNAs gegen das N- und das P-Protein mit einer Alkin-Reportergruppen modifiziert, um eine nachträgliche

Modifizierung mittels Click-Chemie zu ermöglichen. Nach abgeschlossener Festphasensynthese wurde der sense-Strang sowohl mit dem Anandamidmonoazid als auch dem Anandamidtriazid zum Aufbau der verzweigten Strukturen modifiziert. Der antisense-Strang wurde zusätzlich mit dem Glucoseazid **42** modifiziert.

Nach erfolgreicher Synthese der Stränge erfolgte die Hybridisierung, wobei die entsprechenden siRNA-Konstrukte sowohl gegen das N- als auch das P-Protein in Tabelle 7.2 zusammengefasst sind. Zusätzlich wurde die Anandamid modifizierte Renilla-Lucifase-siRNA als Kontroll siRNA eingesetzt, welche zu keiner Regulation eines Tollwut-Proteins führen sollte. Zellen, welche mit dieser Renilla-siRNA behandelt wurden, dienten als Bezugspunkt für die Beurteilung der Reduktion des viralen Titers.

Tabelle 7.2 Zusammenfassung der Anandamid-siRNAs. Synthetisiert wurde eine Renilla-siRNA, welche zu keiner Regulation von Tollwut-Proteinen führen sollte. Zusätzlich wurden mono und trimere siRNAs gegen das N- bzw. das P-Protein des Tollwut-Virus hergestellt. Die trimeren Strukturen trugen dabei eine Glucose-Funktionalität, welche über einen entsprechend modifizierten antisense-Strang eingeführt wurde. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. X = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
AEA-Luc-siRNA (ORN1+4/ ORN2)	5'-ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> (+4)T 3'-TTccg-gaa-agu-gau-gag-gau-g	
AEA-N-siRNA (ORN9+4/ ORN10)	5'-gaa-cuu-uga-gga-aga-gau-a <u>X</u> (+4)T 3'-T <u>X</u> cuu-gaa-acu-ccu-ucu-cua-u	
AEA-Glc-Tri-N-siRNA (ORN9+1/ ORN10+42)	5'-gaa-cuu-uga-gga-aga-gau-a <u>X</u> ⁺¹ T 3'-T <u>X</u> cuu-gaa-acu-ccu-ucu-cua-u ⁺⁴²	
AEA-P-siRNA (ORN11+4/ ORN12)	5'-ccu-uga-uga-uau-agu-uaa-a <u>X</u> (+4)T 3'-T <u>X</u> gga-acu-acu-aua-uca-auu-u	
AEA-Glc-Tri-P-siRNA (ORN11+1/ ORN12+42)	5'-ccu-uga-uga-uau-agu-uaa-a <u>X</u> ⁺¹ T 3'-T <u>X</u> gga-acu-acu-aua-uca-auu-u ⁺⁴²	

Die Untersuchung der antiviralen Aktivität erfolgte durch *Tobias Halbach*. Erste Experimente zur Evaluation der antiviralen Wirkung der synthetisierten siRNAs wurden in Immunzellen (BJAB und Jurkats) durchgeführt, da in diesen Zellen bereits eine effektive Protein-Regulation mittels Anandamid modifizierter siRNA erzielt wurde (Kapitel 3.2). Dazu wurden die Zellen in 96-well Platten ausgesät mit dem Tollwutvirus infiziert (SAD L16) und mit den synthetisierten siRNAs inkubiert. 48 h nach der Infektion wurde das Medium eingefroren (-20 °C) und der Titer mittels Titration bestimmt. BJAB-Zellen ließen sich dabei nur schwer mit dem Virus infizieren. So wurden dabei nur niedrige virale Titer, nahe am Detektionslimit erreicht. Dieses Problem ergab sich jedoch nicht in Jurkat-Zellen, so dass eine quantitative Auswertung möglich war. In Abbildung 7.4 sind die dabei erzielten Regulation zusammengefasst. Durch beide monomere siRNAs adressiert gegen das N- bzw. das P-Protein konnte der virale Titer bis zum Detektionslimit (10^2 ffu/mL) reduziert werden. Die trimeren siRNA Strukturen führten auch in diesem Experiment zu stärkeren Protein-Regulationen. So lag im Fall der trimeren Strukturen der virale Titer sogar unterhalb des Detektionslimits.

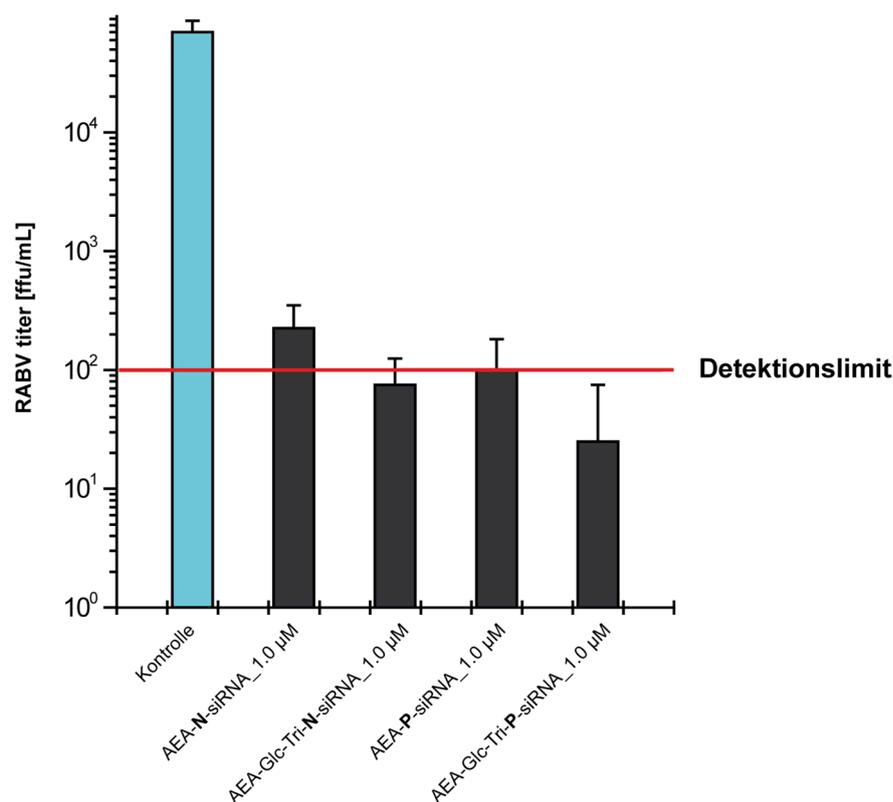


Abbildung 7.4 Einfluss der in Tabelle 7.2 zusammengefassten siRNAs auf den Tollwut-Titer in Jurkat-Zellen (*Tobias Halbach, Prof. Conzelmann*). Die Medium-Überstände wurden durch Titration analysiert. Standard-Abweichungen ergaben sich aus zwei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle und Bezugspunkt wurde die Inkubation mit der Renilla-Luciferase gewählt, welche zu keiner Regulation der Tollwut-Proteine führen sollte.

Da es sich bei Tollwut um ein neurotropes Virus handelt, mussten diese Experimente auch in neuronalen Zellen wiederholt werden. Durchgeführt wurde dies in kortikalen, primären

Neuronen, welche ebenfalls mit dem SAD16-Virus infiziert und mit den in Tabelle 7.2 beschriebenen siRNAs mit jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert wurden. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 7.5 zusammengefasst. Alle vier siRNAs gegen das N- oder P-Protein resultierten in einer dosisabhängigen Reduktion des viralen Titers. Im Fall der siRNAs, gerichtet gegen das N-Protein, wurde dabei durch die monomere siRNA eine stärkere Protein-Regulation beobachtet als durch die trimere Struktur. Betrachtet man jedoch das P-Protein so wurde dabei durch die entsprechende trimere Struktur bei allen drei Konzentrationen höhere Regulationen bestimmt. Insgesamt hatte diese trimere Struktur im gesamten Konzentrationsbereich die stärkste regulative Wirkung auf das Tollwut-Virus.

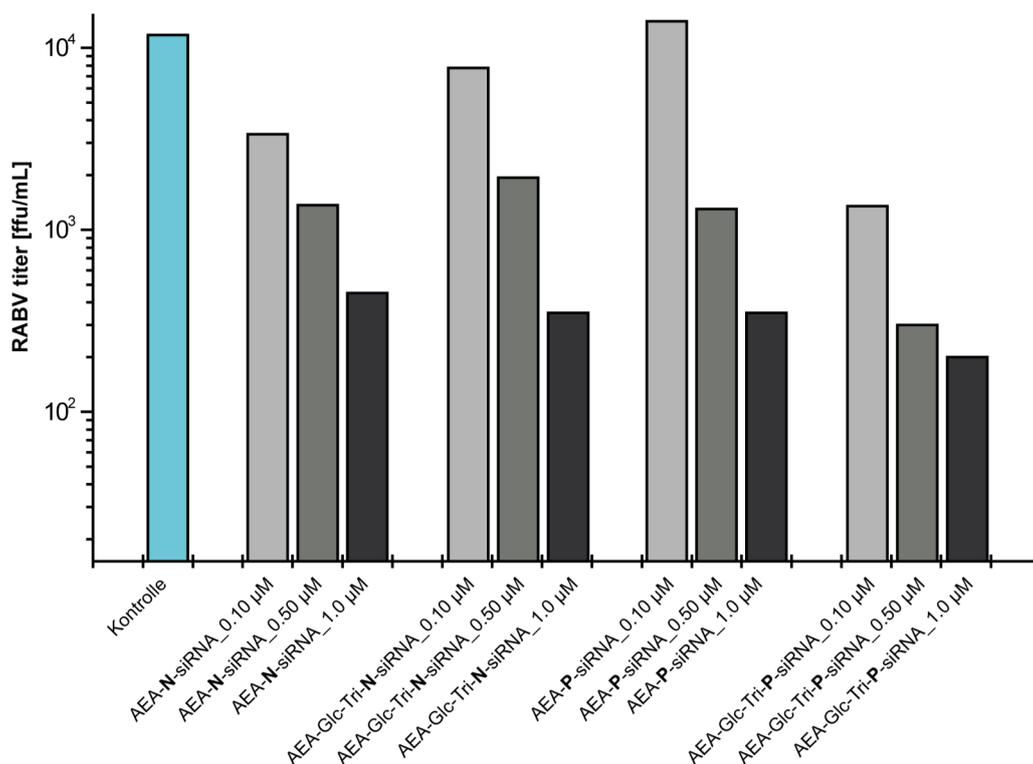


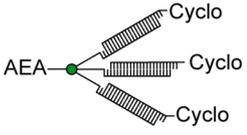
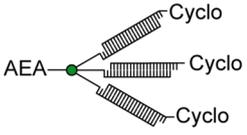
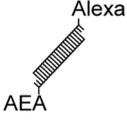
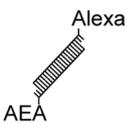
Abbildung 7.5 Einfluss von der in Tabelle 7.2 zusammengefassten siRNAs auf den Tollwut-Titer in primären Neuronen (Tobias Halbach, Prof. Conzelmann). Die siRNAs wurden dabei in drei unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Als Kontrolle und Bezugspunkt wurde die Inkubation mit der Renilla-siRNA gewählt, welche zu keiner Regulation der Tollwut-Proteine führen sollte.

Zusammenfassend konnte Anandamid modifizierte siRNA in primären Neuronen zu einer signifikanten Reduktion der Expression der N- und P-Proteine des Tollwut-Virus führen. Somit konnte die Anandamid vermittelte Aufnahme von siRNA als neue potentielle Behandlungsmöglichkeit dieses Virus dargestellt werden. Im nächsten Schritt muss nun gezeigt werden, dass die hier beschriebenen Regulationen auch *in vivo* reproduzierbar sind.

7.2.1 Synthese von Anandamid-siRNAs für *in vivo* Versuche

Die Regulation von Tollwut-Proteinen *in vivo* sollte in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Schwemmler am Universitätsklinikum Freiburg durchgeführt werden. In Tabelle 7.3 sind alle für diese Experimente hergestellten siRNAs zusammengefasst. Die Synthese erfolgte in Zusammenarbeit mit Korbinian Brunner sowie Andreas Beil. Hergestellt wurde dabei eine Anandamid-siRNA mit nonsense-Sequenz, welche zu keiner Regulation der Tollwut-Proteine führen sollte. Diese kann zur Referenzierung der Protein-Regulationen eingesetzt werden. Synthetisiert wurden desweiteren jeweils zwei siRNAs gegen das N- bzw. das P-Protein. Dabei wurde zum einen der monomere Anandamid Duplex hergestellt sowie zum anderen die entsprechende trimere Struktur. Diese trugen eine zusätzliche Modifizierung am antisense-Strang. Wie in dieser Arbeit herausgestellt wurde, kann auch Glucose einen Transport von siRNA in Zellen bewirken. Um nur die Transport Eigenschaften von Anandamid zu betrachten, wurden die trimeren Strukturen daher nicht mit Glucose- sondern mit β -Cyclodextrin-Molekülen zusätzlich funktionalisiert. Es konnte desweiteren gezeigt werden, dass β -Cyclodextrin einen zu Glucose analogen regulationssteigerenden Effekt auf Anandamid siRNA besitzt. Daher wurde für die *in vivo* Versuche trimere siRNA-Strukturen mit drei Cyclodextrin-Molekülen eingesetzt. Für konfokal mikroskopische Untersuchungen wurden auch Fluorophor (Alexa Fluor[®] 647, Azid, Life Technologies) modifizierte Anandamid siRNAs hergestellt. Dabei wurde sowohl die siRNA mit nonsense-Sequenz als auch die Sequenz, gerichtet gegen das P-Protein, verwendet. In Tabelle 7.3 sind alle hier beschriebenen siRNAs zusammengefasst.

Tabelle 7.3 Zusammenfassung der Anandamid-siRNAs für *in vivo* Regulationen von Tollwut-Proteinen. Synthetisiert wurden eine siRNA mit *nonsense*-Sequenz, welche zu keiner Regulation von Tollwut-Proteinen führen sollte. Zusätzlich wurden mono und trimere siRNAs gegen das N- bzw. das P-Protein des Tollwut-Virus hergestellt. Die trimeren Strukturen trugen dabei eine β -Cyclodextrin-Funktionalität, welche über einen entsprechend modifizierten antisense-Strang eingeführt wurde. Auch hergestellt wurden zwei Anandamid siRNAs mit Fluorophor-Modifizierung. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. \underline{X} = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

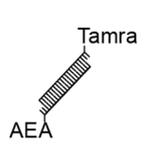
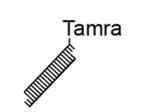
Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
AEA-nonsense-siRNA (ORN13+4/ ORN14)	5'-uuc-ucc-gaa-cgu-guc-acg-u \underline{X} (+4)T 3'-T \underline{X} aag-agg-cuu-gca-cag-ugc-a	
AEA-N-siRNA (ORN9+4/ ORN10)	5'-gaa-cuu-uga-gga-aga-gau-a \underline{X} (+4)T 3'-T \underline{X} cuu-gaa-acu-ccu-ucu-cua-u	
AEA-Cyclo-Tri-N-siRNA (ORN9+1/ ORN10+38)	5'-gaa-cuu-uga-gga-aga-gau-a \underline{X} T ⁺¹ 3'-T \underline{X} cuu-gaa-acu-ccu-ucu-cua-u ⁺³⁸	
AEA-P-siRNA (ORN11+4/ ORN12)	5'-ccu-uga-uga-uau-agu-uaa-a \underline{X} (+4)T 3'-T \underline{X} gga-acu-acu-aua-uca-auu-u	
AEA-Cyclo-Tri-P-siRNA (ORN11+1/ ORN12+38)	5'-ccu-uga-uga-uau-agu-uaa-a \underline{X} T ⁺¹ 3'-T \underline{X} gga-acu-acu-aua-uca-auu-u ⁺³⁸	
AEA-Alexa-nonsense-siRNA (ORN12+4/ ORN13+Alexa)	5'-uuc-ucc-gaa-cgu-guc-acg-u \underline{X} (+4)T 3'-T \underline{X} (+Al.)aag-agg-cuu-gca-cag-ugc-a	
AEA-Alexa-P-siRNA (ORN11+4/ ORN12+Alexa)	5'-ccu-uga-uga-uau-agu-uaa-a \underline{X} (+4)T 3'-T \underline{X} (+Al.)gga-acu-acu-aua-uca-auu-u	

Die biologischen Daten im Zusammenhang mit den hergestellten siRNAs stehen noch aus. Eine erfolgreiche Regulation der viralen Proteine in Tollwut infizierten Mäusen, könnten eine neuartige Behandlungsmöglichkeit des bisher tödlichen Virus herausstellen.

7.2.2 Erste *in vivo* Studie zu Anandamid-siRNA

Über die Eigenschaften von Anandamid für den Transport von siRNA *in vivo* ist bisher nichts bekannt. In Kooperation mit *Dr. Kirmeier* (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) wurden dazu erste Untersuchungen durchgeführt. Dabei sollte herausgestellt werden, ob Anandamid im Gehirn von Mäusen einen Transport der siRNA-Fracht bewirken kann. Im Rahmen der Masterarbeit von *Andreas Beil* wurde dazu Fluorophor (Tamra®) modifizierte siRNA mit sowie ohne Anandamid-Liganden synthetisiert (Tabelle 7.4).

Tabelle 7.4 Zusammenfassung der synthetisierten Fluorophor-siRNAs mit sowie ohne Anandamid-Liganden. Als Fluorophor wurde dabei Tamra® eingesetzt. Kleine Buchstaben bezeichnen dabei RNA-Oligonukleotide, während große Buchstaben DNA-Oligonukleotide kennzeichnen. \underline{X} = 2'Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (sense/antisense)	Sequenz (sense/antisense)	Struktur
AEA-Tamra-nonsense-siRNA (ORN13+4/ ORN14+Tamra)	5'-uuc-ucc-gaa-cgu-guc-acg-u \underline{X} (+Tamra)T 3'-T \underline{X} (+4)aag-agg-cuu-gca-cag-ugc-a	
Tamra-nonsense-siRNA (ORN13+4/ ORN14+Tamra)	5'-uuc-ucc-gaa-cgu-guc-acg-u \underline{X} (+Tamra)T 3'-T \underline{X} (+4)aag-agg-cuu-gca-cag-ugc-a	

Beide siRNAs wurden lokal in den *Hippocampus* von Mäusen injiziert und nach 24 h Gehirnschnitte angefertigt. Die Verteilung beider siRNAs im Gehirn wurde dann konfokalmikroskopisch untersucht (*Leonhard Möckl, Prof. Bräuchle*).

Wie in Abbildung 7.6 erkennbar, bleibt die siRNA ohne Anandamid-Liganden an der Injektionsstelle lokalisiert. Es kommt zu keiner Verteilung dieser siRNA im *Hippocampus*. Im Gegensatz dazu scheint sich siRNA mit Anandamid Liganden in bestimmten Arealen des *Hippocampus* anzureichern (Abbildung 7.6A). Zusätzlich kann auch eine Aufnahme der siRNA in Zellen dieser Areale beobachtet werden (Abbildung 7.6B). Insbesondere wurde eine Aufnahme in so genannte *Mossy-Zellen* beobachtet. Diese Zellen befinden sich im *Gyrus Dentatus* und gehören zu den empfindlichsten Neuronen im *Hippocampus*, wobei ihre Funktion nach wie vor als umstritten gilt.^[201] Bekannt ist jedoch, dass *Mossy-Zellen* ein hohes Expressions-Level des Cannabinoid-Rezeptors 1 besitzen.^[202] Zusammenfassend scheint Anandamid sowohl einen Transport in der extrazellulären Matrix als auch einen Transport in die Zellen zu bewirken. Diese Experimente müssen nun auf Reproduzierbarkeit untersucht werden.

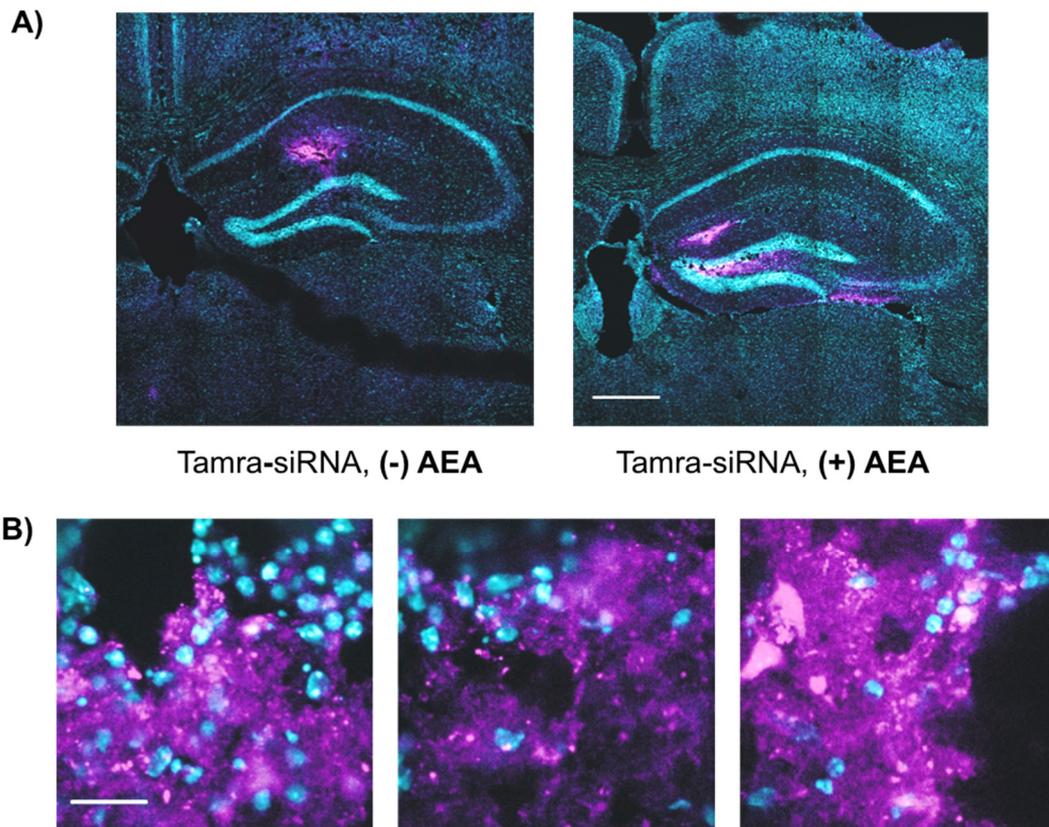


Abbildung 7.6 Kofokal mikroskopische Untersuchung von Mäuse-Gehirnschnitten. Dabei wurde Tamra-siRNA ohne (-) sowie mit (+) Anandamid (AEA) lokal in den *Hippocampus* von Mäusen injiziert (A). Der Anandamid-Ligand bewirkt sowohl eine extrazelluläre Verteilung der siRNA im *Hippocampus* (A) als auch eine Aufnahme in die Gehirnzellen (B). Dafür könnten Cannabinoid-Rezeptoren verantwortlich sein. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte dabei durch DAPI (blau). Tamra-nonsense-siRNA ist violett dargestellt. Die Aufnahme der Bilder wurde von *Leonhard Möckl* (*Prof. Bräuchle*) durchgeführt.

Zusätzlich könnte durch den Einsatz von Cannabinoid-Rezeptor *Knockout*-Mäusen die Rolle dieses Rezeptors bei der Verteilung und Aufnahme der Anandamid-siRNA klar herausgestellt werden.

8 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Anandamid modifizierte siRNAs eine effiziente Regulation von Tollwut-Proteinen *in vitro* ermöglichen. In Kooperation mit der Gruppe von Prof. Schwemmler (Universitäts-Klinikum, Freiburg) sollen diese Experimente im nächsten Schritt *in vivo* also mit Tollwut infizierten Mäusen wiederholt werden. Dazu wurde bereits eine umfassende Bibliothek mit unterschiedlichen Anandamid siRNAs synthetisiert und an den Kooperationspartner verschickt. Die Ergebnisse der *in vivo* Experimente stehen jedoch noch aus. Die siRNAs werden in diesen Experimenten direkt in Tollwut infizierte Mäuse-Hirne injiziert. Anschließend wird der Verlauf der Infektion im Vergleich zu nicht siRNA behandelten Mäusen untersucht. Diese Versuche könnten eine neuartige Behandlungsmöglichkeit der bisher tödlich verlaufenden Virus-Erkrankung demonstrieren.

Um den Transport von siRNA im Gehirn genauer zu untersuchen, wurde eine weitere Kooperation mit Dr. Kirmeier (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) begonnen. Entsprechende Experimente wurden bisher nur einmal durchgeführt und müssen reproduziert werden. Zusätzlich könnten die Experimente mit Cannabinoid-Rezeptor *knockout* Mäusen durchgeführt werden. Dadurch könnte die Rolle des Rezeptors zum Transport der siRNA klar herausgestellt werden. Zusätzlich sollte auch im Rahmen dieser Kooperation Glucose modifizierte siRNA ohne Anandamid hinsichtlich der Verteilung im Gehirn untersucht werden. Da das Gehirn einen sehr hohen Glucose-Bedarf besitzt, ist eine Verteilung und Aufnahme im Gehirn sehr wahrscheinlich. Diese Glucose-siRNA könnte gegebenenfalls auch zur Behandlung Tollwut infizierter Mäuse eingesetzt werden.

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass Glucose einen effizienten Transport von siRNA in eukaryotische Zellen ermöglicht. Dieses System könnte nun auch auf einen ganzen eukaryotischen Organismus übertragen werden. Insbesondere Pflanzen sind dabei ein äußerst attraktiver Kandidat, da diese relativ einfach ohne zusätzliche Genehmigungen gehandhabt werden können. Im ersten Schritt sollte dabei untersucht werden, ob Glucose auch in Pflanzen einen Transport von siRNA, für die spezifische Regulation von Genen bewirken kann. Dadurch könnte die Grundlage beispielsweise für neuartige Herbizide gelegt werden.

9 Experimenteller Teil

9.1 Materialien und Methoden

Lösungsmittel und Chemikalien: In dieser Arbeit wurden trockene Lösungsmittel der Firma *Fluka* mit einem Wassergehalt < 50 ppm verwendet. Lösungsmittel technischer Qualität von *Arcos*, *Aldrich*, *Fluka* oder *Merck* wurden vor Gebrauch durch Destillation *in vacuo* gereinigt. Dazu wurden Rotationsverdampfer (*Laborota 400* von *Heidolph* oder *Rotavapor RE-111* von *Büchi*) verwendet. Chemikalien wurden von *Acros*, *Aldrich*, *Fluka* oder *Merk* in den kommerziell beziehbaren Qualitäten *puriss.*, *p.a.* oder *purum* bezogen. **Oligonukleotide** wurden von den Firmen *Biomers* und *Metabion* bezogen. Lösungsmittel wurden *in vacuo* an einem Rotationsverdampfer der Firma *Heidolph* im Membranpumpenvakuum (*Vario PC2001*, *Vacuubrand*) eingeeengt. Wässrige Proben niedermolekularer Verbindungen wurden in Stickstoff eingefroren und lyophilisiert (*Christ ALPHA 2-4*).

Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden Aluminium Fertigplatten mit Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* verwendet. Die Substanzen wurden unter UV-Licht (254 bzw. 366 nm), durch Anfärben mit Ninhydrin- (1.5 g Ninhydrin in 100 mL *n*-Butanol und 1 mL Eisessig) oder „Yellow-Spray“-Tauchreagenz (120 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ in 800 mL 10 % H_2SO_4) mit anschließender Wärmebehandlung qualitativ nachgewiesen. Moleküle mit Azidfunktionalität konnten durch Eintauchen in eine Triphenylphosphinlösung (2.5 g Triphenylphosphin in 100 mL DCM) und anschließender Behandlung mit Ninhydrinlösung sichtbar gemacht werden.

Säulenchromatographie: Für die Auftrennung von Reaktionsgemischen wurde die *Flash*-Methode mit Stickstoff-Überdruck benutzt. Hierbei diente Kieselgel 60 (Korngröße 0.063-0.200 mm) der Firma *Merck* als stationäre Phase. Die Angabe der eingesetzten Lösungsmittelverhältnisse erfolgte in Volumenprozent.

¹H- und ¹³C-Kernresonanzspektroskopie (NMR): ¹H-200 MHz-Kernresonanzspektren wurden bei Raumtemperatur auf einem *Varian Mercury 200VX* Gerät, Kernresonanzspektren höherer Messfrequenzen wurden von der Kernresonanzabteilung des Departments Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität an *Varian 300*, *Inova 400*, *Varian 600* aufgenommen. Die chemische Verschiebung ist in ppm (*parts per million*) relativ zu

Tetramethylsilan angegeben, wobei das Lösungsmittelsignal als interner Standard verwendet wurde. Die Signalmultiplizitäten werden als *s* (Singulett), *d* (Duplett), *t* (Triplett), *q* (Quartett), *sept.* (Septett) und *m* (Multipllett) sowie gegebenenfalls deren Kombinationen gekennzeichnet. Breite Signale wurden mit *br.* bezeichnet. Die Signalzuordnung wurde unter Zuhilfenahme von COSY-, HMBC-, und HSQC-Spektren durchgeführt. Die Nomenklatur der hergestellten Verbindungen erfolgte nach dem Programm *ChemBioDraw Ultra*.

Massenspektrometrie (MS): Massenspektren wurden von der Massenspektrometrie-Abteilung des Departments Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München an einem *Thermo Finnigan LTQ FT* (Elektronensprayionisation, ESI) Gerät aufgenommen. MALDI-Massenspektrometrie zur Massen-Bestimmung der Oligonukleotide wurde auf einem *Autoflex II* Massenspektrometer der Firma *Bruker* durchgeführt. Die Angabe der Messwerte erfolgt ebenfalls in *m/z*. Zur Messung von Oligonukleotiden wurde eine HPA-Matrix verwendet (Matrix-Zusammensetzung: 900 μL einer gesättigten HPA-Lösung und 100 μL einer Diammoniumhydrogencitrat-Lösung (100 g/L) in MeCN/H₂O 1:1). Zur Entsalzung der HPLC-gereinigten Oligonukleotide für MALDI-Massenspektrometrie wurden Membranfilter der Firma *Millipore* (0.025 μm Porengröße) eingesetzt.

Infrarotspektroskopie (IR): IR-Spektren wurden an einem *Spectrum BX FT-IR* System von *Perkin Elmer* mit einem *DuraSamplIR II* Messkopf von *Smiths* ohne weitere Präparation der Proben aufgenommen. Die *Wellenzahlen* wurden in cm^{-1} angegeben. Die Intensität der Signale wurden in vs (sehr stark), s (stark), m (medium), w (schwach), vw (sehr schwach) unterteilt.

Schmelztemperaturen der neu hergestellten Substanzen wurden auf einer *Büchi B-540*-Schmelzpunkt-Apparatur gemessen.

Oligonukleotidsynthesen wurde auf einem *Äkta Oligopilot* der Firma *Amersham Biosciences* durchgeführt. DNA-Phosphoramidite, der Aktivator ETT und das CPG-Trägermaterial für die DNA-Synthese wurden von der Firmen *Glen Research* und *Link Technologies* bezogen. Der *Aktivator 42* wurde von *Sigma Aldrich* gekauft. Für die Synthese von RNA-Oligonukleotiden wurden TC- bzw. TBDMS-RNA-Phosphoramidite der Firma *Link Technologies* verwendet. Die TC-Amidite wurden in Toluol der Firma *Fluka* (Wassergehalt \leq

10 ppm) gelöst, während für die übrigen Phosphoramidite und Aktivatoren Acetonitril mit einem Wassergehalt von < 10 ppm verwendet wurde.

HPL-Chromatographie wurde, soweit nicht anders vermerkt, nach dem *reverse-phase* Prinzip auf Anlagen von *Waters* (analytisch: *Alliance 2695* mit *Photo Diode Array Detector 2996*; präparativ *1525* mit *2487 dual wavelength* UV-Detektor) durchgeführt. Für analytische Trennungen wurden CC-Nucleosil 100-3 C18 oder CC-Nucleodur 100-3 C18-Säulen der Firma *Macherey & Nagel* verwendet. Präparative Trennungen wurden mit VP250-10 Nucleosil 100-7 C18 oder VP 250-10 Nucleodur 100-5 C18-Säulen der Firma *Macherey & Nagel* durchgeführt. Es wurden Gradientenmethoden mit Puffer A: 0.1 M Triethyl-ammoniumacetat in H₂O und B: 0.1 M Triethylammoniumacetat in 20 % Wasser und 80 % Acetonitril verwendet.

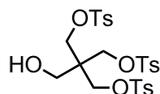
Oligonukleotid-Konzentrationen wurden an einem *ND-1000* Spektrophotometer der Firma *NanoDrop Technologies* gemessen. Extinktionskoeffizienten von DNA-Oligonukleotiden bei 260 nm wurden aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nucleoside (dA 15.2 mM⁻¹cm⁻¹, dC 7.1 mM⁻¹cm⁻¹, dG 12.0 mM⁻¹cm⁻¹, dT 8.4 mM⁻¹cm⁻¹) berechnet. Die Konzentration von RNA-Oligonukleotiden wurde anhand folgender Korrelation bestimmt: ssRNA: 1.0 OD(260 nm) = 40 ng/μL. Wässrige Lösungen von Oligonukleotiden wurden an einer *Savant Speedvac + SC 110A* oder *SPD 111V* eingengt. Sollte das Lösungsmittel vollständig entfernt werden, wurde ein *Christ-Alpha 2-4* Lyophilisator verwendet.

UV-VIS-Spektroskopie: Schmelzpunkte von Oligonukleotiden wurden auf einem *JASCO-V-650* Spektralphotometer mit Temperaturregler aufgenommen. Dabei wurden Küvetten der Firma *Helma* mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlengang verwendet.

9.2 Synthesevorschriften

2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin-Phosphoramidit **6** wurde nach einer Vorschrift entwickelt von *Julian Willibald* synthetisiert.^[149] Das Glukoseazid **42** wurde von *Felix Gnerlich* zur Verfügung gestellt. Das Pentaerythritoltri- **40** bzw. Tetraalkin **25** wurde nach *Zhu et al.* synthetisiert.^[156] Die Synthese des Cyclodextrinmonoazids **38** erfolgte nach *Defaye et al.*^[169] Die Synthese des Folsäuremonoazids **5** ist in der Masterarbeit des Autors beschrieben.^[60]

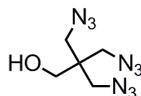
2-(Hydroxymethyl)-2-((tosyloxy)methyl)propanyl-1,3-bis(4'-methylbenzolsulfonat) (**17**)



Zu einer Lösung von Pentaerythritol (10.0 g, 73.5 mmol) in trockenem Pyridin (60 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre bei 0 °C eine Lösung von Tosylchlorid (42.0 g, 220 mmol, 3 Äq.) in trockenem Pyridin (80 mL) über einen Zeitraum von 1 h zugetropft. Die Reaktion wurde anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nach 15 h wurde erneut Tosylchlorid (7.00 g, 36.7 mmol, 0.5 Äq.) in trockenem Pyridin (15 mL) zugetropft und für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde *in vacuo* eingeeengt und mit DCM (20 mL) versetzt. Die organische Phase wurde mit Wasser und zweimal mit HCl (2 M) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ und Reinigung mittels Säulenchromatographie (Silica, *i*-Hex/EtOAc, 5:1 → 1:1) wurde **17** als farblos kristalliner Feststoff (21.4 g, 35.7 mmol, 48 %) erhalten.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ = 7.70-7.68 (*m*, 6H, CH_{arom.}), 7.35-7.33 (*m*, 6H, CH_{arom.}), 3.90 (*s*, 6H, 3×CH₂), 3.50 (*s*, 2H, CH₂), 2.45 (*s*, 9H, 3×CH₃) ppm. **¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ = 145.6 (3×C_{arom.}), 132.0 (3×C_{arom.}), 130.3 (6×CH_{arom.}), 128.1 (6×CH_{arom.}), 66.8 (3×CH₂), 59.6 (CH₂), 44.9 (C_{quart.}), 21.9 (3×CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₂₆H₃₀O₁₀NaS₃⁺ [M+Na]⁺, ber.: 621.0893, gef.: 621.0891. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3407 (br, w), 2962 (vw), 1708 (m), 1359 (s), 1172 (vs), 969 (s). **Schmelzintervall:** 102-105 °C.

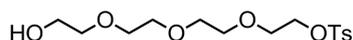
3-Azido-2,2-bis(azidomethyl)propan-1-ol (18)



Pentaerythritoltritosylat **17** (21.36 g, 35.7 mmol) wurde in DMF (60 mL) vorgelegt und mit Natriumazid (13.93 g, 214 mmol, 6 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf 110 °C erhitzt und für 12 h gerührt. Der Ansatz wurde *in vacuo* eingeeengt und in H₂O (50 mL) aufgenommen. Nach Extraktion der wässrigen Phase mit EtOAc (4×40 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung (50 mL) gewaschen. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ und entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Triazid (**18**) als gelbliches Öl erhalten (7.31 g, 34.6 mmol, 97 %).

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ = 3.55 (s, 2H, CH₂), 3.38 (s, 6H, 3×CH₂) ppm. **¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃):** δ = 62.5 (CH₂), 51.8 (3×CH₂), 44.8 (C_{quart.}) ppm. **HR-MS (ESI):** C₅H₉O₁N₉Cl⁺ [M+Cl]⁺, ber.: 246.0624, gef.: 246.0628. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3391 (br, w), 2935 (w), 2084 (vs), 1448 (m), 1284 (br, m), 1043 (m).

14-Hydroxy-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl-4'-methylbenzolsulfonat (47)

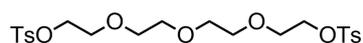


Tetraethylenglykol (35.87 g, 185 mmol) wurde in trockenem THF (110 mL) gelöst und mit Triethylamin (151 g, 1.49 mol, 8 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und in einem Zeitraum von 20 min Tosylchlorid (35.20 g, 185 mmol, 1 Äq.) zugegeben. Nach 48 h rühren bei Raumtemperatur, wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in Salzsäure (2 M, 200 mL) aufgenommen und mit DCM (4×200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Laufmittelgradienten *i*-Hex/EtOAc (Silica, 1:1 → 1:10 → 0:1) bis EtOAc:MeOH (100:1) aufgereinigt. **47** (25.4 g, 72.9 mmol, 39 %) wurde als farbloses Öl erhalten. Tetraethylenglykolditosylat (20.5 g, 40.8 mmol, 22 %) konnte dabei als Nebenprodukt isoliert werden.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.82-7.76 (m, 2H, CH_{arom.}), 7.37-7.30 (m, 2H, CH_{arom.}), 4.20-4.12 (m, 2H, CH₂), 3.73-3.52 (m, 14H, 7×CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.38-2.31 (s, 1H, OH) ppm.

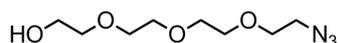
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 144.9$ ($C_{\text{arom.}}$), 133.2 ($C_{\text{arom.}}$), 130.0 ($2\times\text{CH}_{\text{arom.}}$), 128.1 ($2\times\text{CH}_{\text{arom.}}$), 72.6 (CH_2), 70.9 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 69.4 (CH_2), 68.9 (CH_2), 61.9 (CH_2), 21.8 (CH_3) ppm. **HR-MS (ESI):** $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{NaS}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 371.1135, gef.: 371.1134. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 3430 (br, w), 2870 (w), 1350 (m), 1172 (vs), 1095 (s), 916 (vs).

Isoliertes Nebenprodukt: **3,6,9-Trioxaundecyl-1,11-bis(4'-methylbenzolsulfonat)**



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.81$ - 7.76 (*m*, 4H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.36 - 7.30 (*m*, 4H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.18 - 4.12 (*m*, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3.70 - 3.64 (*m*, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3.60 - 3.50 (*m*, 8H, $4\times\text{CH}_2$), 2.44 (*s*, 6H, $2\times\text{CH}_3$) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):** $\delta = 144.9$ ($2\times C_{\text{quart.}}$), 133.2 ($2\times C_{\text{quart.}}$), 130.0 ($4\times\text{CH}_{\text{arom.}}$), 128.1 ($4\times\text{CH}_{\text{arom.}}$), 70.9 ($2\times\text{CH}_2$), 70.7 ($2\times\text{CH}_2$), 69.4 ($2\times\text{CH}_2$), 68.8 ($2\times\text{CH}_2$), 21.8 ($2\times\text{CH}_3$) ppm. **HR-MS (ESI):** $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_9\text{NaS}_2^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 525.1223, gef.: 525.1223. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 2870 (w), 1350 (s), 1169 (vs), 1095 (s), 913 (vs), 772 (s).

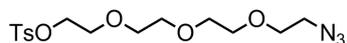
11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (21)



47 (21.9 g, 63.0 mmol) wurde in trockenem DMF (180 mL) vorgelegt. Nach der Zugabe von Natriumazid (20.5 g, 315 mmol, 5 Äq.) wurde die Reaktionsmischung 8 h bei 70 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und anschließend H_2O (120 mL) zugegeben. Es wurde mit DCM (4×120 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung (120 mL) gewaschen. Nach erneuter Extraktion der wässrigen Phase mit DCM (2×120 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Man erhielt **21** (13.8 g, 63.0 mmol, 100 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (599 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.73$ - 3.69 (*m*, 2H, CH_2), 3.68 - 3.63 (*m*, 10H, $5\times\text{CH}_2$), 3.62 - 3.58 (*m*, 2H, CH_2), 3.37 (*t*, $^3J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2), 2.29 (*s*, 1H, OH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3):** $\delta = 72.6$ (CH_2), 70.9 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.2 (CH_2), 61.9 (CH_2), 50.8 (CH_2) ppm. **HR-MS (ESI):** $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_3\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 242.1111, gef.: 242.1111. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 3431 (br, w), 2868 (w), 2097 (s), 1284 (m), 1095 (vs), 1066 (vs), 935 (m).

11-Azido-3,6,9-trioxaundecanyl-(4'-methylbenzolsulfonat) (**22**)



Methode 1:

Tetraethylenglykolmonoazid **21** (13.8 g, 63.0 mmol) wurde in trockenem DCM (120 mL) vorgelegt. Nach der Zugabe von Triethylamin (19.1 g, 189 mmol, 3 Äq.) wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Tosylchlorid (36.0 g, 189 mmol, 3 Äq) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Salzsäure (2 M, 100 mL) aufgenommen. Es wurde mit DCM (4 × 120 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen anschließend über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt konnte säulenchromatographisch mit einem kontinuierlichen Laufmittelgradienten von *i*-Hex/EtOAc (Silica, 1:4 → 100 % Ethylacetat) aufgereinigt werden. Man erhielt **22** (20.1 g, 54.0 mmol, 86 %) als farbloses Öl.

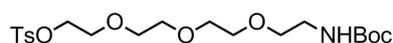
Methode 2:

Tetraethylenglykolditosylat (16.6 g, 33.0 mmol) wurde in trockenem DMF (60 mL) vorgelegt und mit Natriumazid (2.15 g, 33.1 mmol, 1.0 Äq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 70 °C gerührt und anschließend das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in H₂O (100 mL) aufgenommen. Es wurde mit DCM (4 × 100 mL) extrahiert und die organischen Phasen erneut mit H₂O (100 mL) gewaschen. Nach Extraktion der wässrigen Phase mit DCM (2 × 100 mL) wurden die organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde erneut mit DCM (2 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt konnte säulenchromatographisch mit einem kontinuierlichen Laufmittelgradienten von *i*-Hex/EtOAc (Silica, 4:1 → 1:1) aufgereinigt werden. Man erhielt **22** (4.60 g, 12.3 mmol, 37 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.80 (*dd*, ³*J* = 8.5 Hz, 1.9 Hz, 2H, CH_{arom.}), 7.36-7.32 (*m*, 2H, CH_{arom.}), 4.18-4.13 (*m*, 2H, CH₂), 3.71-3.62 (*m*, 8H, 4×CH₂), 3.62-3.35 (*m*, 6H, 3×CH₂), 2.45 (*s*, 3H, CH₃) ppm. **¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 144.9 (C_{quart.}), 133.2 (C_{quart.}), 130.0 (CH_{arom.}), 128.1 (CH_{arom.}), 70.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.2 (CH₂), 69.4 (CH₂), 68.8

(CH₂), 50.8 (CH₂), 21.8 (CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₁₅H₂₃O₆N₃NaS⁺ [M+Na]⁺, ber.: 396.1200, gef.: 396.1199. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 2867 (w), 2097 (m), 1352 (m), 1172 (vs), 1095 (s), 917 (s).

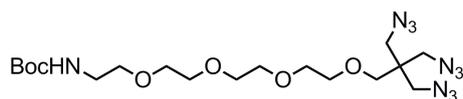
2-(2-(2-(2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-(4'-methylbenzol-sulfonat) (19)



Zu einer Lösung des Monoazids (**22**) (4.55 g, 12.2 mmol) in trockenem Methanol (10 mL) wurde 10 % Pd/C (0.90 g, 20 mol%) gegeben und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von Boc₂O (7.19 g, 32.9 mmol, 2.7 Äq.) wurde die Reaktion unter Wasserstoff-Atmosphäre bei Atmosphärendruck gerührt. Der Katalysator wurde mittels Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Säulenchromatographie (Silica, *i*-Hex/EtOAc, 2:1 → 1:1), wobei das Boc-geschützte Amin **19** als gelbliches Öl erhalten (3.49 g, 7.79 mmol, 63 %) wurde.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ = 7.78 (*d*, ³*J* = 8.3 Hz, 2H, CH_{arom.}), 7.32 (*d*, ³*J* = 8.0 Hz, 2H, CH_{arom.}), 4.99 (*s*, 1H, NH), 4.17-4.11 (*m*, 2H, CH₂), 3.71-3.65 (*m*, 2H, CH₂), 3.61-3.54 (*m*, 8H, 4×CH₂), 3.50 (*t*, ³*J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂), 3.27 (*m*, 2H, CH₂), 2.42 (*s*, 3H, CH₃), 1.41 (*s*, 9H, 3×CH₃) ppm. **¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃):** δ = 156.1 (C=O), 145.0 (C_{arom.}), 133.2 (C_{arom.}), 130.0 (CH_{arom.}), 128.1 (CH_{arom.}), 70.9 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.4 (CH₂), 70.4 (CH₂), 69.4 (CH₂), 68.9 (CH₂), 53.6, 28.4 (3×CH₃), 21.8 (CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₂₀H₃₃NO₈NaS⁺ [M+Na]⁺, ber.: 470.1819, gef.: 470.1818. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3356 (br, w), 2975 (w), 2872 (w), 1709 (s), 1513 (m), 1363 (s), 1248 (m), 1174 (vs), 1096 (vs), 918 (s). (vs), 1096 (vs), 918 (s).

***O*-*tert*-Butyl (18-azido-17,17-bis(azidomethyl)-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadecyl)carbammat (23)**

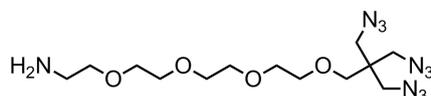


Das Triazid **18** (160 mg, 0.760 mmol) wurde in trockenem DMF (1.5 mL) vorgelegt und unter Stickstoff NaH (60 %, 60 mg, 1.5 mmol, 2 Äq.) sowie 15-Krone-5 (1.60 mg, 7.26 µmol, 1 mol%) zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von **19** (600 mg, 1.34 mmol, 1.8 Äq.) in trockenem DMF (2 mL) zugesetzt. Die Reaktion wurde

4 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine intensive Orangefärbung auftrat. Nach vorsichtiger Zugabe von MeOH (5 mL) wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O (5 mL) aufgenommen und die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 4 mL) sowie mit je DCM (2x4 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Silica, *i*-Hex/EtOAc, 4:1 → 2:1). Es wurden 171 mg (0.350 mmol, 46 %) des Produkts **23** als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ = 5.01 (*s*, 1H, NH), 3.64-3.58 (*m*, 14H, 7×CH₂), 3.52 (*t*, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂), 3.32 (*s*, 6H, 3×CH₂), 3.32 (*s*, 2H, CH₂), 1.44 (*s*, 9H, 3×CH₃) ppm. **¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃):** δ = 156.2 (C=O), 79.4, 71.0 (CH₂), 70.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.5 (CH₂), 70.5 (CH₂), 69.8 (CH₂), 51.8 (3×CH₂), 45.0 (C_{quart.}), 40.7, 28.7 (3×CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₁₈H₃₄N₁₀O₆Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 509.2556, gef.: 509.2550. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3357 (*br, w*), 2870 (*m*), 2099 (*vs*), 1707 (*m*), 1507 (*m*), 1451 (*m*), 1366 (*m*), 1269 (*s*), 1249 (*s*), 1103 (*br, vs*), 909 (*m*).

15-Azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-1-amin (**24**)

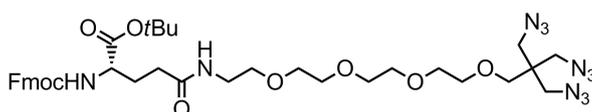


23 (40 mg, 82 μmol) wurde in CHCl₃ (2 mL) gelöst und mit TFA (1.0 mL, 13 mmol, 160 Äq.) versetzt. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel sowie TFA *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in CHCl₃ aufgenommen und mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gefolgt von einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, so dass nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* **24** (30 mg, 77 μmol, 94 %) als farbloses Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ = 3.66-3.57 (*m*, 12H, CH₂-Tetraethylenglycol), 3.51 (*t*, ³*J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂-Tetraethylenglycol), 3.33-3.31 (*m*, 8H, 4×CH₂-Pentaerythritol), 2.87 (*t*, ³*J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂-Tetraethylenglycol), 2.08 (*s*, 2H, NH₂) ppm. **¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃):** δ = 73.2 (CH₂), 71.1 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.5 (CH₂), 70.5 (CH₂), 69.8 (CH₂-Pentaerythritol), 51.8 (3×CH₂-Pentaerythritol), 45.0 (C_{quart.}), 41.9 (CH₂-Tetraethylen-

glykol) ppm. **HR-MS (ESI):** C₁₈H₃₄N₁₀NaO₆⁺ [M+Na]⁺, ber.: 387.2211, gef.: 387.2207. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 2913 (s), 2094 (m), 1352 (m), 1079 (s), 1032 (s).

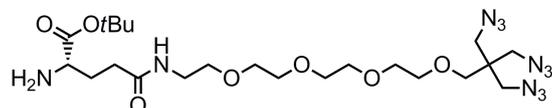
(S)-tert-Butyl-20-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-1-azido-2,2-bis(azidomethyl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azahenicosan-21-olat (48)



Zu einer Lösung von Fmoc-Glu-O^tBu (250 mg, 588 μmol) in trockenem DMF (10 mL) wurde TBTU (239 mg, 744 μmol, 1.3 Äq.) und DIPEA (100 mg, 773 μmol, 1.3 Äq.) zugeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit einer Lösung von **24** (250 mg, 647 μmol, 1.1 Äq.) in DMF (4.6 mL) versetzt und über Nacht auf 50 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica, DCM/MeOH, 150:1 → 100:1 → 80:1) gereinigt und **48** (431 mg, 543 μmol, 92 %) als gelbliches, hoch viskoses Öl erhalten.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ = 7.75 (*d*, ³*J* = 7.6 Hz, 2H, CH_{arom.}), 7.59 (*t*, ³*J* = 6.9 Hz, 2H, CH_{arom.}), 7.41-7.35 (*m*, 2H, CH_{arom.}), 7.32-7.27 (*m*, 2H, CH_{arom.}), 6.35 (*s*, 1H, NH), 5.63 (*s*, 1H, NH), 4.42-4.33 (*m*, 2H, Fluorenyl-CH₂), 4.23-4.18 (*m*, 2H, Fluorenyl-CH, α-CH), 3.64-3.39 (*m*, 16H, Ethylenglykol CH₂), 3.30 (*s*, 6H, Pentaerythritol, 3×CH₂), 3.29 (*s*, 2H, Pentaerythritol, CH₂), 2.29-2.21 (*m*, 2H, γ-CH₂), 2.22-2.15 (*m*, 1H, β-CHH), 1.98-1.90 (*m*, 1H, β-CHH), 1.45 (*s*, 9H, 3×CH₃) ppm. **¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃):** δ = 172.4 (C=O), 171.3 (C=O), 156.5 (C=O), 144.2 (2×C_{arom.}), 141.5 (C_{arom.}), 141.5 (C_{arom.}), 127.9 (2×CH_{arom.}), 127.3 (2×CH_{arom.}), 125.4 (2×CH_{arom.}), 120.2 (2×CH_{arom.}), 82.7 (*tert.*Bu-C_{quart.}), 71.0 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.5 (CH₂), 69.9 (CH₂-Pentaerythritol), 69.8 (CH₂), 67.2 (Fluorenyl-CH₂), 54.3 (α-CH), 51.7 (3×CH₂-Pentaerythritol), 47.4 (Fluorenyl-CH), 44.9 (C_{quart.}), 39.6 (CH₂), 32.6 (γ-CH₂), 29.0 (β-CH₂), 28.2 (3×CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₃₇H₅₁N₁₁NaO₉⁺ [M+Na]⁺, ber.: 816.3763, gef.: 816.3761. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3342 (w), 2918 (w), 2100 (m), 1711 (w), 1075 (s), 669 (w).

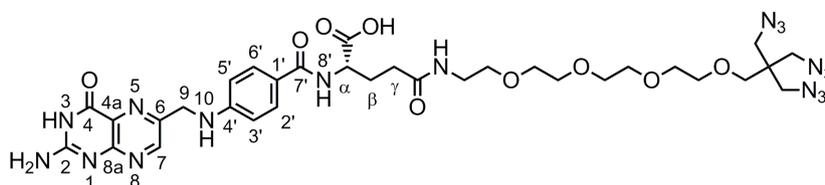
(S)-tert-Butyl-20-amino-1-azido-2,2-bis(azidomethyl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azahenicosan-21-olat (45)



Verbindung **48** (63 mg, 79 μmol) wurde in trockenem DCM (1.0 mL) gelöst und mit frisch destilliertem DBU (238 μL , 1.59 mmol, 20 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 30 °C gerührt. Nach Einengen des Lösungsmittels *in vacuo* bei Raumtemperatur und Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH 100:1) wurde der triazidmodifizierte Glutaminbaustein **45** (37 mg, 65 μmol , 82 %) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (599 MHz, CDCl_3): δ = 6.59-6.51 (*m*, 1H, NH), 3.66-3.58 (*m*, 12H, Ethylenglykol 6 $\times\text{CH}_2$), 3.57-3.53 (*m*, 2H, Ethylenglykol CH_2), 3.51-3.36 (*m*, 3H, Ethylenglykol CH_2 , $\alpha\text{-CH}$), 3.35-3.32 (*m*, 8H, Pentaerythritol, 4 $\times\text{CH}_2$), 2.42-2.29 (*m*, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 2.16-2.06 (*m*, 1H, $\beta\text{-CHH}$), 1.82-1.74 (*m*, 1H, $\beta\text{-CHH}$), 1.45 (*s*, 9H, 3 $\times\text{CH}_3$) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3):** δ = 172.7 (C=O), 81.6 (*tert*.Bu- C_{quart}), 71.0 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.0 (CH_2), 69.8 ($\text{CH}_2\text{-Pentaerythritol}$), 54.5 ($\alpha\text{-CH}$), 51.8 (3 $\times\text{CH}_2\text{-Pentaerythritol}$), 44.9 (C_{quart}), 39.4 (CH_2), 33.1 ($\gamma\text{-CH}_2$), 30.2 ($\beta\text{-CH}_2$), 28.2 (3 $\times\text{CH}_3$) ppm. **HR-MS (ESI):** $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_{11}\text{O}_7^+$ [M+H] $^+$, ber.: 572.3263, gef.: 572.3256. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 2870 (w), 2097 (s), 1726 (m), 1289 (m), 1101 (m), 847 (m).

N-(15-Azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan)folensäureamid (3)



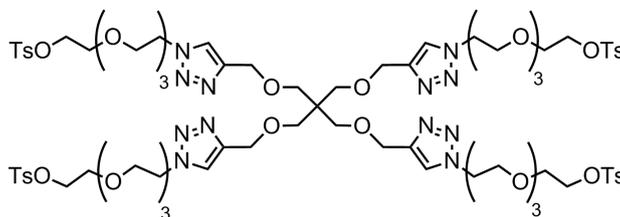
Zu einer Suspension von Pteroinsäure (30 mg, 96 μmol) in einem 1:1 Gemisch von trockenem DMF/DMSO (3.0 mL) wurde TBTU (35 mg, 0.11 mmol, 1.2 Äq.) und DIPEA (25 μL , 0.14 mmol, 1.5 Äq.) zugeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit einer Lösung von Verbindung **45** (63 mg, 0.11 mmol, 1.2 Äq.) in DMF

(0.59 mL) versetzt und 24 h bei 50 °C gerührt. Das Rohprodukt wurde mit Diethylether (45 mL) gefällt, das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und mit Diethylether (30 mL) gewaschen. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatografie (Silica, DCM/MeOH + 1 %NEt₃, 20:1 → 10:1) wurde Verbindung **46** als dunkelgelber Feststoff (20 mg, 23 μmol, 24 %) erhalten. Dieser war ausreichend rein für weitere Umsetzungen.

Verbindung **46** (15 mg, 17 μmol) wurde in einer Emulsion von CHCl₃ (480 μL) und TFA (132 μL, 1.71 mMol, 100 Äq.) gelöst und 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde mit Diethylether (10 mL) gefällt, das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und der Rückstand mit Diethylether (2×10 mL) gewaschen. Nach Trocknung am Hochvakuum wurde das Folsäuretriazid **3** als gelbes Pulver (quantitativ) erhalten.

¹H-NMR (599 MHz, DMSO): δ = 8.65 (*s*, 1H, C7-*H*), 8.18 (*d*, ³*J* = 7.5 Hz, 1H, N8'-*H*), 7.88 (*t*, ³*J* = 7.5 Hz, 1H, N(Ethylenglykol)-*H*), 7.65 (*d*, ³*J* = 8.8 Hz, 2H, C6'-*H*, C2'-*H*), 7.08-6.81 (Sbr., 1H, N10-*H*), 6.64 (*d*, ³*J* = 8.8 Hz, 2H, C5'-*H*, C3'-*H*), 4.49 (*s*, 2H, C9-*H*₂), 4.30-4.24 (*m*, 1H, Cα-*H*), 3.55-3.45 (*m*, 12H, CH₂), 3.40-3.32 (*m*, 8H, 1×CH₂, 3×CH₂-Pentaerythritol), 3.29 (*s*, 2H, CH₂-Pentaerythritol), 3.20-3.15 (*m*, 2H, CH₂) 2.23-2.14 (*s*, 2H, Cγ-*H*₂), 2.07-1.99 (*m*, 1H, Cβ-*HH*), 1.94-1.86 (*m*, 1H, Cβ-*HH*) ppm. **¹³C-NMR (101 MHz, DMSO):** δ = 173.8 (COOH), 171.7 (CONH), 166.3 (C7'=O), 160.8 (C_{arom.}), 155.5 (C_{arom.}), 153.6 (C_{arom.}), 150.7 (C4'_{arom.}), 148.8 (C_{arom.}), 148.5 (C7-*H*) 129.0 (C6'-*H*_{arom.}, C2'-*H*_{arom.}), 128.0 (C_{arom.}), 121.3 (C1'_{arom.}), 111.1 (C5'-*H*_{arom.}, C3'-*H*_{arom.}), 70.4 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 69.5 (CH₂-Pentaerythritol), 69.1 (CH₂), 64.9 (CH₂), 52.2 (C_α), 51.5 (3×CH₂-Pentaerythritol), 45.9 (C-9), 44.3 (C_{quart.}-Pentaerythritol), 38.5 (CH₂), 31.9 (C_γ), 26.5 (C_β) ppm. **HR-MS (ESI):** C₃₂H₄₂N₁₇O₉⁻ [M-H]⁻, ber.: 808.3357, gef.: 808.3371. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3252 (w), 3098 (w), 2867 (w), 2098 (s), 1694 (m), 1604 (m), 1294 (m), 768 (w). **Schmelzintervall:** 232-234 °C.

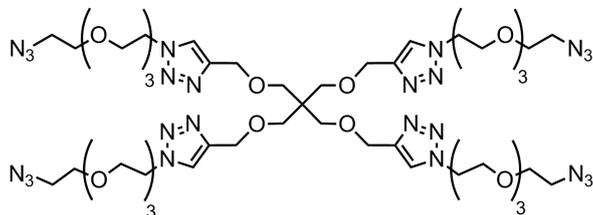
(((((((4,4'-(((2,2-bis(((1-(2-(2-(2-(2-(Tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)propan-1,3-diyl)bis(oxy))bis(methylen))bis(1*H*-1,2,3-triazol-4,1-diyl))bis(ethan-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethan-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethan-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethan-2,1-diyl)-bis(4''-methylbenzolsulfonat) (**26**)



25 (300 mg, 1.04 mmol) wurde in THF/H₂O (1:1, 8 mL) suspendiert. Anschließend wurde 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-tosylat **22** (2.00 g, 5.36 mmol, 5.2 Äq.) und CuSO₄ (51.0 mg, 327 µmol, 0.3 Äq.) zugegeben. Das Lösungsmittel wurde entgast und darauf folgend Natriumascorbat (112 mg, 660 µmol, 0.6 Äq.) zugefügt. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH, 100:1 → 10:1) aufgereinigt. Man erhielt **26** (1.27 g, 714 µmol, 69 %) als farblose, viskose Flüssigkeit.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.86 (*s*, 4H, 4×C=CH(Triazol)), 7.75 (*d*, ³*J* = 8.3 Hz, 8H, 8×CH_{arom.}), 7.33 (*d*, ³*J* = 7.9 Hz, 8H, 8×CH_{arom.}), 4.78-4.71 (*m*, 12H, 6×CH₂), 4.15-4.10 (*m*, 8H, 4×CH₂), 4.02-3.95 (*m*, 8H, 4×CH₂), 3.69-3.65 (*m*, 8H, 4×CH₂), 3.65-3.45 (*m*, 44H, 22×CH₂), 2.43 (*s*, 12H, 4×CH₃) ppm. **¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ = 145.2 (C_{arom.}), 133.0 (C_{arom.}), 130.2 (CH_{arom.}), 129.1, 128.2 (CH_{arom.}), 126.1, 77.2 (CH₂), 70.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.6 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.9 (CH₂), 68.7 (CH₂), 21.9 (4×CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₇₇H₁₁₄N₁₂O₂₈S₄²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 891.3369, gef.: 891.3368. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3137 (w), 2871 (w), 2245 (w), 1741 (w), 1597 (w), 1352 (m), 1175 (s), 1094 (s), 911 (s) 680 (m).

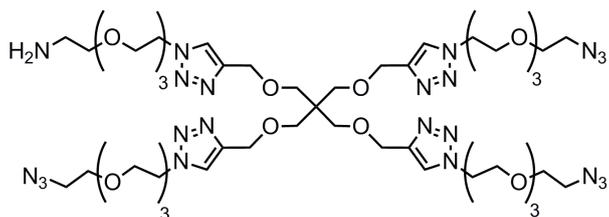
4,4'-(((2,2-bis(((1-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methoxy)methyl)propan-1,3-diyl)bis(oxy))bis(methylene))bis(1-(2-(2-(2-(2-azido-ethoxy)-ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol) (27)



26 (385 mg, 216 μmol) wurde in DMF (2 mL) vorgelegt. Es wurde Natriumazid (98 mg, 1.5 mmol, 7 Äq.) zugegeben und 20 h bei 105 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Produkt mittels Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH, 20:1 \rightarrow 5:1) gereinigt. Man erhielt **27** (174 mg, 138 μmol , 64 %) als braun viskose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (599 MHz, CDCl_3): δ = 7.90 (*s*, 4H, $4 \times \text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.60-4.54 (*m*, 16H, $4 \times \text{C}=\text{CCH}_2\text{O}$, $4 \times \text{CH}_2$), 3.90-3.87 (*m*, 8H, $4 \times \text{CH}_2$), 3.65-3.58 (*m*, 40H, $20 \times \text{CH}_2$), 3.45 (*s*, 8H, $4 \times \text{CH}_2$ (Pentaerythritol)), 3.37-3.34 (*m*, 8H, $4 \times \text{CH}_2$) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):** δ = 144.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 124.7 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 70.9 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.3 (CH_2), 69.4 (CH_2), 69.3 (CH_2), 64.5 ($4 \times \text{C}=\text{CCH}_2\text{O}$), 50.9 (CH_2), 50.8 (CH_2), 45.5 ($\text{C}_{\text{quart.}}$) ppm. **HR-MS (ESI):** $\text{C}_{49}\text{H}_{85}\text{N}_{24}\text{O}_{16}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1265.6570, gef.: 1265.6576. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 3138 (w), 2868 (w), 2099 (s), 1672 (w), 1086 (m), 826 (w).

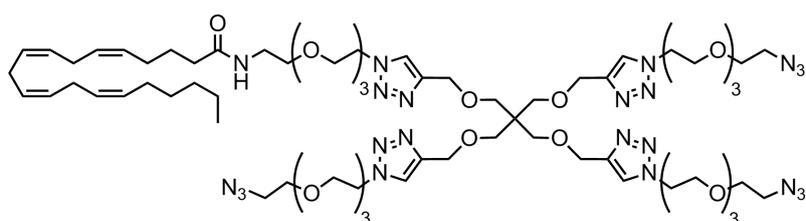
2-(2-(2-(2-(4-(((3-(((1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methoxy)-2,2-bis(((1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methoxy)methyl)propoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-amin (28)



27 (164 mg, 130 μmol) wurde in H_2O (1 mL) gelöst und Diethylether (1 mL) zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung von Triphenylphosphin (34 mg, 0.13 mmol, 1 Äq.) in Diethylether (0.5 mL) durch eine Spritzenpumpe über einen Zeitraum von 30 min hinzugefügt. Danach wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel schließlich *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Silica, DCM/MeOH, 100:1 \rightarrow 10:1). Man erhielt **28** (70 mg, 56 μmol , 40 %) als braunen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO): δ = 8.32 (*s*, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 8.00 (*s*, 3H, $3 \times \text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.50 (*t*, $^3J = 5.3$ Hz, 6H, $3 \times \text{NCH}_2\text{CH}_2$), 4.43 (*s*, 6H, $3 \times \text{C}=\text{CCH}_2\text{O}$), 3.80 (*t*, $^3J = 5.3$ Hz, 6H, $3 \times \text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.58-3.56 (*m*, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3.52-3.43 (*m*, 28H, $14 \times \text{CH}_2$), 3.39-3.30 (*m*, 28H, $14 \times \text{CH}_2$), 2.80 (*t*, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO):** δ = 143.9 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 143.9 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 124.0 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 124.0 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 79.2 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.7, 69.6, 69.6, 69.5, 69.2 (CH_2), 68.7 (NCH_2CH_2), 64.2 ($3 \times \text{C}=\text{CCH}_2\text{O}$), 50.0, 49.3 ($3 \times \text{NCH}_2\text{CH}_2$), 44.9 ($\text{C}_{\text{quart.}}$) ppm. **HR-MS (ESI):** $\text{C}_{49}\text{H}_{87}\text{N}_{22}\text{O}_{16}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1239.6665, gef.: 1239.6660. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 3358 (w), 2917 (vs), 2849 (s), 2102 (w), 1632 (w), 1556 (m), 1082 (m), 718 (m).

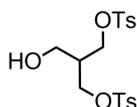
***N*-(2-(2-(2-(2-(4-(((1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-2,2-bis(((1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)propoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)-ethoxy)ethoxy)ethyl)-arachidonylamid (**15**)**



28 (60 mg, 48 μmol) wurde in DMF (0.5 mL) vorgelegt. Es wurde DIPEA (20.1 μL , 118 μmol , 2.5 Äq.) und PyBOP (26 mg, 51 μmol , 1 Äq.) und zuletzt Arachidonsäure (20 mg, 66 μmol , 1.4 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH, DCM \rightarrow 100:1 \rightarrow 5:1) aufgereinigt. Man erhielt **15** (60 mg, 39 μmol , 81 %) als bräunlichen Feststoff.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ = 8.02 (s, 1H, C=CH(Triazol)), 7.99 (s, 3H, C=CH(Triazol)), 5.43-5.30 (m, 8H, CH_{arach.}), 4.64-4.58 (m, 16H, 4×OCH₂C=C, 4×NCH₂CH₂), 4.00-3.87 (m, 8H, 4×NCH₂CH₂), 3.68-3.57 (m, 38H, CH₂), 3.54 (t, ³J = 5.3 Hz, 2H, CH₂), 3.47 (s, 8H, 4×CH₂ (Pentaerythritol)), 3.45-3.41 (m, 2H, NHCH₂), 3.38-3.37 (m, 6H, CH₂N₃), 2.87-2.76 (m, 6H, 3×=CCH_{2arach.}C=), 2.24-2.18 (m, 2H, COCH₂), 2.13-2.08 (m, 2H, =CHCH_{2arach.}), 2.08-2.02 (m, 2H, CH₂), 1.75-1.67 (m, 2H, CH_{2arach.}), 1.41-1.22 (m, 8H, CH₂), 0.93-0.85 (m, 3H, CH₃) ppm. **¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃):** δ = 173.3 (C=O), 144.2 (C_{arom.}), 144.1 (C_{arom.}), 130.7 (C_{arach.H}), 129.4 (C_{arach.H}), 128.8 (C_{arach.H}), 128.4 (C_{arach.H}), 128.0 (C_{arach.H}), 127.7 (C_{arach.H}), 124.9 (CH_{arom.}), 70.8 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.3 (CH₂), 70.2 (CH₂), 70.0 (CH₂), 69.3 (4×NCH₂CH₂), 64.3 (C=CCH₂O), 64.2 (3×C=CCH₂O), 53.6, 51.0 (1×NCH₂CH₂), 50.8 (3×NCH₂CH₂), 47.7 (3×CH₂N₃), 45.4 (C_{quart.}), 39.3 (NHCH₂), 36.1 (CO C_{arach.H}), 31.7 (C_{arach.H}), 29.9 (C_{arach.H}), 29.5 (C_{arach.H}), 27.4 (C_{arach.H}), 26.9 (C_{arach.H}), 25.8 (C_{arach.H}, 3×=CCH_{2arach.}C=), 22.7 (C_{arach.H}), 14.2 (C_{arach.H}) ppm. **HR-MS (ESI):** C₆₉H₁₁₈N₂₂O₁₇²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 1526.9034, gef.: 1526.9036. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3368 (br, w), 3140 (w), 2918 (m), 2869 (m), 2103 (m), 1735 (w), 1659 (w), 1094 (s).

2-(Hydroxymethyl)propanyl-1,3-bis(4'-methylbenzolsulfonat) (31)

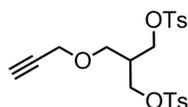


2-Hydroxy-1,3-propanediol (1.00 g, 9.43 mmol) wurde in Pyridin (94 mL) vorgelegt. Es wurde Tosylchlorid (3.50 g, 18.9 mmol, 2 Äq.) zugegeben und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Silica, *i*-Hex/EtOAc 3:1 → 1:1) aufgereinigt. Man erhielt **31** (1.12 g, 2.70 mmol, 29 %) in Form einer farblosen Flüssigkeit.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.77-7.69 (m, 4H, 4×CH_{arom.}), 7.37-7.31 (m, 4H, 4×CH_{arom.}), 4.06 (d, ³J = 5.9 Hz, 4H, 2×CH₂OTs), 3.65 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H, CH₂OH), 2.46 (s, 6H, 2×CH₃), 2.24 (sept., ³J = 5.8 Hz, 1H, CH) ppm. **¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ = 145.2 (C_{arom.}), 132.4 (C_{arom.}), 130.0 (CH_{arom.}), 127.9 (CH_{arom.}), 67.0 (2×CH₂OTs), 58.2 (CH₂OH), 40.7 (CH), 21.7 (2×CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₁₈H₂₂O₇NaS₂⁺ [M+Na]⁺, ber.: 437.0699, gef.: 437.0694. **FT-**

IR (ATR, cm^{-1}): 3550 (br, w), 2960 (w), 1790 (w), 1597 (w), 1354 (s), 1189 (m), 1171 (s), 957 (m), 809 (s), 664 (s).

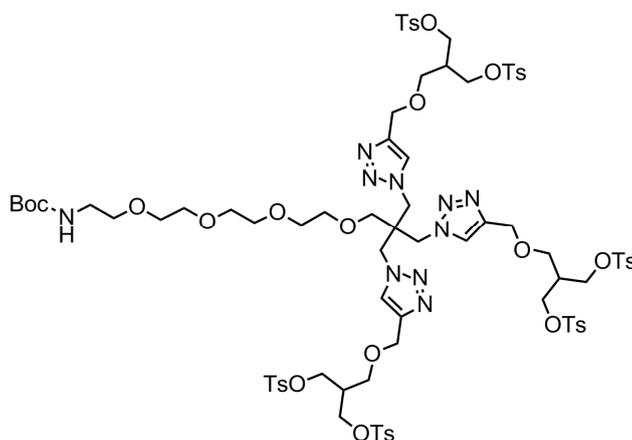
2-((Prop-2'-in-1'-yloxy)methyl)propanyl-1,3-bis(4"-methylbenzolsulfonat) (30)



31 (1.34 mg, 3.24 mmol) wurde in MeCN (32 mL) gelöst. Es wurde Propargylbromid (80 % in Toluol, 5.2 mL, 46.9 mmol, 14 Äq.) und danach Cs_2CO_3 (5.28 g, 32.4 mmol, 10 Äq.) zugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH, 50:1) aufgereinigt. Man erhielt **30** (933 mg, 2.06 mmol, 64 %) als bräunliches Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.74$ (*d*, $^3J = 8.3$ Hz, 4H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.34 (*d*, $^3J = 8.0$ Hz, 4H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.04-3.96 (*m*, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{OTs}$), 3.96 (*d*, $^3J = 2.4$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 3.44 (*d*, $^3J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2), 2.45 (*s*, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 2.39 (*t*, $^3J = 2.4$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.31 (*sept*, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, CH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):** $\delta = 145.1$ ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 132.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 129.9 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 127.9 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 78.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 74.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 67.0 ($2 \times \text{CH}_2\text{OTs}$), 65.9 (HCCH_2OH), 58.4 ($\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 38.8 (CH), 21.7 ($2 \times \text{CH}_3$) ppm. **HR-MS (ESI):** $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{NaO}_7\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 475.0856, gef.: 475.0851. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 3281 (m), 2919 (w), 1598 (w), 1356 (s), 1174 (s), 1096 (m), 815 (s).

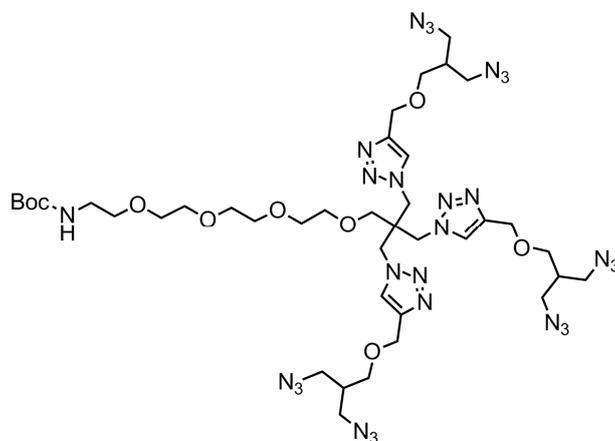
(((1,1'-(2-(17,17-Dimethyl-15-oxo-2,5,8,11,16-pentaoxa-14-azaocetadecyl)-2-((4-((3-(tosyloxy)-2-((tosyloxy)methyl)propoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)propan-1,3-diyl)bis(1*H*-1,2,3-triazol-4,1-diyl))bis(methylene))bis(oxy))bis(methylene))bis(propan-3,2,1-triyl) tetrakis(4''-methylbenzolsulfonat) (**34**)



23 (20 mg, 40 μmol) wurde in THF/H₂O (1:1, 0.5 mL) gelöst und mit **30** (60 mg, 0.13 mmol, 3.3 Äq) versetzt. Anschließend wurde CuSO₄ (1.9 mg, 12 μmol , 0.3 Äq.) zugegeben, das Lösungsmittel entgast und die Reaktion mit Natriumascorbat (3.8 mg, 19 μmol , 0.5 Äq.) versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde erneut Natriumascorbat (5.00 mg, 25.3 μmol , 0.6 Äq.) zugegeben. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH, 100:1 \rightarrow 10:1) aufgereinigt. Man erhielt **34** (44 mg, 24 μmol , 60 %) als farblose Flüssigkeit.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.29 (*s*, 3H, C=CH(Triazol)), 7.69 (*d*, ³*J* = 8.2 Hz, 12H, 12 \times CH_{arom.}), 7.33 (*d*, ³*J* = 7.6 Hz, 12H, 12 \times CH_{arom.}), 4.56 (*s*, 6H, 3 \times C=CCH₂), 4.48 (*s*, 6H, 3 \times CH₂(Pentaerythritol)), 4.01-3.93 (*m*, 12H, 6 \times CH₂OTs), 3.70-3.62 (*m*, 6H, 3 \times CH₂), 3.59-3.46 (*m*, 16H, 8 \times CH₂), 2.94 (*s*, 2H, CH₂(Pentaerythritol)), 2.43 (*s*, 18H, 6 \times CH₃), 2.28 (*sept*, ³*J* = 5.8 Hz, 11.8 Hz, 3H, 3 \times CH), 1.41 (*s*, 9H, 3 \times CH₃(Boc)) ppm. **¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ = 156.4 (C=O), 145.4 (C_{arom.}), 132.6 (C_{arom.}), 130.2 (CH_{arom.}), 128.1 (CH_{arom.}), 70.8 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.5 (CH₂), 70.4 (CH₂), 70.2 (CH₂), 68.5 (CH₂-(Pentaerythritol)), 67.3 (CH₂OTs), 66.3 (CH₂CH), 64.4 (3 \times C=CCH₂O), 49.9 (3 \times CH₂(Pentaerythritol)), 45.8 (C_{quart.}), 39.2 (3 \times CH), 28.7 (3 \times CH₃(Boc)), 21.9 (6 \times CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₈₁H₁₀₇N₁₀O₂₇S₆⁺ [M+H]⁺, ber.: 1843.5626, gef.: 1843.5646. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 2917 (w), 2361 (w), 1706 (w), 1598 (w), 1358 (m), 1175 (s), 1095 (s), 666.5 (m).

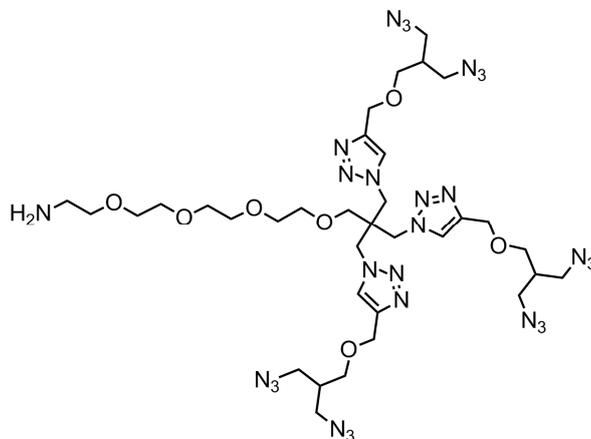
***tert*-Butyl-(15-(4-((3-Azido-2-(azidomethyl)propoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-14,14-bis((4-((3-azido-2-(azidomethyl)propoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)carbamate (**35**)**



34 (115 mg, 62.4 μmol) wurde in DMF (1 mL) gelöst und mit NaN_3 (73 mg, 1.1 mmol) versetzt. Anschließend wurde über Nacht bei 100 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Silica, DCM/MeOH, 40:1) aufgereinigt. Man erhielt **35** (56 mg, 52 μmol , 60 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.22 (*s*, 3H, 3 \times C=CH(Triazol)), 4.63 (*s*, 6H, 3 \times C=CCH₂), 4.40 (*s*, 6H, 3 \times CH₂(Pentaerythritol)), 3.71-3.64 (*m*, 6H, CH₂), 3.62-3.59 (*m*, 2H, CH₂), 3.56-3.52 (*m*, 10H, CH₂), 3.49-3.44 (*m*, 2H, CH₂), 3.43-3.34 (*m*, 12H, 6 \times CH₂N₃), 3.28-3.21 (*m*, 2H, CH₂), 2.91 (*s*, 2H, CH₂(Pentaerythritol)), 2.11-2.02 (*m*, 3H, 3 \times CH), 1.42 (*s*, 9H, 3 \times CH₃(Boc)) ppm. **¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ = 156.1 (C=O), 144.6 (C_{arom.}), 126.5 (CH_{arom.}), 79.5 (C_{quart.}), 70.8 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.4 (CH₂), 70.4 (CH₂), 70.3 (CH₂), 68.6 (CH₂), 68.3 (CH₂(Pentaerythritol)), 64.5 (3 \times C=CCH₂O), 50.5 (6 \times CH₂N₃), 49.6 (3 \times CH₂(Pentaerythritol)), 46.1 (C_{quart.}), 39.7 (3 \times CH), 28.6 (3 \times CH₃(Boc)) ppm. **HR-MS (ESI):** C₃₉H₆₄N₂₈O₉Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 1091.5303, gef.: 1091.5304. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3362 (*w*), 2868 (*w*), 2091 (*s*), 1709 (*m*), 1363 (*m*), 1090 (*s*), 1044 (*m*), 864 (*w*).

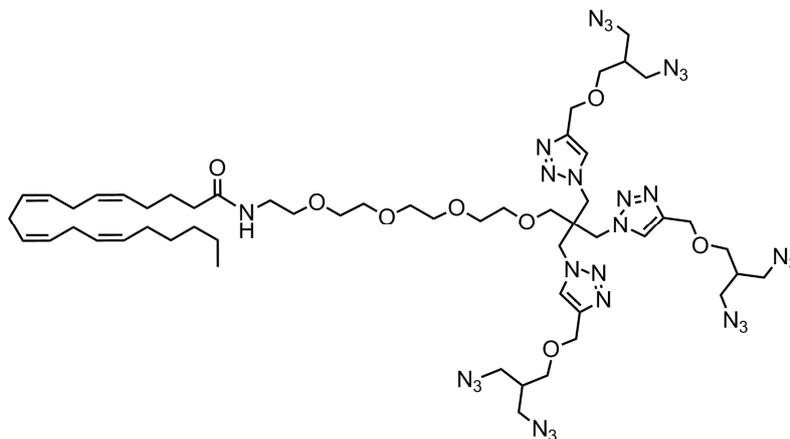
15-(4-((3-Azido-2-(azidomethyl)propoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-14,14-bis((4-((3-azido-2-(azidomethyl)propoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-1-amin (36)



35 (50 mg, 47 μmol) wurde in CHCl_3 (1 mL) gelöst und mit TFA (72 μL , 94 μmol , 2 Äq.) versetzt. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde erneut TFA (100 μL , 131 μmol , 2.8 Äq.) zugegeben und 1 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CHCl_3 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Silica, $\text{DCM}/\text{MeOH} + 1\% \text{NEt}_3$, 100:1 \rightarrow 60:1) aufgereinigt. Man erhielt **36** (32 mg, 33 μmol , 71 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.27$ (s, 3H, $3 \times \text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.63 (s, 6H, $3 \times \text{C}=\text{CCH}_2\text{O}$), 4.45 (s, 6H, $3 \times \text{CH}_2(\text{Pentaerythritol})$), 3.68 (s, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 3.63-3.50 (m, 14H, $7 \times \text{CH}_2$), 3.43-3.35 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2\text{N}_3$), 2.92 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2), 2.88 (s, 2H, $\text{CH}_2(\text{Pentaerythritol})$), 2.09-2.04 (m, 3H, $3 \times \text{CH}$) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):** $\delta = 144.7$ ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 126.6 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 71.2 (CH_2), 70.7 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.0 (CH_2), 68.6 (CH_2), 68.5 ($\text{CH}_2(\text{Pentaerythritol})$), 64.5 ($3 \times \text{C}=\text{CCH}_2\text{O}$), 50.5 ($6 \times \text{CH}_2\text{N}_3$), 49.4 ($3 \times \text{CH}_2(\text{Pentaerythritol})$), 46.0 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 41.1 (CH_2NH_2), 39.7 ($3 \times \text{CH}$) ppm. **HR-MS (ESI):** $\text{C}_{34}\text{H}_{57}\text{N}_{28}\text{O}_7^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 969.4960, gef.: 969.4960. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 3358 (w), 2869 (w), 2097 (s), 1710 (m), 1286 (m), 1249 (m), 1103 (s) 778 (w).

***N*-(15-(4-((3-Azido-2-(azidomethyl)propoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-14,14-bis((4-((3-azido-2-(azidomethyl)propoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)arachidonamid (2)**

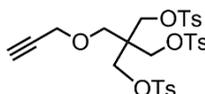


Arachidonsäure (9.4 mg, 31 μmol) wurde in DMF (0.2 mL) vorgelegt und mit DIPEA (9.0 μL , 53 μmol , 1.7 Äq.) und HATU (14 mg, 37 μmol , 1.2 Äq.) versetzt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde eine Lösung von **36** (28 mg, 29 μmol , 0.94 Äq.) in DMF (0.2 mL) zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß wurde abgedunkelt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Silica, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} + 1\% \text{NET}_3$, 100:1 \rightarrow 60:1) aufgereinigt. Man erhielt **2** (19 mg, 15 μmol , 49 %) als gelbliches Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.23$ (*s*, 3H, $3 \times \text{CH}_{\text{arom.}}$), 5.42-5.29 (*m*, 8H, $\text{CH}_{\text{arach.}}$), 4.65 (*s*, 6H, $3 \times \text{C}=\text{CCH}_2\text{O}$), 4.42 (*s*, 6H, $3 \times \text{CH}_2(\text{Pentaerythritol})$), 3.72-3.66 (*m*, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 3.63-3.60 (*m*, 2H, CH_2), 3.58-3.54 (*m*, 10H, CH_2), 3.50 (*t*, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.45-3.37 (*m*, 14H, $6 \times \text{CH}_2\text{N}_3$, CH_2), 2.93 (*s*, 2H, $3 \times \text{CH}_2(\text{Pentaerythritol})$), 2.86-2.76 (*m*, 6H, $3 \times =\text{CCH}_2\text{arach.C}=\text{}$), 2.20-2.14 (*m*, 2H, $\text{CH}_2\text{arach.}$), 2.14-2.01 (*m*, 7H, $3 \times \text{CH}$, $2 \times \text{CH}_2\text{arach.}$), 1.74-1.67 (*m*, 2H, $\text{CH}_2\text{arach.}$), 1.39-1.22 (*m*, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 0.88 (*t*, $^3J = 5.3$ Hz, 3H, CH_3) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3)** δ 172.9 ($\text{C}=\text{O}$), 144.6 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 130.7 ($\text{C}_{\text{arach.H}}$), 129.3 ($\text{C}_{\text{arach.H}}$), 128.9 ($\text{C}_{\text{arach.H}}$), 128.8 ($\text{C}_{\text{arach.H}}$), 128.4 ($\text{C}_{\text{arach.H}}$), 128.3 ($\text{C}_{\text{arach.H}}$), 128.0 ($\text{C}_{\text{arach.H}}$), 127.7 ($\text{C}_{\text{arach.H}}$), 126.4 ($\text{CH}_{\text{arom.}}$), 70.7 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.3 (CH_2), 70.2 (CH_2), 70.1 (CH_2), 68.5 (CH_2), 68.3 (CH_2 (Pentaerythritol)), 64.5 ($3 \times \text{C}=\text{CCH}_2\text{O}$), 50.5 ($6 \times \text{CH}_2\text{N}_3$), 49.5 ($3 \times \text{CH}_2(\text{Pentaerythritol})$), 46.1 ($\text{C}_{\text{quart.}}$), 39.6 ($3 \times \text{CH}$), 39.2 (CH_2), 36.2 ($\text{C}_{\text{arach.H}_2}$), 31.7 ($\text{C}_{\text{arach.H}_2}$), 29.5 ($\text{C}_{\text{arach.H}_2}$), 27.4 ($\text{C}_{\text{arach.H}_2}$), 26.9 ($\text{C}_{\text{arach.H}_2}$), 25.8 ($3 \times =\text{CCH}_2\text{arach.C}=\text{}$), 25.7

($C_{arach.H_2}$), 22.7 ($C_{arach.H_2}$), 14.2 ($C_{arach.H_3}$) ppm. **HR-MS (ESI):** $C_{54}H_{87}N_{28}O_8^+$ $[M+H]^+$, ber.: 1255.7256, gef.: 1255.7263. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 2926 (w), 2868 (w), 2094 (s), 1660 (w), 1452 (w), 1264 (m), 1090 (m), 1045 (m).

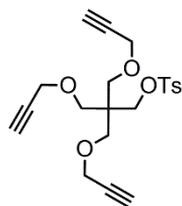
2-Propargyloxymethyl-2-((tosyloxy)methyl)propanyl-1,3-bis(4'-methylbenzolsulfonat) (33)



Zu einer Lösung von **17** (103 mg, 0.172 mmol) in THF (1.7 mL) wurde Propargylbromid (80 % in Toluol, 170 μ L, 1.72 mmol, 10 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von NaH (60 %, 34 mg, 0.86 mmol, 5.0 Äq.) und 15-Krone-5 (10.0 μ L, 50.4 μ mol, 0.29 Äq.) wurde 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch vorsichtige Zugabe von MeOH beendet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Zugabe von H₂O und Extraktion der wässrigen Phase mit DCM (3×10 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatografie (Silica, *i*-Hexan/EtOAc, 3:1) ergab den Propargylether **33** als farblosen Feststoff (94 mg, 0.15 mmol, 87 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.74-7.68 (*m*, 6H, 6× $CH_{arom.}$), 7.39-7.31 (*m*, 6H, 6× $CH_{arom.}$), 3.90-3.88 (*m*, 8H, 3× CH_2 (Pentaerythritol), CH_2), 3.35 (*s*, 2H, CH_2 (Pentaerythritol)), 2.46 (*s*, 9H, 3× CH_3), 2.40 (*t*, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, CH) ppm. **¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 145.5 ($C_{arom.}$), 132.0 ($C_{arom.}$), 130.2 ($CH_{arom.}$), 128.1 ($CH_{arom.}$), 78.7 ($HC\equiv C$), 75.5 ($HC\equiv C$), 66.9 (3× CH_2 (Pentaerythritol)), 66.1 (CH_2 (Pentaerythritol)), 58.7 (CH_2), 43.8 ($C_{quart.}$), 21.9 (3× CH_3) ppm. **HR-MS (ESI):** $C_{29}H_{36}O_{10}NS_3^+$ $[M+NH_4]^+$ ber.: 654.1496, gef.: 654.1494. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 3308 (w), 1597 (w), 1479 (w), 1366 (s), 1307 (w), 1294 (w), 1212 (w), 1191 (s), 1176 (s), 1095 (m), 1019 (m), 966 (s), 874 (m), 827 (s), 806 (s), 792 (s), 705 (w), 666 (s).

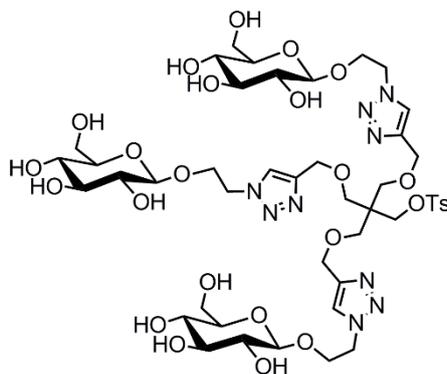
3 Propargyloxyl-2,2-bis(propargyloxymethyl)propyl-1-(4'-methylbenzolsulfonat) (41)



Eine Lösung des Alkohols **40** (2.00 g, 7.99 mmol, 1.0 Äq.) in Pyridin (40 mL) wurde mit Tosylchlorid (4.57 g, 24.0 mmol, 3.0 Äq.) versetzt und 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* mittels Säulenchromatographie (Silica, *i*-Hexan/EtOAc, 8:1) aufgereinigt. Man erhielt **41** als farbloses Öl (3.23 g, 7.98 mmol, quant.).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.81-7.77 (*m*, 2H, CH_{arom.}), 7.37-7.32 (*m*, 2H, CH_{arom.}), 4.04 (*d*, ⁴*J* = 2.4 Hz, 6H, 3×CH₂), 4.03 (*s*, 2H, CH₂(Pentaerythritol)), 3.47 (*s*, 6H, 3×CH₂ (Pentaerythritol)), 2.45 (*s*, 3H, CH₃), 2.40 (*t*, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, CH) ppm. **¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ = 144.6 (C_{arom.}), 132.7 (C_{arom.}), 129.7 (CH_{arom.}), 128.0 (CH_{arom.}), 79.5 (HC≡C), 74.4 (HC≡C), 69.2 (CH₂(Pentaerythritol)), 67.9 (3×CH₂(Pentaerythritol)), 58.6 (CH₂), 44.3 (C_{quart.}), 21.6 (CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₂₁H₂₄O₆NaS⁺ [M+Na]⁺, ber.: 427.1186, gef.: 427.1189. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3284 (*m*), 2951 (*w*), 2923 (*w*), 2901 (*w*), 2860 (*w*), 2131 (*w*), 1597 (*w*), 1482(*w*), 1462 (*w*), 1446 (*w*), 1401 (*w*), 1362 (*s*), 1305 (*w*), 1295 (*w*), 1264 (*w*), 1240 (*w*), 1190 (*m*), 1175 (*s*), 1086 (*s*), 1029 (*m*), 1013 (*m*), 979 (*s*), 966 (*s*), 928 (*w*), 904 (*w*), 838 (*s*), 815 (*m*), 796 (*w*), 692 (*m*), 670 (*s*).

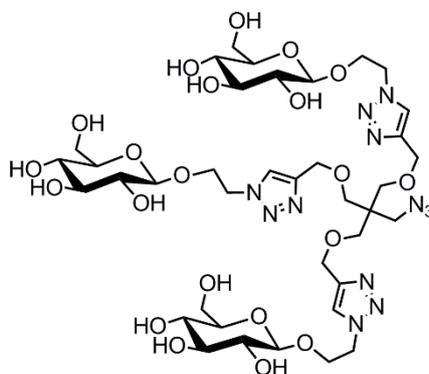
Tri(β-glucose)-Monotosylat (43)



41 (23 mg, 0.057 mmol) und 2-Azidoethyl- β -D-Glucose (**42**) (54 mg, 0.22 mmol, 3.9 Äq.) wurden vorgelegt und in THF/H₂O (1:1, 1.0 mL) gelöst. Nach Zugabe von CuSO₄ (4.9 mg, 0.031 mmol, 0.55 Äq.) und Natriumascorbat (6.1 mg, 0.031 mmol, 0.55 Äq.) wurde das Lösungsmittel entgast und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC (MeCN/H₂O, 0:1 \rightarrow 1:0 in 20 min) aufgereinigt. Das Produkt **43** konnte als farbloser Feststoff (30 mg, 0,026 mmol, 46 %) erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.92 (s, 3H, 3 \times C=CH(Triazol)), 7.63 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, 2 \times CH_{arom.}), 7.28 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, 2 \times CH_{arom.}), 4.58 (t, ³J = 5.1 Hz, 6H, 3 \times NCH₂CH₂), 4.41-4.37 (m, 9H, 3 \times CH₂, 3 \times C1'H), 4.28-4.00 (m, 6H, 3 \times NCH₂CH₂), 3.85-3.81 (m, 5H, 3 \times C6'HH, CH₂ (Pentaerythritol)), 3.65-3.60 (m, 3H, 3 \times C6'HH), 3.44-3.35 (m, 6H, 3 \times C3'H, 3 \times C5'H), 3.32-3.27 (m, 9H, 3 \times C4'H, 3 \times CH₂ (Pentaerythritol)), 3.22-3.18 (dd, ³J = 9,3 Hz, ³J = 8.0 Hz, 3H, 3 \times C2'H), 2.27 (s, 3H, CH₃) ppm. **¹³C-NMR (100 MHz, D₂O):** δ = 146.3 (C_{arom.}), 143.9 (C=CH(Triazol)), 130.2 (C_{arom.}), 129.9 (CH_{arom.}), 127.6 (CH_{arom.}), 125.2 (C=CH(Triazol)), 102.4 (C1'H), 75.8 (C5'H), 75.5 (C3'H), 72.8 (C2'H), 69.5 (C4'H), 68.4 (CH₂ (Pentaerythritol)), 67.9 (3 \times NCH₂CH₂), 66.5 (3 \times CH₂ (Pentaerythritol)), 63.4 (3 \times CH₂), 60.6 (C6'H₂), 50.2 (3 \times NCH₂CH₂), 44.1 (C_{quart.}), 20.7 (CH₃) ppm. **HR-MS (ESI):** C₄₅H₇₀N₉O₂₄S⁺ [M+H]⁺, ber.: 1152.4249, gef.: 1152.4261. **FT-IR (ATR, cm⁻¹):** 3344 (br, m), 2878 (w), 1644 (br, w), 1598 (w), 1453 (w), 1353 (m), 1226 (m), 1190 (m), 1174 (m), 1076 (s), 1034 (s), 966 (s), 895 (m), 816 (m), 775 (m), 668 (s).

Tri(β -glucose)-Monoazid (**37**)



Eine Lösung von **43** (15 mg, 13 μmol) in DMF (130 μL) wurde in einem Mikroreaktionsgefäß (1.5 mL) vorgelegt und mit NaN_3 (4.2 mg, 65 μmol , 5.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 100 °C für 48 h geschüttelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und Aufreinigung des Reaktionsprodukts mittels präparativer HPLC (MeCN/ H_2O , 0:1 \rightarrow 1:0 in 20 min) konnte das Monoazid **37** als farbloser Feststoff (5.5 mg, 5.4 μmol , 42 %) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ = 8.03 (s, 3H, $3\times\text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.63 (t, 3J = 4.8 Hz, 6H, $3\times\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 4.53 (s, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 4.39 (d, 3J = 7.9 Hz, 3H, $3\times\text{C1}'\text{H}$), 4.17 (m, 6H, $3\times\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.85 (dd, 2J = 12.3 Hz, 3J = 2.2 Hz, 3H, $3\times\text{C6}'\text{HH}$), 3.68-3.62 (m, 3H, $3\times\text{C6}'\text{HH}$), 3.46-3.24 (m, 17H, $4\times\text{CH}_2$ (Pentaerythritol), $3\times\text{C3}'\text{H}$, $3\times\text{C4}'\text{H}$, $3\times\text{C5}'\text{H}$), 3.20 (dd, 3J = 9.4 Hz, 3J = 7.9 Hz, 3H, $3\times\text{C2}'\text{H}$) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O):** δ = 143.9 ((C=CH(Triazol)), 125.6 ((C=CH(Triazol)), 102.4 (C1'H), 75.8 (C5'H), 75.5 (C3'H), 72.9 (C2'H), 69.5 (C4'H), 68.2 ($3\times\text{CH}_2$ (Pentaerythritol)), 68.0 ($3\times\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 63.4 ($3\times\text{CH}_2$), 60.7 (C6'H), 50.9 (CH_2 (Pentaerythritol)), 50.2 ($3\times\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 44.5 ($\text{C}_{\text{quart.}}$) ppm. **HR-MS (ESI):** $\text{C}_{38}\text{H}_{63}\text{N}_{12}\text{O}_{21}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1023.4225, gef.: 1023.4227. **FT-IR (ATR, cm^{-1}):** 3364 (br, m), 2879 (w), 2104 (w), 1702 (w), 1430 (w), 1354 (m), 1226 (w), 1190 (w), 1174 (m), 1076 (s), 1034 (s), 966 (m), 895 (w), 816 (m), 755 (w), 707 (w), 668 (w).

Synthese-Vorschriften nach Literatur

Das Cyclodextrinmonoazid **38** wurde nach einer Vorschrift von Defaye *et al.* synthetisiert.^[169] Mittels Abgleich des ^1H sowie ^{13}C -NMR-Spektrums sowie HR-MS (ESI) mit der Literatur (Petter *et al.*) konnte dieses identifiziert werden.^[203]

6'Monotosyl- β -cyclodextrin (44)

Zu einer Suspension von β -Cyclodextrin (5.00 g, 4.41 mmol) in H_2O (220 mL) wurde eine Lösung von $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.30 g, 13.3 mmol, 3.0 Äq.) in H_2O (220 mL) und eine Lösung von NaOH (4.41 g, 110 mmol, 25.0 Äq.) in H_2O (220 mL) zugegeben. Nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur wurde eine Lösung von Tosylchlorid (6.61 g, 34.7 mmol, 7.9 Äq.) in MeCN (44 mL) langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit HCl (1 M) neutralisiert und anschließend auf 0 °C gekühlt. Der dabei gebildete farblose Niederschlag wurde mit Aceton gewaschen. Durch Umkristallisation in H_2O konnte das Mehrfachtosylate nicht komplett abgetrennt werden. Daher wurde ein Teil des Rohprodukts

mittels präparativer HPLC in wiederholten Trennungsdurchläufen (MeCN/H₂O, 0:1 → 1:0 in 20 min) aufgereinigt. Man erhielt das Monotosylat **44** als farblosen Feststoff.

6'Monoazido-β-cyclodextrin (38)

Eine Lösung von **44** (3.4 mg, 2.6 μmol) in DMF (50 μL) wurde in einem Mikroreaktionsgefäß (1.5 mL) mit NaN₃ (3.3 mg, 51 μmol, 20 Äq.) versetzt und 2 h bei 90 °C sowie 14 h bei 70 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde in H₂O (1.0 mL) aufgenommen und auf eine *Sep-Pak*[®] aufgetragen. Es wurde mit H₂O (4.0 mL) gespült und das so entsalzte Produkt mit MeCN/H₂O (4:1, 20 mL) eluiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* konnte das β-Cyclodextrinmonoazid **38** als farbloser Feststoff (1,1 mg, 0,95 μmol, 36 %) erhalten werden. Durch die erfolgreiche Click-Modifizierung von RNA-Oligonukleotiden wurde dieses Azid zusätzlich charakterisiert.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 5.78-5.82, 4.88-4.81, 4.53-4.43, 3.78-3.51, 3.70-3.55, 3.69-3.52, 3.67-3.25, 3.42-3.26 ppm. **¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆):** δ = 102.3-101.5, 83.0-81.4, 73.1-70.2, 59.9, 51.1 ppm. **HR-MS (ESI):** C₄₂H₇₃N₄O₃₄ [M+NH₄]⁺, ber.: 1177.4101, gef.: 1177.4120.

9.3 Oligonukleotidsynthese und Click-Modifikation

9.3.1 Festphasensynthese

RNA - Oligonukleotidsynthese erfolgte an einem *Äkta Oligopilot* der Firma *Amersham Biosciences* im 2.0 μmol Maßstab, wobei kommerziell erhältliche 2'-Thiomorpholin-4-carbothioat RNA-Phosphoramidite (TC-RNA-Amidite) sowie 2'-TBDMS-Phosphoramidite eingesetzt wurden. TC-RNA Amidite wurden 0.1 M in Toluol während TBDMS-Phosphoramidite 0.2 M in Acetonitril angelöst wurden. Es wurde eine Kupplungszeit von 10 min gewählt. Für die Alkinsonderbase wurde die Kupplungszeit auf 20 min erhöht. Als Träger wurde dabei stets dT CPG-Material (500 Å, *Glen Research* bzw. *Prime Synthesis*) verwendet. Die RNA-Synthese fand unter folgenden Bedingungen statt:

Detritylierung:	15 mL Dichloressigsäure in 100 mL Toluol
Aktivator:	0.50 M Ethylthiotetrazol (ETT) in Acetonitril 0.25 M <i>Aktivator 42</i> (<i>Aldrich</i>) in Acetonitril
Capping A:	Acetanhydrid/2,6-Lutidin/MeCN (20:30:50)
Capping B:	20 % <i>N</i> -Methylimidazol in Acetonitril
Oxidation:	0.025 M Iod in 2,6-Lutidin/H ₂ O/Acetonitril (1:5:11)

Thioat-Rückgrat Modifizierungen wurden durch das *Sulfurylation Reagent II* von *Glenn Research* eingeführt. Dazu wurde eine 50 mM Lösung in Pyridin/Acetonitril (6:4) an den dafür vorgesehenen Sonderport des *Äkta Oligopilot* angeschlossen.

9.3.2 Entschützung und Aufreinigung von Oligonukleotiden

TC-Oligonukleotide

Das am CPG-Trägermaterial gebundene Oligonukleotid wurde zunächst *in vacuo* getrocknet und die Kartusche für 3 min mit 1 mL einer Triethylamin-Lösung (20 % in Acetonitril) sowie dreimal mit je 3 mL Acetonitril gewaschen. Die Abspaltung des Oligonukleotids von der festen Phase sowie der TC-Schutzgruppen erfolgte mit 500 μL einer Ethylendiamin-Lösung (50 % in Toluol) für 2 h bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit je 2.5 mL Acetonitril wurde das entschützte Oligonukleotid in drei Schritten mit je 500 μL *ddH*₂O aus der Kartusche eluiert.

TBDMS-Oligonukleotide

Das am CPG-Trägermaterial gebundene Oligonukleotid wurde zunächst *in vacuo* getrocknet und anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2.0 mL) überführt. Die Abspaltung von der festen Phase und sowie der Nucleobasen-Schutzgruppen erfolgte mit 1 mL einer 1:1 Mischung von 28 % NH₃ (in H₂O) und 40 % Methylamin (in H₂O) für 30 min bei 65 °C in einem *Eppendorf Thermomixer*. Nach Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, wobei das CPG-Material anschließend zweimal mit je 250 µL ddH₂O gewaschen wurde. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in 230 µL DMSO bei 65 °C gelöst. Die Abspaltung der 2'-TBDMS-Gruppen erfolgte durch Zugabe von 120 µL Triethylamin und 150 µL TEA·3HF, wobei die Mischung bei 65 °C für 2 h geschüttelt wurde. Durch Zugabe von 50 µL NaOAc-Lösung (3 M) und 1 mL *n*-Butanol und Inkubation bei -80 °C für 1 h wurden die entschützten RNA Oligonukleotide gefällt. Nach Zentrifugation (13400 rpm, 15 min) wurde der Rückstand in 1.0 mL bis 0.50 mL ddH₂O aufgenommen.

Die so erhaltenen Lösungen der Roholigonukleotide wurden zunächst mit einem 0.2 µm Nylon-Membranfilter filtriert und mittels präparativer *reversed phase*-HPLC aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen der chromatografischen Aufreinigung wurden anschließend mittels MALDI-TOF identifiziert und durch analytische HPLC untersucht. Die so synthetisierten RNA-Stränge, deren berechneten sowie durch MALDI-TOF bestimmten Massen sind in Tabelle 9.1 zusammengefasst.

Tabelle 9.1 Zusammenfassung der synthetisierten RNA-Oligonukleotide. Aufgeführt sind die Sequenzen sowie die berechneten und durch MALDI-TOF bestimmten Massen. Die Position der Thioatmodifizierung ist durch ein hochgestelltes S gekennzeichnet. n = 2'-Fluoronukleosid, X = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Strang	Sequenz	m/z (ber.)	m/z (gem.)
ORN15	ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> T	6626	6627
ORN16	ggc-cuu-u <u>ca</u> -cua-cuc-cua-c <u>X</u> T	6616	6617
ORN1	ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> T	6611	6613
ORN17	gua-gga-gua-gug-aaa-ggc-c <u>X</u> T	6923	6925
ORN2	gua-gga-gua-gug-aaa-ggc-cuT	6819	6821
ORN4	gua-gga-gua-gug-aaa-ggc-c ^S T ^S T	6841	6844
ORN3	ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c <u>X</u> ^S T	6627	6632
ORN9	gaa-cuu-uga-gga-aga-gau-a <u>X</u> T	6888	6890
ORN10	uau-cuc-uuc-cuc-aaa-guu-c <u>X</u> T	6597	6595
ORN11	ccu-uga-uga-uau-agu-uaa-a <u>X</u> T	6747	6749
ORN12	uuu-aac-uau-auc-auc-aag-g <u>X</u> T	6706	6705
ORN13	uuc-ucc-gaa-cgu-guc-acg-u <u>X</u> T	6690	6692
ORN14	acg-uga-cac-guu-cgg-aga-a <u>X</u> T	<i>Andreas Beil</i>	
ORN5	gaa-uua-cag-uug-uua-cgg-a <u>X</u> T	<i>Andreas Beil</i>	
ORN6	ucc-gua-aca-acu-gua-auu-c <u>X</u> T	<i>Andreas Beil</i>	
ORN7	acu-acu-aac-ucc-acc-cua-a <u>X</u> T	<i>Andreas Beil</i>	
ORN8	uua-ggg-ugg-agu-uag-uag-u <u>X</u> T	<i>Andreas Beil</i>	

9.3.3 Click-Modifizierung von Oligonukleotiden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden „Click“-Reaktionen an Oligonukleotiden stets nach einem modifizierten Protokoll der Firma *BaseClick* durchgeführt. Zu einer Lösung des Oligonukleotids (2.0 mM, 10 nMol, 5.0 µL) in DMSO/H₂O 1:1 wurde die Lösung des Azids (50 mM, 2.0 µL, 10 äq) in DMSO/*t*BuOH 3:1 und anschließend eine frisch hergestellte Lösung von CuBr und TBTA im Molverhältnis 1:2 (5.0 µL, 50 mM (bezogen auf CuBr) in

DMSO/*t*BuOH 3:1) zugeben. Für mehrfach Click-Modifizierungen wurden entsprechende 5 mM Azid-Stocklösungen eingesetzt und ein leichter Überschuss der Alkin-Oligonukleotide (3.3 äq mit **1** bzw. **3**, 6.3 äq mit **2**) eingesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 5 h bei 30 °C mit Hilfe eines *Eppendorf Thermomixers* geschüttelt. Durch Zugabe von NaOAc (50 µL, 0.30 M) wurde die Reaktion gestoppt, weitere 5 min geschüttelt und das Oligonukleotid mit EtOH (1.0 mL) gefällt. Nach Inkubation bei -80 °C für 1 h oder über Nacht wurde zentrifugiert (13400 rpm, 15 min) und die überstehende Lösung abgenommen. Das Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und in H₂O (90 µL) gelöst. Bei Einführung von Anandamid-Derivaten wurde zum Anlösen stets eine 1:1 Mischung von Puffer A und Puffer B (siehe Materialien und Methoden) verwendet. Die Aufreinigung der Click-Produkte erfolgte mittels analytischer *reversed phase* HPLC, wobei die einzelnen erhaltenen Fraktionen wie im vorherigen Kapitel beschrieben mittels *MALDI-TOF* bzw. erneut analytischer *reversed phase*-HPLC untersucht wurden. Die so modifizierten RNA-Stränge, deren berechneten sowie durch *MALDI-TOF* bestimmten Massen sind in Tabelle 9.2 zusammengefasst.

Tabelle 9.2 RNA-Oligonukleotide modifiziert durch Click-Chemie. Aufgeführt sind die Sequenzen, berechnete und gemessene (MALDI-TOF) Molekulargewichte. Die Position der Thioatmodifizierung ist durch ein hochgestelltes S gekennzeichnet. \underline{n} = 2'-Fluoronukleosid \underline{X} = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Strang	Sequenz	m/z (ber.)	m/z (gem.)
ORN16 + Chol	ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+Chol)T	Julian Willibald	
ORN1 + 4	ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+4)T	7115	7110
ORN1 + 5	ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} (+5)T	7252	7256
ORN3 + 4	ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X}^S (+4)T	7131	7135
ORN2 + 42	gua-gga-gua-gug-aaa-ggc-c \underline{X} (+42)T	7174	7177
ORN2 + 37	gua-gga-gua-gug-aaa-ggc-c \underline{X} (+37)T	7947	7948
ORN2 + 38	gua-gga-gua-gug-aaa-ggc-c \underline{X} (+38)T	8083	8085
ORN9 + 4	gaa-cuu-uga-gga-aga-gau-a \underline{X} (+4)T	7392	7393
ORN11 + 4	ccu-uga-uga-uau-agu-uaa-a \underline{X} (+4)T	7248	7250
ORN10 + 42	uau-cuc-uuc-cuc-aaa-guu-c \underline{X} (+42)T	6844	6848
ORN12 + 42	uuu-aac-uau-auc-auc-aag-g \underline{X} (+42)T	6955	6956
ORN12 + 38	uuu-aac-uau-auc-auc-aag-g \underline{X} (+38)T	7865	7868
ORN13 + 4	uuc-ucc-gaa-cgu-guc-acg-u \underline{X} (+4)T	7194	7197
ORN1 + 1	1 + (ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} T) ₃	20506	20507
ORN1 + 15	15 + (ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} T) ₃	21358	21355
ORN1 + 3	3 + (ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} T) ₃	20642	20631
ORN1 + 2	2 + (ggc-cuu-uca-cua-cuc-cua-c \underline{X} T) ₆	40920	40930
ORN9 + 1	1 + (gaa-cuu-uga-gga-aga-gau-a \underline{X} T) ₃	21337	21334
ORN11 + 1	1 + (ccu-uga-uga-uau-agu-uaa-a \underline{X} T) ₃	20914	20912

9.4 Zell-, mikro- und molekularbiologisches Arbeiten

Fluoreszenzmikroskopie: Bei dem verwendeten Fluoreszenzmikroskop handelte es sich um ein *TCS SPE* Spektral-Konfokalmikroskop der Firma *Leica* mit inversem Stativ und einem Inkubator der Firma PECON.

Lumineszenz-Messungen wurden mit einem *Tecan GENios Pro Injection Reader* durchgeführt. Dazu wurden *Micro*-Platten *96/V-PP* von *Eppendorf* bzw. von *Greiner bio-one* verwendet.

Zellkultur: HeLa-Zellen wurden von *ATCC* gekauft und in 250 mL *CELLSTAR*[®] Zellkultur Flaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche (T75) kultiviert. RBL-2H3-Zellen (*rat basophilic leukemia*, ACC 312) wurden bei der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) kommerziell erworben und ebenfalls in T75-Flaschen kultiviert. Für Lumineszenz-Messungen wurden die Zellen in 96-well Platten von *TPP* bzw. *BD Falcon*[™] ausgesät. Das Kultivieren der Zellen erfolgte in folgenden Medien von *Invitrogen* bzw. *Thermo Scientific*:

- Trypsin, 0.25% (1X)
- *Fetal Bovine Serum*, EU approved (*South America Origin*)
- RPMI-Medium 1640 (1X), *liquid*
- RPMI Medium 1640 (1X), *liquid (Folate-Free)*
- *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)* (1X), *liquid*
- *Antibiotic-Antimycotic* (100X), *liquid*
- *Accel siRNA Delivery Media (Thermo)*

Bakterien-Medien: LB-Medium 1.0 % (w/v) Pepton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1.0 % (w/v) NaCl, nach dem Autoklavieren: 0.1 % (w/v) Antibiotika-Stammlösung. **LB-Medium-Agar** 1,5 % (w/v) Agar-Agar in LB-Medium, nach Autoklavieren: 0,1 % (w/v) Antibiotika-Stammlösung

Agarose-Gelkammern: Mini Sub-Cell GT MINI, BIO-RAD, München

Gel-Dokumentation wurde an einem *IDA Imager* von der Firma *Raytest* durchgeführt. Als Lichtquelle wurde UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und zur Detektion ein 605 nm Filter verwendet.

Verwendete Kits: Isolation von Plasmid-DNA: *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* von *Fermentas*. Transfektionsreagenz: *jetPRIME* von *peqlab*. Quantifizierung der *Firefly* bzw. *Renilla*-Expression: Dual-Luciferase[®] Reporter Assay von *Promega*.

DNA-Massenstandard: 1 kb DNA *Ladder* von *Biolabs*

Verwendete Puffer: **TAE-Laufpuffer** pH 8.3, 40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, **DNA-Auftragspuffer** 50 % (v/v) Glycerin in TAE-Puffer 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, **TAE-Gelpuffer** pH 8.3, 20 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA.

9.4.1 Zellkultur

HeLa- sowie RBL-Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI Media 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum sowie 0.10 % Antibiotikum/Antifungizid in T75 Zellkulturflaschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 % wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 10 mL PBS Puffer gewaschen und nach Zugabe von 2.0 mL Trypsin 2 min (HeLa-Zellen) bzw. 4 min (RBL-Zellen) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 8 mL RPMI-Medium zugeben. 1.0 mL dieser Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und weitere 19 mL RPMI-Medium zugefügt (1/10 Split).

Für das Aussähen von Zellen in 96-well Platten (*Techno Plastic Products AG*) wurde zunächst die Zellkonzentration der Zellsuspension bestimmt. Dazu wurden 20 µL der Zellsuspension mit 20 µL PBS verdünnt. Das Auszählen der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Hämocytometers. Dieses sowie ein Deckglas wurden zunächst mit 80 %igem Ethanol gereinigt. Das Zählnetz der Kammer wurde mit 20 µL der Zellsuspension so befüllt, dass die Kammer vollständig mit Flüssigkeit benetzt war. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops mit 10er Objektiv, indem die Zellen auf 4×16 kleinen Quadraten mäanderförmig ausgezählt wurden. Anschließend wurde das arithmetische Mittel *Z* für ein großes Quadrat bestimmt und die Gesamtzahl der Zellen in der Zellsuspension mittels folgender Formel bestimmt.

$$Z \times 2 \times V \times 10^4 = \text{Gesamtzahl der Zellen in der Zellsuspension}$$

- Faktor 2 = Verdünnungsfaktor, welcher auf Verdünnung der Zellsuspension mit PBS beruht.
- V = Gesamtvolumen der Zellsuspension
- 10^4 = Kammerfaktor der Zählkammer

Bei HeLa-Zellen wurden 20×10^3 in 200 μL und im Fall von RBL-Zellen 30×10^3 Zellen pro *Well* ausgesät. Für HeLa-Zellen wurde dazu stets RPMI-Medium ohne Folsäure verwendet.

Nicht ausgesäte Zellen wurden in flüssigem Stickstoff in 1 mL Aliquots gelagert. Zum Auftauen wurde ein Aliquot auf 37 °C erwärmt und in ein steriles PP-Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurden 14.8 mL vorgewärmtes RPMI-Medium portionsweise (0.10 mL, 0.30 mL, 0.50 mL, 0.80 mL, 1.8 mL, 3.8 mL, 7.5 mL) zugegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 20 mL frischem Medium resuspendiert und in T75 Zellkulturflaschen ausgesät.

9.4.2 Amplifizierung von *psiCHECK*TM-2

Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

50 μL chemisch-kompetente Zellen (Lagerung bei -80 °C) wurden nach dem Auftauen auf Eis mit 1 μL Plasmid-DNA (*psiCHECK*TM-2 Vector von *Promega*) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock bei 42 °C (30 s) wurde weitere 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 250 μL auf 42 °C vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C und 200 rpm regeneriert. Nach dem Abzentrifugieren (1 min, 4000 rpm) wurde der größte Teil des Überstandes verworfen, das Pellet vorsichtig in 50 μL Restvolumen resuspendiert und auf vorgewärmten LB-Agarplatten ausgestrichen. Zur Selektion enthielten die LB-Agarplatten Carbenicillin. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C gelagert.

Anlegen einer Übernachtskultur

Für die Bakterien-Übernachtskultur wurden 4.0 mL LB-Medium in einem 13 mL-Kulturröhrchen vorgelegt. Zur Selektion des gewünschten Bakterienstammes wurde das Medium mit einer Antibiotikum-Stammlösung (Carbenicillin, 1000x) versetzt. Eine Kolonie wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze von einer Plattenkultur entnommen und die Übernachtskultur damit angeimpft, welche bei 37 °C und 200 rpm inkubiert wurde.

Anlegen einer Bakterien-Dauerkultur

Zur längerfristigen Lagerung der Bakterienkulturen wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 250 μL autoklaviertes Glycerin (100 %) mit 750 μL der gewachsenen Übernachtskultur gut vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dadurch ist eine Aufbewahrung der Bakterienkultur bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ möglich.

Mini-Plasmidpräparation

Um Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen zu isolieren, wurde eine Plasmid-Reinigung mit Hilfe des *Plasmid Miniprep-Kits* von *Fermentas* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 4.0 mL einer Übernachtskultur wurden 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lyse der Bakterien wurde das Pellet in 250 μL *Resuspension Solution* resuspendiert. Nach Zugabe von 250 μL *Lysis Solution* und vier- bis sechsmaligem Invertieren entstand ein klares Lysat. Zum Neutralisieren des Lysats wurden 350 μL *Neutralization Solution* zugegeben und mehrmalig invertiert. Das entstandene farblose, flockige Präzipitat wurde 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf die *GeneJET*-Zentrifugensäule gegeben und die Säule 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die gebundene Plasmid-DNA zweimal mit 500 μL *Wash Solution* gewaschen (1 min bei 13000 rpm) und der Säulendurchfluss verworfen. Zum Trocknen der Säule wurde diese 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 50 μL *Elution Buffer* eluiert, indem 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurde.

9.4.3 Duales Luciferase Reportersystem

Für das duale Luciferase Reportersystem wurden die Zellen, 16 h vor der Plasmid-Transfektion in 96-well Platten wie in Kapitel 9.4.1 beschrieben, ausgesät und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Vor der Plasmidtransfektion wurde das Medium durch 100 μL frisches Medium ersetzt. Dabei wurde im Fall Transfektion der Folsäure siRNAs in HeLa-Zellen stets Folsäure freies RPMI-Medium verwendet. Der Plasmidvektor *psiCHECKTM-2* wurde stets mit dem Transfektionsreagenz *jetPRIMETM* der Firma *Polyplus* in Anlehnung an das Herstellerprotokoll transfiziert. Dabei wurde im Fall von RBL-Zellen das Plasmid mit *jetPRIMETM*-Puffer auf 10 ng/ μL verdünnt und kurz durchmischt.

Schließlich wurden 5 μL *jetPRIMETM*-Reagenz pro Mikrogramm Plasmid zugegeben, erneut durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 10 μL dieses Transfektionsgemischs pro well versetzt. Bei HeLa-Zellen wurde das Plasmid zunächst

auf eine Konzentration von 5 ng/ μ L verdünnt und mit 4 μ L *jetPRIMETM*-Reagenz pro Mikrogramm Plasmid versetzt. Nach Durchmischen und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde diese Transfektionslösung 1:1 mit *jetPRIMETM*-Puffer verdünnt und ebenfalls 10 μ L pro *well* auf die Zellen gegeben.

Nach 4 h Inkubation bei 37 °C wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Im Fall von RBL-Zellen wurden 200 μ L frisches Medium zugegeben, während im Fall von HeLa-Zellen 100 μ L frisches RPMI-Medium zugegeben wurden. Schließlich erfolgte die Transfektion der siRNA entweder unter Verwendung des Transfektionsreagenzes *jetPRIMETM* in Anlehnung an das Herstellerprotokoll oder durch direkte Zugabe der siRNA zu den Zellen. Die siRNA wurde dazu 10 μ M in *jetPRIMETM*-Puffer hybridisiert und danach mit *jetPRIMETM*-Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurde stets mit 10 μ L siRNA-Lösung pro *well* transfiziert. Im Falle von *jetPRIMETM*-vermittelter Transfektion wurden stets 0.4 μ L *jetPRIMETM*-Reagenz pro 10 picoMol siRNA zugegeben und nach kurzem Durchmischen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Experimente wurden dabei stets als Triplikat durchgeführt. Nach Zugabe der siRNA-Transfektionslösungen wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C inkubiert.

Die Quantifizierung der Expression beider Luciferasen erfolgte nach dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay* der Firma *Promega*. Dazu wurde 48 h nach der siRNA-Transfektion das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 100 μ L PBS-Puffer gewaschen und diese mit 30 μ L passivem Lysispuffer 60 min bei 37 °C auf einem Thermoschüttler lysiert. Währenddessen wurden die für die Biolumineszenz-Messungen nötigen Substrate nach Angaben des Herstellers frisch angesetzt. Nach dem Lysierschritt wurden je 20 μ L des Zelllysats in das korrespondierende *well* einer neuen weißen 96-*well* Platte (*Thermo Scientific*) gegeben und die so behandelte Platte automatisiert mittels eines *Tecan Injection Readers* ausgelesen. Dazu wurde durch das Gerät zunächst 50 μ L *Luciferase Assay Reagent II (LAR II)* zugegeben und nach kurzer Durchmischung die Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase ausgelesen. Es wurden stets fünf Messwerte mit einer Integrationszeit von 1000 ms bestimmt. Anschließend wurden 50 μ L *Stop and Glow Reagent* zugegeben, wodurch nach erneut kurzer Durchmischung die erste Lumineszenz gestoppt und die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase quantifiziert werden konnte. Bei diesen Experimenten erwies sich die Hintergrund-Lumineszenz als so gering, dass diese vernachlässigt werden konnte.

9.4.4 Realtime PCR zur Bestimmung der Expression von Tet-Enzymen

Die Regulation von Tet1 bzw. Tet2 in Stammzellen wurde durch quantitative *realtime* PCR bestimmt. Das Kultivieren der Stammzellen erfolgte dabei durch *Fabio Sparrer*. Nach Zugabe der siRNAs wurden diese zwischen 24 und 78 h mit den Stammzellen inkubiert.

Die Isolation der mRNA erfolgte durch das Kit *peqGOLD Total RNA* der Firma *PEQLAB Biotechnology* nach dem Herstellerprotokoll. Dazu wurde das Medium der Zellen abgenommen und diese mit 400 μL *Lysis Buffer T* inkubiert. Anschließend wurde das Lysat auf eine *DNA-Removing Column* gegeben und diese für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss der *DNA-Removing Column* wurde mit dem gleichem Volumen an 70 % Ethanol versetzt und gründlich durchmischt. Die Probe (max. 750 μL) wurde dann auf eine *Perfect Bind RNA Column* geladen und erneut für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Es wurde mit 500 μL *RNA Wash Buffer I* gewaschen, für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert und schließlich 600 μL von komplettiertem *RNA Wash Buffer II* (Pufferkonzentrat + 4 Volumeneinheiten 100 % Ethanol) zugegeben und wieder für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde durch 2 min Zentrifugation bei 10.000 rpm getrocknet. Schließlich erfolgte die Elution der RNA, wozu 100 μL RNase freies dH_2O direkt auf die Matrix gegeben wurde. Die Isolation wurde nach 3 min Inkubation durch Zentrifugieren für 1 min bei 5000 rpm abgeschlossen.

Im nächsten Schritt erfolgte ein Verdau endogener DNA mit einem *TURBO DNA-freeTM* der Firma *Applied Biosystems* in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Dazu wurde die RNA in jeder Probe so verdünnt, dass in 44 μL stets 2 μg RNA vorlagen. Zu dieser Lösung wurden 5 μL *TURBO DNase Puffer* (10x) sowie 1 μL *TURBO DNase* zugegeben. Es wurde für 35 min bei 37 °C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 5 μL *DNase Inactivation Reagent* gequencht und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden nach Zentrifugation mit 13.400 rpm für 5 min 40 μL der Lösung in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Die reverse Transkription zur Synthese der cDNA erfolgte durch das *iScript cDNA Synthesis Kit* der Firma *Bio-Rad Laboratories GmbH* in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Es wurden dazu 15 μL der RNA-Lösung mit 4 μL *iScript Mix 5x* und 1 μL *iScript Reverse Transcriptase* versetzt. In einem *Mastercycler* der Firma *Eppendorf* wurde dann die reverse Transkription durchgeführt. Dabei wurde folgendes Protokoll durchlaufen: 5 min bei 25 °C, 1 h bei 42 °C, 5 min bei 85 °C, Abkühlen auf 4 °C.

Die quantitative *realtime* PCR erfolgte unter Verwendung des *SsoFastTM EvaGreen® Supermix Kits* der Firma *Bio-Rad Laboratories*. In einem 96 *well* wurde dazu zunächst 8 µL Primer-Mix vorgelegt und 2 µL cDNA-Templat sowie 10 µL *SsoFast Evagreen Supermix* zugegeben. Sämtliche Messungen wurden als Triplikate an einem *Mastercycler® realplex* der Firma *Eppendorf* durchgeführt. Für den Primer-Mix wurden der *forward* Primer sowie *reverse* Primer auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und anschließend jeweils 5 µL beider Lösungen mit 390 µL dH₂O (Nuklease-frei) verdünnt. Die eingesetzten *Primer* mit entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 9.3 aufgeführt. Das Tet mRNA-Level wurde normalisiert auf das mRNA-Level von GAPDH. In einem *Mastercycler* der Firma *Eppendorf* wurde dann die *realtime* PCR durchgeführt. Dabei wurde folgendes Protokoll durchlaufen: 95 °C für 2 min, 40 Zyklen: 95 °C für 15 s – 60 °C für 15 s – 72 °C für 35 s.

Tabelle 9.3 Primer-Sequenzen für die quantitative *realtime* PCR.^[194]

Primer des housekeeping Gens GAPDH	
<i>Forward</i>	5'-CAT-GGC-CTT-CCG-TGT-TCC-TA-
<i>Reverse</i>	5'-CTT-CAC-CAC-CTT-CTT-GAT-GTC-ATC
Primer des Ziel-Gens TET1	
<i>Forward</i>	5'-CCA-GGA-AGA-GGC-GAC-TAC-GTT
<i>Reverse</i>	5'-TTA-GTG-TTG-TGT-GAA-CCT-GAT-TTA-TTG-T
Primer des Ziel-Gens TET2	
<i>Forward</i>	5'-ACT-TCT-CTG-CTC-ATT-CCC-ACA-GA
<i>Reverse</i>	5'-TTA-GC- CCG-ACT-TCT-CGA-TTG-TC

Literaturverzeichnis

- [1] T. M. Rana, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 23-36.
- [2] a) A. Z. Fire, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6966-6984; b) C. C. Mello, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985-6994.
- [3] D. Castanotto, J. J. Rossi, *Nature* **2009**, *457*, 426-433.
- [4] W. Xia, P. S. Low, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6811-6824.
- [5] a) K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045-2076; b) T. Loftsson, M. Masson, *Int. J. Pharm.* **2001**, *225*, 15-30; c) E. Redenti, C. Pietra, A. Gerloczy, L. Szente, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53*, 235-244; d) T. Loftsson, S. B. Vogensen, M. E. Brewster, F. Konráðsdóttir, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2532-2546.
- [6] H. Bagci, Amanda G. Fisher, *Cell stem cell* **2013**, *13*, 265-269.
- [7] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliansky, D. W. Sah, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 711-719.
- [8] J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378.
- [9] C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell* **1990**, *2*, 279-289.
- [10] M. K. Montgomery, S. Xu, A. Fire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 15502-15507.
- [11] N. Buchon, C. Vaury, *Heredity* **2005**, *96*, 195-202.
- [12] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, *Nature* **2001**, *409*, 363-366.
- [13] A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, *Cell* **2003**, *115*, 209-216.
- [14] a) C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, P. D. Zamore, *Cell* **2005**, *123*, 607-620; b) T. A. Rand, S. Petersen, F. Du, X. Wang, *Cell* **2005**, *123*, 621-629.
- [15] A. Birmingham, E. M. Anderson, A. Reynolds, D. Ilsley-Tyree, D. Leake, Y. Fedorov, S. Baskerville, E. Maksimova, K. Robinson, J. Karpilow, W. S. Marshall, A. Khvorova, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 199-204.
- [16] J. Liu, M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J.-J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, G. J. Hannon, *Science* **2004**, *305*, 1437-1441.
- [17] a) J.-R. Bertrand, M. Pottier, A. Vekris, P. Opolon, A. Maksimenko, C. Malvy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 1000-1004; b) A. Grünweller, E. Wyszko, B. Bieber, R. Jahnel, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3185-3193.
- [18] M. J. Clemens, A. Elia, *J. Interferon Cytokine Res.* **1997**, *17*, 503-524.
- [19] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- [20] S. Weitzer, J. Martinez, *Nature* **2007**, *447*, 222-226.
- [21] M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel, A. Ribas, *Nature* **2010**, *464*, 1067-1070.
- [22] J. W. Gaynor, B. J. Campbell, R. Cosstick, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4169-4184.
- [23] Y. Dorsett, T. Tuschl, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 318-329.
- [24] Y.-L. Chiu, T. M. Rana, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 549-561.
- [25] J. B. Bramsen, M. B. Laursen, A. F. Nielsen, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjær, B. R. Babu, T. Højland, M. Abramov, A. Van Aerschot, D. Odadzic, R. Smicius, J. Haas, C. Andree, J. Barman, M. Wenska, P. Srivastava, C. Zhou, D. Honcharenko, S. Hess, E. Müller, G. V. Bobkov, S. N. Mikhailov, E. Fava, T. F. Meyer, J. Chattopadhyaya, M. Zerial, J. W. Engels, P. Herdewijn, J. Wengel, J. Kjems, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 2867-2881.
- [26] M. P. Czech, M. Aouadi, G. J. Tesz, *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *7*, 473-484.
- [27] Y.-L. Chiu, T. M. Rana, *RNA* **2003**, *9*, 1034-1048.

- [28] M. Amarzguioui, T. Holen, E. Babaie, H. Prydz, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 589-595.
- [29] a) A. M. Kawasaki, M. D. Casper, S. M. Freier, E. A. Lesnik, M. C. Zounes, L. L. Cummins, C. Gonzalez, P. D. Cook, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 831-841; b) P. Muhonen, T. Tennilä, E. Azhayeva, R. N. Parthasarathy, A. J. Janckila, H. K. Väänänen, A. Azhayev, T. Laitala-Leinonen, *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 858-873.
- [30] M. Manoharan, A. Akinc, R. K. Pandey, J. Qin, P. Hadwiger, M. John, K. Mills, K. Charisse, M. A. Maier, L. Nechev, E. M. Greene, P. S. Pallan, E. Rozners, K. G. Rajeev, M. Egli, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2284-2288.
- [31] a) S. Obika, T. Uneda, T. Sugimoto, D. Nanbu, T. Minami, T. Doi, T. Imanishi, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2001**, *9*, 1001-1011; b) S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J.-i. Andoh, K.-i. Morio, T. Doi, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401-5404; c) H. Kaur, B. R. Babu, S. Maiti, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4672-4697.
- [32] a) O. R. Mook, F. Baas, M. B. de Wissel, K. Fluiter, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 833-843; b) J. Elmén, H. Thonberg, K. Ljungberg, M. Frieden, M. Westergaard, Y. Xu, B. Wahren, Z. Liang, H. Ørum, T. Koch, C. Wahlestedt, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 439-447.
- [33] A. Judge, I. MacLachlan, *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 111-124.
- [34] a) D. A. Braasch, S. Jensen, Y. Liu, K. Kaur, K. Arar, M. A. White, D. R. Corey, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7967-7975; b) F. Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10*, 117-121; c) F. Eckstein, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 1157-1160.
- [35] J. Harborth, S. M. Elbashir, K. Vandenburgh, H. Manninga, S. A. Scaringe, K. Weber, T. Tuschl, *Antisense Nucl. Ac. Drug Dev.* **2003**, *13*, 83-105.
- [36] P. Guga, M. Koziolkiewicz, *Chem. Biodiversity* **2011**, *8*, 1642-1681.
- [37] D. Haussecker, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, e8.
- [38] C. Schmidt, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 273-275.
- [39] P. Lundin, *Nat. Biotech.* **2011**, *29*, 493-497.
- [40] D. Jones, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 525-526.
- [41] M. J. Palte, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6218-6223.
- [42] Y. Omid, A. J. Hollins, M. Benboubetra, R. Drayton, I. F. Benter, S. Akhtar, *Journal of drug targeting* **2003**, *11*, 311-323.
- [43] M. G. Stanton, S. L. Colletti, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7887-7901.
- [44] O. Zelphati, F. C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 11493-11498.
- [45] aI. M. Hafez, N. Maurer, P. R. Cullis, *Gene Ther.* **2001**, *8*, 1188-1196; bI. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler, C. R. Safinya, *Science* **1998**, *281*, 78-81.
- [46] S. C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Y. Sah, D. Stebbing, E. J. Crosley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srinivasulu, M. J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. de Fougères, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden, M. J. Hope, *Nat. Biotech.* **2010**, *28*, 172-176.
- [47] T. S. Zimmermann, A. C. H. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M. N. Fedoruk, J. Harborth, J. A. Heyes, L. B. Jeffs, M. John, A. D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L. V. Nechev, L. R. Palmer, T. Racie, I. Röhl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A. J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H.-P. Vornlocher, I. MacLachlan, *Nature* **2006**, *441*, 111-114.
- [48] M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 992-1009.
- [49] S. Akhtar, I. Benter, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 164-182.
- [50] a) C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H. P. Vornlocher, C. Unverzagt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4975-4977; b) J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John,

- V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, H.-P. Vornlocher, *Nature* **2004**, *432*, 173-178.
- [51] C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E. M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Koteliansky, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nat. Biotech.* **2007**, *25*, 1149-1157.
- [52] A. Patwa, A. Gissot, I. Bestel, P. Barthelemy, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5844-5854.
- [53] K. Nishina, T. Unno, Y. Uno, T. Kubodera, T. Kanouchi, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 734-740.
- [54] K. Zhang, Q. Wang, Y. Xie, G. Mor, E. Sega, P. S. Low, Y. Huang, *RNA* **2008**, *14*, 577.
- [55] A. Aviñó, S. Ocampo, R. Lucas, J. Reina, J. Morales, J. Perales, R. Eritja, *Mol. Diversity* **2011**, *15*, 751-757.
- [56] M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1624-1625.
- [57] L. Zhu, R. I. Mahato, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2119-2127.
- [58] D. B. Rozema, D. L. Lewis, D. H. Wakefield, S. C. Wong, J. J. Klein, P. L. Roesch, S. L. Bertin, T. W. Reppen, Q. Chu, A. V. Blokhin, J. E. Hagstrom, J. A. Wolff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 12982-12987.
- [59] C. P. Leamon, P. S. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 5572-5576.
- [60] J. Harder, Master thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München **2010**.
- [61] B. a. Ugarte-Urbe, S. Pérez-Rentero, R. Lucas, A. Aviñó, J. J. Reina, I. Alkorta, R. n. Eritja, J. C. Morales, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1280-1287.
- [62] R. L. Boudreau, E. Rodriguez-Lebron, B. L. Davidson, *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, R21-27.
- [63] a) S. D. Larson, L. N. Jackson, L. A. Chen, P. G. Rychahou, B. M. Evers, *Surgery* **2007**, *142*, 262-269; b) D. L. Lewis, J. E. Hagstrom, A. G. Loomis, J. A. Wolff, H. Herweijer, *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 107-108.
- [64] Q. Chen, D. Butler, W. Querbes, R. K. Pandey, P. Ge, M. A. Maier, L. Zhang, K. G. Rajeev, L. Nechev, V. Kotelianski, M. Manoharan, D. W. Y. Sah, *J. Controlled Release* **2010**, *144*, 227-232.
- [65] D. Grimm, K. L. Streetz, C. L. Jopling, T. A. Storm, K. Pandey, C. R. Davis, P. Marion, F. Salazar, M. A. Kay, *Nature* **2006**, *441*, 537-541.
- [66] Y.-L. Wang, W. Liu, E. Wada, M. Murata, K. Wada, I. Kanazawa, *Neurosci. Res.* **2005**, *53*, 241-249.
- [67] W. Querbes, P. Ge, W. Zhang, Y. Fan, J. Costigan, K. Charisse, M. Maier, L. Nechev, M. Manoharan, V. Kotelianski, D. W. Sah, *Oligonucleotides* **2009**, *19*, 23-30.
- [68] S. L. Hofmann, D. W. Russell, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 6312-6316.
- [69] M. DiFiglia, M. Sena-Esteves, K. Chase, E. Sapp, E. Pfister, M. Sass, J. Yoder, P. Reeves, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, M. Manoharan, D. W. Y. Sah, P. D. Zamore, N. Aronin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 17204-17209.
- [70] E. B. D. Clabough, *Yale J. Biol. Med.*, *86*, 217-233.
- [71] D. K. Stiles, Z. Zhang, P. Ge, B. Nelson, R. Grondin, Y. Ai, P. Hardy, P. T. Nelson, A. P. Guzaev, M. T. Butt, K. Charisse, V. Kosovrasti, L. Tchangov, M. Meys, M. Maier, L. Nechev, M. Manoharan, W. F. Kaemmerer, D. Gwost, G. R. Stewart, D. M. Gash, D. W. Y. Sah, *Exp. Neurol.* **2012**, *233*, 463-471.
- [72] H. Kuwahara, K. Nishina, K. Yoshida, T. Nishina, M. Yamamoto, Y. Saito, W. Piao, M. Yoshida, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol. Ther.* **2011**.
- [73] Y. Uno, W. Piao, K. Miyata, K. Nishina, H. Mizusawa, T. Yokota, *Human gene therapy* **2010**, *22*, 711-719.

- [74] P. Kumar, H. Wu, J. L. McBride, K.-E. Jung, M. Hee Kim, B. L. Davidson, S. Kyung Lee, P. Shankar, N. Manjunath, *Nature* **2007**, *448*, 39-43.
- [75] P. Kumar, H.-S. Ban, S.-S. Kim, H. Wu, T. Pearson, D. L. Greiner, A. Laouar, J. Yao, V. Haridas, K. Habiro, Y.-G. Yang, J.-H. Jeong, K.-Y. Lee, Y.-H. Kim, S. W. Kim, M. Peipp, G. H. Fey, N. Manjunath, L. D. Shultz, S.-K. Lee, P. Shankar, *Cell* **2008**, *134*, 577-586.
- [76] B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 790-796.
- [77] L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, T. I. Bonner, *Nature* **1990**, *346*, 561-564.
- [78] a) M. Herkenham, A. B. Lynn, B. R. de Costa, E. K. Richfield, *Brain Res.* **1991**, *547*, 267-274; b) B. F. Thomas, X. Wei, B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *263*, 1383-1390; c) T. M. Westlake, A. C. Howlett, T. I. Bonner, L. A. Matsuda, M. Herkenham, *Neuroscience* **1994**, *63*, 637-652.
- [79] W. A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam, *Science* **1992**, *258*, 1946-1949.
- [80] J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330-12333.
- [81] S. Munro, K. L. Thomas, M. Abu-Shaar, *Nature* **1993**, *365*, 61-65.
- [82] a) M. D. Van Sickle, M. Duncan, P. J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J. S. Davison, L. J. Marnett, V. Di Marzo, Q. J. Pittman, K. D. Patel, K. A. Sharkey, *Science* **2005**, *310*, 329-332; b) J.-P. Gong, E. S. Onaivi, H. Ishiguro, Q.-R. Liu, P. A. Tagliaferro, A. Brusco, G. R. Uhl, *Brain Res.* **2006**, *1071*, 10-23; c) E. S. Onaivi, H. Ishiguro, J.-P. Gong, S. Patel, A. Perchuk, P. A. Meozzi, L. Myers, Z. Mora, P. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B. E. Akinshola, Q.-R. Liu, B. Hope, S. Iwasaki, T. Arinami, L. Teasenfitz, G. R. Uhl, *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, *1074*, 514-536.
- [83] a) M. Shen, S. A. Thayer, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 459-462; b) W. B. Veldhuis, M. van der Stelt, M. W. Wadman, G. van Zadelhoff, M. Maccarrone, F. Fezza, G. A. Veldink, J. F. Vliedthart, P. R. Bar, K. Nicolay, V. Di Marzo, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 4127-4133; c) D. Panikashvili, C. Simeonidou, S. Ben-Shabat, L. Hanus, A. Breuer, R. Mechoulam, E. Shohami, *Nature* **2001**, *413*, 527-531; d) M. van der Stelt, W. B. Veldhuis, G. W. van Haften, F. Fezza, T. Bisogno, P. R. Bar, G. A. Veldink, J. F. Vliedthart, V. Di Marzo, K. Nicolay, *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8765-8771; e) F. Molina-Holgado, E. Pinteaux, J. D. Moore, E. Molina-Holgado, C. Guaza, R. M. Gibson, N. J. Rothwell, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 6470-6474; f) M. T. Viscomi, S. Oddi, L. Latini, N. Pasquariello, F. Florenzano, G. Bernardi, M. Molinari, M. Maccarrone, *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 4564-4570.
- [84] M. Maccarrone, *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 189-198.
- [85] E. Frider, R. Mechoulam, *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *231*, 313-314.
- [86] G. Marsicano, F. Chaouloff, *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 5-6.
- [87] T. Sugiura, S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita, K. Waku, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 89-97.
- [88] L. Hanuš, S. Abu-Lafi, E. Frider, A. Breuer, Z. Vogel, D. E. Shalev, I. Kustanovich, R. Mechoulam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 3662-3665.
- [89] A. C. Porter, J.-M. Sauer, M. D. Knierman, G. W. Becker, M. J. Borna, J. Bao, G. G. Nomikos, P. Carter, F. P. Bymaster, A. B. Leese, C. C. Felder, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 1020-1024.
- [90] R. G. Pertwee, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1553-1571.
- [91] J. N. Crawley, R. L. Corwin, J. K. Robinson, C. C. Felder, W. A. Devane, J. Axelrod, *Pharmacol., Biochem. Behav.* **1993**, *46*, 967-972.

- [92] P. B. Smith, D. R. Compton, S. P. Welch, R. K. Razdan, R. Mechoulam, B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *270*, 219-227.
- [93] a) V. Di Marzo, A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J.-C. Schwartz, D. Piomelli, *Nature* **1994**, *372*, 686-691; b) D. Piomelli, M. Beltramo, S. Glasnapp, S. Y. Lin, A. Goutopoulos, X. Q. Xie, A. Makriyannis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5802-5807.
- [94] M. Beltramo, N. Stella, A. Calignano, S. Y. Lin, A. Makriyannis, D. Piomelli, *Science* **1997**, *277*, 1094-1097.
- [95] M. Maccarrone, M. van der Stelt, A. Rossi, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegthart, A. F. Agrò, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32332-32339.
- [96] a) C. J. Hillard, A. Jarrahan, *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 802-808; b) C. J. Fowler, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 181-185; c) S. Oddi, F. Fezza, G. Catanzaro, C. De Simone, M. Pucci, D. Piomelli, A. Finazzi-Agro, M. Maccarrone, *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2435-2444.
- [97] a) F. Rakhshan, T. A. Day, R. D. Blakely, E. L. Barker, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 960-967; b) T. Bisogno, S. Maurelli, D. Melck, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3315-3323.
- [98] M. J. McFarland, E. L. Barker, *Pharmacol. Ther.* **2004**, *104*, 117-135.
- [99] B. M. Fonseca, M. A. Costa, M. Almada, G. Correia-da-Silva, N. A. Teixeira, *Prostaglandins other Lipid Mediators* **2013**, *102-103*, 13-30.
- [100] a) C. J. Hillard, W. S. Edgmond, A. Jarrahan, W. B. Campbell, *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 631-638; b) S. T. Glaser, N. A. Abumrad, F. Fatade, M. Kaczocha, K. M. Studholme, D. G. Deutsch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4269-4274.
- [101] a) D. G. Deutsch, S. T. Glaser, J. M. Howell, J. S. Kunz, R. A. Puffenbarger, C. J. Hillard, N. Abumrad, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6967-6973; b) M. Kaczocha, A. Hermann, S. T. Glaser, I. N. Bojesen, D. G. Deutsch, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 9066-9075.
- [102] a) A. Ligresti, E. Morera, M. Van Der Stelt, K. Monory, B. Lutz, G. Ortar, V. Di Marzo, *Biochem. J.* **2004**, *380*, 265-272; b) D. Fegley, S. Kathuria, R. Mercier, C. Li, A. Goutopoulos, A. Makriyannis, D. Piomelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 8756-8761; c) S. Ortega-Gutiérrez, E. G. Hawkins, A. Viso, M. L. López-Rodríguez, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2004**, *43*, 8184-8190; d) J. Fu, G. Bottegoni, O. Sasso, R. Bertorelli, W. Rocchia, M. Masetti, A. Guijarro, A. Lodola, A. Armirotti, G. Garau, T. Bandiera, A. Reggiani, M. Mor, A. Cavalli, D. Piomelli, *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 64-69.
- [103] M. E. Kleinman, K. Yamada, A. Takeda, V. Chandrasekaran, M. Nozaki, J. Z. Baffi, R. J. C. Albuquerque, S. Yamasaki, M. Itaya, Y. Pan, B. Appukuttan, D. Gibbs, Z. Yang, K. Kariko, B. K. Ambati, T. A. Wilgus, L. A. DiPietro, E. Sakurai, K. Zhang, J. R. Smith, E. W. Taylor, J. Ambati, *Nature* **2008**, *452*, 591-597.
- [104] B. L. Davidson, P. B. McCray, *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 329-340.
- [105] J. Haasnoot, E. M. Westerhout, B. Berkhout, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1435-1443.
- [106] a) D. Boden, O. Pusch, F. Lee, L. Tucker, B. Ramratnam, *J. Virol.* **2003**, *77*, 11531-11535; b) A. T. Das, *J. Virol.* **2004**, *78*, 2601-2605; c) L. Gitlin, J. K. Stone, R. Andino, *J. Virol.* **2005**, *79*, 1027-1035; d) Y. Kusov, T. Kanda, A. Palmenberg, J. Y. Sgro, V. Gauss-Muller, *J. Virol.* **2006**, *80*, 5599-5610; e) J. A. Wilson, C. D. Richardson, *J. Virol.* **2005**, *79*, 7050-7058; f) H. L. Wu, *Gastroenterology* **2005**, *128*, 708-716.
- [107] V. Bitko, S. Barik, *BMC Microbiol.* **2001**, *1*, 34.
- [108] a) G. A. Coburn, B. R. Cullen, *J. Virol.* **2002**, *76*, 9225-9231; b) J. M. Jacque, K. Triques, M. Stevenson, *Nature* **2002**, *418*, 435-438; c) N. S. Lee, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 500-505.

- [109] a) J. Kronke, *J. Virol.* **2004**, *78*, 3436-3446; b) T. Yokota, *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 602-608.
- [110] a) A. P. McCaffrey, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 639-644; b) A. Shlomai, Y. Shaul, *Hepatology* **2003**, *37*, 764-770.
- [111] Q. Ge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2718-2723.
- [112] M. J. Schnell, J. P. McGettigan, C. Wirblich, A. Papaneri, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 51-61.
- [113] A. A. V. Albertini, R. W. H. Ruigrok, D. Blondel, in *Adv. Virus Res.*, Vol. 79, **2011**, pp. 1-22.
- [114] S. Finke, J. H. Cox, K.-K. Conzelmann, *J. Virol.* **2000**, *74*, 7261-7269.
- [115] F. Iseni, A. Barge, F. Baudin, D. Blondel, R. W. Ruigrok, *J. Gen. Virol.* **1998**, *79*, 2909-2919.
- [116] M. Mavrakakis, S. Méhouas, E. Réal, F. Iseni, D. Blondel, N. Tordo, R. W. H. Ruigrok, *Virology* **2006**, *349*, 422-429.
- [117] a) K. Brzózka, S. Finke, K.-K. Conzelmann, *J. Virol.* **2005**, *79*, 7673-7681; b) M. Rieder, K. Brzózka, C. K. Pfaller, J. H. Cox, L. Stitz, K.-K. Conzelmann, *J. Virol.* **2011**, *85*, 842-852.
- [118] T. Mebatsion, F. Weiland, K.-K. Conzelmann, *J. Virol.* **1999**, *73*, 242-250.
- [119] S. Finke, R. Mueller-Waldeck, K.-K. Conzelmann, *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 1613-1621.
- [120] T. Mebatsion, M. König, K.-K. Conzelmann, *Cell* **1996**, *84*, 941-951.
- [121] R. Etessami, K.-K. Conzelmann, B. Fadai-Ghotbi, B. Natelson, H. Tsiang, P.-E. Ceccaldi, *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 2147-2153.
- [122] F. Superti, M. Derer, H. Tsiang, *J. Gen. Virol.* **1984**, *65*, 781-789.
- [123] P. Lewis, Y. Fu, T. L. Lentz, *Muscle Nerve* **2000**, *23*, 720-730.
- [124] M. Lafon, *J. NeuroVirol.* **2005**, *11*, 82-87.
- [125] Y. Klingen, K. K. Conzelmann, S. Finke, *J. Virol.* **2008**, *82*, 237-245.
- [126] a) Y. Jacob, H. Badrane, P. E. Ceccaldi, N. Tordo, *J. Virol.* **2000**, *74*, 10217-10222; b) H. Raux, A. Flamand, D. Blondel, *J. Virol.* **2000**, *74*, 10212-10216.
- [127] a) A. A. V. Albertini, G. Schoehn, W. Weissenhorn, R. W. H. Ruigrok, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 282-294; b) X. Lahaye, *J. Virol.* **2009**, *83*, 7948-7958.
- [128] T. Mebatsion, M. König, K. K. Conzelmann, *Cell* **1996**, *84*, 941-951.
- [129] L. E. Iverson, J. K. Rose, *Cell* **1981**, *23*, 477-484.
- [130] a) K. K. Conzelmann, J. H. Cox, L. G. Schneider, H. J. Thiel, *Virology* **1990**, *175*, 485-499; b) N. Tordo, O. Poch, A. Ermine, G. Keith, F. Rougeon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 3914-3918.
- [131] P. Liu, J. Yang, X. Wu, Z. F. Fu, *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 3725-3734.
- [132] S. Finke, K. K. Conzelmann, *J. Virol.* **1997**, *71*, 7281-7288.
- [133] a) Y. Tang, O. Rampin, F. Giuliano, G. Ugolini, *J. Comp. Neurol.* **1999**, *414*, 167-192; b) G. Ugolini, *J. Comp. Neurol.* **1995**, *356*, 457-480.
- [134] K. Brzózka, S. Finke, K. K. Conzelmann, *J. Virol.* **2005**, *79*, 7673-7681.
- [135] L. Baloul, M. Lafon, *Biochimie* **2003**, *85*, 777-788.
- [136] A. C. Jackson, in *Advances in Virus Research*, Vol. Volume 79 (Ed.: C. J. Alan), Academic Press, **2011**, pp. 365-375.
- [137] Z. W. Wang, *J. Virol.* **2005**, *79*, 12554-12565.
- [138] M. Baltazard, M. Ghodssi, *Bull World Health Organ.* **1954**, *10*, 797-803.
- [139] a) G. M. Baer, S. A. Moore, J. H. Shaddock, H. B. Levy, *Bull World Health Organ.* **1979**, *57*, 807-813; b) T. G. Smith, X. Wu, R. Franka, C. E. Rupprecht, in *Advances in Virus Research*, Vol. 79 (Ed.: C. J. Alan), **2011**, pp. 345-363; c) T. J. Wiktor, B. Postle, M. Ho, H. Koprowski, *J. Infect. Dis.* **1972**, *126*, 408-418.
- [140] E. De Clercq, *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115-133.
- [141] F. Bussereau, M. Picard, J. Blancou, P. Sureau, *Acta Virol.* **1988**, *32*, 33-49.

- [142] Y.-J. Yang, P.-S. Zhao, T. Zhang, H.-L. Wang, H.-R. Liang, L.-L. Zhao, H.-X. Wu, T.-C. Wang, S.-T. Yang, X.-Z. Xia, *Virus Res.* **2012**, *169*, 169-174.
- [143] G. Castel, M. Chtéoui, G. Caignard, C. Préhaud, S. Méhouas, E. Réal, C. Jallet, Y. Jacob, R. W. H. Ruigrok, N. Tordo, *J. Virol.* **2009**, *83*, 10808-10820.
- [144] E. Real, J.-C. Rain, V. Battaglia, C. Jallet, P. Perrin, N. Tordo, P. Chrisment, J. D'Alayer, P. Legrain, Y. Jacob, *J. Virol.* **2004**, *78*, 7410-7417.
- [145] W. H. Wunner, C. Pallatroni, P. J. Curtis, *Arch. Virol.* **2004**, *149*, 1653-1662.
- [146] N. Israsena, P. Supavonwong, N. Ratanasetyuth, P. Khawplod, T. Hemachudha, *Antiviral Res.* **2009**, *84*, 76-83.
- [147] P. E. Brandão, J. G. Castilho, W. Fahl, P. Carnieli Jr., R. d. N. Oliveira, C. I. Macedo, M. L. Carrieri, I. Kotait, *Braz. J. Infect. Dis.* **2007**, *11*, 224-225.
- [148] a) P. K. Gupta, A. A. Sonwane, N. K. Singh, C. D. Meshram, S. S. Dahiya, S. S. Pawar, S. P. Gupta, V. K. Chaturvedi, M. Saini, *Virus Res.* **2012**, *163*, 11-18; b) A. A. Sonwane, S. S. Dahiya, M. Saini, V. K. Chaturvedi, R. P. Singh, P. K. Gupta, *Res. Vet. Sci.* **2012**, *93*, 498-503.
- [149] J. Willibald, PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München **2013**.
- [150] a) R. Ramer, B. Hinz, *J. Natl. Cancer Inst.* **2008**, *100*, 59-69; b) N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low, C. P. Leamon, *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 284-293; c) V. Clavey, S. Lestavel-Delattre, C. Copin, J. M. Bard, J. C. Fruchart, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **1995**, *15*, 963-971; d) M. Nakahara, H. Fujii, P. R. Maloney, M. Shimizu, R. Sato, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37229-37234.
- [151] S. Verma, F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 99-134.
- [152] J. Hong, Y. Huang, J. Li, F. Yi, J. Zheng, H. Huang, N. Wei, Y. Shan, M. An, H. Zhang, J. Ji, P. Zhang, Z. Xi, Q. Du, Z. Liang, *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2010**, *24*, 4844-4855.
- [153] H. Lee, A. K. Lytton-Jean, Y. Chen, K. T. Love, A. I. Park, E. D. Karagiannis, A. Sehgal, W. Querbes, C. S. Zurenko, M. Jayaraman, C. G. Peng, K. Charisse, A. Borodovsky, M. Manoharan, J. S. Donahoe, J. Truelove, M. Nahrendorf, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 389-393.
- [154] E. R. Wilson, M. B. Frankel, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3211-3212.
- [155] K. Shimokawa, K. Yamada, O. Ohno, Y. Oba, D. Uemura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 92-95.
- [156] J. Zhu, X. Zhu, E. T. Kang, K. G. Neoh, *Polymer* **2007**, *48*, 6992-6999.
- [157] L. H. Boudreau, N. Picot, J. Doiron, B. Villebonnet, M. E. Surette, G. A. Robichaud, M. Touaibia, *New J. Chem.* **2009**, *33*, 1932-1940.
- [158] S. S. Iyer, A. S. Anderson, S. Reed, B. Swanson, J. G. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4285-4288.
- [159] S. Oddi, F. Fezza, G. Catanzaro, C. De Simone, M. Pucci, D. Piomelli, A. Finazzi-Agrò, M. Maccarrone, *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2435-2444.
- [160] M. Oishi, Y. Nagasaki, N. Nishiyama, K. Itaka, M. Takagi, A. Shimamoto, Y. Furuichi, K. Kataoka, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1290-1297.
- [161] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.
- [162] a) M. Dubber, J. M. J. Fréchet, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *14*, 239-246; b) M. A. Maier, C. G. Yannopoulos, N. Mohamed, A. Roland, H. Fritz, V. Mohan, G. Just, M. Manoharan, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *14*, 18-29; c) Y. Singh, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362; d) J. C. Morales, J. J. Reina, I. Díaz, A. Aviñó, P. M. Nieto, R. Eritja, *Chem.--Eur. J.* **2008**, *14*, 7828-7835.
- [163] M. E. Davis, M. E. Brewster, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023-1035.
- [164] J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1754.
- [165] G. Wenz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 851-870.

- [166] a) C. O. Mellet, J. M. G. Fernandez, J. M. Benito, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1586-1608; b) A. M. O'Mahony, J. Ogier, R. Darcy, J. F. Cryan, C. M. O'Driscoll, *PloS one* **2013**, *8*, e66413.
- [167] I. Habus, Q. Zhao, S. Agrawal, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 327-331.
- [168] P. Jarho, A. Urtti, K. Järvinen, D. W. Pate, T. Järvinen, *Life sciences* **1996**, *58*, 181-185.
- [169] J. Defaye, S. Crouzy, N. Evrard, H. Law, in *PCT Int. Appl.*, (Centre National De La Recherche Scientifique, Fr.) **1999**.
- [170] R. Fuchs, N. Habermann, P. Klüfers, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 852-854.
- [171] S. Zhang, Y. Zhao, B. Zhao, B. Wang, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1003-1009.
- [172] P. J. Stover, *Nutr. Rev.* **2004**, *62*, S3-S12.
- [173] A. Antony, *Blood* **1992**, *79*, 2807-2820.
- [174] a) R. Zhao, S. H. Min, Y. Wang, E. Campanella, P. S. Low, I. D. Goldman, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4267-4274; b) A. Qiu, M. Jansen, A. Sakaris, S. H. Min, S. Chattopadhyay, E. Tsai, C. Sandoval, R. Zhao, M. H. Akabas, I. D. Goldman, *Cell* **2006**, *127*, 917-928.
- [175] B. A. Kamen, A. Capdevila, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 5983-5987.
- [176] H. Elnakat, M. Ratnam, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1067-1084.
- [177] M. A. Salazar, M. Ratnam, *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 141-152.
- [178] a) S. Chatterjee, E. R. Smith, K. Hanada, V. L. Stevens, S. Mayor, *EMBO J.* **2001**, *20*, 1583-1592; b) S. Sabharanjak, S. Mayor, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1099-1109; c) J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J.-X. Cheng, P. S. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13872-13877; d) J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J.-X. Cheng, P. S. Low, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 462-468.
- [179] a) E. Fuchs, T. Tumber, G. Guasch, *Cell* **2004**, *116*, 769-778; b) T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, I. L. Weissman, *Nature* **2001**, *414*, 105-111; c) C. E. Murry, G. Keller, *Cell* **2008**, *132*, 661-680.
- [180] A. Solanki, S. Shah, P. T. Yin, K.-B. Lee, *Sci. Rep.* **2013**, *3*.
- [181] a) L. Ding, F. Buchholz, *Stem Cell Rev.* **2006**, *2*, 11-18; b) A. Heidersbach, A. Gaspar-Maia, M. T. McManus, M. Ramalho-Santos, *Gene Ther.* **2006**, *13*, 478-486; c) L. Ding, I. Poser, M. Paszkowski-Rogacz, F. Buchholz, *Stem Cell Rev. Rep.* **2012**, *8*, 32-42.
- [182] S. Akhtar, I. F. Benter, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 3623-3632.
- [183] L. Armstrong, *Stem Cell Rev. Rep.* **2012**, *8*, 67-77.
- [184] B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **2000**, *403*, 41-45.
- [185] a) F. Fuks, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*, 490-495; b) A. Bird, *Genes Dev.* **2002**, *16*, 6-21; c) P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, *293*, 1068-1070.
- [186] X. Nan, H.-H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, A. Bird, *Nature* **1998**, *393*, 386-389.
- [187] S. K. T. Ooi, T. H. Bestor, *Cell* **2008**, *133*, 1145-1148.
- [188] H. Wu, Y. Zhang, *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2436-2452.
- [189] a) S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929-930; b) M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930-935.
- [190] a) S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300-1303; b) T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truß, M. Münzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeyer, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed., Engl.* **2011**, *50*, 7008-7012.
- [191] Y.-F. He, B.-Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C.-X. Song, K. Zhang, C. He, G.-L. Xu, *Science* **2011**, *333*, 1303-1307.
- [192] K. Williams, J. Christensen, K. Helin, *EMBO Rep.* **2012**, *13*, 28-35.

- [193] K. P. Koh, A. Yabuuchi, S. Rao, Y. Huang, K. Cunniff, J. Nardone, A. Laiho, M. Tahiliani, C. A. Sommer, G. Mostoslavsky, R. Lahesmaa, S. H. Orkin, S. J. Rodig, G. Q. Daley, A. Rao, *Cell stem cell* **2011**, *8*, 200-213.
- [194] A. Szwagierczak, S. Bultmann, C. S. Schmidt, F. Spada, H. Leonhardt, *Nucleic Acids Res.* **2010**.
- [195] a) K. Ui-Tei, Y. Naito, F. Takahashi, T. Haraguchi, H. Ohki-Hamazaki, A. Juni, R. Ueda, K. Saigo, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 936-948; b) T. Holen, M. Amarzguioui, M. T. Wiiger, E. Babaie, H. Prydz, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1757-1766.
- [196] a) R. Kretschmer-Kazemi Far, G. Sczakiel, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4417-4424; b) M. Manoharan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 570-579.
- [197] S. Jiang, Y. Fu, J. Williams, J. Wood, L. Pandarinathan, S. Avraham, A. Makriyannis, S. Avraham, H. K. Avraham, *PloS one* **2007**, *2*, e641.
- [198] C. Compagnucci, S. Di Siena, M. B. Bustamante, D. Di Giacomo, M. Di Tommaso, M. Maccarrone, P. Grimaldi, C. Sette, *PloS one* **2013**, *8*, e54271.
- [199] M. Chenik, M. Schnell, K. K. Conzelmann, D. Blondel, *J. Virol.* **1998**, *72*, 1925-1930.
- [200] M. J. Schnell, T. Mebatsion, K. K. Conzelmann, *EMBO J.* **1994**, *13*, 4195-4203.
- [201] a) P. S. Buckmaster, P. A. Schwartzkroin, *Hippocampus* **1994**, *4*, 393-402; b) H. E. Scharfman, C. E. Myers, *Front. Neural Circuits* **2013**, *6*.
- [202] Y. Kawamura, M. Fukaya, T. Maejima, T. Yoshida, E. Miura, M. Watanabe, T. Ohno-Shosaku, M. Kano, *The Journal of Neuroscience* **2006**, *26*, 2991-3001.
- [203] R. C. Petter, J. S. Salek, C. T. Sikorski, G. Kumaravel, F. T. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860-3868.