

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

Entwicklung und Anwendung komplexer siRNA-Strukturen

Korbinian Michael Maria Brunner
aus
München

2021

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, 13.02.2022

.....Korbinian Brunner.....

Korbinian Brunner

Dissertation eingereicht am 19.04.2021

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Bein

Mündliche Prüfung am 31.05.2021

Danksagung

Meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* möchte für das mir geschenkte Vertrauen und seine Geduld danken. Ein interessanteres Forschungs-Projekt hätte ich mir nicht wünschen können. Ohne die fantastische Ausstattung und die freundschaftliche und anregende Zusammenarbeit in einem sehr interdisziplinären Kollegium wäre eine Arbeit auf diesem Thema undenkbar.

Prof. Dr. Thomas Bein danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Markus Müller möchte ich für seine Hilfsbereitschaft und sein immer offenes Ohr danken. Besonders bei technischen Problemen und bei der Einarbeitung in alle Fragestellungen im Zuge der Untersuchung der RNAi in Pflanzen war seine Hilfe unersetztlich.

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

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an meine Laborkollegen *Felix Gnerlich, Arne Schröder, Edris Parsa, René Rahimoff, Johannes Harder* und *Martin Rossa* richten. Die anregenden fachlichen Gespräche und der große Spaß im Labor und privat machten die gemeinsame Zeit unvergesslich.

Auch möchte ich meinen Studenten *Tanja Lüdtke, Sebastian Neidig, Christina Buchecker, Thomas Bartelmann, Irina Knoll* und *Alexander Wagner* für die Mitarbeit an den verschiedenen Projekten danken.

Den größten Dank möchte ich *Johannes Harder* aussprechen. Zum einen für die tolle Vorarbeit auf dem Thema der Liganden-modifizierten siRNA zusammen mit *Julian Willibald*. Besonders aber für die unermüdliche Unterstützung bei der Fertigstellung und Korrektur dieser Arbeit.
Vielen Dank für deine Freundschaft.

Neben meinen Eltern und meiner Schwester gilt mein größter persönlicher Dank meiner Frau Jeanne-Maike für die bedingungslose Unterstützung. Danke für den Rückhalt, den ich immer bei euch finden kann.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

K. Brunner*, J. Harder*, T. Halbach*, J. Willibald, F. Spada, Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, K-K Conzelmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1946-1949, *Cell-penetrating and neurotargeting dendritic siRNA nanostructures*.

* equal contribution

S. Datz, C. Argyo, M. Gattner, V. Weiss, K. Brunner, J. Bretzler, C. von Schirnding, AA. Torrano, F. Spada, M. Vrabel, H. Engelke, C. Bräuchle, T. Carell, T. Bein, *Nanoscale* **2016**, *8*, 8101-8110, *Genetically designed biomolecular capping system for mesoporous silica nanoparticles enables receptor-mediated cell uptake and controlled drug release*.

M. Vrabel, P. Kölle, KM. Brunner, MJ. Gattner, V. López-Carrillo, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 13309-13312, *Norbornenes in inverse electron-demand Diels-Alder reactions*.

Patent:

WO-2015107115-A1/US20160333364A1, *Saccharide-modified nucleic acid molecules*, Inventor: Thomas Carell, Application status granted.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	VII
SUMMARY.....	XIII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 RNA-INTERFERENZ	1
1.1.1 <i>miRNA</i>	2
1.1.2 <i>siRNA</i>	3
1.1.3 <i>Mechanismus der RNA-Interferenz</i>	4
1.1.4 <i>Rolle der RNAi in der Zelldifferenzierung</i>	6
1.2 RNAI IN PFLANZEN	8
1.3 RNAI AUF DEM WEG ZU EINEM THERAPEUTISCHEN EINSATZ IM MENSCHEN.....	12
1.3.1 <i>Off-target-Effekte und Immunantwort durch siRNA</i>	13
1.3.2 <i>Transport von siRNA</i>	13
1.3.3 <i>Oligonukleotid-Konjugate</i>	15
1.3.4 <i>Klinische Anwendungen von siRNA</i>	21
2. AUFGABENSTELLUNG	24
3. ENTWICKLUNG MULTIMERER GLUCOSE-MODIFIZIERTER SIRNA	26
3.1 SYNTHESE ALKIN-MODIFIZIERTER SIRNA	27
3.2 SYNTHESE EINES GLUCOSE-TRIAZIDS.....	29
3.3 SYNTHESE EINER TRIMEREN GLUCOSE-SIRNA-STRUKTUR	31
3.4 EVALUIERUNG UNTERSCHIEDLICHER TRIMERER SIRNA-KONSTRUKTE	33
3.4.1 <i>Evaluierung einer trimeren Glucose-siRNA-Struktur</i>	35
3.4.2 <i>Vergleich unterschiedlicher trimerer siRNA-Konstrukte</i>	36
3.5 UNTERSUCHUNG DER AUFNAHME GLUCOSE-MODIFIZIERTER SIRNA.....	39
4. REGULATION DER EXPRESSION DURCH LIGANDEN-MODIFIZIERTE SIRNA IN ARABIDOPSIS THALIANA	43
4.1 UNTERSUCHUNG DER AUFNAHME VON LIGANDEN-MODIFIZIERTER SIRNA.....	43
4.2 EVALUIERUNG VON LIGANDEN-MODIFIZIERTEN SIRNAS DURCH AUFNAHME ÜBER DIE WURZELN....	47
4.3 EVALUIERUNG VON LIGANDEN-MODIFIZIERTEN SIRNAS DURCH AUFNAHME ÜBER DIE BLÄTTER	52
5. TRANSDIFFERENZIERUNG VON FIBROBLASTEN DURCH LIGANDEN-MODIFIZIERTE SIRNA	55
5.1 SYNTHESE UND MODIFIKATION VON SIRNA GEGEN PTBP1	56
5.2 EVALUIERUNG DER TRANSDIFFERENZIERUNG DURCH MODIFIZIERTE SIRNAS	58

6. ZELLSPEZIFISCHE AUFNAHME VON HOCHFUNKTIONALISIERTEN MESOPORÖSEN SILICA-NANOPARTIKELN	62
6.1 BIOORTHOGONALE CLICKREAKTIONEN	63
6.2 SYNTHESE EINES TETRAZIN-FUNKTIONALISIERTEN ANANDAMIDS.....	65
6.3 FUNKTIONALISIERUNG VON NANOPARTIKELN MIT FOLSÄURE UND ANANDAMID.....	67
6.4 REZEPTORVERMITTELTE AUFNAHME VON HOCHFUNKTIONALISIERTEN MESOPORÖSEN SILICA-NANOPARTIKELN.....	68
7. AUSBLICK	71
8. EXPERIMENTELLER TEIL	72
8.1.1 <i>Material und Methoden</i>	72
8.2 SYNTHESEVORSCHRIFTEN	75
8.2.1 <i>Synthese eines Glucose-Triazids</i>	75
8.2.2 <i>Synthese eines Anandamid-Tetrazins</i>	83
8.3 OLIGONUKLEOTIDSYNTHESЕ UND CLICK-MODIFIKATION	89
8.3.1 <i>Oligonukleotidsynthese:</i>	89
8.3.2 <i>Entschützung und Aufreinigung von Oligonukleotiden</i>	89
8.3.3 <i>Aufreinigung von Oligonukleotiden</i>	90
8.3.4 <i>Click-Modifizierung von Oligonukleotiden</i>	91
8.4 ZELL-, MIKRO- UND MOLEKULARBIOLOGISCHES ARBEITEN	95
8.4.1 <i>Material und Methoden</i>	95
8.4.2 <i>Zellkulturtechnik</i>	96
8.5 ARBEITEN MIT ARABIDOPSIS THALIANA	101
8.5.1 <i>Material und Methoden</i>	101
8.5.2 <i>Kultivieren von Arabidopsis thaliana</i>	101
8.5.3 <i>Untersuchung der Aufnahme von modifizierten siRNA</i>	102
8.6 BIOORTHOGONALE MODIFIKATION VON NANOPARTIKELN	104
9. LITERATURVERZEICHNIS	106

ZUSAMMENFASSUNG

Als RNA-Interferenz (RNAi) wird ein zellulärer Mechanismus bezeichnet, durch den kurze doppelsträngige RNA-Moleküle (*small interfering RNAs*, siRNAs) sequenzspezifisch die Expression eines Gens inhibieren können.^[1] Gut zwanzig Jahre nachdem *Andrew Fire* und *Craig Mello* für die Entdeckung dieses Vorgangs mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden, konnte mit *Patisiran* (*Onpattro®*, *Alnylam Pharmaceuticals*) erstmals das Potential der RNAi für therapeutische Einsätze demonstriert werden.^[2] Eine große Herausforderung bei einem solchen Einsatz ist der Transport der mehrfach negativ geladenen siRNAs durch die hydrophobe Zellmembran in das Innere der Zielzelle.^[3] Eine besonders vielversprechende Strategie ist die Verknüpfung der siRNA mit einem Rezeptor-Liganden. Auf diesem Weg ist ein Transport der Oligonukleotide in Zellen der Zielgewebe ohne die zum Teil erheblichen Nachteile klassischer Transfektionsmethoden möglich. Um die Effizienz der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von siRNA zu steigern, wurden unter Mitarbeit des Autors verzweigte Strukturen entwickelt, in denen mehrere siRNAs mit einem Liganden verknüpft sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte dieses Konzept um das von *Prof. Thomas Carell* zum Patent angemeldete Glucose-Ligandsystem erweitert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Synthese für ein dendritisches Glucose-Triazid (**1**) entwickelt (Abbildung I).

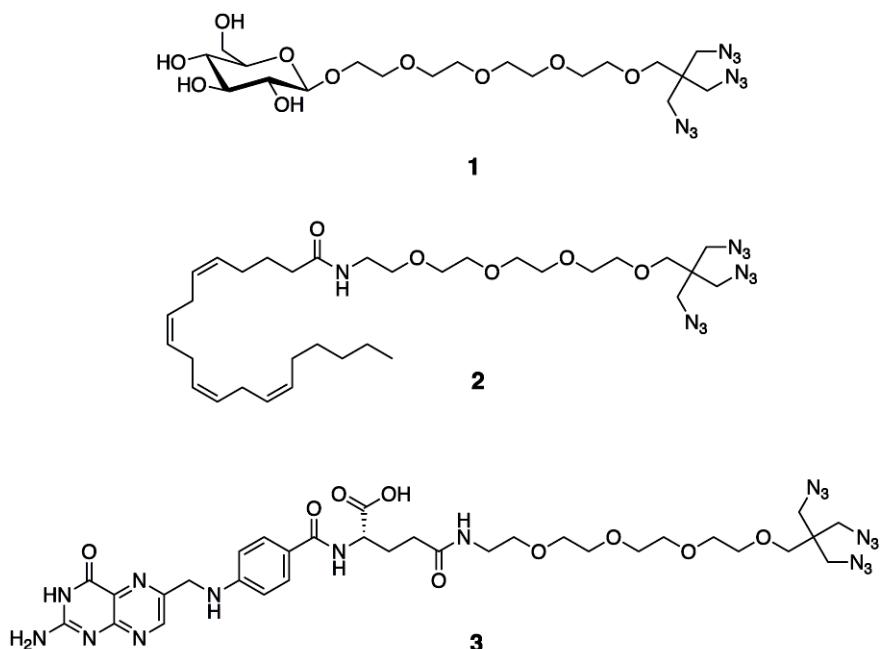


Abbildung I: Exemplarisch aufgeführte Liganden mit dreifacher Azidmodifizierung zur Synthese verzweigter siRNA-Strukturen. Hergestellt wurde ein Glucose-Triazid **1** und die biologische Aktivität der daraus resultierenden siRNA-Dendrimere wurde mit den von *Julian Willibald* und *Johannes Harder* entwickelten Anandamid-**2** und Folsäure-Triazid **3** verglichen.

Unter Verwendung von Click-Chemie wurde das synthetisierte Glucose-Triazid **1** mit Alkin-modifizierten RNA-Oligonukleotiden umgesetzt. Die so hergestellten verzweigten siRNA-Strukturen wurden mittels eines Luciferase-basierten Assays in HeLa und RBL-2H3-Zellen auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Ein Vergleich mit monomerer Glucose-modifizierten siRNA zeigte eine deutliche größere Regulation durch die trimere Glucose-siRNA. Des Weiteren wurde die trimere Glucose-siRNA auch mit einem kommerziell verfügbaren Transfektionsreagenz (*jetPRIME™*) verglichen. Die verzweigte Glucose-modifizierte Struktur erreichte dabei einen vergleichbar großen Einfluss auf die Expression der Luciferase wie das kationische Transfektionsreagenz. Auch wurde das Glucose-Ligandensystem mit den anderen Ligandensystemen (Abbildung II A), B)) verglichen und somit die breite Anwendbarkeit der verzweigten Liganden-siRNA-Strukturen erfolgreich demonstriert.

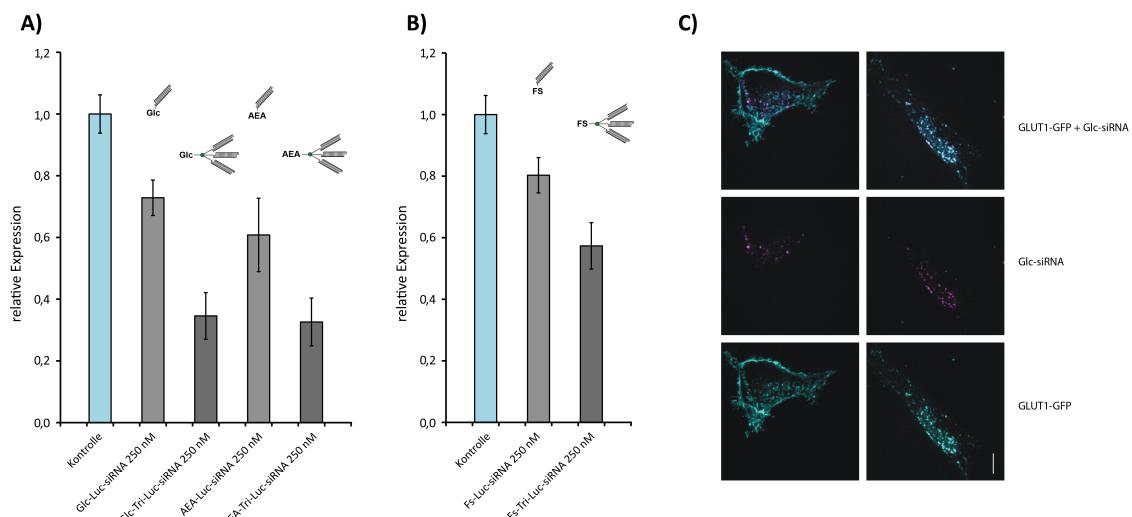


Abbildung II: Regulation der *Renilla*-Luciferase durch siRNAs mit unterschiedlicher Liganden-Modifizierung bei einer einheitlichen Konzentration von 250 nM bezogen auf den siRNA-Duplex. A) Vergleich der Regulation durch Glucose (Glc)-modifizierte und Anandamid (AEA)-modifizierte siRNA-Strukturen in RBL-2H3-Zellen. B) Regulation durch Folsäure (FS)-modifizierte siRNA in HeLa-Zellen. Die Strukturen der verwendeten Konstrukte sind über den jeweiligen Diagrammspalten symbolisch dargestellt. C) Konfokalmikroskopische Aufnahme von HeLa-Zellen, die GLUT1-GFP exprimieren nach Inkubation mit einer unspezifischen Alexa Fluor® 647-gelabelten Glc-siRNA. Dargestellt sind die Fluoreszenz von GLUT1-GFP (unten), Alexa Fluor® 647-gelabelter Glc-siRNA (Mitte) und die simultane Wiedergabe beider Fluoreszenzen (oben).

Um einen genaueren Einblick in den Ablauf und die Anwendbarkeit einer Glucose-vermittelten Aufnahme von siRNA zu erhalten, wurde diese in Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Christoph Bräuchle* näher untersucht. Dazu wurden Glucose-modifizierte siRNAs zusätzlich mit Alexa 647 markiert und konfokalmikroskopisch die Aufnahme in unterschiedliche Zellen verfolgt. Durch die Verwendung von HeLa-Zellen, die ein GLUT1-GFP-Fusionsprotein exprimieren, konnte dabei gezeigt werden, dass die Liganden-modifizierte siRNA eine deutliche Kolokalisation mit GLUT1 aufweist (Abbildung II C)). Diese Beobachtung legt nahe, dass dieser Glucose-Transporter an der Aufnahme von Glucose-modifizierter siRNA beteiligt ist.^[4]

Da RNA-Interferenz in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung in der Entwicklung krankheits- und schädlingsresistenter Pflanzen gewinnt, wurde im zweiten Teil der Arbeit die Anwendbarkeit Liganden-modifizierter siRNAs zur systemischen Regulation in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Im

ersten Schritt wurden dazu fluoreszenzmarkierte RNA-Doppelstrände mittels Click-Chemie mit Glucose-Azid (**4**) und Indol-3-Essigsäure-Azid (**5**) modifiziert (Abbildung III). Indol-3-Essigsäure ist eines der häufigsten Phytohormone und beeinflusst das Zellwachstum und die Zellteilung^[5], während Glucose neben Saccharose der wichtigste gelöste Zucker in den meisten Pflanzen ist.^[6]

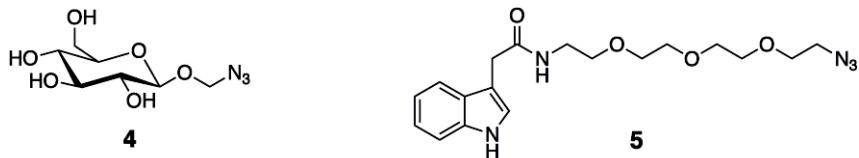


Abbildung III: Darstellung der beiden Liganden-Azide zur Modifikation von RNA-Oligonukleotiden für Aufnahmestudien in *Arabidopsis thaliana*. Verwendet wurden Glucose-Azid 4 und Indol-3-Essigsäure-Azid 5.

Beide Substanzen werden auf vielen unterschiedlichen Wegen von Pflanzen aufgenommen und systemisch verbreitet.^[7] Daher wurde konfokalmikroskopisch die Aufnahme der so modifizierten Oligonukleotide über die Wurzeln untersucht. Dabei konnte eine effiziente Aufnahme der Glucose-modifizierten RNA und deren Weiterleitung durch die Leitbündel beobachtet werden (Abbildung IV A)). Um die biologische Aktivität der so aufgenommenen Oligonukleotide beurteilen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit der BASF fünf funktionell aktive siRNAs gegen Schlüsselgene in wichtigen Biosynthesewegen von *Arabidopsis thaliana* synthetisiert. Die Wahl der Zielgene sollte zu einem deutlich erkennbaren Phänotyp führen, was eine schnelle und einfache Beurteilung der Expressionskontrolle durch erfolgreiche RNAi ermöglicht.

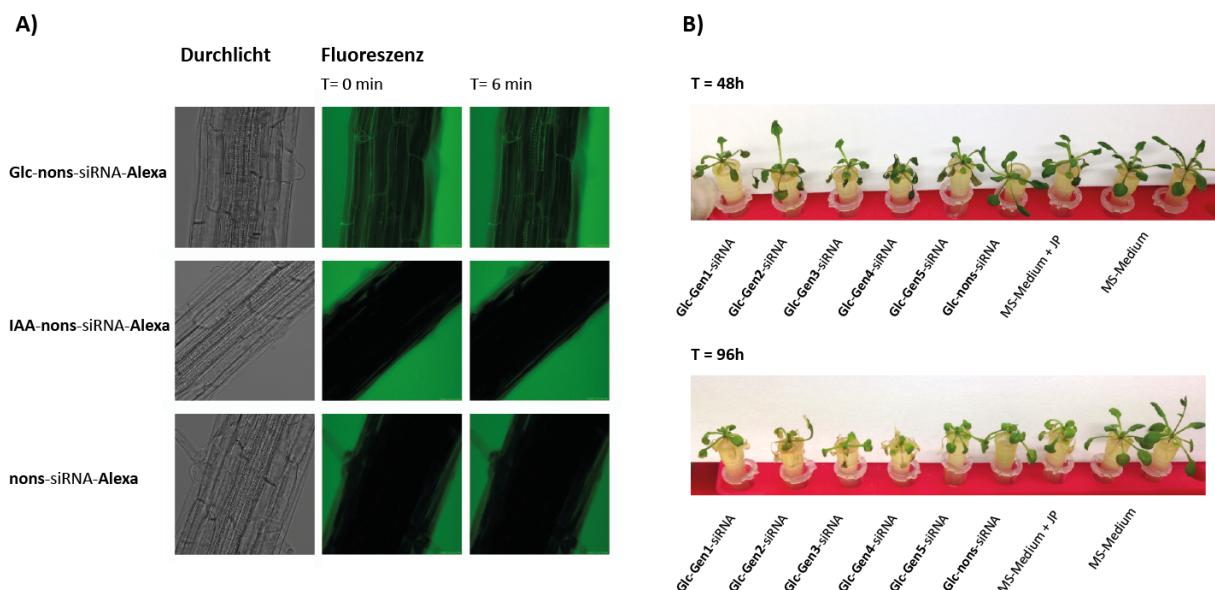


Abbildung IV: A) Zusammenstellung konfokalmikroskopischer Aufnahmen unterschiedlich behandelter Wurzeln. Dazu wurden Glucose (**Glc-nons-siRNA-Alexa**) sowie Indolessigsäure-modifizierte siRNA (**IAA-nons-siRNA-Alexa**) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde nonsense-siRNA mit Alexa Fluor® 647 (**nons-siRNA-Alexa**) ohne Liganden-Modifizierung eingesetzt. B) Exemplarische Darstellung von *Arabidopsis thaliana* 48 h und 96 h nach der Behandlung mit unterschiedlichen Glucose-modifizierten siRNAs.

Die fünf siRNAs wurden mittels Click-Chemie mit den beiden erwähnten Liganden modifiziert (Abbildung III) und ihr Potential zu einer systemischen RNAi sowohl durch eine Aufnahme über die

Wurzeln als auch über die Blätter betrachtet. Dabei konnte an *Arabidopsis thaliana*, die Glucose-modifizierte siRNA über die Wurzeln aufgenommen hatten, ein deutlich verändertes Erscheinungsbild beobachtet werden. Bereits nach 48 h zeigten alle Pflanzen ein deutlich verzögertes Wachstum im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der Einfluss der funktionell aktiven Glucose-modifizierten siRNAs auf den Phänotyp verstärkte sich über den Beobachtungszeitraum entsprechend des Zielgens der jeweiligen siRNA (Abbildung IV B)).

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Redifferenzierung von Fibroblasten zu Neuronen, einem relevanten Bereich der regenerativen Medizin. Eine effiziente Methode Nervenzellen aus gut verfügbaren Patientenzellen zu gewinnen ist ein wichtiger Schritt zur Behandlung von schweren Schädigungen des Nervensystems ohne Abstoßreaktion. In einer internen Kooperation mit *Fabio Spada* wurden dazu Fibroblasten mit Glucose- und Anandamid-modifizierten siRNAs gegen PTBP1 behandelt. PTBP1 nimmt eine zentrale Rolle bei der neuronalen Differenzierung ein. So konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von PTBP1 eine Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Neuronen zur Folge hat, was unter anderem mit seinem Einfluss auf alternative Spleißvorgänge zusammenhängt.^[8] Ein Produkt alternativen Spleißens ist die neuronen-spezifische Isoformen PTBP2.^[9] Da PTBP2 erst in Neuronen exprimiert wird, wurde seine Expression als Indikator für eine Differenzierung in Neuronen herangezogen (Abbildung V A)).^[10]

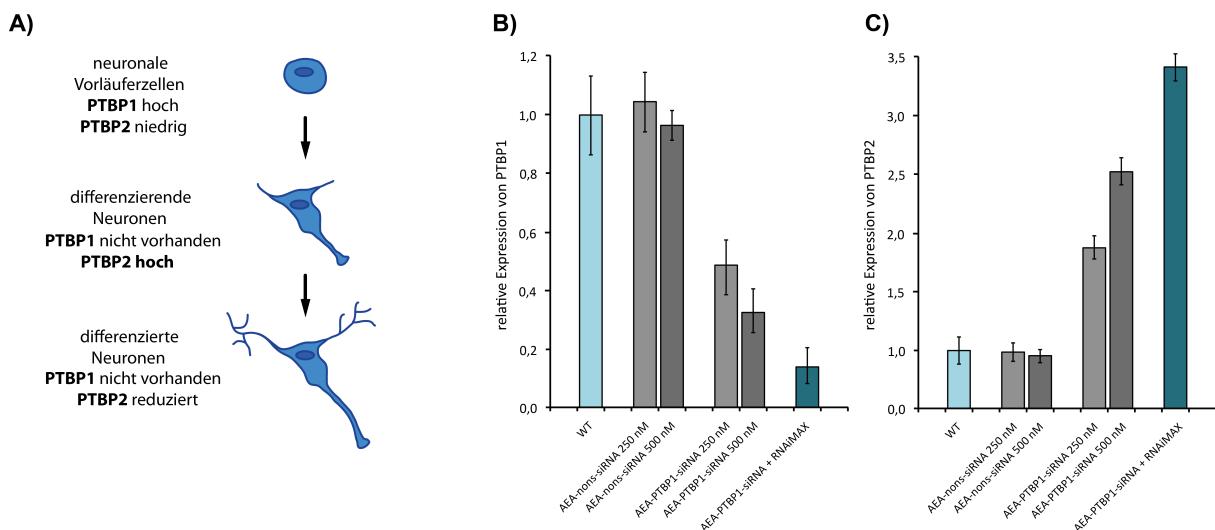


Abbildung V: A) Unterschiedliche Expression von PTBP1 und PTBP2 während der neuronalen Differenzierung. Somatische Zellen und neuronale Vorläuferzellen exprimieren in erster Linie PTBP1. Nach der Induktion der neuronalen Differenzierung sinkt das Expressionslevel von PTBP1 und die Expression von PTBP2 wird induziert. Nach der Reifung zu differenzierten Neuronen sinkt das Expressionslevel von PTBP2.^[11] B) Regulation von PTBP1 in Fibroblasten durch Anandamid-modifizierte AEA-PTBP1-siRNA. C) Relative Expression von PTBP2. Die verwendete AEA-PTBP1-siRNA wurde auch mittels Lipofectamin RNAiMAX in die Zellen transfiziert. Als Kontrollexperiment wurden die Zellen auch mit einer AEA-nons-siRNA behandelt. Die relative Expression wurde über das relative mRNA-Level mittels quantitativer *realtime PCR* bestimmt.

Dabei konnte durch die Behandlung mit Anandamid-modifizierter siRNA eine deutlich verringerte Expression von PTBP1 erreicht werden. Da eine damit korrelierende erhebliche Zunahme der Expression von PTBP2 beobachtet wurde, konnte eine eingeleitete Redifferenzierung der Fibroblasten zu Neuronen bestätigt werden (Abbildung V B), C)).

Im vierten Teil dieser Arbeit sollte eine bioorthogonale Modifizierung von Proteinen mit Rezeptorliganden ermöglicht werden. Diese Modifizierung sollte dabei auf einer Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA) zwischen einem Tetrazinderivat und einer Norbornen-modifizierten Aminosäure erfolgen. Die Anwendbarkeit der so hergestellten Protein-Ligand-Hybridstrukturen sollte durch den selektiven Transport beliebig beladbarer Silica-Nanopartikeln für den gezielten Wirkstofftransport demonstriert werden.

Dazu wurden in Zusammenarbeit mit *Milan Vrabel* zunächst unterschiedliche Tetrazinderivate hergestellt. Diese Verbindungen wurden anschließend bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber unterschiedlichen Norbornenderivaten hin untersucht. Anschließend wurde eine Synthese entwickelt, durch die ein in Bezug auf Reaktivität und Isolierbarkeit optimiertes Tetrazin mit einem Anandamid verknüpft werden konnte (Abbildung VI).

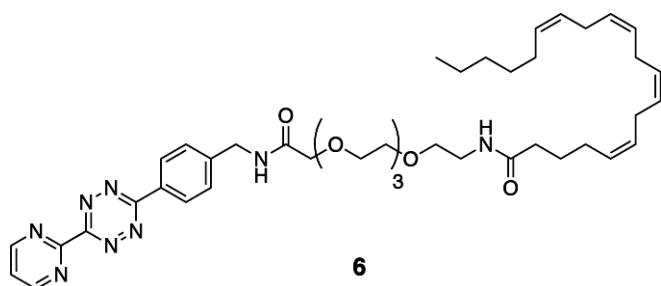


Abbildung VI: Darstellung des hergestellten Tetrazin-modifizierten Anandamid-Liganden **6** zur schonenden bioorthogonalen Modifikation einer Norbornen-modifizierten Carboanhydrase.

Der so hergestellte Tetrazin-modifizierte Anandamid-Ligand **6** wurde in einer Kooperation mit der Gruppe von *Prof. Thomas Bein* zur zellspezifischen Aufnahme von hochfunktionalisierten, beliebig beladbaren Silica-Nanopartikeln eingesetzt. Dazu wurde die Oberfläche der Nanopartikel mit Sulfonamiden behandelt, wodurch die Bindung einer Carboanhydrase über eine Enzym-Substrat-Bindung möglich ist. Das gebundene Enzym verschließt die zuvor beladenen Poren des Silica-Nanopartikels. Verwendet wurde eine Norbornen-funktionalisierte Carboanhydrase, die abschließend in einer bioorthogonalen Click-Reaktion mit dem Anandamid-Liganden modifiziert wurde (Abbildung VII).

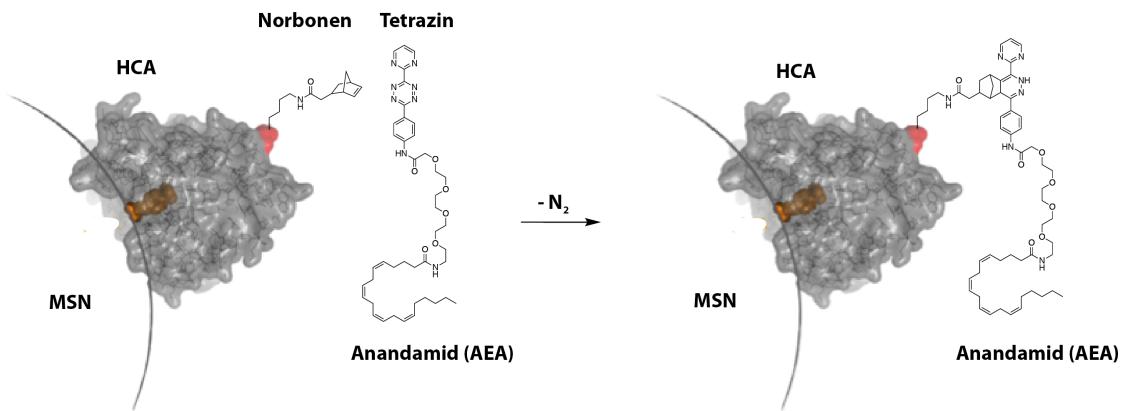


Abbildung VII: : Diels-Alder Reaktion zur Modifikation von hochfunktionalisierten Mesoporösen Silica-Nanopartikeln (MSN). Eine Norbornen-funktionalisierte humane Carboanhydrase (grau) bindet mit ihrem aktivem Zentrum (orange) ein auf der Oberfläche eines MSN liegendes Sulfonamid. Die Norbornen-modifizierte Aminosäure befindet sich an der gegenüberliegenden Seite der Sekundärstruktur des Enzyms (rot). Die bioorthogonale Click-Reaktion zwischen einem Tetrazin-modifizierten Anandamid (AEA) und der Norbornen-Aminosäure führt zur Bildung eines Dihydropyridazins.

Anschließend wurde die Aufnahme der so modifizierten Nanopartikel in neuronale Stammzellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Modifikation mit Anandamid zu einem effizienten Transport in diese schwer zu transfizierende Zellen führt, der ohne die Liganden-Modifikation kaum nachweisbar war.

SUMMARY

RNA interference (RNAi) is a cellular mechanism by means of which short double-stranded RNA molecules (*small interfering* RNAs, siRNAs) can specifically inhibit the expression of a gene.^[1] Twenty years after *Andrew Fire* and *Craig Mello* were awarded the Nobel Prize in Medicine for discovering this process, *Patisiran* (*Onpattro®*, *Alnylam Pharmaceuticals*) was the first drug to demonstrate the potential of RNAi for therapeutic use.^[2] A major challenge for such an application is the transport of the multiply negatively charged siRNAs through the hydrophobic cell membrane into the interior of the target cell.^[3] A particularly promising strategy consists in linking the siRNA with a receptor ligand. In this way, a cell-specific uptake of oligonucleotides into cells of the target tissue is possible without the sometimes considerable disadvantages of classical transfection methods. In order to increase the efficiency of the receptor-mediated uptake of siRNA, branched structures were developed with participation of the author in which several siRNAs are linked to one ligand.^[12] In the first part of this thesis, this concept was expanded to include the glucose-ligand system of *Prof. Thomas Carell* (patent granted). For this reason, a synthesis of a dendritic glucose triazide (**1**) was developed (Figure I).

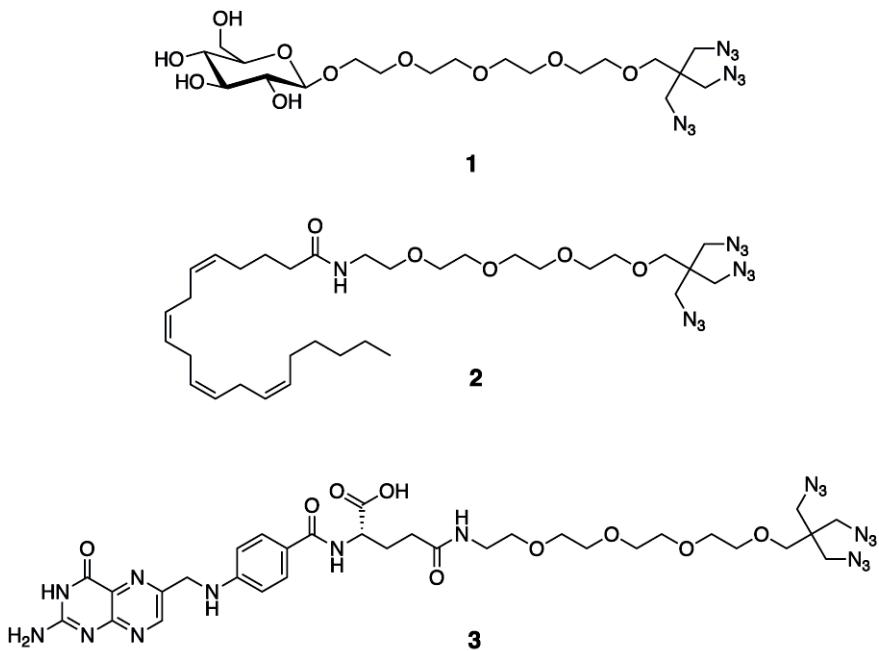


Figure I: Exemplary listed ligands with triple azide modification for the synthesis of branched siRNA structures. A glucose triazide **1** was prepared and the biological activity of the resulting siRNA dendrimers was compared with the anandamide triazide **2** and folic acid triazide **3** developed by Julian Willibald and Johannes Harder.

Using click chemistry, the synthesized glucose triazide **1** was reacted with alkyne-modified RNA oligonucleotides. The branched siRNA structures thus prepared were examined for biological activity by means of a luciferase-based assay in HeLa and RBL2H3 cells. A comparison with monomeric glucose-modified siRNA revealed a significantly greater regulation by the trimeric glucose siRNA.

Furthermore, the trimeric glucose siRNA was also compared with a commercially available transfection reagent (*jetPRIME*™). The branched glucose-modified structure achieved a comparably influence on the expression of luciferase as the cationic transfection reagent. Also, the glucose-ligand system was compared with the other ligand systems (Figure II A), B)) and thus successfully demonstrated the broad applicability of the branched ligand siRNA structures.

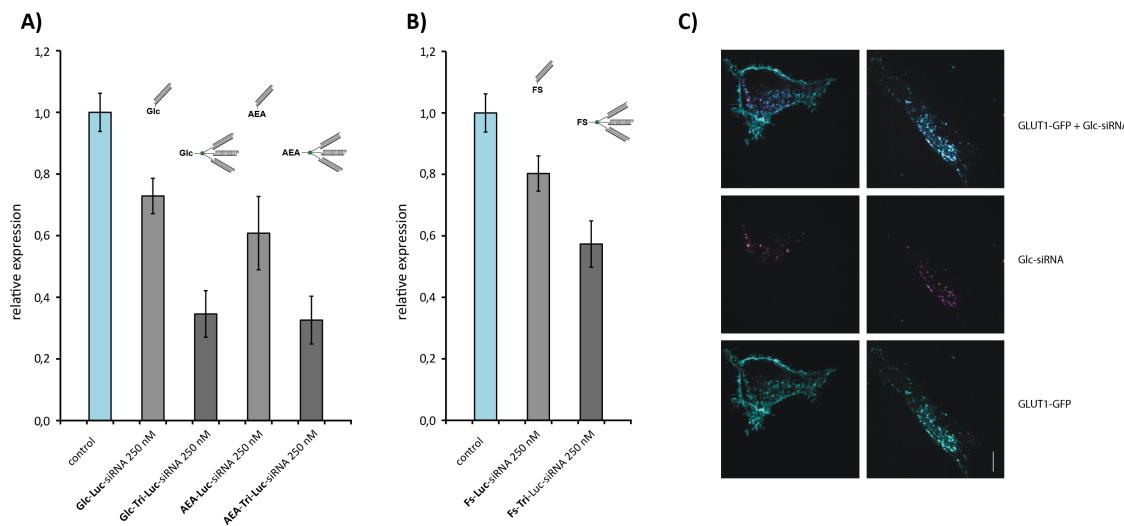


Figure II: Regulation of Renilla luciferase by siRNAs with different ligand modification at a uniform concentration of 250 nM with respect to the siRNA duplex. A) Comparison of regulation by glucose (Glc)-modified and anandamide (AEA)-modified siRNA structures in RBL-2H3 cells. B) Regulation by folic acid (FS)-modified siRNA in HeLa cells. The structures of the constructs used are symbolically represented over the respective diagram columns. C) Confocal micrograph of HeLa cells expressing GLUT1-GFP after incubation with a non-specific Alexa Fluor® 647-labeled Glc-siRNA. Shown are the fluorescence of GLUT1-GFP (bottom), Alexa Fluor® 647-labeled Glc-siRNA (center) and the simultaneous display of both fluorescences (top). A colocalization of the two fluorescence signals is recognizable.

In cooperation with the group of Prof. *Christoph Bräuchle* the glucose-mediated uptake of siRNA was examined in order to obtain more detailed insight into the course and applicability. For this purpose, glucose-modified siRNAs, that were additionally labeled with Alexa 647, were monitored by confocal microscopy regarding their uptake into different cells. By using HeLa cells expressing a GLUT1-GFP fusion protein, it could be shown that the ligand-modified siRNA shows a significant colocalization with GLUT1 (Figure II C)). This observation suggests that this glucose transporter is involved in the uptake of glucose-modified siRNA.^[4]

Since RNA interference has become increasingly important for the development of disease- and pest-resistant plants in recent years, the applicability of ligand-modified siRNAs for systemic regulation in *Arabidopsis thaliana* was investigated in the second part of this thesis. In a first step, fluorescence-labeled RNA double strands were modified by click chemistry with glucose azide (**4**) and indole-3-acetic acid azide (**5**) (Figure III). Indole-3-acetic acid is one of the most common phytohormones and affects cell growth and cell division^[5], while glucose, in addition to sucrose, is the most important dissolved sugar in most plants.^[6]

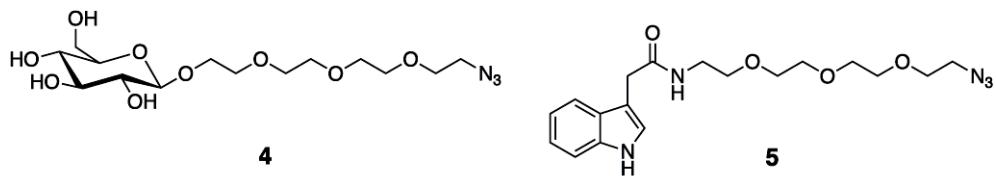


Figure III: Representation of the two ligand azides for the modification of RNA oligonucleotides for uptake studies in *Arabidopsis thaliana*. Glucose-azide **4** and indole-3-acetic acid-azide **5** were used.

Both substances are in many different ways absorbed by plants and systemically disseminated.^[7] Therefore, the uptake of the modified oligonucleotides via the roots was investigated by confocal microscopy. An efficient uptake of the glucose-modified RNA and its distribution through the vascular bundles could be observed (Figure IV A)). In order to assess the biological activity of the oligonucleotides thus obtained, five functionally active siRNAs against key genes in important biosynthetic pathways of *Arabidopsis thaliana* were synthesized in collaboration with BASF. The choice of target genes should lead to a clearly recognizable phenotype, allowing a quick and easy assessment of expression control by successful RNAi.

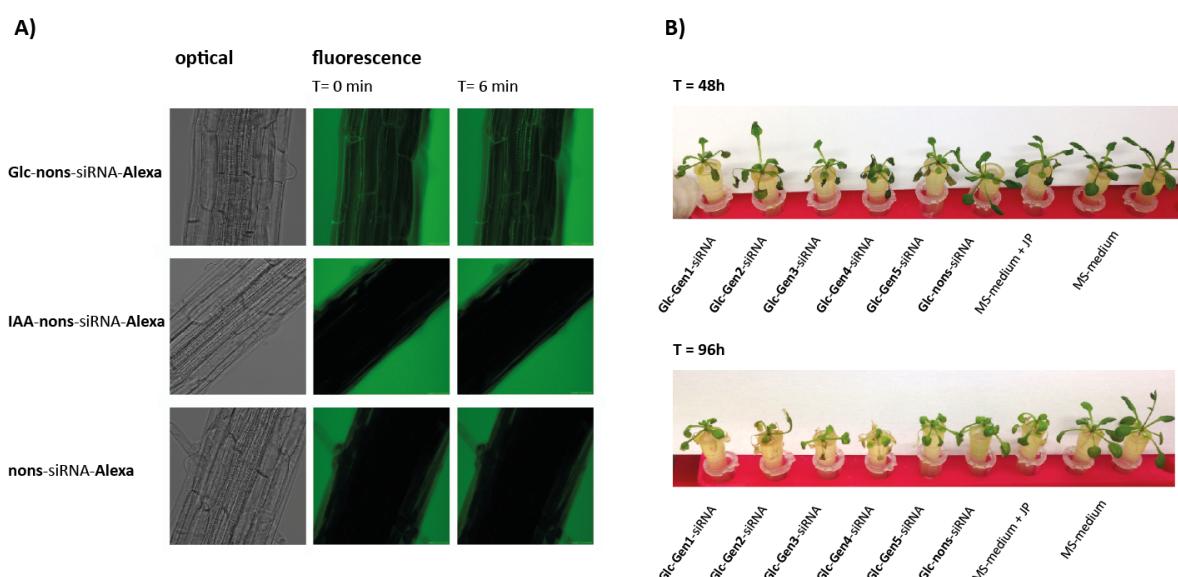


Figure IV: A) Compilation of confocal micrographs of differently treated roots. Glucose (**Glc-nons-siRNA-Alexa**) and indoleacetic acid-modified siRNA (**IAA-nons-siRNA-Alexa**) were used for this purpose. The negative control used was nonsense siRNA with Alexa Fluor® 647 (**nons-siRNA-Alexa**) without ligand modification. B) Exemplary representation of *Arabidopsis thaliana* 48 h and 96 h after treatment with different glucose-modified siRNAs.

The five siRNAs were modified by means of click chemistry with the two ligands (Figure III), and their potential for systemic RNAi was assessed by uptake via the roots as well as through the leaves. In this case, *Arabidopsis thaliana*, which had taken up glucose-modified siRNA via the roots, had a distinctly different appearance. Already after 48 h, all plants showed a significantly delayed growth compared to the control group. The influence of the functionally active glucose-modified siRNAs on the phenotype increased over the observation period corresponding to the target gene of the respective siRNA (Figure IV B)).

The third part of this thesis deals with the redifferentiation of fibroblasts into neurons, a relevant field of regenerative medicine. An efficient method of obtaining nerve cells from well-available patient cells is an important step in the treatment of severe nervous system damage without rejection. In an internal collaboration with *Fabio Spada*, fibroblasts were treated with glucose- and anandamide-modified siRNAs against PTBP1. PTBP1 plays a central role in neuronal differentiation. It has been shown that reduced expression of PTBP1 results in transdifferentiation of fibroblasts into neurons, mainly because of its influence on alternative splicing.^[8] A product of alternative splicing is the neuron-specific isoform PTBP2.^[9] Since PTBP2 is first expressed in neurons, its expression was used as an indicator of differentiation into neurons (Figure V A)).^[10]

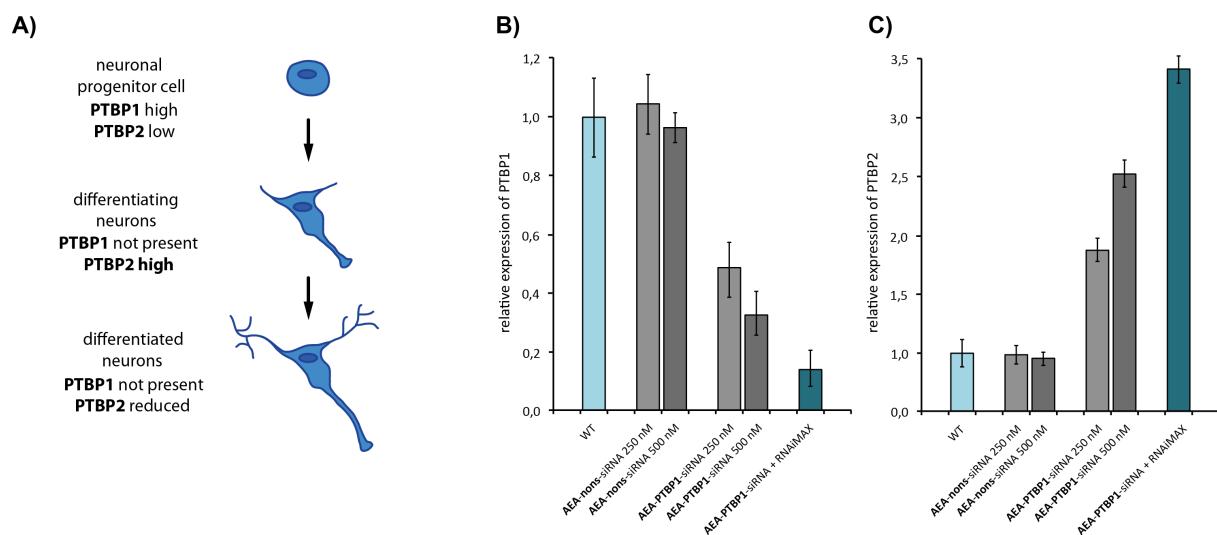


Figure V: Different expression of PTBP1 and PTBP2 during the neuronal differentiation. Somatic cells and neuronal progenitor cells primarily express PTBP1. Upon induction of neuronal differentiation, the expression level of PTBP1 decreases and expression of PTBP2 is induced. After maturation into differentiated neurons, the expression level of PTBP2 decreases again.^[11] B) Regulation of PTBP1 in fibroblasts by anandamide-modified **AEA-PTBP1-siRNA**. C) Relative expression of PTBP2. The **AEA-PTBP1-siRNA** used was also transfected into the cells by Lipofectamine RNAiMAX. As a control experiment, the cells were also treated with an **AEA-nons-siRNA**. The relative expression was determined via the relative mRNA level by means of quantitative real-time PCR.

The treatment with anandamide-modified siRNA significantly reduced the expression of PTBP1. The significant increase in the expression of PTBP2 that correlated with it confirmed an induced redifferentiation of the fibroblasts into neurons (Figure V B), C)).

In the fourth part of this thesis a bioorthogonal modification of proteins with receptor ligands should be developed. This modification was carried out by a Diels-Alder reaction with inverse electron demand (IEDDA) between a tetrazine derivative and a norbornene-modified amino acid. The applicability of the protein-ligand hybrid structures produced in this way was demonstrated by the selective transport of arbitrarily loadable silica nanoparticles for targeted drug delivery.

To this end different tetrazine derivatives were produced in collaboration with *Milan Vrabel*. These compounds were then tested for their reactivity towards different norbornene derivatives. Subsequently, a synthesis was developed, in which a tetrazine, optimized in terms of reactivity and isolability, could be linked to an anandamide (Figure VI).

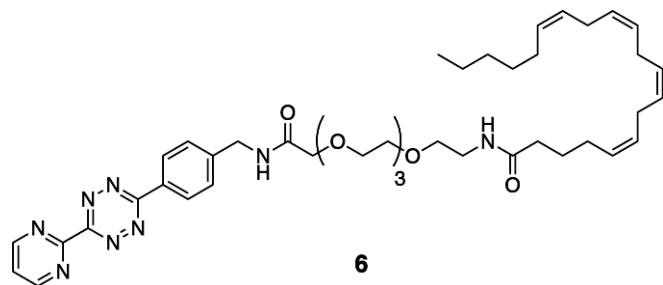


Figure VI: Representation of the prepared tetrazine-modified anandamide ligand **6** for gentle bioorthogonal modification of a norbornene-modified carbonic anhydrase.

The tetrazine-modified anandamide ligand **6** thus prepared was used in a collaboration with the group of Prof. *Thomas Bein* for the cell-specific uptake of highly functionalized, arbitrarily loadable silica nanoparticles. For this purpose, the surface of the nanoparticles was treated with sulfonamide, which allows the binding of a carbonic anhydrase via an enzyme-substrate bond. The bound enzyme seals the previously loaded pores of the silica nanoparticle. A norbornene-functionalized carbonic anhydrase was used, which was finally modified in a bioorthogonal click reaction with the anandamide ligand (Figure VII).

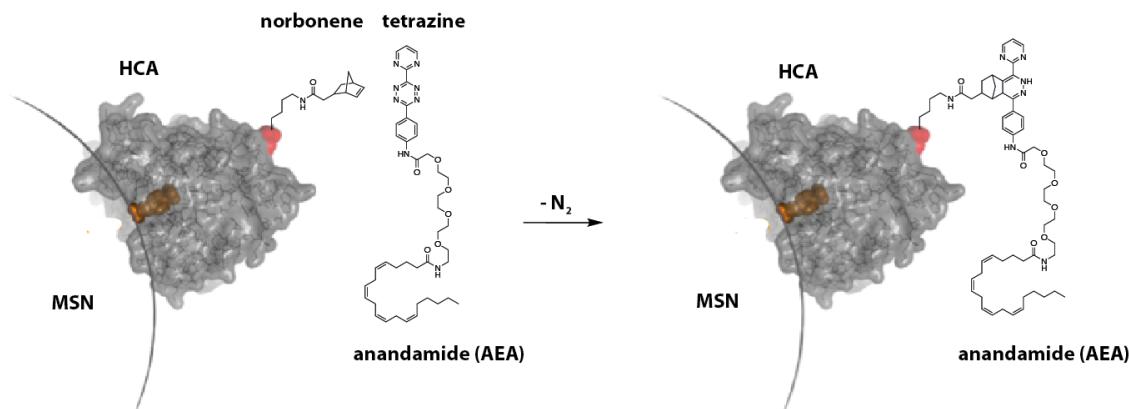


Figure VII: Diels-Alder reaction for the modification of highly functionalized mesoporous silica nanoparticles (MSN). A norbornene-functionalized human carbonic anhydrase (gray) binds with its active center (orange) a sulfonamide on the surface of an MSN. The norbornene-modified amino acid is located on the opposite side of the secondary structure of the enzyme (red). The bioorthogonal click reaction between a tetrazine-modified anandamide (AEA) and the norbornene amino acid leads to the formation of a dihydropyridazine.

Subsequently, the uptake of such modified nanoparticles into neuronal stem cells was investigated. It was shown that the modification with anandamide leads to an efficient transport into these difficult to transfect cells, which could hardly be detected without the ligand modification.

1. EINLEITUNG

Klassische therapeutische Ansätze zielen darauf ab Liganden und kleine Moleküle zu entwerfen, die an Proteine binden und deren Funktion verändern.^[13] Die Entwicklung von spezifischen und potenzen Medikamenten stellt allerdings eine große Herausforderung dar, weshalb Alternativen zu den traditionellen Strategien intensiv untersucht werden.^[14] Eine alternative Methode eröffnete sich als *Zamecnik* und *Stephenson* in den späten 70er Jahren das Konzept der *antisense Oligonukleotide* (ASO) zur gezielten Beeinflussung der Translation von RNAs des *Rous sarcoma Virus* vorstellten.^[15] Dieses Konzept führte zu einer intensiven Suche nach alternativen Möglichkeiten die Translation mit Oligonukleotiden zu modulieren.^[16] Dadurch ist es prinzipiell möglich jedes beliebige Gen zu regulieren. Auf diese Weise können folglich auch Krankheiten behandelt werden, die mit konventionellen Wirkstoffklassen schlecht oder nicht therapierbar sind.^[17] Besonders die RNA-Interferenz hat in den letzten Jahren das Augenmerk der pharmazeutischen Industrie auf sich gezogen. Bei diesem zellulären Mechanismus führen kleine doppelsträngige RNA-Moleküle zu einer spezifischen Veränderung der Genexpression. Auch wenn in der jüngsten Vergangenheit erhebliche Fortschritte hin zu klinischen Anwendungen dieses Mechanismus gemacht wurden, haben RNA basierte Therapeutika mit einer Vielzahl von Problemen zu kämpfen.^[17e, 18] Besonders der zielgerichtete Transport von Oligonukleotiden in die Zellen des Zielgewebes stellt eine erhebliche Herausforderung in praktischen Anwendungen dar. Im Folgenden werden die RNA-Interferenz, unterschiedliche Strategien für den Transport von Nukleinsäuren und die aktuellen Entwicklungen im Bereich ihrer klinischen Anwendungen vorgestellt.

1.1 RNA-INTERFERENZ

1990 entdeckten *Napoli et al.* in Petunien, dass das Einbringen einer Kopie eines endogenen Gens die Konzentration der mRNA des entsprechenden Gens nicht erhöht sondern im Gegenteil deutlich herabsetzt. Diese Beobachtung hatte intensive Forschungsanstrengungen zur Folge, um die zugrundeliegenden und bis dahin völlig unbekannten Mechanismen dieser Expressionskontrolle von Genen zu untersuchen.^[17e, 19] Die Entdeckung von RNA-Molekülen, welche die Entwicklung in *C. elegans* kontrollieren und dabei nicht für Proteine kodieren, legte 1993 den Grundstein für die Erkenntnis, dass kurze RNA-Moleküle in die Genexpression eingreifen.^[20] Es war bereits bekannt, dass RNA zelluläre Aufgaben jenseits ihrer Funktion als Blaupause für die Proteinbiosynthese erfüllt. So wurden 1989 *Didney Altman* und *Thomas Cech* mit dem Nobelpreis für Chemie für die Entdeckung von katalytisch aktiven RNA-Molekülen (Ribozymen) ausgezeichnet.^[21] Die Entdeckung von kleinen nicht kodierenden RNA-Molekülen, welche die Expression von einzelnen Genen und ganzen Gengruppen regulieren, erweiterte das Wissen über das Spektrum der zellulären Funktionen von RNA

gewaltig. Diese regulatorische Funktion kann an den unterschiedlichsten Stellen stattfinden. So beeinflussen kleine RNAs die Chromatinstruktur, die Segregation von Genen, die Transkription, die Prozessierung von mRNAs, die Stabilität von mRNAs und deren Translation.^[22]

So unterschiedlich wie ihre spezifische Wirkungsweise ist auch der genaue Aufbau dieser kurzen RNA-Oligonukleotide. Wichtigste Vertreter sind einzelsträngige antisense RNA (asRNA), small nuclear RNA (snRNA), piwi-interacting RNA (piRNA), doppelsträngige small interfering RNA (siRNA) und micro RNA (miRNA).^[14, 23] Die Grundlage der regulatorischen Funktion all dieser Oligonukleotide ist dabei ihr Binden an komplementäre mRNA oder pre-mRNA via Watson-Crick Basenpaarung.^[24] Die genauen Mechanismen sowie die beteiligten Proteine unterscheiden sich allerdings zum Teil erheblich.

Der erste und wohl am besten verstandene dieser Vorgänge wurde 1998 durch *Andrew Fire* und *Craig Mello* in *C. elegans* beschrieben und von ihnen RNA-Interferenz (RNAi) genannt.^[2] Für ihre Arbeiten zur Entdeckung und Aufklärung dieses Mechanismus erhielten beide 2006 den Nobelpreis für Medizin.^[1, 25]

Als RNA-Interferenz wird der Prozess bezeichnet, in dem doppelsträngige RNA (dsRNA) zu einer verringerten Expression einer zelleigenen mRNA führen kann. In den vergangenen Jahren stellte sich heraus, dass RNAi ein weitverbreitetes und natürliches Phänomen in Pflanzen, Pilzen und Tieren ist und eine Methode der posttranskriptionellen Genregulation darstellt.^[26] RNAi kann durch eine Vielzahl von RNA-Quellen wie RNA-Viren, Transposons, exogenen dsRNAs und kleinen endogenen RNAs ausgelöst werden.^[27] Zu den Letzteren werden unter anderem miRNAs und endogene siRNAs gezählt.^[28]

1.1.1 miRNA

Die erste regulatorische Gruppe an kleinen RNA-Molekülen wurde bereits 1993 in *C. elegans* entdeckt und später den miRNAs zugeordnet. Ihre regulatorische Funktion rückte allerdings erst 2001 in den Fokus als sie in Wirbeltieren und Wirbellosen als wichtiger Faktor bei der Entwicklung identifiziert wurde.^[29] Seither konnten tausende miRNAs in unterschiedlichsten Spezies identifiziert werden, die wichtige Aufgaben in unterschiedlichsten Bereichen wie der Zellteilung, Zelldifferenzierung und der Apoptose übernehmen.^[28a, 30]

Der Großteil der Gene, die für miRNAs kodieren, werden im Zellkern in Form sogenannter primärer miRNAs (pri-miRNA) von der RNA Polymerase II (Pol II) transkribiert. Die initialen Transkripte werden mit einer 5'-Cap-Struktur versehen, gespleißt und an ihrem 3'-Ende polyadenyliert.^[31] Die überwiegende Zahl der pri-miRNAs hat dabei einen Genlocus zum Ursprung, der nur für diese miRNA kodiert, allerdings gehen sie zu ungefähr 30 % aus Transkripten hervor, die auch eine proteinkodierende mRNA beinhalten. In solchen Fällen liegt die spätere pri-miRNA innerhalb eines Introns und entsteht erst durch Spleißen.^[32] In beiden Fällen kann eine pri-miRNA entweder nur eine spätere miRNA oder ein Cluster von mehreren miRNAs enthalten. Diese pri-miRNAs bilden

komplexe Sekundärstrukturen, die Haarnadelstrukturen mit einem Stamm von durchschnittlich 33 bp aufweisen, wobei häufig eine nicht exakte Basenpaarung zu finden ist.^[33] Diese Haarnadelstrukturen werden durch ein doppelsträngige RNA-bindendes Protein (DGCR8 in Säugetieren) erkannt und stabilisiert. Zusammen mit einer RNase III (Drosha in Menschen) wird daraufhin der sogenannte Microprocessor Komplex gebildet, der aus der langen pri-miRNA die Sequenzen entfernt, welche die Haarnadelstruktur flankieren und so eine zwischen 60 bis 70 bp lange precursor miRNA (pre-miRNA) freisetzt.^[34] Diese pre-miRNAs werden in Tieren anschließend durch Exportin 5 gebunden und unter Mithilfe von Ran-GTP aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert.^[35] Dort wird die pre-miRNA durch eine Klasse von großen RNase III-Enzymen erkannt, die als Dicer bezeichnet werden. Diese Enzyme weisen unter anderem eine PAZ-Domäne, eine ATPase-Domäne und zwei RNase III-Domänen auf. Die PAZ-Domänen interagieren vermutlich mit den 3'-Enden der pre-miRNA und positioniert die aktiven Zentren der RNase-Domänen so, dass sie zwei Helixwindungen des ds-RNA-Stamms (~22 bp) von dem 3'-Ende entfernt sind. Daraufhin spalten die beiden RNase-Domänen je eines der beiden Rückräder der doppelsträngigen RNA, wobei sie ein 5'-Monophosphat zurücklassen.^[36] Der so entstandene reife miRNA-Duplex von ~22 bp mit durchschnittlich 2 bp Überhängen an den 3'-Enden wird nun unter der Mithilfe von TRBP (*transactivation-responsive RNA-binding protein*) an die Gruppe der Argonaut-Proteine weitergereicht, um den in Kapitel 1.3 beschriebenen Mechanismus der RNA-Interferenz einleiten zu können.

1.1.2 siRNA

Die Entdeckung der RNAi führte zu intensiver Forschung auf dem Gebiet der regulatorisch aktiven RNAs. Durch die Injektion von langer dsRNA gelang es *Andrew Fire* und *Craig Mello* in *C. elegans* gezielt die Expression einzelner Gene zu beeinflussen.^[2] Die Anwendung dieser Methode auf Säugetierzellen gelang allerdings nicht, da dsRNA mit mehr als 30 bp zu einer Interferon-Antwort und zum Tod der Zelle führt.^[37]

Gelangt eine lange exogene dsRNA beispielsweise in Form eines Virusgenoms in eine Zelle, so werden sie, wie pre-miRNAs, durch Dicer erkannt und zu kürzeren Doppelsträngen prozessiert. Dicer ist Teil eines Multiproteinkomplexes mit diversen Kofaktoren,^[38] die dafür sorgen, dass auch andere dsRNA ohne Überhang bzw. mit 5'-Überhang akzeptiert werden kann.^[39] Die hieraus resultierende 21-23 Nukleotide lange RNA, die eine Doppelhelix mit perfekter Basenpaarung und einer Länge von meist 19 Basenpaaren ausbildet, wird nun als siRNA bezeichnet. Sie weist Überhänge von 2 Nukleotiden an den jeweiligen 3'-Enden der beiden RNA-Stränge auf und wird in einen *antisense*- oder *guide*-Strang und einen dazu bis auf die Überhänge komplementären *sense*- oder *passenger*-Strang eingeteilt. Der *guide*-Strang ist dabei komplementär zu der Sequenz der zu spaltenden mRNA.

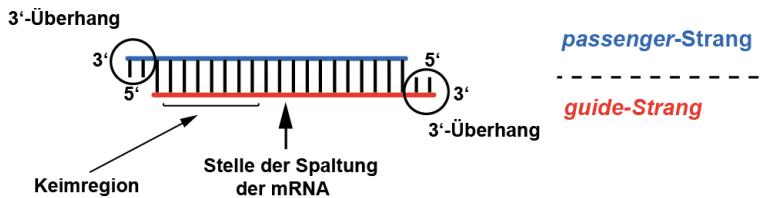


Abbildung 1: Prinzipieller Aufbau einer siRNA. Die beiden Stränge formen eine durchschnittlich 19 bp lange Doppelhelix und weisen an ihren 3'-Enden einen ungepaarten Überhang von 2 Nukleotiden auf. Der *guide-Strang* ist dabei komplementär zur adressierten mRNA, während der *passenger-Strang* die identische Sequenz wie diese aufweist. Diese Bereiche tragen wenig zur Erkennung der Ziel-mRNA bei und dienen daher in synthetisch hergestellten siRNAs häufig zur Modifikation, beispielsweise mit Farbstoffen.^[27] Des Weiteren ist auf dem *guide-Strang* (rot) der Bereich der Keimregion angegeben, in der die Interaktion mit der mRNA beginnt und die Position der Spaltung der mRNA.

Nachdem die Struktur der tatsächlich regulatorisch aktiven dsRNA-Fragmente bekannt war, konnte das Prinzip der RNAi durch *Thomas Tuschl* und seine Mitarbeiter erstmals erfolgreich an Säugetierzellen angewendet werden, indem sie synthetische siRNAs zur Regulation von Genen einsetzten.^[40] Die exogenen siRNAs werden dabei an ihren 5'-Enden eine Kinase (Clp1) phosphoryliert^[41] und wie endogene siRNAs und miRNAs an Argonaut-Proteine weitergereicht, um den Mechanismus der RNA-Interferenz einzuleiten.^[42]

1.1.3 Mechanismus der RNA-Interferenz

Die RNA-Doppelstränge der siRNA oder der miRNA werden nun in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut. RISC ist ein Multiproteinkomplex, dessen Komponenten in Eukaryoten zum Teil hoch konserviert sind.^[43] Zu den bekannten Komponenten des menschlichen RISC zählen Dicer, TRBP (*(TAR) RNA-bindung protein*), PACT und verschiedene Argonaut-Proteine.^[44] Im Zuge der Inkorporation der RNA in RISC erfolgt die bereits erwähnte Diskriminierung der beiden Stränge des Doppelstranges in den *guide-Strang*, und den *passenger-Strang*. Diese Unterscheidung der beiden Stränge nimmt eine Schlüsselstelle ein, da sie bestimmt, ob die beabsichtigte mRNA effektiv gespalten werden kann. Durch Untersuchungen einer Vielzahl von siRNAs konnte gezeigt werden, dass die thermodynamische Stabilität des Duplexes eine entscheidende Rolle spielt. So zeigten *Khvorova et al.*, dass der Strang, an dessen 5'-Ende eine geringere thermodynamische Stabilität der RNA-Helix zu finden ist (höherer A/T-Gehalt) eine signifikant höhere Tendenz zeigt, als *guide-Strang* diskriminiert zu werden. Nachdem die Unterscheidung der beiden Stränge getroffen ist, wird der *passenger-Strang* durch das Protein Ago 2 abgebaut und lediglich der *guide-Strang* verbleibt in dem aktiven RISC (siRISC) (siehe Abbildung 2).^[45]

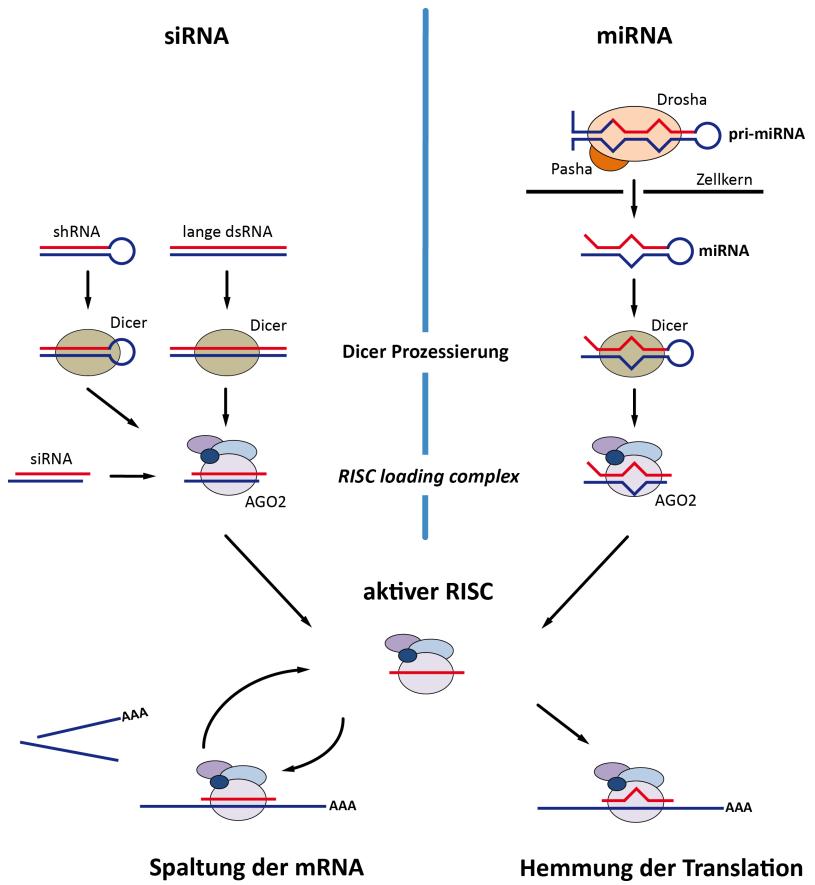


Abbildung 2: Posttranskriptionale Genregulation durch siRNA und miRNA. siRNA wird in die Zelle transfiziert oder innerhalb der Zelle durch Dicer-Prozessierung von langer dsRNA oder shRNA generiert. Die siRNA wird anschließend durch den *RISC loading complex* gebunden. Das darin enthaltene Argonaut-Protein Ago 2 spaltet den *passenger*-Strang der siRNA, was zur Ausbildung des aktiven RISC führt. Der *guide*-Strang innerhalb des aktiven RISC ermöglicht die Sequenzspezifische Adressierung einer mRNA, welche nach der Hybridisierung mit dem *guide*-Strang durch das Ago 2-Protein gespalten wird. Nach der Dissoziation der gespaltenen mRNA vom aktiven RISC ist dieser zur erneuten Adressierung einer mRNA in der Lage. miRNA wird innerhalb des Zellkerns durch einen Proteinkomplex aus den Proteinen Drosha und Pasha generiert. Nach dem Transport in das Zytoplasma wird diese auch durch das Dicer-Enzym prozessiert und vom *RISC loading complex* gebunden. Die Aktivierung des RISC führt ebenfalls zur spezifischen Adressierung einer mRNA meist im Bereich der 3' untranslatierten Regionen (3'-UTR). Allerdings findet hier häufig eine nicht vollständige Basenpaarung statt, was auch dazu führt, dass eine miRNA eine Vielzahl von mRNAs adressiert. Kommt es zu einer unvollständigen Basenpaarung, wird die mRNA nicht geschnitten, sondern lediglich deren Translation gehemmt.

Der aktive RISC tritt nun in einen katalytischen Zyklus ein. Zunächst wird eine zum *guide*-Strang komplementäre mRNA erkannt. Dabei scheint der Bereich zwischen Nukleotid 2 und 8 (Keimregion; siehe Abbildung 1) eine besonders wichtige Rolle in der Erkennung dieser Ziel-mRNA zu spielen, da hier die Ausbildung der Interaktionen zwischen *guide*-Strang und der komplementären mRNA beginnt.^[46]

Kommt es zu einer perfekten Basenpaarung der beiden Sequenzen, wird das Phosphatrückrad der mRNA zwischen den Positionen 10 und 11 in Bezug auf den *guide*-Strang gespalten und die beiden Fragmente freigesetzt. Das eben erwähnte Ago 2-Protein spielt bei der Spaltung eine Schlüsselrolle.

Nach der Spaltung ist die mRNA nicht länger durch eine Cap-Struktur am 5'-Ende und eine Poly-Adenosin Sequenz am 3'-Ende geschützt und kann durch RNasen abgebaut werden.^[47] Der RISC kann nach Dissoziation der gespaltenen mRNA aus dem Komplex wiederholt eine mRNA adressieren, was zu einer Abnahme der Ziel-mRNA Konzentration führt und so in einer verringerten Translation des entsprechenden Proteins resultiert.^[48]

Kommt es nicht zu einer perfekten Basenpaarung zwischen dem *guide*-Strang und der adressierten mRNA, greift ein anderer Mechanismus. Unterbleibt die Bildung der dsRNA-Helix durch nur teilweise Komplementarität zwischen den beiden Strängen, so wird die mRNA nicht gespalten und bleibt an den RISC gebunden. Damit ist sie für die Translationsmaschinerie nicht mehr zugänglich. Sie wird als Teil des RISC in sogenannte P-bodys (*processing bodies*) transportiert, wo die Proteinkomponenten des Komplexes recycelt und die beteiligten RNAs abgebaut werden.^[49] Besonders häufig wird dieser Mechanismus bei miRNAs beobachtet. Dabei richten sich viele dieser kleinen RNAs gegen die 3'-*untranslated regions* (UTR) von mRNAs, wobei keine perfekte Homologie besteht.^[50]

1.1.4 Rolle der RNAi in der Zelldifferenzierung

Während der Entwicklung eines Organismus kommt es zu einer gewebe- und zellspezifischen Expression von kleinen RNA-Molekülen in einer räumlich und zeitlich genau definierten Weise.^[51] Erstmals wurde dies in embryonalen Stammzellen beobachtet, welche während der Differenzierung eine große Zahl an miRNAs verstärkt oder vermindert exprimieren.^[52] Einen weiteren Hinweis auf die wichtige Rolle, die RNAi in der Zelldifferenzierung einnimmt, erbrachten Mäuse in denen das Dicer-Gen durch knockout inaktiviert wurde. Durch die resultierende Hemmung der miRNA-Synthese kam es unter anderem zu einem frühen Tod der Embryonen durch normale Zelldifferenzierung.^[52] Xu und seine Kollegen konnten zeigen, dass eine miRNA (miR-145) in neuroendokrinen Zellen des Verdauungstrakts (EC-Zellen) während ihrer Differenzierung in deutlich höherer Konzentration vorliegt als in ihrem adulten Stadium.^[53] Auch konnte eine Rolle von miR-145 in der Kontrolle der Differenzierung von glatten Muskelzellen der Blutgefäße (VSMCs) *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden.^[54] Andere bisher untersuchte Beispiele umfassen die Differenzierung von Adipozyten (miR-143)^[55], von Myoblasten (miR-181)^[56] und neuronalen Zellen (miR-125b und miR-124).^[57]

In den letzten Jahren konnte auch gezeigt werden, dass miRNAs einen Weg eröffnen sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) zu gewinnen. Um differenzierte Zellen in ein Stadium der Pluripotenz zurück zu führen, ist es normalerweise notwendig, mindestens einen von fünf Transkriptionsfaktoren künstlich zu exprimieren oder von außen zuzuführen.^[58] Diese für pluripotente Stammzellen typischen Transkriptionsfaktoren umfassen Oct4, Nanog, Sox2, Klf4 und Myc.^[59]

Neben diesen Transkriptionsfaktoren kann auch die verstärkte Expression von miRNAs eine solche Rückdifferenzierung möglich machen. Dies konnte für einige miRNAs gezeigt werden, die besonders in embryonalen Stammzellen exprimiert werden. Dabei scheinen sie zu helfen diese in einem

undifferenzierten Zustand zu halten.^[60] Die Expression dieser Familie an miRNAs, die wohl in der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen, scheint die Induzierung der Pluripotenz von differenzierten Zellen zu unterstützen.^[61] So konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression des miR-302/367-Clusters eine effektive Methode darstellt pluripotente Stammzellen aus Fibroblasten von Mäusen und Menschen zu gewinnen.^[62] In unterschiedlichen Studien zeigte sich, dass miRNAs eine deutlich höhere Effizienz im Vergleich zu konventionellen Methoden zeigen.^[63] Damit scheint es möglich auf diesem Weg iPSCs nicht nur für stammzell-biologische Untersuchungen zu gewinnen, sondern auch *high throughput* Verfahren für die Gewinnung von patientenspezifischen iPSCs zu entwickeln. Diese Klone bieten die Möglichkeit einer Differenzierung in unterschiedlichste Zelllinien wie Blutzellen, Herzmuskelzellen und Leberzellen.^[64]

Für gezielte therapeutische Einsätze stellt die Gewinnung von pluripotenten Stammzellen allerdings einen Umweg dar. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Expression von miRNAs auch zu einer direkten Umwandlung von unterschiedlichen, ausdifferenzierten Zellen ineinander führen kann. Ein Beispiel für eine solche miRNA ist miR-124 (siehe Abbildung 3). Diese hoch konservierte miRNA wird in Mäusen und Menschen von drei Genen kodiert und besonders in Zellen des Nervensystems exprimiert.^[65] miR-124 reguliert unter anderem die Expression von der Phosphatase SCP1, einer Komponente des REST Komplexes (*RE1-silencing transcription factor complex*). Dieser reguliert die Transkription einer großen Anzahl an Neuronen-spezifischen Genen. Unter diesen Genen befindet sich unter anderem auch miR-124 selbst, was zu einer Autoregulation während der neuronalen Differenzierung führt.^[65b, 66] Ein weiteres direktes Ziel von miR-124 ist die mRNA von PTBP1 (*polypyrimidine-tract-binding protein I*). Die Bindung dieses Proteins an prä-mRNAs verhindert die Bildung eines Spliceosoms und somit das Herausschneiden von Introns. Eine verringerte Expression von PTBP1 unter dem Einfluss von miR-124 führt somit zu alternativem Spleißen. Schätzungen zufolge unterliegen etwa die Hälfte der prä-mRNAs in Säugetieren alternativem Spleißen.^[67] Ein großer Anteil des alternativen Spleißens ist auf Zellen des Nervensystem beschränkt, wobei die entstehenden Proteine wichtige Rollen in der Ausbildung von Axonen und Synapsen sowie der Signalübertragung übernehmen.^[68] Eine dieser Isoformen ist der zu PTBP1 homologe Spleiß-Inhibitor PTBP2.^[9] Dieser nimmt während der weiteren Differenzierung zu Neuronen zahlreiche Aufgaben ein, die Gegenstand aktueller Forschung sind.^[11] Die Expression von miR-124 ist somit eng mit der Differenzierung von Neuronen verbunden. So konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von miR-124 neuronale Vorläuferzellen, Myoblasten und sogar ausdifferenzierte Fibroblasten dazu veranlasst, sich zu Neuronen zu differenzieren.^[69] Auf diesem Wege wäre eine noch einfachere und schnellere Gewinnung von patientenspezifischen Nervenzellen möglich. Dies könnte beispielsweise neue Möglichkeiten zur Behandlung von Verletzungen des Rückenmarks oder des Gehirns eröffnen.

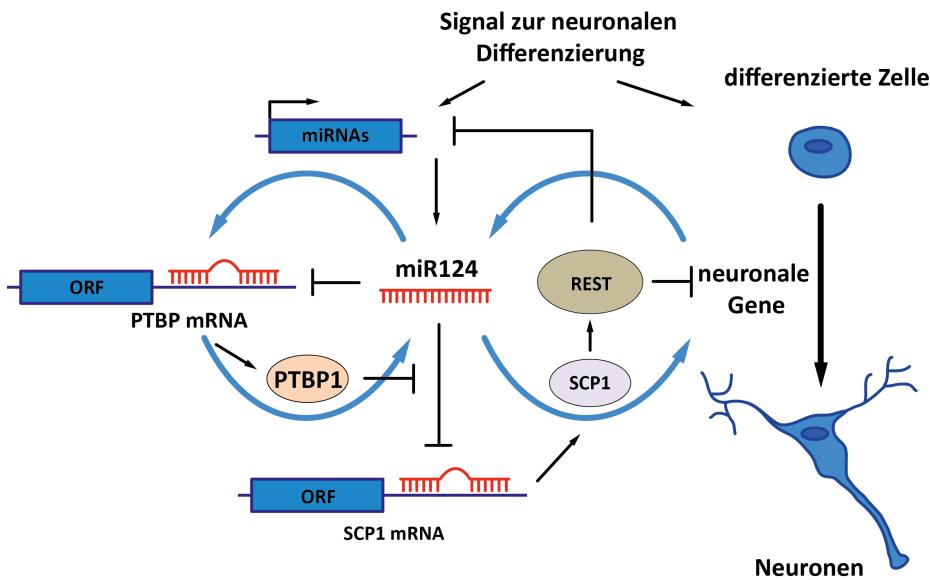


Abbildung 3: Schematische Darstellung des miR-124 kontrollierten Regelkreislaufes zur Kontrolle der neuronalen Differenzierung. Ein Differenzierungssignal führt in neuronalen Vorläuferzellen zu einer Veränderung der Expression, was unter anderem zu einer gesteigerten Konzentration von miR-124 führt. Direkte Ziele von miR-124 sind unter anderem die mRNAs von SCP1 und PTBP1. Daraufhin sinkt die effektive Konzentration von SCP1 und PTBP1 in der sich differenzierenden Zelle. SCP1 ist Bestandteil des REST-Komplexes, der die Expression einer großen Anzahl an Neuronenspezifischen Genen reguliert. Eine verringerte Expression von SCP1 resultiert in einer veränderten Aktivität des REST-Komplexes und zu einer Expression von für die Differenzierung zu Neuronen wichtigen Genen. PTBP1 ist ein Spleiß-Inhibitor, dessen verringerte Expression zu alternativem Spleißen führt. Dadurch kommt es zur Entstehung von Neuronenspezifischen Protein-Isoformen wie PTBP2.

Bei der Zelldifferenzierung und Entwicklung nehmen Regelkreisläufe eine wichtige Rolle ein. Diese Strategie stellt eine Kontrolle von Zelltyp-spezifischen Expressionsmustern sicher. Faktoren, die in diese Regelkreisläufe eingreifen, können zu einer dauerhaften Veränderung der Homöostase führen.^[70] Da miRNAs in diesen Regelkreisläufen eine wichtige Rolle spielen, ist ihre dauerhafte Überexpression nicht notwendig.^[71] Daher sind zur Beeinflussung der Expression besonders transiente Methoden interessant.

1.2 RNAI IN PFLANZEN

Aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung und dem Schrumpfen an landwirtschaftlicher Nutzfläche ist es langfristig unumgänglich die Nahrungsmittelproduktion zu steigern.^[72] Pflanzenschädlinge wie Bakterien, Pilze, Nematoden, Insekten und Viren sind für rund ein Drittel der Ernteeinbußen verantwortlich.^[73] Der Einsatz von Pestiziden zur Eindämmung dieser Verluste hat allerdings in den letzten Jahren erhebliche gesundheitliche und ökologische Nebenwirkungen gezeigt, die alternative Methoden dringend notwendig erscheinen lassen. Auch wenn klassische Ansätze der Pflanzenzüchtung eine große Anzahl an krankheits- und schädlingsresistenten Sorten hervorgebracht haben, sind diese Methoden sehr kosten- und zeitintensiv.^[74] Auf der Suche nach Alternativen erwiesen sich biotechnologische Methoden in den letzten 20 Jahren als das Mittel der Wahl.^[75] Auch RNA-Interferenz zur gezielten Veränderung der Expression einzelner Gene kommt dabei zum Einsatz. RNAi hat sich als effektives Mittel erwiesen, um nicht nur Pflanzen mit Resistenzen gegen Pathogene

wie Insekten, Nematoden und Viren zu entwickeln, sondern auch verbesserte Haltbarkeit der Früchte, Erhöhung und Veränderung des Nährstoffgehalts, Verringerung der Konzentration von Allergenen und Toxinen und größere Toleranz gegenüber abiotischem Stress zu erreichen.^[75]

Im Folgenden soll der Mechanismus der RNA-Interferenz in Pflanzen beschrieben werden, der sich in einigen wichtigen Bereichen von dem in Tieren unterscheidet. Anschließend sollen einige Anwendungen und gegenwärtige Herausforderungen der RNAi in der Entwicklung verbesserter Pflanzensorten vorgestellt werden.

1.2.1.1 Mechanismus der RNAi in Pflanzen

Kleine RNA-Moleküle sind auch in Pflanzen ein wichtiger Faktor sowohl in der Immunantwort als auch in anderen wesentlichen Funktionen. Beispiele hierfür sind die Regulation der Entwicklung, der Erhaltung der Genomstabilität und der Antwort auf äußere Einflüsse wie Trockenheit und Salzstress in Pflanzen.^[76] Wie auch in Tieren können diese kleinen RNAs anhand ihres Ursprungs und ihrer Biogenese in die zwei bereits erwähnte Hauptgruppen eingeteilt werden: miRNAs und siRNAs.^[77] miRNAs entstehen auch in Pflanzen aus einem einzelsträngigen Transkript in einem Prozess, der dem in Tieren ähnlich ist und in Kapitel 1.1 vorgestellt wurde.^[78]

siRNAs werden aus doppelsträngigen RNA-Vorläufern gebildet und können anders als in Tieren in drei Gruppen unterteilt werden: hc-siRNAs (*heterochromatic siRNAs*), nat-siRNAs (*natural antisense siRNAs*) und phasiRNAs (*phased siRNAs*).^[77] Diese sollen in Folgendem kurz vorgestellt werden:

Hc-RNAs werden durch eine nur in Pflanzen vorkommende RNA-Polymerase (PollV) von repetitiven DNA-Elementen und Transposonen transkribiert. Anschließend werden sie durch DCL3 in 24 nt lange dsRNA-Fragmente prozessiert. Diese werden durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RDR) amplifiziert und übernehmen im Komplex mit anderen Proteinen eine wichtige Rolle bei der DNA-Methylierung.^[78f]

Nat-siRNAs entstehen aus genomischen Transkripten, die teilweise komplementär zueinander sind. Untersuchungen zeigen, dass 11 % der transkribierten Gene in *Arabidopsis thaliana* solche antisense-Transkripte ergeben.^[79] Formen zwei zueinander komplementäre mRNAs einen teilweisen Doppelstrang, können sie durch *Dicer-like*-Proteine erkannt und zu nat-siRNAs prozessiert werden. Da diese siRNAs durch RNAi die effektive Konzentration einer der beiden mRNAs beeinflussen, spielen sie so eine wichtige Rolle in Rückkopplungsmechanismen als Reaktion auf äußere Einflüsse^[80] oder zur Kontrolle der Pflanzenentwicklung.^[81]

PhasiRNAs sind sogenannte sekundäre siRNAs, die aus einer mRNA entstehen.^[82] Durch diesen Mechanismus kommt es in Pflanzen zu einer Verstärkung der RNA-Interferenz nach dem Einbringen einer exogenen RNAi-Quelle. Wird in Pflanzen eine mRNA aus dem Zellkern transportiert, kann diese durch eine miRNA oder siRNA (mit dazugehörigen Proteinkomplex) erkannt werden. Die entstehenden einzelsträngigen RNA-Fragmente werden anschließend (durch RDR6 und SGS3) in RNA-Doppelstränge umgewandelt. Im nächsten Schritt werden die gebildeten

dsRNAs mithilfe von DCL4 und DRB4 (*double-strand RNA binding factor*) in 21 nt lange phasiRNAs umgewandelt.^[82] Diese *phased siRNAs* werden nun durch Ago-Proteine in einen aktiven RISC eingebaut und können so zu einer Spaltung ihrer Ursprungs-mRNA sorgen, was zu einer Verstärkung der Expressionskontrolle führt.^[83] Eine Untergruppe dieser siRNAs sind die sogenannten *trans-acting siRNAs* (tasiRNA).^[84] Die Aufgaben dieser tasiRNAs sind sehr vielfältig und Gegenstand intensiver Forschung. Bisher konnte gezeigt werden, dass sie unter anderem bei der Reaktion auf äußere Einflüsse, der Pflanzenentwicklung und der Abwehr von Pathogenen wichtige Positionen einnehmen.^[85]

1.2.1.2 Anwendungen der RNAi zur Entwicklung verbesserter Pflanzensorten

RNA-Interferenz findet in den letzten Jahren breite Anwendung in Zier- und Nutzpflanzen. Dabei wurden Pflanzen mit verbesserten Eigenschaften in unterschiedlichsten Bereichen entwickelt. Um eine systemische RNAi-Antwort hervorzurufen, wird in den meisten Fällen auf das Einbringen unterschiedlicher Vektoren in das Innere von Pflanzenzellen zurückgegriffen. Dazu wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Vektorsysteme entwickelt, die eine bestimmte miRNA oder siRNA exprimieren.^[86] Vorteile dieser Methode ist die oftmals auch über viele Generationen stabile und gewebeabhängig steuerbare Expression. Ein Problem dieser Systeme ist allerdings, dass sie zu transgenen Pflanzen führen und aufwändige und zum Teil problematische Selektionsprozesse benötigen.^[87] In den letzten Jahren wurden allerdings auch unterschiedliche Ansätze entwickelt, um durch Applikation von RNA-Molekülen auf unterschiedliche Pflanzenteile eine lokale und systemische RNAi auszulösen. So gelang es durch die Anwendung von Hochdrucksprays in gewissem Umfang eine Regulation von GFP in *Nicotiana benthamian* Pflanzen auszulösen.^[88] Im Folgenden sollen kurz einige Anwendungen der RNA-Interferenz bei der Entwicklung von verbesserten Pflanzensorten vorgestellt werden.

Verbesserung der Haltbarkeit von Früchten

Die schnelle Verderblichkeit von Gemüse und Obst nach der Ernte führt zu erheblichen ökonomischen Ausfällen. Um diesem Problem entgegen zu wirken, ist eine verzögerte Reifung erstrebenswert. In vielen Früchten wird der Reifungsprozess durch Ethylen gesteuert, das eine ganze Reihe von reifungsspezifischen Genen reguliert.^[89] Die Verringerung der Expression unterschiedlicher Proteine, welche für die Biosynthese von Ethylen verantwortlich sind, kann die Haltbarkeit erheblich verlängern. Mithilfe von RNAi gelang dies in Tomaten, Kiwi und Erdbeeren. So konnte durch die Regulierung der 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat Oxidase (ACCO) in Tomaten eine deutlich verringerte Ethylenproduktion in den Früchten nachgewiesen werden, was zu einer Haltbarkeit der Früchte von bis zu 120 Tage führte.^[90] Bemerkenswert an diesem Ansatz ist, dass die so gewonnenen Früchte, verglichen mit unbehandelten Früchten, keine Veränderungen in der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe aufwiesen. Auf diesem Weg wurde auch in Kiwis durch RNAi-vermittelte Reduktion der

Expression von ACCO die Erweichung des Fruchtfleisches verhindert und die Haltbarkeit erheblich gesteigert.^[91]

Verringelter Gehalt an Allergenen und Toxinen

Lebensmittelallergien sind hypersensitive Immunantworten auf normalerweise unproblematische Proteinbestandteile von Nahrungsmitteln wie Erdnüssen, Äpfeln oder Mangos.^[92] Um die Konzentration dieser Allergene zu senken und so eine bessere Verträglichkeit herzustellen, wurde RNA-Interferenz in unterschiedlichen Pflanzen eingesetzt. So konnte durch den Einsatz von RNAi die Expression eines bekannten Apfel-Allergens (Mal d1) deutlich gesenkt werden. Es zeigte sich eine Verringerung an Mal d1 um das Zehnfache ohne Einfluss auf die Entwicklung und das Wachstum der Pflanzen zu haben.^[93] Durch die Expression einer hpRNA gegen die mRNA von Ara h2, einem der wichtigsten Allergen in Erdnüssen, wurde der Gehalt an Ara h2 in Erdnüssen um bis zu 25 % herabgesetzt.^[94]

Darüber hinaus enthalten viele Nutzpflanzen toxische Substanzen, die generell oder ohne sachgemäße Zubereitung zu Vergiftungserscheinungen führen können. Eines dieser Toxine ist das Steroidalkaloid α-Solanin. Dieses wird in Sprossen und grünen Knollen von Kartoffeln gebildet und führt zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran und damit zur Apoptose betroffener Zellen.^[95] Durch RNAi wurde eine verringerte Expression eines Schlüsselenzyms in der Biosynthese von Cholesterin (*sterol side chain reductase 2*) erreicht. Dadurch wurden Kartoffelpflanzen entwickelt, die eine Verringerung an toxischen Steroidalkaloiden aufwiesen.^[96]

Verbesserte Resistenz gegenüber Pathogenen

Viren stellen einen der wichtigsten Gründe für Ernteausfälle dar.^[97] So wird geschätzt, dass allein der *potato leaf roll virus* (PLRV) jährlich zu einem weltweiten Verlust von 20 Millionen Tonnen Kartoffeln führt.^[76] Durch die Entdeckung der RNA-Interferenz als wesentlicher Bestandteil der natürlichen pflanzlichen Abwehr von Virusinfektionen lag es nahe, sie gezielt für Resistzenzen gegen solche Pathogene einzusetzen.^[98] So wurden in den letzten Jahren unterschiedliche miRNAs eingesetzt, um die viralen Genome zu regulieren. Bisher zeigten sich besonders die für Hüllproteine kodierenden Gene als erfolgreiche Ziele für eine RNAi-basierte Resistenz gegen Pflanzenviren. Auf diese Weise wurden beispielsweise Tabakpflanzen mit einer Resistenz gegen das *beet necrotic yellow vein Virus* (BNYVV) oder Kartoffelpflanzen mit einer Resistenz gegen das *potato virus Y* (PVY) entwickelt.^[99]

Eine innovative und vielversprechende Strategie stellt die Anwendung der RNA-Interferenz zur verbesserten Abwehr von Fressfeinden wie Insekten und Nematoden dar. Die Aufnahme von doppelsträngiger RNA mit der Nahrung kann bei diesen Schädlingen zu einer RNAi-Antwort führen.^[100] Dieser als *environmental RNA interference* (eRNAi) bezeichnete Effekt konnte erstmals in dem Fadenwurm *C. elegans* beobachtet werden, wobei sich allerdings schnell zeigte, dass eine

einfache Übertragbarkeit sogar auf Fadenwürmer desselben Genus nicht möglich ist.^[101] Der Mechanismus der Aufnahme doppelsträngiger RNA und die Gründe für die unterschiedliche Sensibilität in der Reaktion gegenüber eRNAi sind Gegenstand laufender Forschung.^[102] Dabei konnte gezeigt werden, dass in *C. elegans* das Protein SID-2 (*systemic RNA interference defective 2*) verantwortlich für die endozytotische Aufnahme von dsRNA von mehr als 50 bp in Zellen des Verdauungstrakts ist.^[103] Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden unterschiedliche Pflanzen entwickelt, die Resistenzen gegen Fressfeinde aufweisen. So wurden beispielsweise Sojapflanzen entwickelt, die zwei 170 bp und 292 bp lange dsRNAs exprimieren. Diese RNAs richten sich gegen zwei, für die Reproduktion von Nematoden essentielle Gene (fib-1 und Y25C1A.5). Sojabohnenzystennematoden (*Heterodera glycines*), die Wurzelgewebe dieser Sojapflanzen aufnahmen, zeigten eine um 95 % verringerte Produktion von Eiern, was zu einer deutlich schwächeren Schädigung der Pflanzen führt.^[104] Bei der Auswahl der Zielgene in Fressfeinden ist allerdings zu beachten, dass konstitutive Gene (*house-keeping genes*) auch über Speziesgrenzen hinaus oft hoch konserviert sind und daher unerwünschte Effekte in nützlichen Organismen auftreten können.^[105]

All diese Beispiele zeigen, dass die RNA-Interferenz ein sehr potentes Mittel zur Erzeugung von Pflanzen mit verbesserten Eigenschaften in den unterschiedlichsten Bereichen ist. Da allerdings die Mechanismen, besonders der sogenannten eRNAi noch nicht vollständig verstanden sind, muss bei einem Einsatz dieser Methode noch erheblicher Forschungsaufwand betrieben werden, um unerwünschte ökologische Auswirkungen ausschließen zu können.

1.3 RNAI AUF DEM WEG ZU EINEM THERAPEUTISCHEN EINSATZ IM MENSCHEN

Nachdem RNA-Interferenz als Methode zur Untersuchung der Funktion einzelner Gene als Labortechnik weite Verbreitung gefunden hat, wird in den letzten Jahren auch die Möglichkeit Medikamente auf Basis von siRNAs zu entwickeln intensiv untersucht. Dabei liegt der Fokus auf der Regulation von Genen, welche mit Krankheiten in Verbindung stehen, deren Behandlung mit konventionellen Wirkstoffklassen schlecht möglich ist.^[17a-d] Allerdings befinden sich RNA basierte Therapeutika meist noch in einem relativ frühen Stadium der Entwicklung, da sie mit einer Vielzahl von Herausforderungen zu kämpfen haben.^[18] Besonders der Transport von Oligonukleotiden in das Zytosol einer Zielzelle stellt eine große Hürde auf dem Weg zu einer therapeutischen Anwendung von siRNA dar. Durch die negative Ladung des Phosphatrückrades ist es für RNA extrem schwer passiv durch die hydrophobe Zellmembran und die überwiegend negativ geladene extrazellulären Bereiche einer Zelle zu diffundieren.^[106] Um also in eine Zelle zu gelangen sind Methoden erforderlich, die diesen Transport ermöglichen. In folgendem Abschnitt sollen die wichtigsten Herausforderungen sowie Lösungsstrategien für eine therapeutische Anwendung von siRNA vorgestellt werden.

1.3.1 Off-target-Effekte und Immunantwort durch siRNA

Während *off-target*-Effekte und die Aktivierung der zellulären Immunantworten für *in vitro* Anwendungen meist nur überschaubaren Einfluss haben, stellen sie in präklinischen und klinischen Studien eine große Herausforderung dar.^[17b]

Off-target-Effekte bezeichnen die Veränderung der Expression von anderen Genen als den beabsichtigten. Diese Effekte wurden in vielen Fällen nach dem Einsatz von siRNA durch Microarray-Untersuchungen nachgewiesen und stellen einen Ursprung für möglicherweise gefährliche Mutationen und ungewollte Zellveränderungen dar.^[107] Dabei hat sich herausgestellt, dass in den meisten dieser Fälle eine Übereinstimmung von sechs oder sieben Nucleotiden innerhalb der Keimregion (*seed region*) der Sequenz der siRNA mit der *off-target*-mRNA vorliegt.^[108] Dieses könnte daraufhin deuten, dass hier ein ähnlicher Mechanismus vorliegt wie bei der Genregulation durch miRNAs. Ein weiterer Ursprung für *off-target*-Regulationen ist eine mangelhafte Diskriminierung von *guide*- und *passenger*-Strang. Dabei kann es durch den Einbau des *passenger*-Strangs in den RISC zur unbeabsichtigten Regulation einer mRNA kommen.^[109]

Gelangt eine siRNA in das Innere einer Zelle, so aktiviert sie die zelluläre Immunantwort im Wesentlichen auf drei Wegen. Kurze RNA-Moleküle werden dabei durch Toll-like Rezeptoren (besonders TLR3),^[110] die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR)^[111] und die RNA-Helikase RIG-1 (*retinoic acid inducible gene I*)^[112] erkannt, die verschiedene Signalkaskaden in Gang setzen. Daraufhin kommt es zu einer verstärkten Transkription von Alpha-Interferonen (INF-α) und entzündungsfördernden Zytokinen, was zu einer Blockierung der Protein-Synthese und zum Tod der Zelle führt.^[37] Um sowohl *off-target*-Effekte als auch die zelluläre Immunantwort zu minimieren, wurden unter anderem verschiedene chemische Modifikationen der eingesetzten RNA untersucht. So konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von unterschiedlichen Substituenten an der 2'-Position der Ribose sowohl die Immunantwort als auch das Auftreten von *off-target*-Effekten verringern kann.^[113] Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von *locked nucleic acids* (LNA) und *unlocked nucleic acids* (UNA). Bei LNAs ist der 2'-Sauerstoff sowie der 4'-Kohlenstoff der Ribose durch eine Methylengruppe verbunden, während UNAs keine Verbindung zwischen dem 2'- und dem 3'-Kohlenstoff aufweisen.^[114] Durch ihren Einsatz kann die thermodynamische Stabilität des RNA-Duplexes beeinflusst werden, was eine bessere Steuerung der Diskriminierung von *guide*- und *passenger*-Strang erlaubt. 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 reduziert werden.^[115]

1.3.2 Transport von siRNA

Wie bereits erwähnt ist eine der größten Herausforderungen einer therapeutischen Anwendung von siRNA ihr Transport in das Zytosol der Zielzelle.^[106] Um also in eine Zelle zu gelangen sind

Methoden erforderlich, die diesen Transport ermöglichen. Dabei unterscheidet man allgemein zwischen Strategien, die einen indirekten und die einen direkten Transport der siRNA vermitteln.

Unter indirektem Transport versteht man Methoden, bei denen die siRNA im Inneren der Zielzelle exprimiert wird. Ein Vektor mit ihrer genetischen Information wird eingeschleust, der die Synthese einer sogenannte shRNA (*small hairpin RNA*) ermöglicht. Aus dieser shRNA wird anschließend mit Hilfe von Dicer in einer der miRNA-Synthese homologen Weise eine siRNA generiert.^[116] Wegen der hohen Effizienz und zum Teil sehr hohen Zellspezifität werden vor allem virale Vektoren verwendet.^[117] Der große Nachteil dieser Strategie ist allerdings das erhebliche immunogene und mutagene Risiko viraler Vektoren.^[118]

Eine weitere Strategie ist der direkte Transport von siRNA mit Hilfe von anorganischen Nanopartikeln, Polymeren, Liposomen oder durch Liganden-Konjugate.

Anorganische Nanopartikel stellen eine relativ neue Methode für den direkten Transport von siRNA dar. Es werden meist Partikel auf der Basis von magnetischem Eisenoxid, Gold, Calciumphosphat, Kieselsäure und Quantum Dots eingesetzt.^[119] Die Vorteile von Nanopartikeln sind die gute Funktionalisierbarkeit ihrer Oberfläche, der gute Schutz der siRNA vor Nukleasen und ihr relativ leichtes Eindringen in die Zelle.^[120] Trotz ihrer hohen Effektivität sind Nanopartikel aufgrund ihrer mutagenen und zytotoxischen Wirkung derzeit jedoch nur begrenzt einsetzbar.^[121] Darüber hinaus können chronische Risiken durch ihre ausgeprägte Stabilität nur schwer abgeschätzt werden.^[121]

Zu den gut untersuchten Strategien zum direkten Transport von siRNA zählt ihre Komplexierung mit Polymeren zur Bildung eines sogenannten Polyplexes.^[122] Die verwendeten Polymere enthalten eine große Zahl von sekundären und tertiären Aminen, um so elektrostatisch mit der RNA interagieren zu können. Neben Poly-L-Glutamin (PGA) und Poly-L-Lysin (PLL) haben sich Polyethylenimine (PEI) als die effektivsten Polymere zur Transfektion von siRNA erwiesen.^[123] Die hohe positive Ladungsdichte führt auch zu einer Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran und bewirkt eine effektive Transfektion und darüber hinaus eine nahezu vollständige Abschirmung der siRNA gegenüber Nukleasen.^[124] Die Aufnahme der Polyplexen ins Innere der Zelle erfolgt mittels Endozytose.^[125] Wegen der hohen Anzahl von Aminen, die im sauren Milieu des Endosoms zunehmend protoniert werden, kommt es zu einem erhöhten Protonenfluss in das Endosom. Um einen Ladungsausgleich herzustellen, kommt es dadurch zu einer erhöhten Konzentration an Chlorid-Ionen. Das Ungleichgewicht in der Ionen-Konzentration zwischen dem Inneren des Endosoms und dem Zytosol führt dazu, dass die Membran des Endosoms durchlässig wird.^[123a] Durch diesen als *proton sponge effect* bezeichneten Mechanismus wird der Polyplex freigesetzt, wodurch die siRNA an den Ort ihrer regulativen Wirkung gelangt.^[126] Neben ihrer Effektivität weisen sämtliche Polyplex jedoch eine hohe Zytotoxizität auf, was ihren therapeutischen Einsatz stark einschränkt.^[121, 127]

Eine weitere effektive Methode des direkten Transports von siRNA ist die Verwendung von Lipoplexen. Dabei wird ein Liposom aus kationischen Lipiden und neutralen Helfer-Lipiden aufgebaut, in die RNA durch elektrostatische Wechselwirkung eingelagert werden kann.^[128] Während

die Helfer-Lipide wie Cholesterol eingesetzt werden, um die Größe, Einheitlichkeit und Stabilität der Partikel zu beeinflussen.^[129] spielen die kationischen Lipide vor allem für die endosomale Aufnahme der Lipoplexe und die Freisetzung der siRNA aus dem Endosom eine wichtige Rolle.^[130] Wie bei Polyplexen hat der Einsatz von Lipoplexen allerdings den Nachteil potentiell zytotoxischer Effekte und einer verstärkten Immunantwort.^[131]

1.3.3 Oligonukleotid-Konjugate

Die oben erwähnten Polyplex und Lipoplexe werden durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen.^[132] Diese Aufnahme ist allerdings weitestgehend unspezifisch und ermöglicht keine Fokussierung der RNA-Interferenz auf einzelne Gewebe oder Zelltypen. Um allerdings die eingesetzte RNA-Menge und mögliche Nebenwirkungen zu minimieren, ist ein spezifischer Transport von erheblichem Vorteil. Eine Strategie für eine gezielte Aufnahme stellt die Verknüpfung einer siRNA mit einem Rezeptor-Liganden dar. Dabei nutzt man die Tatsache, dass sich unterschiedliche Zelltypen bei der Präsentation von Oberflächenrezeptoren zum Teil stark unterscheiden. Da Rezeptoren in vielen Fällen nicht zwischen einem unmodifizierten Liganden und dem Konjugat unterscheiden können, wird das Konjugat durch Rezeptoren erkannt und meist durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen. Auf der Suche nach möglichen Liganden für eine solche gezielte Aufnahme von siRNA in Zellen wurden die unterschiedlichsten Stoffklassen (Lipide, Vitamine, Saccharide sowie Peptide und Nukleinsäuren) untersucht. Im Folgenden sollen die wichtigsten Beispiele kovalenter siRNA-Konjugate beschrieben werden.

1.3.3.1 Kohlenhydrat-modifizierte siRNA

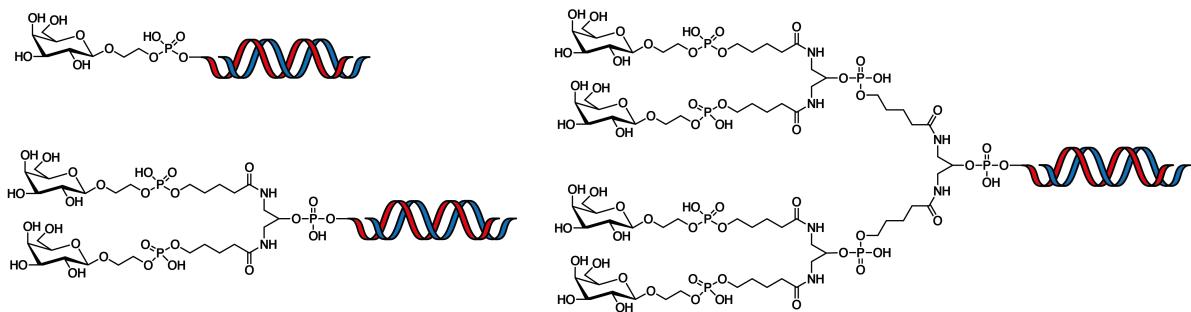
Saccharide nehmen wichtige Funktionen bei der Übertragung von Signalen beispielsweise in der Zellerkennung durch Lektine ein.^[133] Aufgrund dieser zentralen Rolle stellten sie schon früh eine vielversprechende Gruppe an Modifikationen für eine gezielte Aufnahme von Oligonukleotiden und anderen Wirkstoffen dar.^[134] Das wohl am besten untersuchte Beispiel ist die Modifikation mit Galactose (Gal) zur Adressierung des Asialoglycoprotein-Rezeptors. Dieser Rezeptor wird besonders auf der Oberfläche von Hepatozyten von Säugetieren exprimiert, wodurch er die lysosomale Aufnahme von Proteinen mit *N*-Acetylgalactosamin- (GalNac) und Galactose-Modifikationen ermöglicht.^[135]

Dass eine Galactose-Funktionalisierung zu einer Rezeptor-vermittelten Aufnahme eines Oligonukleotids führen kann, wurde durch *Mahato* erstmals postuliert. Er konnte zeigen, dass sich ein Galactose-DNA-25mer *in vivo* in Ratten-Hepatozyten anreichert.^[136] Auf diesem Weg gelang in einem zweiten Schritt auch die Aufnahme von siRNA in Hepatozyten-Zellen (HepG2). Die Galactose-Modifikation wurde dabei mittels eines Polyethylenglykol Polymers (MW: 3400 Da) mit dem 3'-Ende des *sense*-Strangs verbunden.^[137] Auf die gleiche Weise gelang es auch siRNA mit Mannose-6-

Phosphat (M6P) zu verknüpfen und somit den M6P/IGF2-Rezeptor auf hepatischen Sternzellen (HSC-T6) zu adressieren. Beide Konstrukte bewirkten eine bis zu 40 %ige Reduktion der Expression in einem Luciferase-Reportersystem. Da das Saccharid allerdings mittels eines Polymers mit dem Oligonukleotid verbunden wurde, stellen die Konstrukte kein Liganden-Konjugat im eigentlichen Sinn dar, sondern könnte als Liganden-modifizierter Nanopartikel angesehen werden.

Saccharid-Konjugate im engeren Sinn stellen die Konstrukte von *Vengut-Climent et al.* dar, bei denen mittels eines Galactose-Phosphoramidits, im Rahmen der Festphasensynthese, das 5'-Ende des *passenger*-Strangs einer siRNA mit Galactose modifizierte wurde.^[138] Auf diese Weise konnten, neben den einfach mit Saccharid modifizierten Konstrukten auch solche mit zwei Galactose-Modifikationen hergestellt werden. Eine Untersuchung der regulatorischen Aktivität in Hepatozyten mittels eines Luciferase-Reportersystems ergab allerdings eine maximale Reduktion der Expression um 20 %. Ein Nebeneffekt der Modifikationen war eine extrem gesteigerte Stabilität der modifizierten siRNA gegen Nukleaseen.^[138] Basierend auf dieser Methode entwickelte *Eritja et al.* siRNA-Konstrukte gegen TNF- α (*tumor necrosis factor- α*).^[139] Diese Konstrukte enthielten eine, zwei oder vier Galactose-Modifikationen pro 5'-Ende des *passenger*-Strangs des siRNA-Duplex, um die Aufnahme mittels des Asialoglycoprotein-Rezeptors zu vermitteln (Abbildung 4 A)). Diese Strategie orientiert sich an dem in der Natur genutzten sogenannten *glycocluster effect*. Da die Wechselwirkungen zwischen Sacchariden und Zelloberflächen-Rezeptoren nur schwach ausgebildet sind, wird oft auf verzweigte Saccharidstrukturen zurückgegriffen, um die Interaktion zu verstärken und spezifischer zu machen.^[140] Daher werden beim *glycotargeting* meist verzweigte Strukturen mit mehreren Saccharid-Modifikationen verwendet, um die Interaktion der Konjugate mit den zellulären Rezeptoren zu verbessern.^[141] Mit diesen Konstrukten konnte eine erfolgreiche Aufnahme und regulatorische Aktivität in humanen Hepatozyten (HuH-7-Zellen) gezeigt werden. Die Anzahl der Galactose-Modifikationen hatte allerdings keinen Einfluss auf die maximale Reduktion der Expression von TNF- α um 20 %.^[142] Neben Galactose wurde auch eine Modifikation mit Glucose eingeführt, wobei kein Einfluss auf die Expression von TNF- α beobachtet werden konnte.

A)



B)

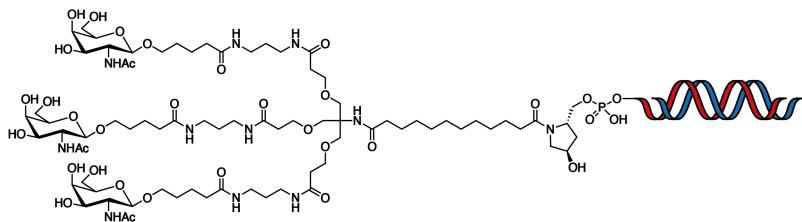


Abbildung 4: Verzweigte Saccharid-siRNA-Konjugate. A) Durch Eritja et al. entwickelte Galactose-modifizierte siRNA Konjugate.^[139] B) GalNAc modifizierte siRNA-Konjugate nach Nair et al..^[143]

Zur Einführung der Modifikation am 3'-Ende entwickelten Nair et al. unterschiedliche Trägermaterialien für Oligonukleotid-Festphasensynthese, die bis zu drei geschützte *N*-Acetylgalactosamine-Modifikationen tragen (GalNAc-Tripod) (Abbildung 4B)).^[143] Auf diese Weise gelang es eine Reihe von GalNAc-modifizierten siRNAs sowohl gegen Apolipoprotein B100 (ApoB100) als auch gegen Transthyretin von Mäusen (mTTR) herzustellen.^[144] Es zeigte sich, dass die 3'-Modifikation mit einem GalNAc-Tripod *in vitro* zu einer deutlich verstärkten Aufnahme in hepatische Zellen führte und die Expression von ApoB deutlich verringerte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine einzige subkutane Injektion in Mäusen (1mg/kg) eine deutliche Verringerung der Expression über einen Zeitraum von 9 Monaten bewirkte.

1.3.3.2 Lipid-modifizierte siRNA

Eine Klasse von Naturstoffen, die sehr früh für die Modifikation von Oligonukleotiden eingesetzt wurden, sind Lipide. Cholesterin (Chol) war einer der ersten Vertreter dieser Klasse, an dem nachgewiesen werden konnte, dass er für eine verbesserte Aufnahme von Nukleinsäuren in Zellen sorgen kann.^[145] So zeigte sich, dass die Modifikation einer antisense-DNA mit Cholesterin *in vitro* eine effektive Regulation hervorruft. Die Modifikation der gleichen antisense-DNA mit anderen Lipiden bewirkte keine nennenswerte Aufnahme in das Zellinnere. Aufgrund dieser Beobachtung schlussfolgerte Cook, dass die Aufnahme des Cholesterol-Konjugats nicht auf dessen Hydrophobizität zurück zu führen ist. Er folgerte, dass es sich um einen Rezeptor-vermittelten Vorgang handelt und postulierte den LDL-Rezeptor (**Low Density Lipoprotein** Rezeptor) als möglichen Kandidaten.^[145]

Dieser Rezeptor wird auf nahezu allen Zelloberflächen exprimiert und bindet dort das Apoprotein B100 in Cholesterin reichem LDL, woraufhin er die Clathrin-vermittelte Endozytose einleitet.^[146] Da unmodifizierte siRNA nur in sehr geringem Umfang in Leberzellen aufgenommen wird, modifizierten *Vornlocher* und *Unverzagt* erstmals eine siRNA mit Cholesterin, um eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme zu ermöglichen (Abbildung 5 A)).^[147] Sie modifizierten dabei das 5'-Ende des *passenger*- und/oder des *guide*-Strangs mit einer siRNA gegen βGalactosidase neben Cholesterin auch mit Desoxycholsäure, Laurinsäure und einem C₃₂-Membranlipid Analogon. Eine Untersuchung der regulatorischen Potentiale in humanen Hepatozyten-Zellen HuH-7 zeigte, dass die mit Abstand effektivste Regulation mit der Cholesterol-modifizierten siRNA beobachtet werden konnte (maximale Reduktion der Expression um 45 %). Die anderen Modifikationen bewirkten geringe oder keine Veränderung der Expression von β-Galactosidase.^[147] Zu einem ganz ähnlichen Ergebnis kamen auch Chernolovskaya *et al.*, die die Aufnahme einer Reihe von Lipid- und Steroid- modifizierten siRNA-Konjugate *in vitro* an den Krebszelllinien HepG2, KB-8-5 und HEK293 untersuchten.^[148] Mittels Konfokal-Mikroskopie und Durchflusszytometrie konnten sie zeigen, dass das Cholesterol-Konjugat von den verwendeten Zelllinien am effektivsten aufgenommen wurde. Auch zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Hydrophobizität und Aufnahme der Konjugate in die verwendeten Zellen. Diese Beobachtung interpretierten sie als Hinweis auf eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme des Cholesterol-Konjugats über den LDL-Rezeptor. Durch eine Verknüpfung der Cholesterol-Modifikation mit dem 3'-Ende des *passenger*-Strangs und dem Einsatz von 2'-Methoxy Nukleosiden und Phosphorthioaten zur Stabilisierung gegen Nukleaseen gelang Vornlocher *et al.* eine Optimierung und eine *in vivo* Regulation von ApoB in Mäusen um bis zu 64 %.^[149] Dabei zeigte sich auch eine verstärkte Bindung der Cholesterol-siRNA an Serum-Proteine, was zu einer deutlich gesteigerten Halbwertszeit des Konjugats im Serum nach intravaskulärer Injektion (16fach im Vergleich zu unmodifizierter siRNA) führte.

Primäre Neuronen stellen eine besondere Herausforderung für die Anwendung der RNA-Interferenz dar, da sie sehr empfindlich auf äußere Einflüsse reagieren und bei klassischen Methoden geringe Transfektions-Effizienzen zeigen.^[150] Da der LDL-Rezeptor auch auf Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert wird,^[151] wurde untersucht, ob ein effektiver Transport von siRNA mittels einer Cholesterol-Modifikation in diese Zellen möglich ist. So nutzten Sapp *et al.* siRNAs-Konjugate zur Veränderung der Expression Huntingtin (HTT) in primären kortikalen Neuronen.^[152] Dazu wurde das 5'-Ende des *passenger*-Strangs über einen Triethylenglycol-Linker mit Cholesterol verbunden, wodurch eine effektive Aufnahme und eine Reduktion der mRNA-Konzentration von Huntingtin um bis zu 90 % beobachtet werden konnte. Auch konnten sie zeigen, dass so modifizierte siRNA *in vivo* nach direkter Injektion in spezielle Bereiche des Gehirns von Mäusen eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der mRNA-Konzentration von Huntingtin (bis zu 77 % nach 24 h) bewirkt.

Ein weiteres Beispiel für eine intensiv untersuchte lipophile Modifikation von siRNA stellt α-Tocopherol (Vitamin E) dar (Abbildung 5 B)). Wegen seines hydrophoben Charakters wird α-

Tocopherol durch Lipoproteine wie Chylomikrone, LDL- und VLDL-Partikel gebunden und ebenfalls über den LDL-Rezeptor aufgenommen.^[153] Die Modifikation des 5'-Endes einer siRNA gegen das Apolipoprotein B (ApoB) konnte *in vitro* in hepatischen Leberzellen (Hepa 1-6) eine Reduktion der Expression um bis zu 50 % bewirken.^[154] In einer Untersuchung *in vivo* zeigte das α -Tocopherol-Konjugat nach intravaskulärer Injektion eine Reduktion der Konzentration an ApoB-mRNA um bis zu 80 % in der Leber von Mäusen.^[155]

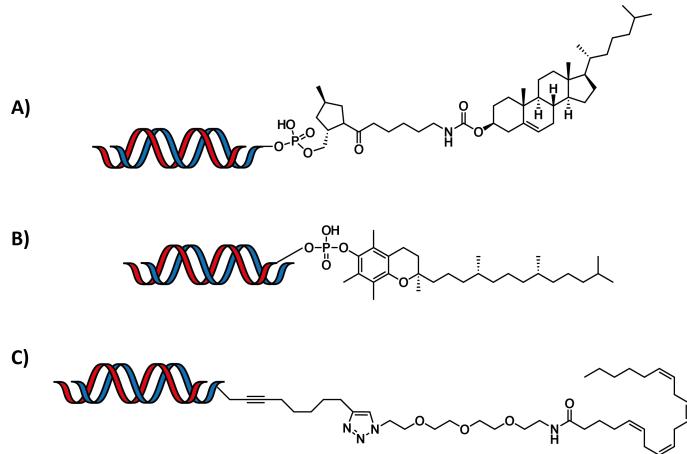


Abbildung 5: Lipid-siRNA-Konjugate. A) Cholesterin-Modifikation des 3'-Ende des *passenger*-Strangs einer siRNA nach Vornlocher et al..^[149] B) kovalente Verknüpfung des 5'-Ende einer siRNA mit Vitamin E (α -Tocopherol) nach Yokota et al..^[155] C) Durch Carell et al. entwickelte Modifizierung eines 3'-alkin-modifizierten *passenger*-Strangs mit einem azidfunktionalisierten Anandamid (AEA).^[156]

Arachidonylethanolamid (Anandamid, AEA) ist ein weiteres Beispiel (Abbildung 5 C)). AEA zählt zu den Endocannabinoiden und wurde als erster Ligand für die Gruppe der Cannabinoidrezeptoren identifiziert.^[157] Die Mitglieder dieser Gruppe sind das pharmakologische Ziel von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), der wichtigsten psychoaktiven Substanz in Cannabis, und umfassten die zwei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CB₁ und CB₂. Dabei findet sich CB₁ vorwiegend im zentralen Nervensystem und scheint nach seiner Aktivierung eng mit der Inhibierung der Adenylatcyclase und verschiedener Ionenkanäle verbunden zu sein.^[158] Demgegenüber wurde CB₂ in erster Linie in Zellen des Immunsystems wie B Lymphozyten und Mastzellen gefunden. Seine genaue Wirkungsweise ist noch nicht geklärt, allerdings wird ein Einfluss seiner Aktivierung in der Modulation der Immunantwort vermutet.^[159] AEA bindet an beide Vertreter der Cannabinoidrezeptoren, woraufhin es rasch ins Innere der Zielzelle aufgenommen und durch die am endoplasmatischen Retikulum lokalisierte *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) zu Arachidonsäure und Ethanolamin abgebaut wird.^[160] Nachdem gezeigt werden konnte, dass dieses Molekül für den gezielten Transport geeignet ist, wurde durch Carell et al. mittels Click-Chemie das 3'-Ende des *passenger*-Strangs einer siRNA mit Anandamid funktionalisiert.^[156, 161] Mittels Konfokalmikroskopie konnte deren Aufnahme in Mastzellen (RBL-2H3) als Modellsystem für Immunzellen nachgewiesen werden.^[159b, 162] Eine Untersuchung der biologischen Aktivität der AEA-funktionalisierten siRNA mittels Luciferase-Assay ergab eine konzentrationsabhängige Reduktion der Expression um bis zu 60 %. Besonders hervorzuheben ist die Beobachtung, dass diese Strategie sehr geringe toxische Effekte auf diese

empfindlichen Zellen zu haben scheint und somit eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Methoden darstellt.^[156]

1.3.3.3 Verzweigte siRNA-Liganden-Konjugate

Die Nutzung von Liganden-Rezeptor-Interaktionen stellt ein sehr potentes und intensiv untersuchtes Mittel dar, um siRNA gezielt in einzelne Gewebe und Zelltypen zu transportieren. Allerdings hat diese Methode auch einige Nachteile. So besitzen siRNA-Liganden-Konjugate eine relativ geringe Größe und werden daher *in vivo* relativ schnell über die Niere ausgeschieden.^[163] Ein weiteres Problem stellt die eingeschränkte Expression einiger Rezeptoren dar. Kommt es zu einem Überangebot an Bindungspartnern, ist eine Absättigung möglich und somit die Aufnahme an siRNA über diesen Weg beschränkt.^[164] Um diese beiden Probleme zu umgehen, wurden verzweigte Strukturen entwickelt, in denen mehrere siRNAs kovalent mit einem Liganden verknüpft sind.^[12] Derartige Strukturen sollten durch den größeren räumlichen Anspruch auch bessere pharmakologische Eigenschaften zeigen. So wurde 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.^[165]

Daher wurden unter Mitarbeit des Autors dieser Arbeit verzweigte Strukturen hergestellt, in denen mittels Click-Chemie drei, sechs oder neun siRNA-Duplexe mit Arachidonylethanolamid (AEA) verknüpft sind. Die Verbindung mit der siRNA erfolgte dabei postsynthetisch mit dem 3'-Ende des *passenger*-Strangs der jeweiligen siRNA (Abbildung 6).

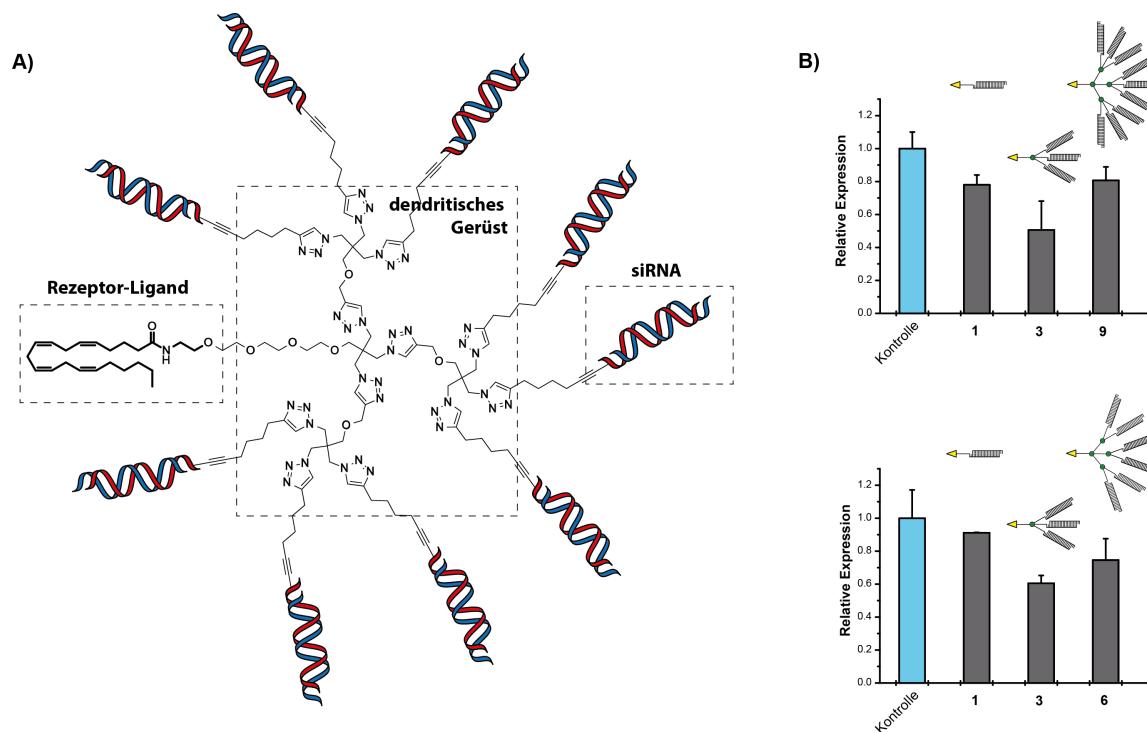


Abbildung 6: A) Schematische Darstellung der unter Mitarbeit des Autors dieser Arbeit entwickelten verzweigten siRNA-Struktur, in der neun siRNA-Duplexe mit einem AEA-Liganden verknüpft sind. B) Regulation einer *Renilla*-Luciferase durch verzweigte siRNA-Strukturen in RBL-2H3-Zellen.

Bei der Untersuchung der biologischen Aktivität der Konstrukte mit Hilfe eines Luciferase-Assays in RBL-2H3-Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Anzahl an siRNA-Duplexe pro Ligand zu einer deutlich stärkeren Regulation der Expression führt. Es zeigte sich, dass ein Optimum der Regulation bei drei siRNAs pro Liganden erreicht ist. Da eine AEA-Modifikation besonders für einen Transport von siRNA in Zellen des zentralen Nervensystems geeignet ist, wurde die biologische Aktivität der trimeren siRNA-Konstrukte in primären Neuronen untersucht.^[166] Dazu wurden murine E14 kortikale Neuronen mit dem neurotropen Tollwutvirus (RABV) infiziert und anschließend mit zwei trimeren-siRNA-Konjugaten behandelt. Als Ziele der siRNAs wurden die mRNA des viralen Nukleoproteins (N-Protein) und des Phosphoproteins (P-Protein) gewählt, die für die Transkription und Replikation des Virus essentiell sind und als vielversprechende Ziele für die Behandlung einer RABV-Infektion gelten.^[167] Durch die Behandlung mit den trimeren-Konstrukten konnte der Virustiter dosisabhängig um zwei Zehnerpotenzen bis an die experimentelle Nachweisgrenze gesenkt werden. In einem Kontrollexperiment, in dem die infizierten primären Neuronen mittels eines konventionellen Transfektionsreagens mit den unmodifizierten siRNAs behandelt wurden, zeigte sich eine um den Faktor zehn geringere Regulation, was das Potential dieses Konzeptes verdeutlicht.

1.3.4 Klinische Anwendungen von siRNA

In den letzten Jahren wurden verstärkt Anstrengungen unternommen alternative Behandlungsmethoden zu entwickeln.^[14] Eine dieser Methoden eröffnete sich, als *Zamecnik* und *Stephenson* in den späten 70er Jahren das Konzept der *antisense* Oligonukleotide (ASO) zur gezielten Beeinflussung der Translation von RNAs des *Rous sarcoma Virus* vorstellten.^[15] Dieses Konzept führte zu einer intensiven Suche nach alternativen Möglichkeiten die Translation mit Oligonukleotiden zu modulieren.^[16] Eine sehr vielversprechende Möglichkeit ist der Einsatz von siRNA zur Nutzung des beschriebenen Mechanismus der RNA-Interferenz. Nach intensiver Forschung und vielen vergeblichen Anläufen siRNA basierte Medikamente zu entwickeln, kam mit *Patisiran* (*Onpattro®*, *Alnylam Pharmaceuticals*) 2018 ein erster Vertreter dieser innovativen Methode auf den Markt. Neben diesem befinden sich eine ganze Reihe solcher Präparate in unterschiedlichen Phasen klinischer Studien. Im Folgenden sollen die in klinischen Studien erfolgreichsten Vertreter dieser innovativen Wirkstoffgruppe vorgestellt werden.

Generell kann man siRNA-basierte Präparate in zwei Klassen einteilen: weitgehend chemisch unmodifizierte Oligonukleotide und siRNAs Liganden-Konjugate, die zum Teil erheblich chemisch modifiziert sind.

Ein Beispiel für eine weitgehend unmodifizierte siRNA ist das bereits erwähnte *Patisiran* (*Alnylam Pharmaceuticals*). Dieses Medikament wurde zur Behandlung der familiären Amyloid-Polyneuropathie (FAP) entwickelt. Diese Erbkrankheit führt zu einer Fehlfaltung (β -Fibrillen) von Transthyretin. Die Ablagerung dieser Fibrille resultiert in schweren Schädigungen im Bereich der

Nieren und Augen sowie des peripheren und zentralen Nervensystems.^[168] Da unmodifizierte siRNAs nach einer systemischen Aufnahme nur schlecht in Gewebe aufgenommen werden und eine sehr geringe Halbwertszeit in der Blutbahn zeigen,^[169] ist eine Formulierung mit beispielsweise Polymeren oder Liposomen notwendig. Im Falle von *Patisiran* erfolgt die Formulierung durch sogenannte Lipid-Nanopartikel (LNPs), welche eine Aufnahme vor allem in der Leber bewerkstelligen. Die formulierte siRNA ist durch die chemische Modifikation mit 2'-Methoxyribose und 2'-Desoxythymidin an den Überhängen leicht gegen Nukleasen stabilisiert und richtet sich gegen die mRNA des Transthyretin (TTR)-Gens, das mit der familiären Amyloid-Polyneuropathie (FAP) assoziiert ist.^[170] Dabei stellen die bereits erwähnten Probleme der Erregung einer verstärkten Immunantwort ein erhebliches Problem dar.^[131] Aus diesem Grund müssen Patienten vor der Verabreichung des siRNA-Präparats Antihistamine, nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) und relativ hoch dosierte Glucocorticoide verabreicht werden, um die Nebenwirkungen zu kontrollieren.^[171] In klinischen Studien der Phasen 1 konnte gezeigt werden, dass es nach der Verabreichung von *Patisiran* zu einer dosisabhängigen Verringerung der Konzentration von Transthyretin (TTR) kommt. In Studien der Phase 2 zeigte sich eine Reduktion von TTR von mehr als 80 % in Patienten nach intravenöser Injektion (0.3 mg/kg) im Abstand von drei Wochen. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurden in Phase 3 anschließend 225 Patienten über einen Zeitraum von 18 Monaten alle 3 Wochen intravenös mit *Patisiran* behandelt, wobei eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität und ein deutlich verlangsamtes Fortschreiten der Krankheit beobachtet werden konnte (*Alnylam Pharmaceuticals*, Pressemitteilung vom 2. November 2017). Daraufhin wurde *Patisiran*, nach einer beschleunigten Begutachtung durch die FDA, für die Behandlung von TTR-Amyloidose unter dem Markennamen *Onpattro* zugelassen. Es stellt somit die erste zugelassene Behandlung für diese Erkrankung und das zur Zeit am weitesten fortgeschrittene siRNA-basierte Medikament dar.^[172]

Beispiele für stark modifizierte siRNA Liganden-Konjugate sind *Revusiran* (*Alnylam Pharmaceuticals*) und *Fitusiran* (*Alnylam Pharmaceuticals*). In beiden Fällen handelt es sich um GalNAc-Konjugate, wobei die siRNA durch den Einsatz von Phosphorthioaten und 2'-Methoxyribose gegenüber Nukleasen stabilisiert wurde.^[173] *Revusiran* stellt den ersten Vertreter einer GalNAc-modifizierten siRNA dar, der in klinischen Studien untersucht wurde, wobei drei Liganden kovalent mit dem 3'-Ende des *passenger*-Strangs verbunden sind. Wie im Falle von *Patisiran* richtete sich die siRNA gegen die mRNA des Transthyretin (TTR)-Gens zur Behandlung von Patienten mit TTR-Amyloidose. Das siRNA-Konjugat konnte in Studien der Phase 1 und 2 eine dosisabhängige Reduktion der Konzentration des TTR-Proteins im Plasma von Patienten nach subkutaner Injektion um bis zu 85 % erreichen. Nach diesen vielversprechenden Ergebnissen zeigten sich allerdings in einer großangelegten Phase 3-Studie erhebliche Probleme mit dem Präparat. So konnten Komplikationen wie Leberversagen, metabolischer Azidose, bis hin zum Tod von Patienten beobachtet werden, weshalb die Entwicklung 2016 eingestellt wurde. Das nah verwandte *Fitusiran* richtet sich gegen die mRNA des SERPINC1-Gens, das für Antitrombin III (AT III) kodiert. Dieser

Serinprotease-Inhibitor wird in der Leber exprimiert und ist einer der wichtigsten Hemmstoffe der Blutgerinnung. Auch hier wird die Liganden-Modifikation über die von *Nair et al.* entwickelte Methode eingeführt, wodurch drei GalNAc-Moleküle über einen trivalenten Linker kovalent mit dem 3'-Ende des *passenger*-Strangs verbunden sind.^[143, 173b] Nachdem die Effektivität und gute Verträglichkeit des Präparats in einer klinischen Studie der Phase 1 gezeigt werden konnte, wurden die Untersuchungen ausgedehnt, wobei Patienten mit Hämophilie einmal monatlich subkutan *Fitusiran* verabreicht wurde. Dabei wurden, unabhängig von Körpergewicht, entweder 50 oder 80 mg des Präparats verabreicht und eine konzentrationsabhängige Abnahme an Antithrombin im Blutplasma der Patienten bis zu 87 % beobachtet.^[174] Aufgrund des daraus resultierenden Anstiegs von Thrombin um bis zu 289 % und der nur geringen beobachteten Nebenwirkungen wurde 2018 eine großangelegte Studie der Phase 3 mit 250 Patienten eingeleitet.^[175]

Diese Beispiele zeigen, dass Oligonukleotid-basierte Medikamente kurz davor stehen eine wichtige Rolle als alternative Behandlung unterschiedlichster Krankheiten einzunehmen. Dabei stellte die Zulassung der beiden *antisense*-Therapeutika *Nusinersen* (*Spinraza®*, *Ionis und Biogen*) und *Eteolirsen* (*EXONDYS 51®*, *Sarepta Therapeutics*) 2016 durch die FDA einen bedeutenden Meilenstein dar. Mit *Patisiran* (*Onpattro®*, *Alnylam Pharmaceuticals*) wurde 2018 das erste siRNA-basierte Medikament durch die FDA zugelassen und so das seit langem postulierte Potential der RNA-Interferenz für klinische Anwendungen bewiesen. Die dabei auftretenden Probleme mit der immunstimulierenden Formulierung mittels Liposomen ist eine der Herausforderungen, die noch zu überwinden sind. Besonders Liganden-Konjugate wie *Fitusiran* könnten eine erhebliche Verbesserung des Therapieerfolgs bewirken, da sie ohne Formulierung auskommen.^[176] Am Beispiel von *Revusiran* zeigte sich allerdings auch, dass noch erhebliche Forschungsanstrengungen notwendig sind, um das ganze Potential der siRNA-Therapeutika ausschöpfen zu können.

2. AUFGABENSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in vier Teile. Im ersten Teil der Arbeit sollte das unter Mitarbeit des Autors entwickelte Konzept der verzweigten siRNA-Strukturen auf ein weiteres Ligandensystem neben Anandamid und Folsäure erweitert werden, um die breite Anwendbarkeit der neuartig verzweigten Strukturen zu untermauern. Dazu sollte ein dendritisches trimeres siRNA-Konstrukt mit Glucose-Liganden entwickelt werden. Dieses sollte anschließend mittels Luciferase basiertem *Assay* auf seine biologische Aktivität im Vergleich zu monomerer siRNA untersucht werden. Im Weiteren sollte auch die Aufnahme der von Prof. *Thomas Carell* zum Patent angemeldeten, Glucose vermittelten Aufnahme von siRNA näher untersucht werden. Dies sollte durch konfokalmikroskopische Studien in Kooperation mit der Gruppe von Prof. *Christoph Bräuchle* erfolgen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Anwendbarkeit Liganden-modifizierter siRNAs zur systemischen Regulation in Pflanzen untersucht werden. Im ersten Schritt sollte dazu die Aufnahme unterschiedlicher Liganden-modifizierter RNAs mittels Konfokalmikroskopie untersucht werden. Im nächsten Schritt wurden in Zusammenarbeit mit der *BASF* verschiedene Zielgene ausgewählt. Nach der Synthese einer Bibliothek Liganden-modifizierter siRNAs gegen diese Gene sollten die Auswirkungen einer Behandlung von *Arabidopsis thaliana* durch Aufnahme über die Wurzeln und die Blätter beobachtet werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Redifferenzierung von Fibroblasten zu Neuronen, einem relevanten Bereich der regenerativen Medizin. Eine effiziente Methode Nervenzellen aus gut verfügbaren Patientenzellen zu gewinnen, ist dabei ein wichtiger Schritt zur Behandlung von schweren Schädigungen des Nervensystems ohne Abstoßreaktion. In einer internen Kooperation mit *Fabio Spada* sollten dazu Fibroblasten mit unterschiedlich Liganden-modifizierten siRNAs behandelt werden. Als Ziel der Regulation wurde das für die Differenzierung von Neuronen wichtige PTBP1 gewählt. Mittels quantitativer *realtime PCR* sollte die Abnahme der relativen Expression von PTBP1 untersucht werden. Als Indikator für eine Differenzierung in Neuronen sollte die relative Expression der neuronenspezifischen Isoform PTBP2 herangezogen werden.

Im vierten Teil dieser Arbeit sollte zum einen eine bioorthogonale Modifizierung von Proteinen mit Rezeptorliganden ermöglicht werden. Des Weiteren sollte die Anwendbarkeit der so hergestellten Protein-Ligand-Hybridstrukturen durch den selektiven Transport beliebig beladbarer Silica-Nanopartikeln für den gezielten Wirkstofftransport demonstriert werden. Zunächst sollte in Zusammenarbeit mit *Milan Vrabel* die bioorthogonale Modifikation von Proteinen mit Anandamid durch Diels-Alder Reaktion ermöglicht werden. Dazu sollte zunächst ein in Bezug auf Reaktivität und Isolierbarkeit optimiertes Tetrazin entwickelt und mit Anandamid verknüpft werden. Dies sollte eine

schonende bioorthogonale Clickreaktion mit einer Norbornen-funktionalisierten Carboanhydrase ermöglichen.

In einer weiteren Kooperation mit der Gruppe von Prof. *Thomas Bein* sollte die so Liganden modifizierten Carboanhydrase den Transport von hochfunktionalisierten, beliebig beladbaren Silica-Nanopartikeln ermöglichen.

3. ENTWICKLUNG MULTIMERER GLUCOSE-MODIFIZIERTER siRNA

Die Verwendung von Liganden-modifizierter siRNA zur Bewerkstelligung einer Rezeptor-vermittelten Aufnahme der Oligonukleotide wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht.^[177] Im Zuge dieser Untersuchungen konnte durch *Julian Willibald* und *Johannes Harder* gezeigt werden, dass neuartige multimere siRNA-Strukturen, in denen ein Ligand die Aufnahme mehrerer siRNA-Moleküle vermittelt, zu einer deutlichen Steigerung der Effektivität dieses Systems führen. Die höchste Effizienz zeigten dabei Strukturen mit drei siRNAs pro Liganden. Bei der weiteren Optimierung trimerer siRNA-Konstrukte zeigte eine Modifikation des *guide*-Strangs mit Sacchariden eine zusätzliche Steigerung der biologischen Aktivität.

Glucose (Glc) als einfachstes verwendetes Saccharid zeigte den größten Einfluss. Daraufhin konnte gezeigt werden, dass eine Modifikation von siRNA mit Glucose alleine auch zu einer Aufnahme der siRNA in die Zellen führen kann. Diese, zur Patentierung angemeldete Strategie für die Aufnahme von Oligonukleotiden, sollte daraufhin weiter untersucht werden.^[178] Glucose ist die primäre Energiequelle für viele Zellen und sollte daher eine universelle und rasche Aufnahme von Glucose-siRNA-Konjugaten sicherstellen. Des Weiteren wird Glucose auf sehr vielfältige Weise in Zellen aufgenommen, wobei die wichtigsten Importwege durch Transporterproteine bewerkstelligt werden. Ist ein solcher Transport auch für Glucose-Konjugate zugänglich, stellt er eine sehr effektive und schnelle Möglichkeit des Imports von siRNA in Zielzellen dar. Im Zuge einer Rezeptor-vermittelten Aufnahme wird das Ligandenkonjugat zusammen mit dem Rezeptor durch Endozytose aufgenommen.^[125] Bevor der Rezeptor für eine erneute Bindung eines weiteren Liganden zur Verfügung steht, muss er aus dem Inneren des Endosoms ausgeschleust werden und wieder an die Außenseite der Zellmembran gelangen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Aufnahme durch Transportproteine um einen kontinuierlichen Vorgang, der daher wesentlich effizienter ist. Auch die Freisetzung der siRNA aus dem Inneren des Endosoms stellt bei einer Endozytose-vermittelten Aufnahme einen problematischen Schritt dar.^[179] Bei einer Aufnahme mittels Transportproteinen würden daher eine Hürden entfallen, was zu einer effektiveren Aufnahme von siRNA führen könnte. Die breite Anwendbarkeit von Glucose als Liganden für einen Import von siRNA ist nicht nur für *in vitro* Anwendungen ein großer Vorteil. Wie beispielsweise *Sapp et al.* im Falle von Cholesterol-modifizierter siRNA zeigte, ist für *in vivo* Anwendungen in vielen Fällen eine lokale Administration, allein schon zur Verringerung der anzuwendenden Wirkstoffmenge, einer systemischen Administration vorzuziehen. In solchen Fällen ist die Spezifität des eingesetzten Liganden im Vergleich zu seiner Effektivität nicht entscheidend.

Um die breite Anwendbarkeit der trimeren Strukturen weiter zu untermauern, wurde daher eine trimere siRNA-Struktur hergestellt, in der ein Glucose-Ligand mittels CuAAC mit drei Alkin-

modifizierten *passenger*-Strängen einer siRNA modifiziert werden konnte. Im Folgenden werden die dazu notwendigen Arbeitsschritte näher erläutert.

3.1 SYNTHESE ALKIN-MODIFIZIERTER siRNA

Für RNAi-Experimente mit Liganden-modifizierter siRNA wurden RNA-Oligonukleotide hergestellt, die eine postsynthetische Modifikation mittels CuAAC erlauben. Dazu wurde eine Alkin-Ankergruppe eingeführt, die in vorangegangenen Studien im Arbeitskreis *Carell* sehr erfolgreich eingesetzt wurde.^[180] Die Einführung dieser Alkin-Modifikation erfolgte dabei durch den Einbau eines 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin-Phosphoramidits (**7**) in RNA-Oligonukleotide mittels Festphasensynthese. Die Synthese des Alkin-Phosphoramidits erfolgte in sechs Stufen ausgehend von 2'-Desoxyuridin (**8**) (Abbildung 7).^[181]

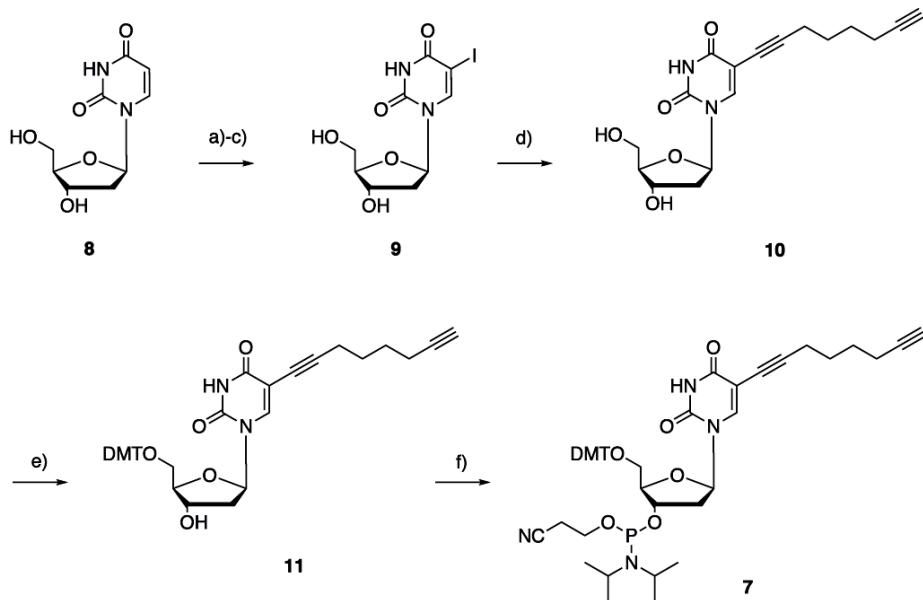


Abbildung 7: Synthese von 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin-Phosphoramidit **7**. a) Ac₂O, 0 °C, 97 %, b) I₂, CAN, 90 °C, 55 %, c) NH₃/MeOH 7N, RT, quant., d) Okta-1,7-diin, PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, DIPEA, DMF, RT, 39 %, e) DMTCl, DMAP, Pyridin, 0 °C -> RT, 51 %, f) CEDCl, DIPEA, DCM, RT, n.b.

In einem ersten Schritt wurde eine quantitative Acetylierung der beiden Hydroxylgruppen vorgenommen, um diese für die anschließend durchgeführte Iodierung der C5-Position des Uridins zu schützen. Nach der Entschützung mittels Ammoniak in Methanol wurde das Iodouridin **9** in einer *Sonogashira*-Kreuzkupplung mit Okta-1,7-diin umgesetzt, um das Oktadiinyl-Uridin **10** zu erhalten. An dem so gewonnenen Oktadiin-Uracil wurde nun eine Schützung der 5'-Hydroxylgruppe mit Dimethoxytritylchlorid vorgenommen und das DMT-geschützte Uridin **11** abschließend mit 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropyl-chlorophosphor-diamidit (CEDCl) zum Phosphoramidit **7** umgesetzt. Um eine Oxidation der Phosphor(III)-Spezies zu vermeiden, erfolgte dieser Schritt jeweils unmittelbar vor dem Einsatz in der Festphasensynthese.

Für die Festphasensynthese von RNA-Oligonukleotiden wurden stets Phosphoramidite eingesetzt, deren 2'-OH-Gruppe mittels *tert*-Butyldimethylsilylether geschützt waren (TBDMS-Phosphoramidite). Um eine hohe Kupplungseffizienz während der Festphasensynthese (> 95 %) zu erreichen, wurden diese mit einer höheren Konzentration (0.20 – 0.15 M statt 0.10 M) angelöst. Für RNA-Festphasensynthesen wurden im Vergleich zu DNA-Synthesen (30 sec) deutlich verlängerte Kupplungszeiten von 10 min gewählt. Das 2'-Desoxy-Phosphoramidit wurde stets an der zweiten Position des 3'-Überhangs der hergestellten siRNAs eingebaut. Sämtliche Synthesen wurden unter Verwendung von dT-CPG (2'-Desoxy-Thymidin *Controlled Pore Glass*) als Trägermaterial durchgeführt, wobei sich die Maßstäbe je nach der erforderlichen Menge des RNA-Oligonukleotids zwischen 200 nMol und 2 µMol bewegten. Die Entschützung der RNA-Stränge erfolgte in zwei Schritten. In einem ersten Schritt wurden durch Inkubation in Ammoniumhydroxid zuerst der CPG-Träger und die Nukleobasen-Schutzgruppen abgespalten und anschließend durch eine Behandlung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) die TBDMS-Schutzgruppen der 2'-Hydroxylgruppen entfernt. Die Aufreinigung und Charakterisierung erfolgte mittels präparativer *reversed phase* HPLC sowie MALDI-TOF.

Für RNAi-Experimente wurden verschiedene RNA-Oligonukleotide mit Alkinmodifizierung nach der oben beschriebenen Methode hergestellt, um eine postsynthetische Liganden-Modifizierung mittels CuAAC zu ermöglichen. So wurde zum einen der *passenger*-Strang (ORN1) und der *guide*-Strang (ORN2) eines gegen die mRNA von *Renilla*-Luciferase gerichteten siRNA-Duplexes hergestellt. Um einen Einfluss der verwendeten Liganden auf die Expression überprüfen zu können, wurde zusätzlich eine siRNA verwendet, die keine komplementäre mRNA besitzt und im Folgenden als „nonsense“-siRNA bezeichnet wird.

Die biologische Prozessierbarkeit der entsprechenden siRNAs durch RISC wurde durch den Einbau der Alkinbase an der 2. Position des 3'-Überhangs sichergestellt. Für die Hybridisierung der siRNA-Duplexe wurden die jeweiligen Sequenzen ebenfalls ohne eine Alkin-Modifikation synthetisiert. Die Sequenzen der hergestellten RNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Sequenzen der hergestellten und aufgereinigten RNA-Oligonukleotide. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die Position der Alkinmodifizierung durch Einbau von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin ist dabei mit **Y** angegeben.

RNA	Sequenz	Beschreibung
ORN1	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-C Y dT	Luc-passenger-Strang-Alkin
ORN2	GUA-GGA-GUA-GUG-AAA-GGC-C Y dT	Luc-guide-Strang-Alkin
ORN3	UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-U Y dT	Nonsense-passenger-Strang-Alkin
ORN4	ACG-UGA-CAC-GUU-CGG-AGAA- Y dT	Nonsense-guide-Strang-Alkin
ORN5	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CdTdT	Luc-passenger-Strang
ORN6	GUA-GGA-GUA-GUG-AAA-GGC-CdTdT	Luc-guide-Strang
ORN7	UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UdTdT	Nonsense-passenger-Strang
ORN8	ACG-UGA-CAC-GUU-CGG-AGAA-ddTdT	Nonsense-guide-Strang

3.2 SYNTHESE EINES GLUCOSE-TRIAZIDS

Da besonders bei lokaler Administration von Oligonukleotid-Konjugaten ein universelles und effektives System sehr vorteilhaft ist, sollte die universelle Einsetzbarkeit des erfolgreich angewendeten Prinzips der siRNA-Dendrimere untermauern werden. Daher sollten verzweigte trimere siRNA-Strukturen mit einem universell einsetzbaren Liganden aufgebaut werden. Im zweiten Schritt wurde daher ein Glucosemolekül kovalent mit drei Azidfunktionalitäten verknüpft.

Dies ist notwendig um anschließend RNA-Stränge mittels Kupfer(I) katalysierter Azid/Alkin-Cycloaddition mit dem Liganden verbinden zu können. Bei der Gestaltung der Verbindung wurde auf die Erfahrungen von *Johannes Harder* und seiner Untersuchungen unterschiedlicher Liganden-Triazide zurückgegriffen. Bei der Synthese eines Glucose-Triazids wurde eine chemische Struktur angestrebt, die möglichst analog zu der durch *Johannes Harder* entwickelten Triazidostruktur **2** sein sollte. Auch hier sollten die drei Azide mittels eines Pentaerythritoltriazids, als Kern der verzweigten Struktur, eingeführt werden. Die Verbindung des Pentaerythritol-Kerns mit dem Glucoserest sollte auch hier durch einen Tetraethylenglycol-Linker erfolgen, wodurch eine möglichst freie

Zugänglichkeit der Glucose gewährleistet sein sollte. Die Synthese dieses Glucose-Triazids soll in Folgendem kurz vorgestellt werden.

Um den Kern der verzweigten Struktur zu generieren, wurde Pentaerythritoltriazid (**12**) in einer zweistufigen Synthese ausgehend von Pentaerythritol (**12**) hergestellt. Dazu wurde **12** in Pyridin mit drei Äquivalenten *para*-Toluolsulfonsäurechlorid umgesetzt und nach chromatographischer Aufreinigung Pentaerythritol-tritosylat **14** in guter Ausbeute erhalten (Abbildung 8). Das Tosylat **14** wurde nun mit einem Überschuss an Natriumazid zur Reaktion gebracht, wobei nach chromatographischer Aufreinigung das Triazid **12** nahezu quantitativ erhalten wurde. Bei dieser S_N2-Reaktion wurde besondere Sorgfalt angewendet, da durch die große Anzahl von Azidfunktionalitäten relativ zum Molekulargewicht eine potentielle Explosionsgefahr nicht ausgeschlossen werden kann.^[182]

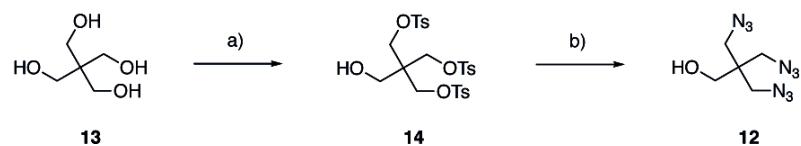


Abbildung 8: Synthese eines Pentaerythritoltriazids **12** als Kern der verzweigten Glucose-RNA-Struktur. a) TsCl, Pyridin, RT, 48 %, b) NaN₃, DMF, 110 °C, 94 %.

Um den Linker bereit zu stellen, wurde anfangs eine der beiden Hydroxygruppen von Tetraethylenglycol **15** durch Umsetzen mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid als Silylether geschützt (Abbildung 9). Durch den Einsatz eines leichten Überschusses (1.1 Äquivalente) des Silylchlorids wurde eine Bildung der zweifach geschützten Verbindung weitgehend vermieden.

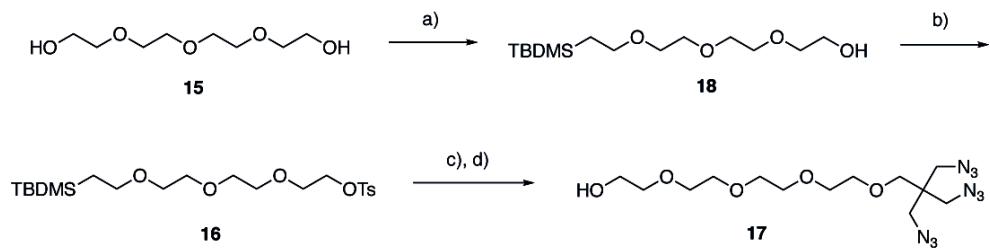


Abbildung 9: Synthese des Tetraethylenglycol-Linkers **17**. a) TBDMS-Cl, DMAP, DIPEA, 0 °C-RT, 24 %, b) Tosyl-Cl, MeCN, Et₃N, 0 °C-RT, 82 %, c) **12** (Pentaerythritoltriazid), NaH, [15]-Krone-5, DMF, RT, 35 %, d) TBAF, THF, 0 °C-RT, 94 %.

Im nächsten Schritt wurde die zweite Hydroxygruppe durch Reaktion mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid umgesetzt. Durch die so entstandene gute Abgangsgruppe konnte nun in einer S_N2-Reaktion das tosylierte Tetraethylenglycol **15** mit dem zuvor hergestellten Pentaerythritoltriazid (**12**) verknüpft werden. Zur Spaltung des Silylethers wurde anschließend mit TBAF umgesetzt und so der entschützte Triazido-Linker **17** erhalten.

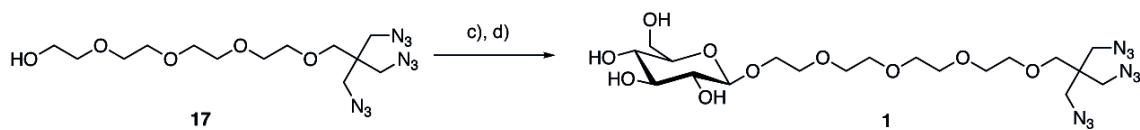


Abbildung 10: Synthese des Glucose-Triazids **1** aus dem Triazid-Linker und Glucosepentaacetat. a) Glucosepentaacetat, $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, DCM, 0 °C-RT, 52 %, b) NaOMe, MeOH, RT, 91 %.

Zur Gewinnung des fertigen Glucosetriazids **1** sollte der so erhaltene Linker **17** mit Glucose gekoppelt werden (Abbildung 10). Dazu wurde wie bei der Synthese des Glucosemonoazids durch *Felix Gnerlich* vorgegangen und der Linker mit Glucosepentaacetat umgesetzt. Zur Aktivierung wurde dabei $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ als Lewissäure verwendet.^[183] Abschließend wurde die Verbindung mit Natriummethanolat inkubiert, wodurch eine Abspaltung der Acetylschutzgruppen erreicht wurde und nach chromatographischer Aufreinigung **1** in guter Ausbeute erhalten wurde.

3.3 SYNTHESE EINER TRIMEREN GLUCOSE-SI RNA-STRUKTUR

Nach der erfolgreichen Synthese des Triazides **1** wurde dieses mittels Kupfer (I) katalysierter Azid/Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit den zuvor beschriebenen Alkin-modifizierten RNA-Oligonukleotiden verknüpft.

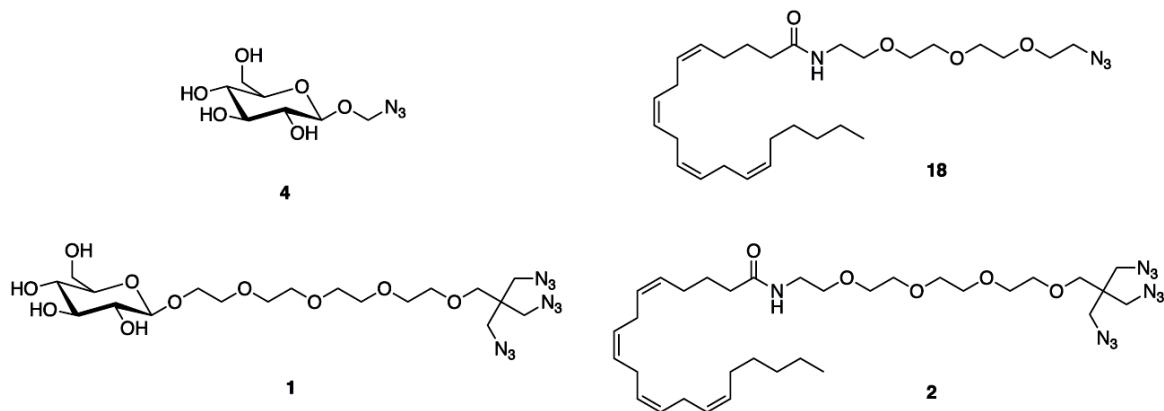


Abbildung 11: Für die postsynthetische Modifikation von siRNA verwendete Liganden-Azide. Bei den beiden Anandamid-Aziden (**2** und **18** links) handelt es sich um die von *Julian Willibald* entwickelten Strukturen.

Um die biologische Aktivität der daraus resultierenden siRNA-Struktur vergleichen zu können, wurden alle der in Abbildung 11 dargestellten Ligandenazide mit dem in Tabelle 1 beschriebenen Alkin-modifizierten *passenger*-Strang einer gegen die *Renilla*-Luciferase gerichteten siRNA (ORN1) verknüpft. Dieser Strang wird vor der Entstehung des aktiven RISC gespalten und freigesetzt, was eine gute Zugänglichkeit der *guide*-Stränge gewährleisten soll. Dazu wurde ein im Rahmen der Masterarbeit des Verfassers optimiertes Protokoll verwendet. Um einen möglichst quantitativen Umsatz zu gewährleisten, wurde in den Fällen der beiden Triazide **1** und **2** das Oligonukleotid ORN1

in einem leichten Überschuss (3.3 Aquiv.) eingesetzt, während die beiden Monoazide in einem 10 fachen Überschuss im Vergleich zu ORN1 eingesetzt wurden.

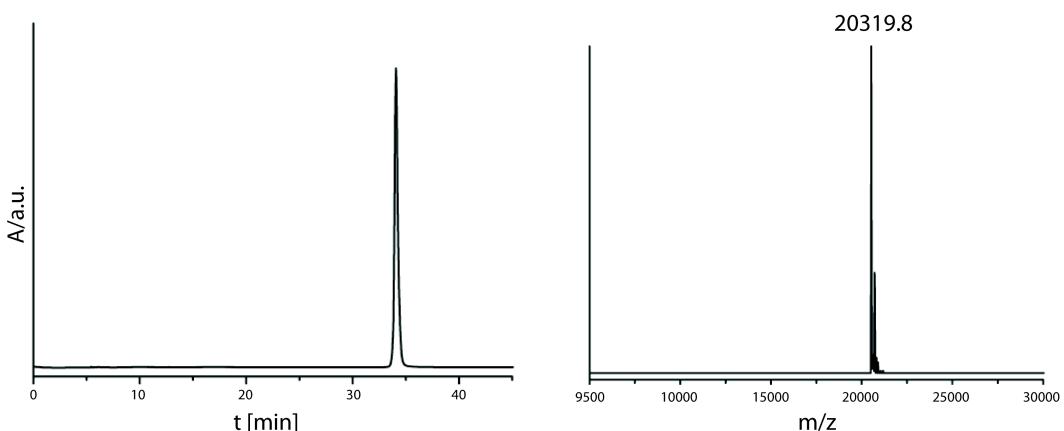


Abbildung 12: Charakterisierung der Click-Reaktion zwischen ORN1 und dem Glucosetriazids **1**. Exemplarisch dargestellt ist das HPL-Chromatogramm des HPL-Aufgereinigten Clickprodukts **1** + (ORN1)₃ (links). Die mittels MALDI-TOF bestimmte Masse des aufgereinigten Click-Produkts konnte der zu erwartenden Masse des dreifach Click-Produkts (ber. 20318.8) zugeordnet werden (rechts).

Die Aufreinigung sowie Analytik erfolgte durch HPL-Chromatografie und MALDI-TOF. In Abbildung 12 ist exemplarisch die Charakterisierung des Produkts der Click-Reaktion zwischen dem Glucosetriazids **1** mit dem *passenger*-Strang der *Renilla*-Luciferase siRNA (ORN1) dargestellt. Das Click-Produkt **1** + (ORN1)₃ konnte dabei in sehr hoher Reinheit gewonnen werden. Auf diese Weise wurden alle der in Abbildung 11 dargestellten Azide mit ORN1 verknüpft. Auch wurde der Alkin-modifizierte *passenger*-Strang der nicht regulierenden nonsense siRNA mit den vier Ligandenaziden umgesetzt und die entsprechenden Click-Produkte isoliert. Nach der vollständigen Charakterisierung wurde der entsprechende antisense-Strang in äquimolarer Menge zugegeben und durch Erhitzen auf 90 °C, gefolgt von langsamem Abkühlen, an das trimere Konstrukt hybridisiert. Die so erhaltenen siRNA-Konjugate sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Liganden-modifizierten siRNA-Konjugate gegen *Renilla*-Luciferase. Y = 2'Desoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (guide/passenger)	Sequenz	Struktur
Glc-Luc-siRNA (ORN1+4/ORN6)	5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CYdT-3' 3'dTdTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G-5'	+4 ^{Glc-Monoazid}
Glc-Tri-Luc-siRNA ((ORN1) ₃ +1/(ORN6) ₃)	5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CYdT-3' 3'dTdTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G-5'	+1 ^{Glc-Triazid}
Glc-nons-siRNA (ORN3+4/ORN8)	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT 3'-dTdTAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5'	+4 ^{Glc-Monoazid}
Glc-Tri-nons-siRNA ((ORN3) ₃ +1/(ORN8) ₃)	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT 3'-dTdTAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5'	+1 ^{Glc-Triazid}
AEA-Luc-siRNA (ORN1+18/ORN6)	5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CYdT-3' 3'-dTdTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G-5'	+18 ^{AEA-Monoazid}
AEA-Tri-Luc-siRNA ((ORN1) ₃ +2/(ORN6) ₃)	5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CYdT-3' 3'-dTdTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G-5'	+2 ^{AEA-Triazid}
AEA-nons-siRNA (ORN3+18/ORN8)	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT 3'-dTdTAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5'	+18 ^{AEA-Monoazid}
AEA-Tri-nons-siRNA ((ORN3) ₃ +2/(ORN8) ₃)	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT 3'-dTdTAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5'	+2 ^{AEA-Triazid}

Neben den in Tabelle 2 angegebenen siRNA-Konstrukten wurden auch die unmodifizierten siRNA gegen die *Renilla*-Luciferase (Luc-siRNA: ORN5/ORN6) und die unspezifische nonsense siRNA (nons-siRNA: ORN7/ORN8) hybridisiert.

Die hergestellten Glucose- und Anandamid-modifizierte siRNA-Konjugate sollten anschließend auf ihre biologische Aktivität hin untersucht werden. Dies sollte durch einen Luciferase-Assay geschehen, der in folgendem Kapitel kurz beschrieben wird.

3.4 EVALUIERUNG UNTERSCHIEDLICHER TRIMERER SIRNA-KONSTRUKTE

Um die biologische Aktivität der Liganden-modifizierten siRNA-Konstrukte beurteilen zu können, sollte ein dualer-Luciferase Assay verwendet werden, der bereits erfolgreich für RNAi-Studien mit unterschiedlichen siRNA-Konstrukten angewendet wurde (Abbildung 13).^[12, 184] Hierbei werden Zellen zunächst durch einen Vektor (*psiCHECK™-2*) mit den Genen der Luciferasen aus *Photinus pyralis* (Firefly-Luciferase) und *Renilla reniformis* (*Renilla*-Luciferase) transfiziert. Nach Expression

der beiden Gene liegen beide Enzyme in den Zellen vor und können nach Zellyse durch Zugabe der jeweiligen Substrate eine Reaktion katalysieren, die zur Freisetzung von Licht führt. Diese Reaktion ist im Falle der *Firefly*-Luciferase die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin, wobei Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 560$ nm frei wird. Die *Renilla*-Luciferase katalysiert eine ATP-unabhängige oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin, wobei Licht der Wellenlänge $\lambda = 482$ nm freigesetzt wird. Die unterschiedlichen Substrate ermöglichen eine getrennte Betrachtung beider Luciferasen.

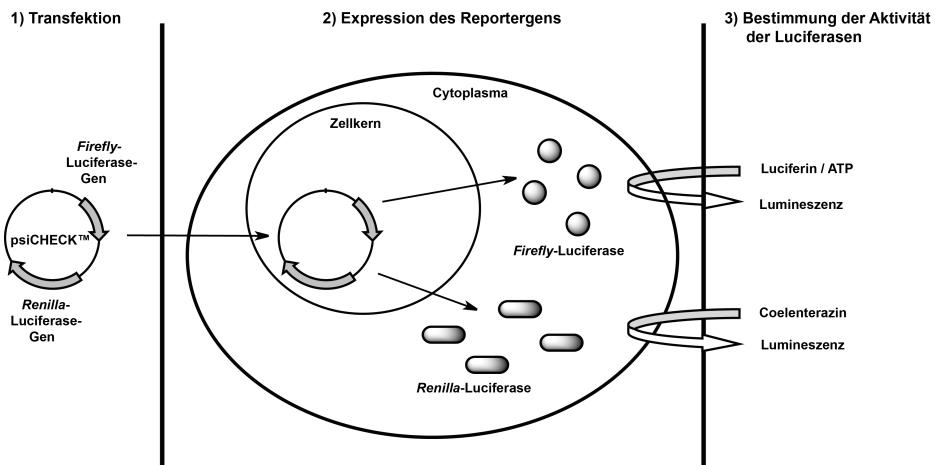


Abbildung 13: Funktionsweise des verwendeten dualen-Luciferase Reportersystems. Durch Transfektion der Zellen mit einem Vektor, der die Gene der Luciferasen aus *Photinus pyralis* (*Firefly*-Luciferase) und *Renilla reniformis* (*Renilla*-Luciferase) trägt, werden die entsprechenden Enzyme in den Zellen exprimiert. Die Zugabe der jeweiligen Substrate (*Firefly*-Luciferase: Luciferin und ATP, *Renilla*-Luciferase: Coelenterazin) nach Lyse der Zellen führt zu einer Lumineszenz, wodurch die Expression der beiden Enzyme quantifiziert werden kann.

Die Messung der Intensität des emittierten Lichts lässt dabei eine Aussage über das Maß der Expression der einzelnen Luciferasen zu. Da die beiden Luciferasen unterschiedliche Substrate benötigen, kann nach der Lyse der Zellen der Grad dieser Expression durch Zugabe des jeweiligen Substrats und Quantifizierung der emittierten Lichtquanten bestimmt werden. Dazu wurde im ersten Schritt die Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase bestimmt. Anschließend wurde diese gehemmt und gleichzeitig die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase durch entsprechende Substratzugabe ausgelöst.

Wird eine siRNA gegen die mRNA einer der beiden Luciferasen in die Zellen gebracht, verändert sich die Expression dieses „experimentellen“ Reporters in Relation zur zweiten Luciferase (interner Standard). Diese Veränderung in der relativen Expression der beiden Enzyme zueinander kann anschließend über das Verhältnis der Intensitäten der Lumineszenzen bestimmt werden.

In allen vorgenommenen Untersuchungen wurde die *Firefly*-Luciferase als experimenteller Reporter gewählt, während das Enzym der *Renilla reniformis* als interner Standard diente. Die Normalisierung durch die Lumineszenz der zusätzlich exprimierten Luciferase macht somit einen Verzicht auf Zelllinien mit stabil-transfizierten Reporter-Genen möglich.

Die Experimente wurden stets in 96-well-Platten durchgeführt, was einen hohen Durchsatz bei geringem Materialverbrauch ermöglicht. Je nach untersuchter Zelllinie wurden 10.000 (HeLa) bis 30.000 Zellen (RBL-2H3) eingesetzt und Untersuchungen in Triplikaten durchgeführt. 16 h nach dem Aussähen der Zellen wurden diese mit Hilfe des Transfektionsreagenz *jetPRIME* mit 100 ng des Vektors (*psiCHECK™-2*) transfiziert. Nach 4 h wurde das Medium gewechselt, um Reste des Transfektionsreagenz zu entfernen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit der zu untersuchenden siRNA. Dabei wurde bei allen Experimenten die Konzentrationen der siRNA stets bezogen auf den Duplex angegeben. Dies stellt eine Vergleichbarkeit auch bei Konstrukten sicher, die mehrere siRNA-Duplexe pro Ligand aufweisen.

Nach weiteren 48 h wurden die Zellen lysiert und die Expression beider Luciferasen durch Messung der jeweiligen Lumineszenz bestimmt. Anschließend wurde die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase gegen die des internen Standards (*Firefly*-Luciferase) normalisiert. Um eine Aussage über Veränderungen in der Expression durch Zugabe der einzelnen siRNA-Konstrukte treffen zu können, wurden die so erhaltenen Werte gegen die Werte eines Experiments normalisiert in dem keine Zugabe von siRNA erfolgt war (externer Standard). Diese Werte werden im Weiteren als relative Expressionen bezeichnet und sind in Prozent angegeben.

3.4.1 Evaluierung einer trimeren Glucose-siRNA-Struktur

Im nächsten Schritt wurde die biologische Aktivität der trimeren Struktur mit der einer einfachen Glucose-modifizierten siRNA und mit Anandamid-modifizierten Strukturen verglichen. Des Weiteren sollten die Effizienzen der trimeren Strukturen mit denen von siRNAs verglichen werden, welche durch kommerziell verfügbare Transfektionsreagenzien formuliert wurden. Kationische Reagenzien bilden so genannte Lipo- oder Polyplex mit negativ geladener siRNA aus und führen zu einer Aufnahme mittels Endozytose. Als Maß für die biologische Aktivität wurde die Regulation einer *Renilla*-Luciferase verwendet, was durch den im vorherigen Kapitel beschrieben Assay quantifiziert werden kann. Dabei wurden zwei Zelllinien verwendet. Zum einen wurden Ratten-Mastzellen (RBL-2H3) verwendet die als Modellsystem für das Einbringen von siRNA in Immunzellen mittels rezeptorvermittelter Endozytose unter Verwendung von Anandamid als Rezeptorliganden geeignet sind.^[185] Zum anderen wurde die Aufnahme der Glucose-modifizierten Konstrukte auch in HeLa-Zellen untersucht.

Die auf diese Weise gewonnenen siRNA-Konstrukte wurden anschließend mit einer Konzentration von 10 µM in dd H₂O angelöst. Die Molaritäten wurde auf den jeweiligen siRNA-Duplex bezogen, um später die Vergleichbarkeit der biologischen Aktivitäten zu ermöglichen. Die jeweiligen siRNA-Konstrukte wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt (125 nM, 250 nM, 500 nM). Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und das Expressionsniveau der beiden Luciferasen relativ zu einander bestimmt.

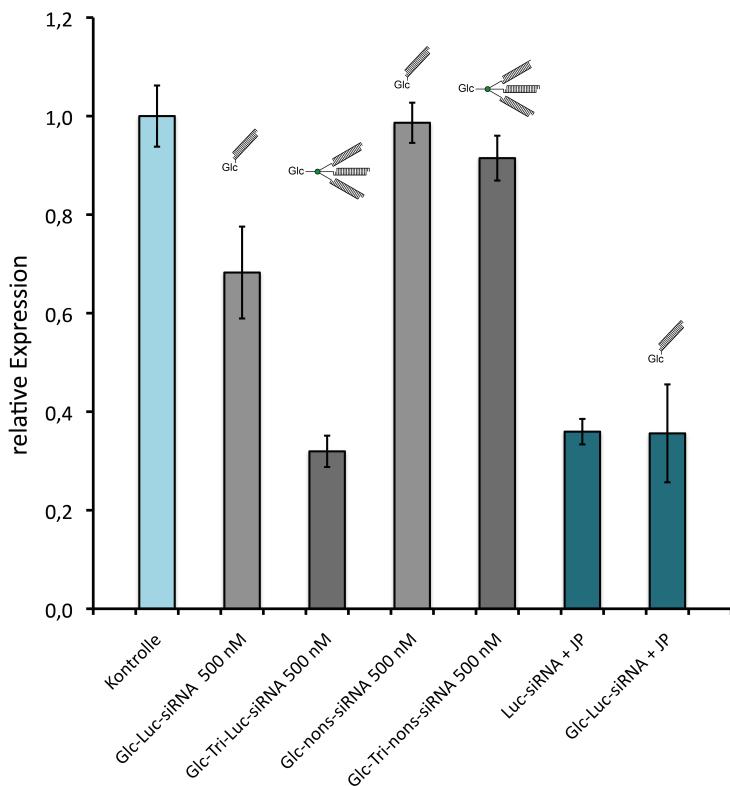


Abbildung 14: Regulation der *Renilla*-Luciferase durch siRNAs mit unterschiedlicher Glucose-Modifizierung in RBL-2H3-Zellen. Verglichen wurden die relativen Expressionen unter Einfluss von einfach Glucose-modifizierter siRNA gegen *Renilla*-Luciferase und der Glucose-modifizierten trimeren siRNA. Um einen Einfluss der Glucose auf die Expression zu untersuchen, wurden beiden Konstrukte auch mit einer nonsense siRNA hergestellt und eingesetzt (Tabelle 2). Um die generelle Funktionalität der eingesetzten siRNA zu überprüfen, wurden die Zellen auch mittels *jetPRIME* mit den Glucose-tragenden Strukturen transfiziert. Die Strukturen der Konstrukte sind über den jeweiligen Diagrammspalten symbolisch dargestellt.

Zunächst wurde der Einfluss des Glucose-Liganden auf die Expression überprüft. Dabei zeigte sich, dass die nonsense siRNA mit Glucose-Modifikation (monomer und trimer) im Rahmen der Messgenauigkeiten, keine Regulation hervorrief. Dagegen zeigten die Glucose-modifizierten Konstrukte mit funktionell gestalteter siRNA eine signifikante Reduktion der Expression. Um die biologische Aktivität der eingesetzten Glc-siRNA gegen *Renilla*-Luciferase mit einem kommerziell erhältlichem Transfektionsreagenz vergleichen zu können, waren die Glucose-modifizierten Konstrukte auch mittels *jetPRIME* in die Zellen transfiziert worden. Dabei zeigte sich, dass das trimere Konstrukt ohne die Anwendung von *jetPRIME* einen vergleichbar großen Einfluss auf die Expression ermöglicht, wie bei Formulierung mit einem kationischen Transfektionsreagenz.

3.4.2 Vergleich unterschiedlicher trimerer siRNA-Konstrukte

Um einen genaueren Eindruck von der biologischen Aktivität der Glucose-modifizierten Konstrukte zu erhalten, wurden diese im Vergleich zu Anandamid-modifizierten untersucht (Abbildung 15). Dabei zeigte sich eine deutliche dosisabhängige Zunahme der Regulation in allen Fällen. Zunächst wurde die trimere Glucose-modifizierte Struktur mit dem einfach Glucose-modifizierten siRNA-

Duplex verglichen. Dabei zeigte sich, dass die trimere Struktur mehr als doppelt so effektiv in Bezug auf die Reporterprotein Regulation ist.

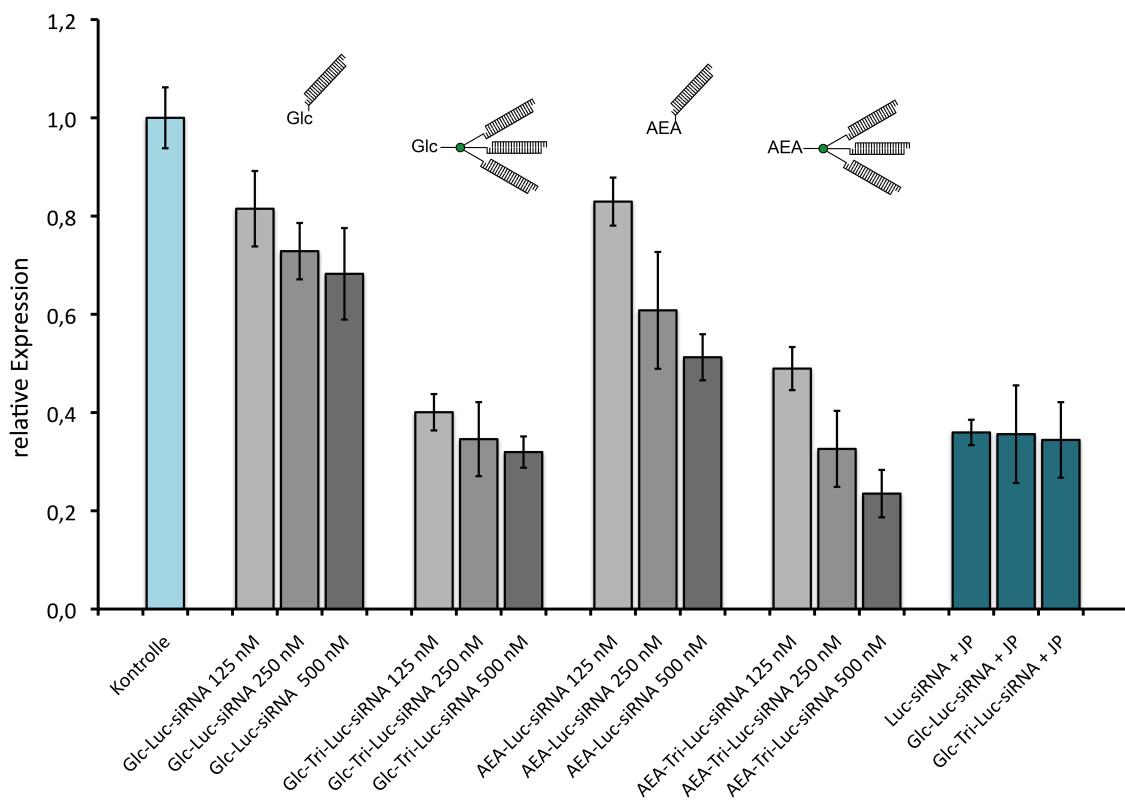


Abbildung 15: Regulation der *Renilla*-Luciferase durch siRNAs mit unterschiedlicher Liganden-Modifizierung in RBL-2H3-Zellen. Verglichen wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Konstrukte, deren Strukturen über den jeweiligen Diagrammspalten symbolisch dargestellt sind. Um die biologische Aktivität der liganden-modifizierte siRNA mit einem kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenz vergleichen zu können, wurden unmodifizierte siRNA, Glucose-modifizierte siRNA und das trimere Glucose-siRNA-Konstrukt zusätzlich mittels *jetPRIME* in die Zellen transfiziert (rechts).

Auch zeigte sich bei der trimeren Struktur eine geringere Zunahme der Regulation mit steigender Konzentration. Dieser deutlich flachere Stufeneffekt könnte auf eine Sättigung des Systems schon bei niedrigen Konzentrationen zurückzuführen sein. So zeigte sich bereits bei einer relativ niedrigen Konzentration von 125 nM ein Rückgang der relativen Expression um 63 %. Damit konnte gezeigt werden, dass die trimere Glucose-modifizierte Struktur eine ähnliche Effizienz wie die durch Transfektionsreagenz eingebrachte siRNA aufweist.

Vergleicht man nun die Glucose-modifizierten siRNA-Konstrukte mit den Anandamid-modifizierten siRNAs, so zeigte sich eine vergleichbare biologische Aktivität in den verwendeten RBL-2H3-Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass auch bei der Verwendung von Glucose als Liganden trimere siRNAs zu einer deutlichen Steigerung der Effizienz führen. Um dieses Ergebnis in einer weiteren Zelllinie zu bestätigen, wurde das Experiment in HeLa-Zellen wiederholt (Abbildung 16). Auch dabei zeigte sich die in RBL-2H3-Zellen beobachtete, deutlich gesteigerte biologische Aktivität der siRNA in den trimeren Glucose-modifizierten Konstrukten.

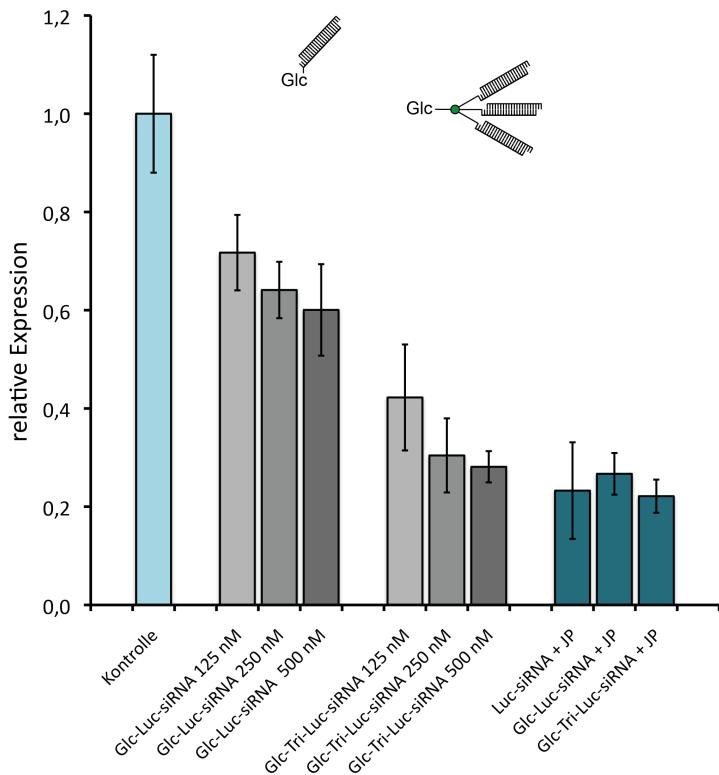


Abbildung 16: Regulation der *Renilla*-Luciferase durch siRNAs mit unterschiedlicher Liganden-Modifizierung in HeLa-Zellen. Verglichen wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Glucose-modifizierten Konstrukte, deren Strukturen über den jeweiligen Diagrammspalten symbolisch dargestellt sind. Um eine generelle Überprüfung der biologischen Aktivität der siRNA mit und ohne Modifikation vor zu nehmen, wurden unmodifizierte siRNA, Glucose-modifizierte siRNA und das trimere Glucose-siRNA-Konstrukt zusätzlich mittels *jetPRIME* (JP) in die Zellen transfiziert (rechts).

Zusammenfassend konnte das Konzept der trimeren siRNA-Konstrukte mit drei unterschiedlichen Liganden getestet werden: Anandamid (AEA) und Folsäure (FS) und Glucose (Glc) (Abbildung 17). Dabei zeigte sich in allen Fällen eine deutliche stärkere biologische Aktivität der trimeren Strukturen gegenüber den monomeren siRNA-Liganden-Konjugaten.

Wie eingangs erwähnt bindet Anandamid an die Cannabinoid-Rezeptoren CB1 und CB2, die von Zellen des Nerven- und Immunsystems exprimiert werden.^[186] Auch wenn der genaue Mechanismus der Aufnahme dieses Liganden in die Zellen nicht geklärt ist, konnte durch Julian Willibald gezeigt werden, dass er eine effektive Möglichkeit zum gezielten Transport von siRNA in Immunzellen darstellt.^[184] Mit Hilfe von siRNA, die durch Click-Chemie mit AEA verknüpft wurde, konnte weiter gezeigt werden, dass auch der effektive Transport in primäre Neuronen erfolgreich ist.^[12]

Folsäure oder Vitamin B9 hat sich als besonders vielversprechender Ligand zur gezielten Krebstherapie erwiesen.^[187] Dies liegt besonders daran, dass Krebszellen Folsäurekonjugate verstärkt aufnehmen. Dieses essentielle Vitamin liegt unter physiologischen Bedingungen vorwiegend als Anion vor und muss somit aktiv aufgenommen werden.^[188] Diese Aufnahme findet durch den *Reduced Folate Carrier*,^[189] einen Protonen gekoppelten Folat Transporter^[190] und den Folat-Rezeptor statt.^[191] Der Folat-Rezeptor wird durch Krebszellen deutlich verstärkt in einer Isoform präsentiert, die besonders gut für die Bindung von Folsäurekonjugate zugänglich ist und die Aufnahme der Konjugate durch Endozytose vermittelt.^[192]

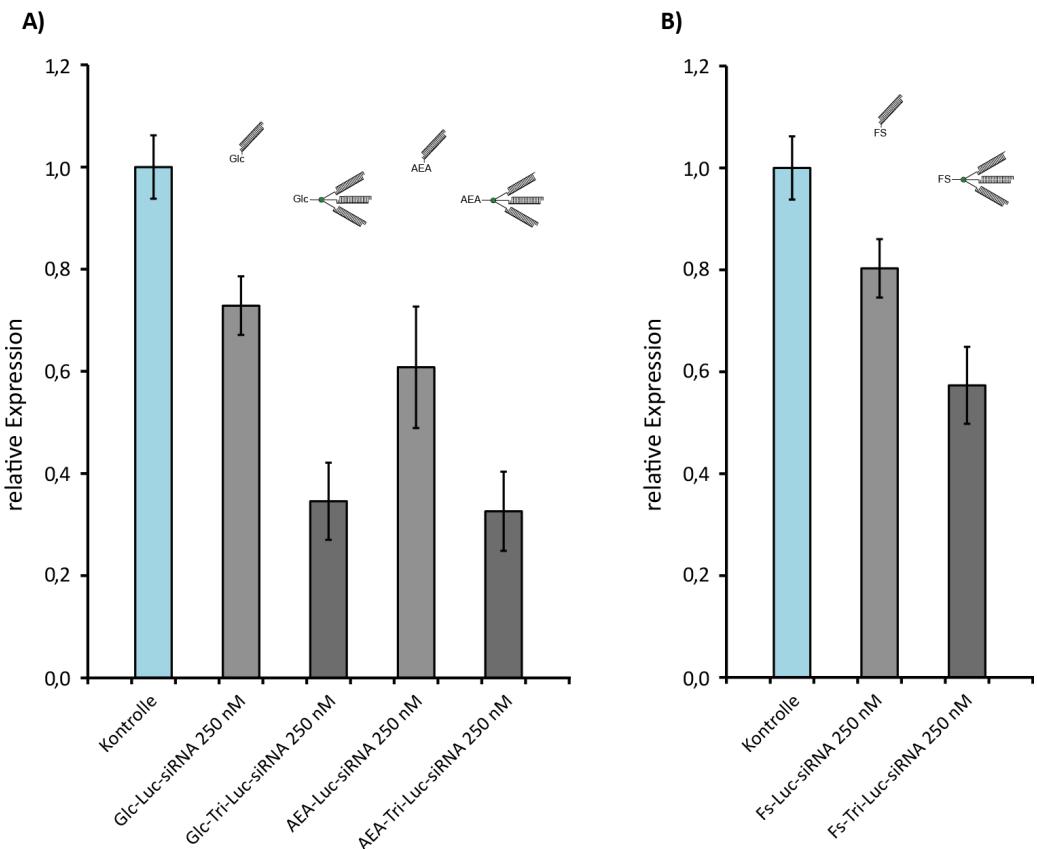


Abbildung 17: Regulation der *Renilla*-Luciferase durch siRNAs mit unterschiedlicher Liganden-Modifizierung bei einer einheitlichen Konzentration von 250 nM bezogen auf den siRNA-Duplex. A) Vergleich der Regulation durch Glucose (Glc)-modifizierte und Anandamid (AEA)-modifizierte siRNA-Strukturen in RBL-2H3-Zellen. B) Regulation durch Folsäure (FS)-modifizierte siRNA in HeLa-Zellen (Daten von Johannes Harder). Die Strukturen der verwendeten Konstrukte sind über den jeweiligen Diagrammspalten symbolisch dargestellt.

Als universeller Ligand wurde im Rahmen dieser Arbeit Glucose eingeführt. Somit kann von einer universellen Anwendbarkeit des Konzeptes ausgegangen werden.

3.5 UNTERSUCHUNG DER AUFNAHME GLUCOSE-MODIFIZIERTER siRNA

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Glucose-modifizierte siRNA in der Lage ist in Immunzellen (RBL-2H3-Zellen) eine dosisabhängige Protein-Regulation zu ermöglichen. Daher wurde die Aufnahme von siRNA mit einer Glucose-Modifikation näher untersucht. In Kooperation mit dem Arbeitskreis *Bräuchle* wurden dazu konfokalmikroskopische Studien zur zellulären Aufnahme durchgeführt. Dazu wurde der alkin-modifizierte *passenger*-Strang einer nonsense siRNA (ORN3) mittels CuAAC mit dem einfachen Glucose-Monoazid (**4**) umgesetzt. Um die Aufnahme der siRNA mittels Konfokalmikroskopie beobachten zu können, wurde auch der komplementäre, alkin-modifizierte *guide*-Strang (ORN4) mit einem Alexa Fluor® 647-Azid (*Life Technologies*) zur Reaktion gebracht. Nach erfolgreicher Aufreinigung der beiden modifizierten Oligonukleotide wurden

sie durch Erwärmen auf 95°C und anschließendes schrittweises Abkühlen auf 4°C hybridisiert und so eine Glucose-siRNA mit Fluoreszenz-Markierung gewonnen. Für Aufnahmestudien wurde auch eine Negativkontrolle benötigt. Dazu wurde der unmodifizierte *passenger*-Strang der nonsense-siRNA (ORN7) mit dem Alexa-modifizierten *guide*-Strang (ORN4+Alexa) hybridisiert. Die Sequenzen sowie die schematischen Darstellungen der beiden siRNAs sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der modifizierten siRNAs für die konfokalmikroskopische Untersuchung der Aufnahme Glucose-modifizierter siRNA. Y = 2'Deoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (<i>guide</i> / <i>passenger</i>)	Sequenz	Struktur
Glc-nons-siRNA-Alexa (ORN3+4/ORN4+Alexa)	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT 3'-dTYAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5' +Alexa 647	+4 ^{Glc-Monoazid} 
nons-siRNA-Alexa (ORN7/ORN4+Alexa)	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UdTdT 3'-dTYAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5' +Alexa 647	

Um die Aufnahme von Glucose-modifizierter siRNA in unterschiedlichste Zelllinien zu zeigen, wurden HeLa-, HMEC-, KB- und HUH-7-Zellen mit den beiden in Tabelle 3 dargestellten siRNAs behandelt. Nach 24 stündiger Inkubation der Zellen mit der siRNA (125 nM) wurden diese durch Behandlung mit Paraformaldehyd fixiert und die Fluoreszenz des Alexa-Fluorophors untersucht. Dabei zeigten alle vier untersuchten Zelllinien eine erfolgreiche Aufnahme der Glucose-modifizierten siRNA. Die Aufnahme der fluoreszenz-gelabelten siRNA ohne Glucose-Modifikation konnte dabei nicht beobachtet werden (Abbildung 18).

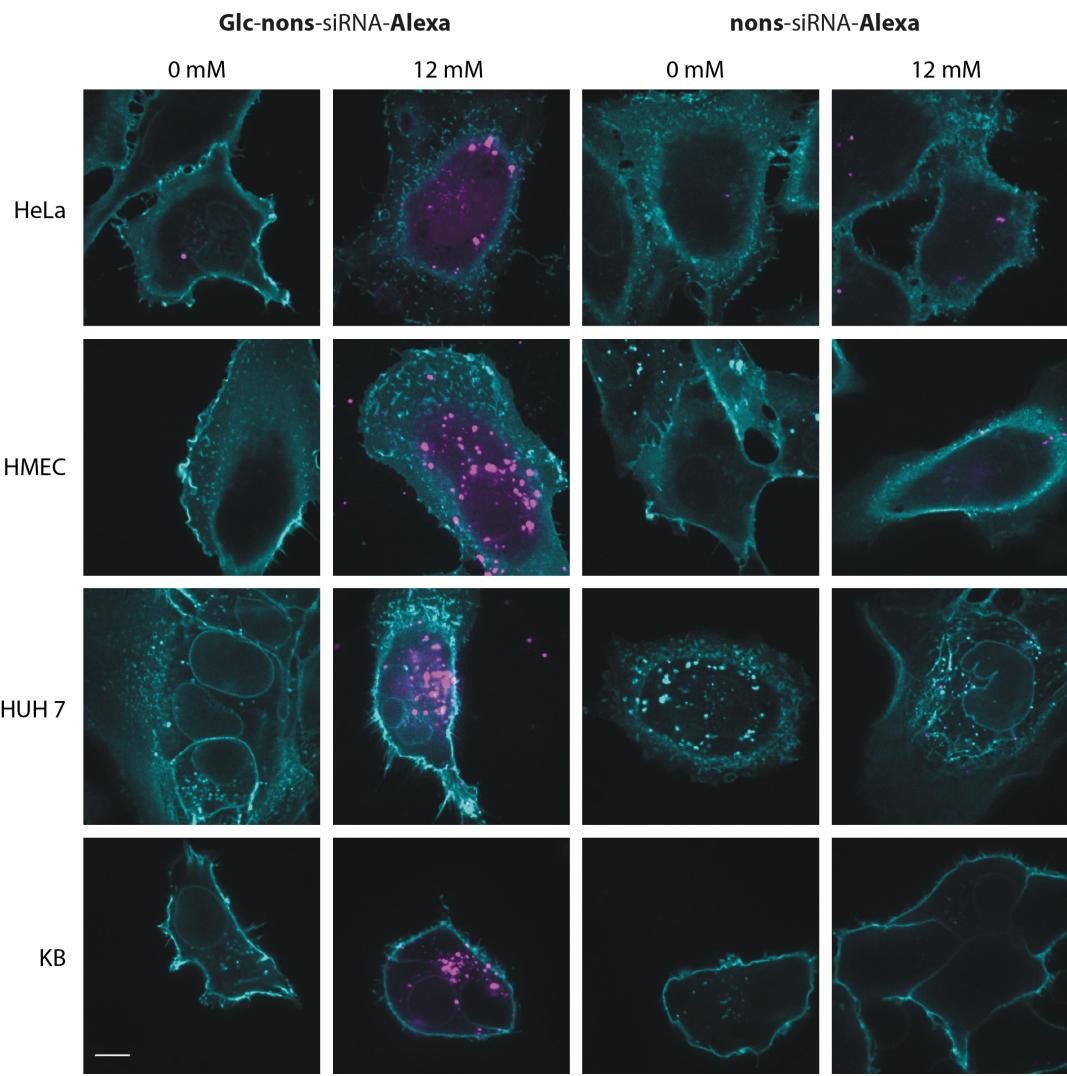


Abbildung 18: Repräsentative Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HeLa-, HMEC-, HUH 7- und KB-Zellen nach Inkubation mit einer unspezifischen Alexa Fluor® 647-gelabelten Glc-siRNA (**Glc-nons-siRNA-Alexa**) (links) und mit einer nicht Glucose-modifizierten Alexa-gelabelten siRNA (**nons-siRNA-Alexa**) (rechts). Die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd erfolgte 24 h nach Beginn der Inkubation mit der jeweiligen siRNA (125 nM). Die Zellwände wurden mittels WGA488 angefärbt (türkis) während die gelabelte siRNA violett dargestellt ist.

Im einem nächsten Schritt wurde die Aufnahme der Glucose-modifizierten siRNA in Abhängigkeit von der Konzentration an Glucose im verwendeten Medium untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Aufnahme der Glucose-modifizierten siRNA selbst bei sehr hoher Konzentration an Glucose. Erst ab einem 10^5 fachen Überschuss an Glucose konnte eine Abnahme der internalisierten siRNA beobachtet werden. Eine sehr interessante Beobachtung stellte die geringere Aufnahme an **Glc-nons-siRNA-Alexa** bei Verwendung eines Mediums ohne Glucose dar. Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache könnte die Umstellung der Zellen in einem glucosefreien Medium auf eine alternative Energiequelle sein. Durch eine solche Umstellung könnte es zu einer verringerten Expression von Glucosetransportern kommen.

Einer dieser Glucosetransporter ist GLUT1. Das Transportprotein GLUT1 ist Bestandteil der Zellmembranen vieler Gewebetypen von Säugetieren und sorgt dort für den Insulin-unabhängigen Transport von Glucose und anderen Hexosen, Pentosen und Vitamin C in das Zellinnere.^[4] Um den Import von Glucose-modifizierter siRNA über diesen Transporter zu untersuchen, wurden HeLa-

Zellen untersucht, die ein GLUT1-GFP-Fusionsprotein exprimieren. Nach einer 24 stündigen Inkubation dieser Zellen mit **Glc-nons-siRNA-Alexa** wurde mittels Konfokalmikroskopie eine deutliche Kolokalisation der siRNA und GLUT1 beobachtet (Abbildung 19).

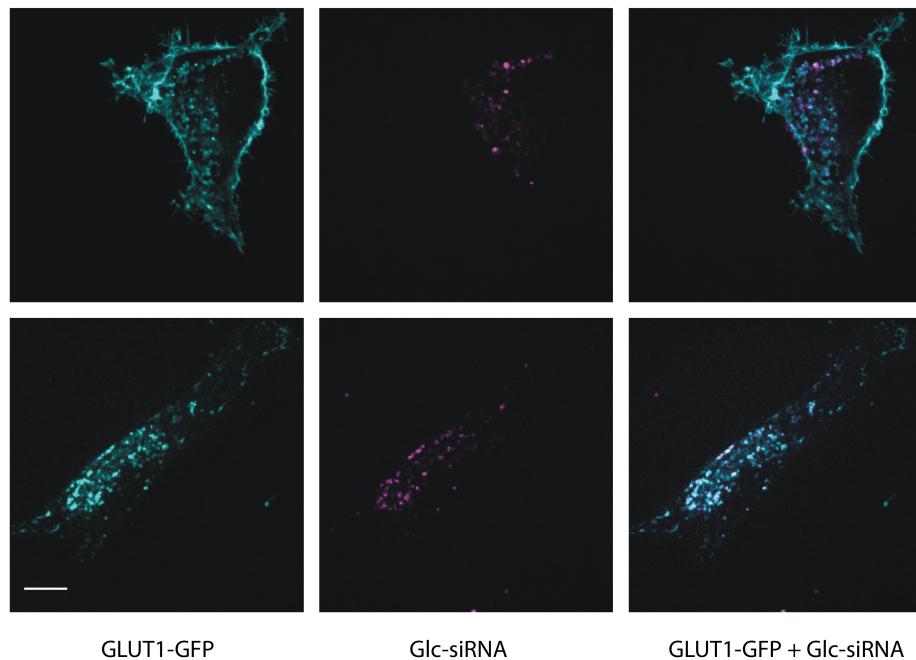


Abbildung 19: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen, die GLUT1-GFP exprimieren nach Inkubation mit einer unspezifischen Alexa Fluor® 647-gelabelten Gluc-siRNA. Dargestellt sind die Fluoreszenz von GLUT1-GFP (links), Alexa Fluor® 647-gelabelter Gluc-siRNA (Mitte) und die simultane Wiedergabe beider Fluoreszenzen. Erkennbar ist eine Kolokalisation der beiden Fluoreszenzsignale.

Diese Untersuchungen zeigten, dass GLUT1 sehr wahrscheinlich an der Aufnahme von Glucose-siRNA-Konjugaten beteiligt ist. Da dieser Transporter von nahezu allen Zellen exprimiert wird^[193], ist dies ein starker Hinweis darauf, dass Glucose eine universelle und effiziente Aufnahme von insbesonders trimerer siRNA vermitteln kann. Da sich die bisher in klinischen Studien weit fortgeschrittenen siRNA-Anwendungen auf lokale Administration am Ort der beabsichtigten Wirkung konzentrieren stellt Glucose somit einen vielversprechenden Liganden für therapeutische Anwendungen dar.

4. REGULATION DER EXPRESSION DURCH LIGANDEN-MODIFIZIERTE siRNA IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Auf der Suche nach Wegen die wachsende Weltbevölkerung, bei zeitgleich immer weiter schrumpfender landwirtschaftlicher Nutzfläche ernähren zu können, sind alternative Strategien zur Entwicklung verbesserter Sorten in den Fokus der Forschung gerückt.^[72] Im Zuge dieser Bemühungen hat die RNA-Interferenz in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit gefunden. Um eine systemische RNAi-Antwort hervorzurufen, wird in den meisten Fällen auf das Einbringen unterschiedlicher Vektoren in das Innere von Pflanzenzellen zurückgegriffen.^[86] Vorteile dieser Methode ist die oftmals stabile und gewebeabhängig steuerbare Expression der biologisch aktiven RNA-Moleküle. Ein Problem dieser Methode ist allerdings, dass sie zu transgenen Pflanzen führen und aufwändige und zum Teil problematische Selektionsprozesse benötigen.^[87]

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob auch siRNA-Liganden-Konjugate eine systemische RNA-Interferenz in Pflanzen hervorrufen können. Dazu sollte im ersten Schritt die Aufnahme von RNA-Doppelsträngen mit unterschiedlichen Liganden-Modifikationen über die Wurzeln konfokalmikroskopisch untersucht werden. Im nächsten Schritt sollten in Pflanzen funktionell aktive siRNAs mit Liganden modifiziert werden. Diese Liganden-Konjugate sollten anschließend auf ihre biologische Aktivität getestet werden. Dabei sollte sowohl eine Aufnahme der siRNAs über die Wurzeln als auch über die Blätter von *Arabidopsis thaliana* betrachtet werden.

4.1 UNTERSUCHUNG DER AUFNAHME VON LIGANDEN-MODIFIZIERTER siRNA

Da Pflanzen über die Wurzeln in erster Linie Nährsalze und Wasser aufnehmen, sollte in einem ersten Schritt untersucht werden, ob auch eine Aufnahme von Liganden-modifizierter siRNA über die Wurzeln erfolgen kann. Um eine systemische Verteilung der Oligonukleotide zu ermöglichen, müssen sie den Casparischen Streifen passieren, um in die Leitbündel des Zentralzylinders gelangen zu können. Der Casparische Streifen wird durch die Zellwände von Endodermiszellen gebildet und verhindert das apoplastische Eindringen von Wasser, gelösten Mineralstoffen, Phytohormonen und Metaboliten (Abbildung 20).^[194]

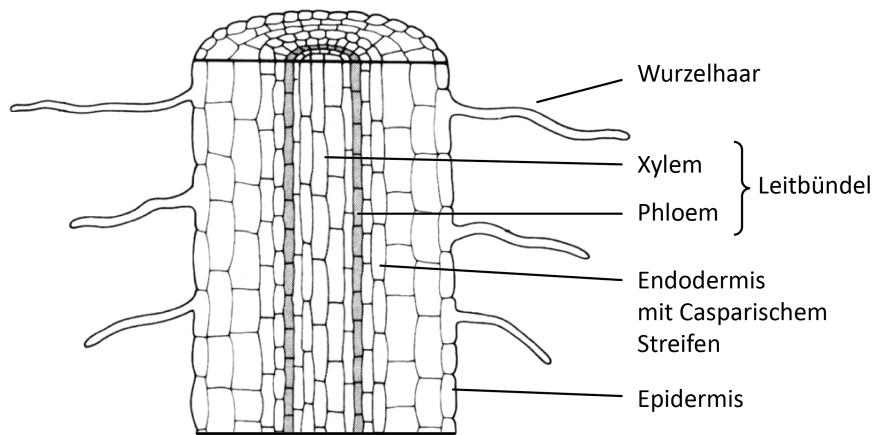


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Querschnitts einer Primärwurzel im Bereich der Wurzelhaarzone.^[195]

Substanzen, welche ihn durchqueren wollen, müssen somit von den Durchlasszellen der Epidermis aktiv aufgenommen und in die Leitbündel abgegeben werden. Dabei unterliegen sie der Selektion der Transportsysteme in den Zellwänden dieser Zellen.

Für die Modifikation der RNA mussten folglich Liganden eingesetzt werden, die aktiv von Endodermiszellen des Casparischen Streifens aufgenommen werden. Als solche wurden in Zusammenarbeit mit *Markus Müller* Indol-3-Essigsäure (IAA) und Glucose (Glc) gewählt.

Indol-3-Essigsäure ist ein sehr häufig vorkommendes Phytohormon aus der Gruppe der Auxine. Es wird besonders in den Knospen und jungen Blättern gebildet und beeinflusst das Zellwachstum und die Zellteilung durch ein komplexes System der Gen-Regulation.^[5]

Glucose ist neben Saccharose der wichtigste gelöste Zucker in den meisten Pflanzen.^[6] Sie spielt in höheren Pflanzen eine fundamentale Rolle als Nährstoff und Signalmolekül und wird in den autotrophen Geweben der grünen Pflanzenteile als Produkt der Photosynthese gebildet.^[196] Ausgehend von diesen Pflanzenteilen wird sie durch das Phloem an die nicht-grünen Teile weitergegeben, wo sie durch mehrere unterschiedliche Transportproteine aufgenommen wird.^[7]

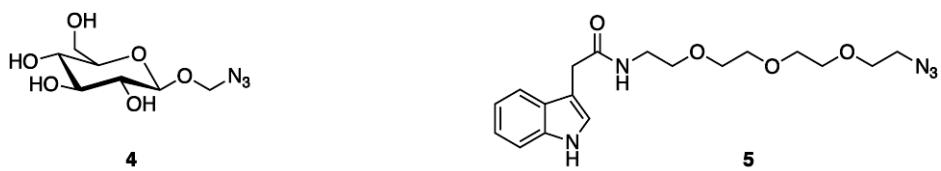
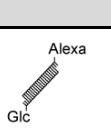
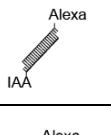


Abbildung 21: Verwendete Liganden-Azide für die Modifikation von RNA für Untersuchungen zur Aufnahme über die Wurzeln von *Arabidopsis thaliana*. Hergestellt wurde zum einen das Indol-3-Essigsäure-Azid **5** zum anderen das von *Felix Gnerlich* entwickelte Glucose-Azid **4**.

Um die Aufnahme von Liganden-modifizierten RNA-Doppelsträngen über die Wurzeln untersuchen zu können, wurde nun der alkin-modifizierte *passenger*-Strang einer nonsense siRNA (ORN3) mittels CuAAC mit dem in Abbildung 21 dargestellten Glucose-Monoazid (**4**) und Indol-3-essigsäure-Azid (**5**) umgesetzt. Die Aufnahme der siRNA sollte mittels Konfokalmikroskopie beobachtet werden, weshalb auch der komplementäre, alkin-modifizierte *guide*-Strang (ORN4) mit einem Alexa Fluor® 647-Azid (*Life Technologies*) zur Reaktion gebracht wurde.

Nach erfolgreicher Aufreinigung der beiden modifizierten Oligonukleotide wurden sie durch Erwärmen auf 95°C und anschließendes schrittweises Kühlen auf 4°C hybridisiert und so eine Liganden-siRNA mit Fluoreszenzmarkierung gewonnen. Für Aufnahmestudien wurde auch eine Negativkontrolle benötigt. Dazu wurde der unmodifizierte *passenger*-Strang der nonsense-siRNA (ORN7) mit dem Alexa-modifizierten *guide*-Strang (ORN4+Alexa) hybridisiert. Die Sequenzen sowie die schematischen Darstellungen der beiden siRNAs sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammenfassung der modifizierten siRNAs für die konfokalmikroskopische Untersuchung der Aufnahme Glucose und IAA modifizierter siRNA. Y = 2'Desoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (<i>guide</i> / <i>passenger</i>)	Sequenz	Struktur
Glc-nons-siRNA-Alexa (ORN3+4/ORN4+Alexa)	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT 3'-dTYAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5' +Alexa 647	
IAA-nons-siRNA-Alexa (ORN3+5/ORN4+Alexa)	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT 3'-dTYAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5' +Alexa 647	
nons-siRNA-Alexa (ORN7/ORN4+Alexa)	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UdTdT 3'-dTYAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5' +Alexa 647	

Parallel zu diesen Arbeiten wurden *Arabidopsis thaliana* auf rechteckigen Kulturplatten mit einer Phytoagar Auflage ausgesät. Dabei wurden die Pflanzen im oberen Drittel ausgesät und die Platten aufrecht stehend in einem Inkubator bei 23 °C, 24 h Beleuchtung (Langtag) und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 8 Tagen wurden die jungen Pflanzen vorsichtig aus dem Agar präpariert und auf einen mit PBS beschichteten Objektträger gelegt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die gesamte Struktur des Wurzelgewebes unbeschädigt blieb, um einen Eintrag der fluoreszenzmarkierten RNA in die Leitbündel ohne aktiven Transport durch den Casparischen Streifen zu vermeiden. Auf die Wurzeln der Pflanzen wurden anschließend 20 µL einer 0.9 µM Lösung der Liganden-modifizierten RNA-Doppelstränge mit Fluoreszenzlabel gegeben, die 0.05 % Silwet enthielt. Silwet sorgt dafür, dass die Oberflächenspannung von Wasser herabgesetzt wird. Dadurch erleichtert es das Auftragen der Lösung und erhöht andererseits das Eindringungsvermögen der siRNA-Lösung. Um die Wurzeln vor Austrocknung zu schützen, wurde ein Deckglas aufgelegt und die Pflanzen in einem Inkubator bei 23 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit konfokalmikroskopisch untersucht (Abbildung 22). Dazu wurden im Abstand von 2 min über einen Zeitraum von 15 min Aufnahmen gemacht, um die zeitliche Veränderung der Fluoreszenz zu dokumentieren.

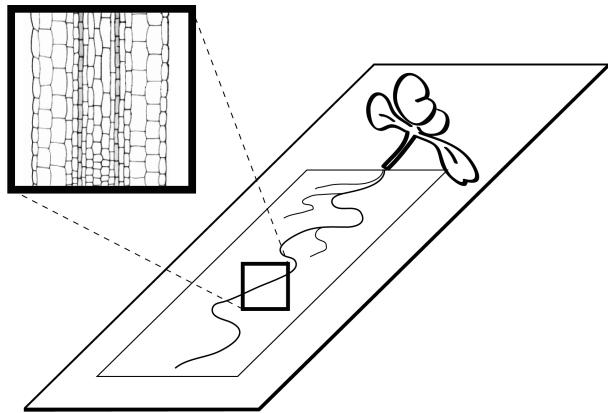


Abbildung 22: Schematische Darstellung der jungen, geträgerten *Arabidopsis thaliana* zur konfokal-mikroskopischen Untersuchung der Aufnahme fluoreszenzgelabelter Liganden-modifizierter RNA.

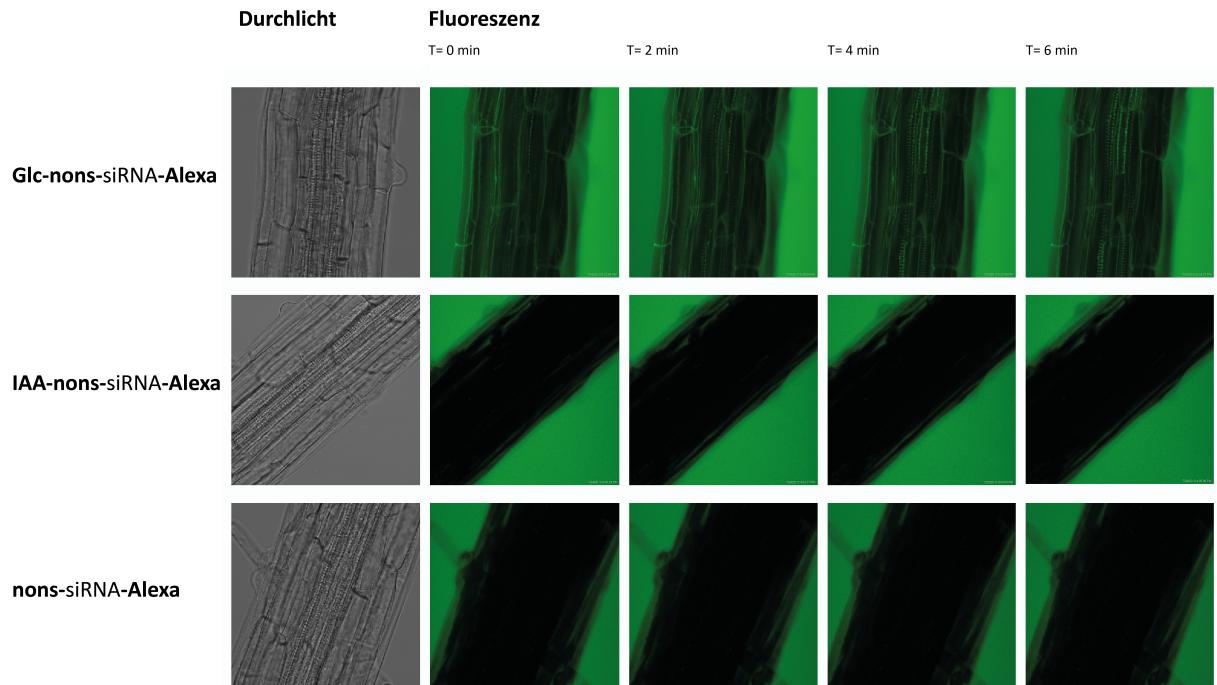


Abbildung 23: Zusammenstellung konfokalmikroskopischer Aufnahmen unterschiedlich behandelter Wurzeln. Dazu wurden Glucose- (**Glc-nons-siRNA-Alexa**) sowie Indolessigsäure-modifizierte siRNA (**IAA-nons-siRNA-Alexa**) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde nonsense-siRNA mit Alexa Fluor® 647 (**nons-siRNA-Alexa**) ohne Liganden-Modifizierung verwendet.

Dabei konnte eine deutliche Aufnahme der Glucose-modifizierten RNA in die Zellen des Casparischen Streifens nach 4 min und ein daraus resultierender kontinuierlicher Transport im Bereich der Leitbündel beobachtet werden (Abbildung 23). Nach ca. 15 min war durch die Austrocknung kein weiterer Nachschub von Glc-nons-siRNA-Alexa gegeben. Daraufhin konnte eine schnelle Abnahme der Fluoreszenz in den Endothelzellen des Casparischen Streifens und in den Leitbündeln beobachtet werden. Beide Beobachtungen legen eine aktive Aufnahme der Glucose-modifizierten RNA und einen systemischen Weitertransport über die Leitbündel nahe. In den Fällen der Indol-3-essigsäure-modifizierten und der unmodifizierten RNA-Doppelstränge konnte eine solche Aufnahme zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Somit konnte im ersten Schritt eine aktive Aufnahme von Glucose-

modifizierter siRNA über die Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* gezeigt und evidente Hinweise für einen systemischen Weitertransport in andere Teile der Pflanze gesammelt werden.

Um die Möglichkeiten zur Expressionskontrolle mittels dieser Strategie weiter zu untersuchen, sollten im nächsten Schritt funktionell aktive siRNAs mit unterschiedlichen Liganden-Modifikationen getestet werden.

4.2 EVALUIERUNG VON LIGANDEN-MODIFIZIERTEN SIRNAs DURCH AUFNAHME ÜBER DIE WURZELN

Durch die erfolgreiche Aufnahme der Liganden-modifizierten siRNA über die Wurzeln konnte eine große Herausforderung auf dem Weg zu einer effektiven systemischen Expressionskontrolle in Pflanzen mittels dieser Strategie überwunden werden. Um die biologische Aktivität der aufgenommenen RNA-Duplexe zeigen zu können, mussten im nächsten Schritt funktionell aktive Sequenzen ausgewählt und synthetisiert werden.

Die Auswahl der Sequenzen erfolgte dabei in Kooperation mit der BASF. Alle Zielgene der siRNA-Sequenzen nehmen Schlüsselstellungen in wichtigen Biosynthesewegen ein. Eine verringerte Expression durch erfolgreiche RNAi sollte somit relativ schnell zu einem deutlich erkennbaren Phänotyp führen. Dies sollte im weiteren Verlauf eine einfache Auswertung durch Beobachtung des Phänotyps ermöglichen. Auf diesem Weg wurden fünf Sequenzen ausgewählt.

Tabelle 5: Beschreibung der hergestellten und aufgereinigten RNA-Oligonukleotide. Die Alkinmodifizierung erfolgte durch den Einbau von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin an Position 2 der 3'-Überhänge. Da die Sequenzen auf Wunsch des Kooperationspartners BASF nicht veröffentlicht werden dürfen, sind sie lediglich mit ihren genauen Massen beschrieben.

RNA	Masse	Beschreibung
ORN3	6751,9	Nonsense-passenger-Strang-Alkin
ORN9	6647,9	Pflanzengen 1-passenger-Strang
ORN10	6827,1	Pflanzengen 2-passenger-Strang
ORN11	6633,9	Pflanzengen 3-passenger-Strang
ORN12	6782,0	Pflanzengen 4-passenger-Strang
ORN13	6859,1	Pflanzengen 5-passenger-Strang

Um eine Liganden-Modifizierung mittels CuAAC möglich zu machen, wurden die *passenger*-Stränge mit einer Alkinfunktionalität versehen. Dazu wurde bei der Festphasensynthese an der Position 2 der 3'-Überhänge 2'-Desoxy-oktadiinyl-uridin eingeführt. Da die genauen Sequenzen der verwendeten siRNAs auf Wunsch des Kooperationspartners nicht veröffentlicht werden dürfen, werden diese im Weiteren wie in Tabelle 5 angegeben bezeichnet und sind nur mit ihren Massen näher beschrieben. Da die *guide*-Stränge nicht modifiziert werden mussten, wurden diese von *biomers.net GmbH* erworben. Nach der Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der in Tabelle 5 aufgeführten Alkin-modifizierten RNA-Oligonukleotiden mittels HPL-Chromatografie und MALDI-TOF, wurden sie mit dem in Abbildung 21 dargestellten Glucose-Azid **4** und Indol-3-essigsäure-Azid **5** verknüpft.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Liganden-modifizierten siRNA-Konjugate gegen fünf Schlüsselgene im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana*.

Duplex (<i>guide/passenger</i>)	Beschreibung	Struktur
Glc-Gen1-siRNA (ORN9+4/ORN14)	siRNA gegen Pflanzengen 1	
Glc-Gen2-siRNA (ORN10+4/ORN15)	siRNA gegen Pflanzengen 2	
Glc-Gen3-siRNA (ORN11+4/ORN16)	siRNA gegen Pflanzengen 3	
Glc-Gen4-siRNA (ORN12+4/ORN17)	siRNA gegen Pflanzengen 4	
Glc-Gen5-siRNA (ORN13+4/ORN18)	siRNA gegen Pflanzengen 5	
Glc-nons-siRNA (ORN3+4/ORN8)	nicht regulierende Kontroll-siRNA	
IAA-Gen1-siRNA (ORN9+5/ORN14)	siRNA gegen Pflanzengen 1	
IAA-Gen2-siRNA (ORN10+5/ORN15)	siRNA gegen Pflanzengen 2	
IAA-Gen3-siRNA (ORN11+5/ORN16)	siRNA gegen Pflanzengen 3	
IAA-Gen4-siRNA (ORN12+5/ORN17)	siRNA gegen Pflanzengen 4	
IAA-Gen5-siRNA (ORN13+5/ORN18)	siRNA gegen Pflanzengen 5	
IAA-nons-siRNA (ORN3+5/ORN8)	nicht regulierende Kontroll-siRNA	

Auf diese Weise konnte ein Einfluss der Liganden auf den beobachteten Phänotyp überprüft werden. Anschließend wurden die Click-Produkte mittels HPL-Chromatografie und MALDI-TOF aufgereinigt und charakterisiert.

Nach der vollständigen Charakterisierung wurde der entsprechende *antisense*-Strang in äquimolarer Menge zugegeben und durch Erhitzen auf 90 °C, gefolgt von langsamem Abkühlen, die funktionelle siRNA hybridisiert. Die so erhaltenen siRNA-Konjugate sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die so hergestellten Glucose- und Indol-3-essigsäure- modifizierten siRNA-Konjugate wurden im nächsten Schritt auf ihr Potential untersucht eine systemische RNA-Interferenz hervorrufen zu können. Dabei sollte einerseits eine Aufnahme der Liganden-modifizierten siRNA über die Wurzeln untersucht werden. Da bei großflächiger Anwendung von siRNA im Bereich des Pflanzenschutzes eine Applikation durch Sprühen erfolgt, wurde andererseits auch die Auswirkungen eines Aufbringens der siRNA auf die Blätter betrachtet.

Um die Auswirkungen einer Aufnahme der siRNA-Konjugate über die Wurzel zu untersuchen, wurde eine alternative Anzuchtmethode der Pflanzen etabliert. Dabei war es erforderlich eine Methode zu entwickeln, *Arabidopsis thaliana* nach der Anzucht unter siRNA-freien Bedingungen zu einem definierten Zeitpunkt und für einen längeren Beobachtungszeitraum mit einem siRNA-haltigen Nährmedium versorgen zu können. Wegen des erheblichen Aufwands bei der Herstellung der siRNA sollten die benötigten Mengen so gering wie möglich gehalten werden.

So wurden 200 µL Pipettenspitzen vor der Autoklavierung die untersten 2 mm entfernt, um eine größere Öffnung zu schaffen. Anschließend wurden diese mit Phytoagar gefüllt, in welchem die Samen aufgebracht wurden. Um eine gleichmäßige Versorgung mit Wasser und Nährsalzen zu ermöglichen, wurden die Pipettenspitzen in einer abgeschlossenen und lichtdurchlässigen Box so platziert, dass die untere Öffnung in Murashige & Skoog-Medium (MS-Medium) getaucht war (Abbildung 24). Die auf diese Weise ausgesäten Pflanzen wurden nun für 8 Tage bei 23 °C, 24 h Beleuchtung (Langtag) und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dieser Zeit hatten die meisten Keimlinge Wurzeln ausgebildet, die aus der unteren Öffnung der Pipettenspitzen herausragten.

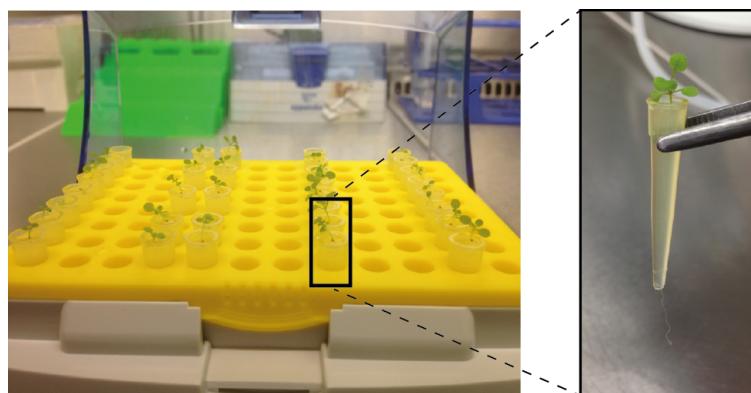


Abbildung 24: Exemplarische Darstellung von in Pipettenspitzen ausgesäten *Arabidopsis thaliana* zur Untersuchung einer systemischen RNA-Interferenz.

Diese Jungpflanzen wurden anschließend in passende Eppendorf-Gefäße mit 200 µL einer Lösung der jeweiligen Liganden-modifizierten siRNA (1.0 µM) in MS-Medium überführt. Neben den fünf funktionell aktiven siRNAs wurde auch eine nonsense-siRNA mit der entsprechenden Liganden-Modifikation eingesetzt, um Einflüsse des Liganden ausschließen zu können. Pflanzen, die mit siRNA-freiem MS-Medium behandelt wurden, dienten als Vergleich zur Beurteilung der Veränderungen des Phänotyps. Nach diesem Wechsel des Nährmediums wurden die Pflanzen erneut bei 23 °C, 24 h Beleuchtung und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Da eine Veränderung des

Phänotyps in einem Zeitraum von 48-96 h nach der Behandlung mit der siRNA erwartet wurde, erfolgte nach 48, 72 und 96 h eine Untersuchung der *Arabidopsis*.

Um ein besseres Eindringen der siRNA-Lösung zu ermöglichen, wurden unterschiedliche Zusätze verwendet. Dabei wurde anfangs Silwet in Konzentrationen zwischen 0,05 % und 0,5 % eingesetzt. Unter Verwendung dieses Zusatzes konnte allerdings weder durch die Glucose- noch durch die IAA-modifizierten siRNAs ein veränderter Phänotyp beobachtet werden. Auch ein Ausdehnen des Beobachtungszeitraums änderte nichts an dieser Beobachtung. Auf Grund den Erfahrungen mit Zellkulturen von Säugetierzellen wurde in einem nächsten Schritt ein kommerziell erhältliches Transfektionsreagenz (*jetPRIME*) den siRNA-Lösungen in einer Konzentration von 0,01 % zugesetzt. Auch durch diesen Zusatz zeigten die Pflanzen nach einer Behandlung mit den IAA-modifizierten siRNAs keine Veränderung des Phänotyps. Da in den anfänglichen Aufnahmestudien keine Aufnahme von IAA-modifizierter RNA über die Wurzeln beobachtet werden konnte, stand diese Beobachtung im Einklang mit den Erwartungen.

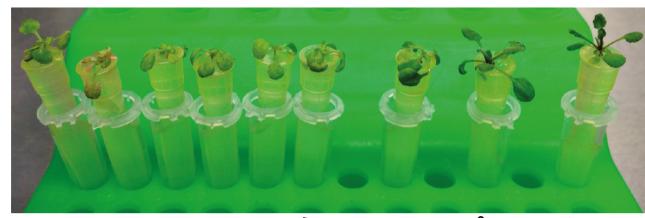
Im Gegensatz dazu konnte an *Arabidopsis thaliana*, die auf diese Weise mit Glucose-modifizierter siRNA behandelt wurden, ein deutlich verändertes Erscheinungsbild beobachtet werden. Bereits nach 48 h zeigten alle Pflanzen, die mit den funktionell aktiven Glucose-siRNA-Konjugaten behandelt worden waren, ein deutlich verzögertes Wachstum im Vergleich zu solchen Pflanzen, die in einem MS-Medium mit 1.0 μ M **Glc-nons**-siRNA wuchsen. Das Erscheinungsbild der Kontroll-Pflanzen (behandelt mit MS-Medium + 0,01 % *jetPRIME* oder reinem MS-Medium) unterschied sich weder untereinander, noch von den mit **Glc-nons**-siRNA behandelten. Der Einfluss der funktionell aktiven Glucose-modifizierten siRNAs verstärkte sich über den Beobachtungszeitraum. So zeigte sich nach 96 h durch die Behandlung mit den fünf funktionell aktiven siRNAs (**Glc-Gen1**-siRNA, **Glc-Gen2**-siRNA, **Glc-Gen3**-siRNA, **Glc-Gen4**-siRNA, **Glc-Gen5**-siRNA) ein deutlich veränderter Phänotyp im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Die Aufnahmen wurden 48 h und 96 h nach der Umstellung auf ein Medium mit Liganden-modifizierter siRNA aufgenommen.

T = 48h



Glc-Gen1-siRNA
Glc-Gen2-siRNA
Glc-Gen3-siRNA
Glc-Gen4-siRNA
Glc-Gen5-siRNA
Glc-nons-siRNA
MS-Medium + JP
MS-Medium

T = 96h



Glc-Gen1-siRNA
Glc-Gen2-siRNA
Glc-Gen3-siRNA
Glc-Gen4-siRNA
Glc-Gen5-siRNA
Glc-nons-siRNA
MS-Medium + JP
MS-Medium

Abbildung 25: Exemplarische Darstellung von *Arabidopsis thaliana* nach der Behandlung mit unterschiedlichen Glucose-modifizierten siRNAs. Dargestellt sind Aufnahmen der Pflanzen 48 h und 96 h nachdem sie auf MS-Medium mit 1 µM der unterschiedlichen Liganden-modifizierten siRNAs umgestellt wurden. Zusätzlich wurde dem Medium 0,01 % *jetPRIME* zugesetzt.

T = 48h



Glc-Gen1-siRNA
Glc-Gen2-siRNA
Glc-Gen3-siRNA
Glc-Gen4-siRNA
Glc-Gen5-siRNA
Glc-nons-siRNA
MS-Medium + JP
MS-Medium

T = 96h



Glc-Gen1-siRNA
Glc-Gen2-siRNA
Glc-Gen3-siRNA
Glc-Gen4-siRNA
Glc-Gen5-siRNA
Glc-nons-siRNA
MS-Medium + JP
MS-Medium

Abbildung 26: Exemplarische Darstellung von *Arabidopsis thaliana* nach der Behandlung mit unterschiedlichen Glucose-modifizierten siRNAs. Dargestellt sind Aufnahmen der Pflanzen 48 h und 96 h nachdem sie auf MS-Medium mit 1 µM der unterschiedlichen Liganden-modifizierten siRNAs umgestellt wurden. Zusätzlich wurde dem Medium 0,01 % *jetPRIME* zugesetzt.

So zeigte eine Behandlung mit **Glc-Gen1-siRNA** und **Glc-Gen5-siRNA** nach dieser Zeit ein deutlich reduziertes Wachstum während Pflanzen unter dem Einfluss von **Glc-Gen2-siRNA**, **Glc-Gen3-siRNA** und **Glc-Gen4-siRNA** neben dem reduzierten Wachstum auch ein Ausbleichen der Blätter zeigten. Der Einfluss von **Glc-Gen1-siRNA** und **Glc-Gen5-siRNA** war im Vergleich zu den Kontrollen klar zu erkennen. Eine Behandlung mit **Glc-Gen2-siRNA**, **Glc-Gen3-siRNA** und **Glc-Gen4-siRNA** zeigte einen deutlich stärkeren Effekt, der in einzelnen Fällen bis hin zum Absterben der Pflanzen reichte. In Abbildung 25 und 26 sind exemplarisch zwei unterschiedliche Experimente mit *Arabidopsis thaliana* durch Behandlung mit Glucose-modifizierter siRNA dargestellt. Auch wenn diese Veränderungen des Phänotyps aufgrund der unterschiedlichen Einflüsse auf das Wachstum der Pflanzen in der Stärke ihrer Ausprägung nicht in allen Fällen identisch ausfielen, zeigte sich ein vergleichbarer Trend in allen Experimenten. Somit konnte ein deutlicher Hinweise auf eine systemische RNA-Interferenz durch Glucose-modifizierte siRNA in *Arabidopsis thaliana* beobachtet werden.

4.3 EVALUIERUNG VON LIGANDEN-MODIFIZIERTEN SIRNAs DURCH AUFNAHME ÜBER DIE BLÄTTER

Parallel zu der Verabreichung der siRNA-Lösungen über die Wurzeln, wurde auch die Aufnahme über die Blätter von *Arabidopsis thaliana* untersucht. Dazu wurde von jeder der in Tabelle 6 angegebenen Liganden-modifizierten siRNAs eine 1 µM Lösung in PBS-Puffer hergestellt. Auch wurden *Arabidopsis thaliana* wie zuvor beschrieben in 200 µL Pipettenspitzen ausgesät, die zuvor mit Phytoagar gefüllt worden waren. Die ausgesäten Pflanzen wurden nun für 10 Tage bei 23 °C, 24 h Beleuchtung (Langtag) und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die jungen Pflanzen mit den unterschiedlichen Glucose- und Indol-3-essigsäure-modifizierten siRNAs behandelt (Tabelle 6). Wie bei der Untersuchung einer Aufnahme über die Wurzeln wurde auch in diesem Fall eine nonsense-siRNA mit der entsprechenden Liganden-Modifikation eingesetzt, um Einflüsse des Liganden ausschließen zu können. Auch wurden *Arabidopsis* mit siRNA-freiem MS-Medium behandelt, um eine Beurteilung der Veränderungen des Phänotyps zu ermöglichen. Nach der Behandlung der Blätter wurden die Pflanzen erneut bei 23 °C, 24 h Beleuchtung und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Veränderungen im Erscheinungsbild wurden anschließend im Abstand von 24 h untersucht.

Um eine bessere Benetzung der Blätter zu erreichen, wurde auch hier Silwet in Konzentrationen zwischen 0,05 % und 0,5 % zugesetzt. Der theoretische Effekt von Silwet war in der Praxis jedoch nur bedingt beobachtbar, da sich das Auftragen der Lösung auf das Blatt als schwierig herausstellte. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Experimenten dazu übergegangen die Pflanzen kopfüber in ein Eppendorfgefäß mit der jeweiligen siRNA-Lösung zu tauchen, wobei darauf geachtet wurde, dass lediglich die Blätter vollständig benetzt wurden. Allerdings konnte in keinem der Experimente eine Veränderung des Phänotyps der behandelten Pflanzen beobachtet werden. Aufgrund der positiven

Erfahrungen durch Zugabe von 0.01 % *jetPRIME* in den Experimenten zur Aufnahme der siRNA über die Wurzeln wurde daraufhin auch hier ein solcher Zusatz verwendet. In Abbildung 27 sind die Aufnahmen von Pflanzen 24 h und 96 h nach einer Behandlung auf diese Weise dargestellt.

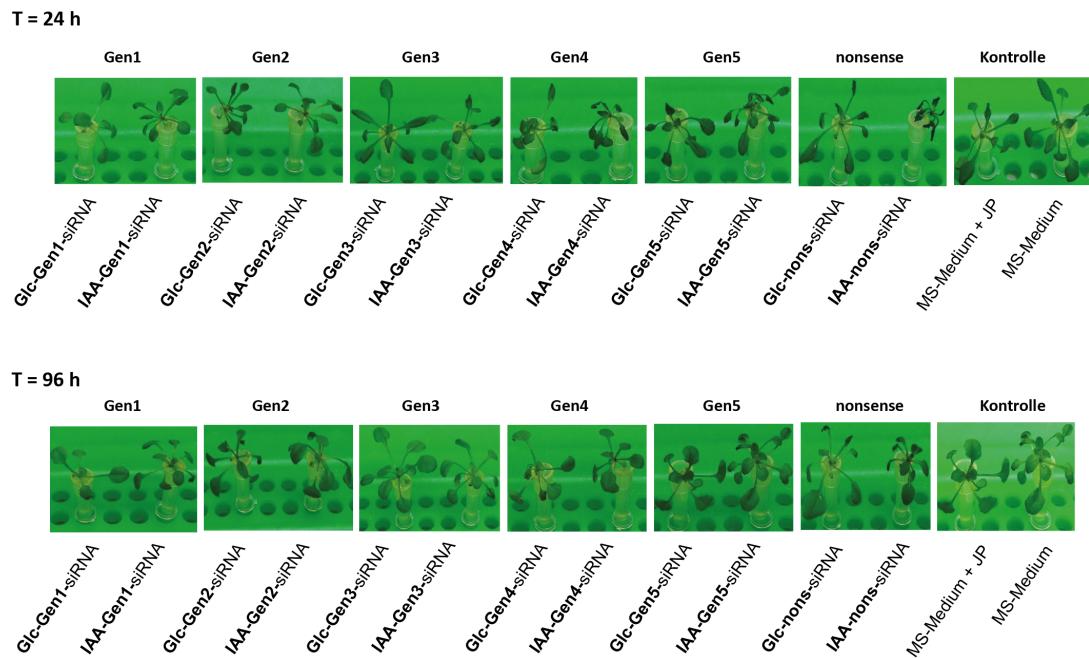


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung von *Arabidopsis thaliana* nach der Behandlung mit unterschiedlichen Glucose (Glc)-und Indol-3-essigsäure (IAA)-modifizierten siRNAs. Die siRNA wurde in einer Konzentration von 1 µM in PBS-Puffer auf die Blätter aufgetragen. Dargestellt sind Aufnahmen 24 h und 96 h nach der Behandlung mit den siRNAs. Zusätzlich wurden den siRNA-Lösungen 0,01 % *jetPRIME* zugesetzt.

Auch durch Zugabe von *jetPRIME* konnte bei keiner der Pflanzen eine Veränderung im Vergleich zu den Negativkontrollen beobachtet werden. Da sich bei einer Aufnahme der unterschiedlichen Glucose modifizierter siRNAs über die Wurzeln deutliche Effekte zeigten, liegt nahe, dass durch Behandlung der Blätter keine effektive Aufnahme der Glucose- und IAA-modifizierten siRNAs erreicht wurde.

Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurde ein alternativer Ansatz gewählt. Dazu wurden *Arabidopsis thaliana* auf autoklavierter kommerziell erhältlicher Anzuchterde ausgesät und 3 Wochen bei 23 °C und 18 h Belichtung pro Tag angezogen. Die Blätter dieser adulten Pflanzen sind erheblich stabiler gegenüber mechanischer Belastung und veränderter Luftfeuchtigkeit. Nach dieser Zeit wurden die Blätter je einer Pflanze mit Lösungen der Glucose- oder IAA-modifizierten siRNAs behandelt. Um das Eindringen der Lösungen in das Gewebe der Blätter zu erleichtern, wurde durch Reiben die mechanische Belastung erhöht. Dabei wurde darauf geachtet die Struktur der Blätter nicht zu zerstören. In Abbildung 28 sind Abbildungen von *Arabidopsis* vor und 96 h nach einer Behandlung mit Liganden-modifizierter siRNA auf diese Weise dargestellt.

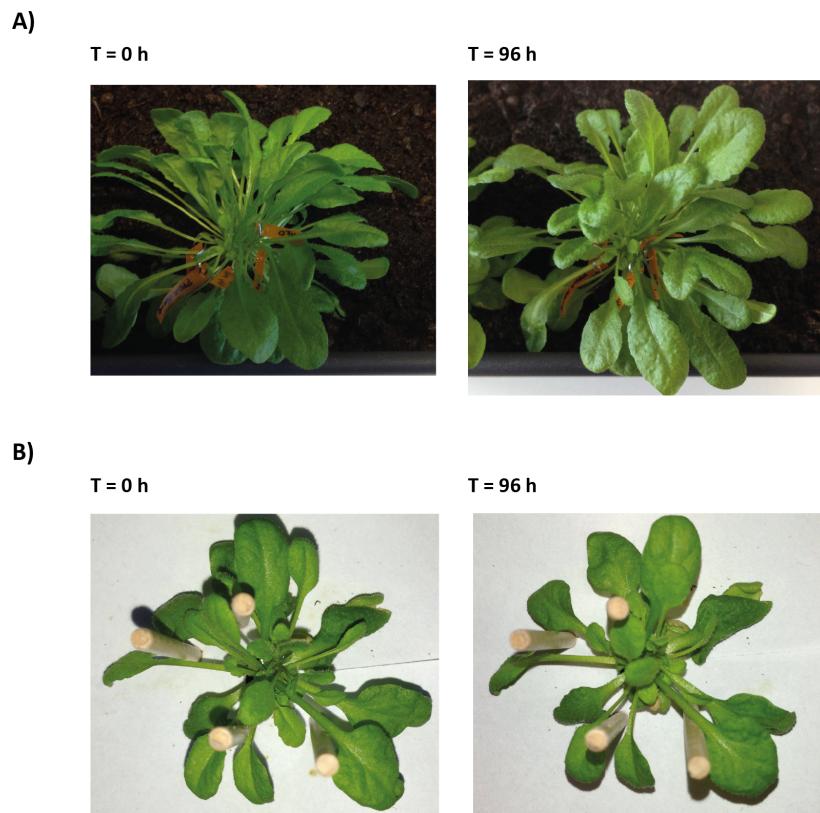


Abbildung 28: Exemplarische Aufnahmen von adulten *Arabidopsis thaliana* (21 Tage) nach Behandlung der Blätter mit Liganden-modifizierter siRNA. A) Aufnahmen der Pflanzen vor und 96 h nach einer Behandlung der Blätter mit fünf verschiedenen funktionell aktiven Glucose-modifizierten siRNAs (**Glc-Gen1-siRNA**, **Glc-Gen2-siRNA**, **Glc-Gen3-siRNA**, **Glc-Gen4-siRNA**, **Glc-Gen5-siRNA**). B) Aufnahmen der Pflanzen vor und 96 h nach einer Behandlung der Blätter mit fünf verschiedenen funktionell aktiven Indol-3-essigsäure-modifizierten siRNAs (**IAA-Gen1-siRNA**, **IAA-Gen2-siRNA**, **IAA-Gen3-siRNA**, **IAA-Gen4-siRNA**, **IAA-Gen5-siRNA**).

Da auch auf diesem Wege keine Veränderung des Phänotyps der Pflanzen beobachtet werden konnte, wurden keine weitere Experimente zur Untersuchung einer systemischen RNA-Interferenz durch Verabreichung von Liganden-modifizierten siRNAs über die Blätter durchgeführt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine aktive Aufnahme von Glucose-modifizierter siRNA über die Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* konfokalmikroskopisch gezeigt werden konnte. Bei der Untersuchung der biologischen Aktivität von fünf unterschiedlichen Indol-3-essigsäure- und Glucose-modifizierten siRNAs wurde bei Auftragen auf die Blätter kein Effekt beobachtet. Eine Inkubation der Wurzeln mit Lösungen der Glucose-siRNA-Konjugate zeigte dagegen deutlich eine systemische RNA-Interferenz. Somit konnte das Konzept der Liganden-modifizierten siRNAs erfolgreich auf eine Anwendung in Pflanzen erweitert werden.

5. TRANSDIFFERENZIERUNG VON FIBROBLASTEN DURCH LIGANDEN-MODIFIZIERTE siRNA

Die regenerative Medizin verspricht enormes Potential bei der Therapie chronischer Erkrankungen wie Diabetes und Parkinson.^[197] Die Behandlung von schweren Schädigungen des Nervensystems durch Unfälle oder Schlaganfälle liegen im Fokus dieses relativ neuen Forschungsfeldes.^[198] Um dabei Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, ist es notwendig die eingesetzten Zellen aus Gewebe des zu behandelnden Patienten zu gewinnen. Eine Methode ist dabei die Nutzung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs). Dabei werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren eingesetzt, um somatische Zellen in einen pluripotenten Zustand zu überführen.^[58] Anschließend werden sie in das benötigte Gewebe differenziert und in den Patienten transplantiert. Eine deutlich effizientere Methode stellt die direkte Umwandlung von unterschiedlichen, ausdifferenzierten Zellen ineinander dar. Durch den Einsatz von spezifischen Transkriptionsfaktoren konnten dies in den letzten Jahren mit unterschiedlichen Ausgangsgeweben erreicht werden.^[199] Ein alternativer Weg eröffnete sich als gezeigt wurde, dass auch die veränderte Expression von bestimmten miRNAs wie miR-124 zu einer Transdifferenzierung führen kann.^[8] Diese hoch konservierte miRNA wird in Mäusen und Menschen von drei Genen kodiert und besonders in Zellen des Nervensystems exprimiert.^[65] So konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von miR-124 neuronale Vorläuferzellen, Myoblasten und sogar ausdifferenzierte Fibroblasten dazu veranlasst, sich zu Neuronen zu differenzieren.^[69] Ein direktes Ziel von miR-124 ist die mRNA von PTBP1 (*polypyrimidine-tract-binding protein 1*). PTBP1 wird vor allem in nicht-neuronalen Zellen exprimiert, wo es unterschiedliche zelluläre Aufgaben wahrnimmt.^[200] Die genauen Mechanismen sind dabei Gegenstand aktueller Forschung.

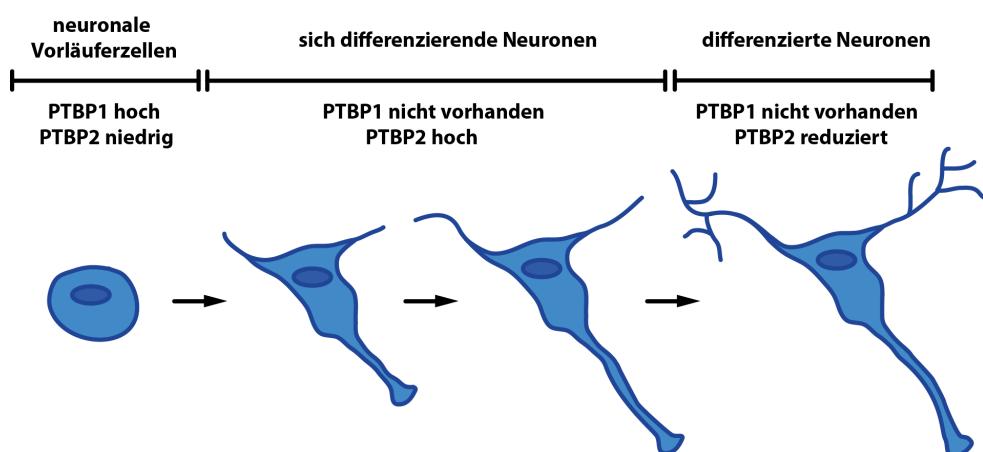


Abbildung 29: Unterschiedliche Expression von PTBP1 und PTBP2 während der neuronalen Differenzierung. Somatische Zellen und neuronale Vorläuferzellen exprimieren in erster Linie PTBP1. Nach der Induktion der neuronalen Differenzierung sinkt das Expressionslevel von PTBP1 und die Expression von PTBP2 wird induziert. Nach der Reifung zu differenzierten Neuronen sinkt das Expressionslevel von PTBP2.^[11]

PTBP1 nimmt eine zentrale Rolle bei der neuronalen Differenzierung ein und es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression eine Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Neuronen veranlasst.^[8] Eine reduzierte Expression von PTBP1 führt zu alternativem Spleißen, wodurch neuronen-spezifische Protein-Isoformen gebildet werden. Eine solche ist die neuronen-spezifische Isoformen PTBP2.^[9] Die weitreichenden Aufgaben dieser Isoform sind noch nicht gänzlich verstanden.^[11] Da PTBP2 allerdings erst in post-mitotischen Neuronen exprimiert wird, kann seine Expression als Indikator für eine Differenzierung in Neuronen herangezogen werden (Abbildung 29).^[10]

Als Teil dieser Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht, ob Liganden-modifizierte Oligonukleotide ohne den Einsatz potentiell toxischer Transfektionsreagenzien für eine Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Neuronen eingesetzt werden können. Als Liganden wurden Glucose bzw. Anandamid gewählt. Anandamid ist, wie in der Einleitung beschrieben, ein Ligand für die Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂. Die Expression von CB₁ erfolgt vorwiegend im zentralen Nervensystem während CB₂ in erster Linie in Zellen des Immunsystems exprimiert wird.^[201] Neuere Untersuchungen zeigten allerdings, dass CB₁ auch Bestandteil der Zellmembran von Fibroblasten ist.^[202]

5.1 SYNTHESE UND MODIFIKATION VON siRNA GEGEN PTBP1

Im ersten Schritt mussten die unterschiedlichen RNA-Oligonukleotide einer siRNA gegen PTBP1 synthetisiert werden (Tabelle 7). Die entsprechenden Sequenzen wurden der Literatur entnommen und von einer shRNA abgeleitet.^[8] Um eine postsynthetische Modifikation mit unterschiedlichen Liganden zu ermöglichen, wurde der entsprechende *passenger*-Strang, wie in Kapitel 5.3 beschrieben, durch den Einbau von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin an der 2. Position des 3'-Überhangs mit einem Alkin modifiziert (ORN19).

Tabelle 7: Sequenzen der hergestellten und aufgereinigten RNA-Oligonukleotide zur Regulation der Expression von PTBP1. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die Position der Alkinmodifizierung durch Einbau von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin ist dabei mit Y angegeben.

RNA	Sequenz	Beschreibung
ORN19	AAA-AUA-AAA-TCT-CTG-GTC-TYdT	PTBP1-passenger-Strang-Alkin
ORN20	AAA-AUA-AAA-TCT-CTG-GTC-TTdT	PTBP1-passenger-Strang ohne Alkin
ORN21	AGA-CCA-GAG-AUU-UUA-UUU-UUdT	PTBP1-guide-Strang

Nach erfolgreicher Synthese und Aufreinigung der in Tabelle 7 angegebenen RNA-Oligonukleotide, wurden der *passenger*-Strang der gegen PTBP1 gerichteten siRNA (ORN19) durch CuAAC mit Glucose bzw. Anandamid modifiziert. Auch wurde der Alkin-modifizierte *passenger*-Strang, der nicht regulierenden nonsense siRNA (ORN3) mit beiden Ligandenaziden umgesetzt und die entsprechenden Click-Produkte isoliert. Nach der vollständigen Charakterisierung wurde der entsprechende *antisense*-Strang in äquimolarer Menge zugegeben und durch Erhitzen auf 90 °C, gefolgt von langsamem Abkühlen, zu den biologisch aktiven RNA-Doppelsträngen hybridisiert. Die so erhaltene siRNA Bibliothek ist in Tabelle 8 aufgeführt. Neben der mit Glucose bzw. Anandamid modifizierten siRNA (**AEA-PTBP1-siRNA** und **Glc-PTBP1-siRNA**) gegen PTB1 lagen zusammenfassend vier zusätzliche Kontroll siRNAs vor. Diese waren nicht Liganden modifizierte, gegen PTB1 gerichtete siRNAs (**PTBP1-siRNA**) um die Funktionalität der aus der Literatur abgeleiteten Sequenz zu überprüfen, sowie nicht modifizierte nonsense siRNA (**nons-siRNA**). Um des Weiteren den Einfluss des Liganden auf die Differenzierung auszuschließen, wurde die nonsense siRNA mit Anandamid (**AEA-nons-siRNA**) und Glucose (**Glc-PTBP1-siRNA**) Modifizierung hergestellt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Liganden-modifizierten siRNA-Konjugate gegen PTBP1. Y = 2'Desoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (guide/ <i>passenger</i>)	Sequenz	Struktur
PTBP1-siRNA (ORN20/ORN21)	5'- AAA-AUA-AAA-TCT-CTG-GTC-TTdT -3' 3'dTU-UUU-UAU-UUU-AGA-GAC-CAG-A -5'	
nons-siRNA (ORN7/ORN8)	5'- AAA-AUA-AAA-TCT-CTG-GTC-TYdT -3' 3'dTU-UUU-UAU-UUU-AGA-GAC-CAG-A -5'	
Glc-PTBP1-siRNA (ORN19+4/ORN21)	5'- AAA-AUA-AAA-TCT-CTG-GTC-TYdT -3' 3'dTU-UUU-UAU-UUU-AGA-GAC-CAG-A -5' +4 ^{Glc-Monoazid}	
Glc-nons-siRNA (ORN3+4/ORN8)	5'- UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT 3'-dTdTAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC-A-5' +4 ^{Glc-Monoazid}	
AEA-PTBP1-siRNA (ORN19+18/ORN21)	5'- AAA-AUA-AAA-TCT-CTG-GTC-TYdT -3' 3'dTU-UUU-UAU-UUU-AGA-GAC-CAG-A -5' +18 ^{AEA-Monoazid}	
AEA-nons-siRNA (ORN3+18/ORN8)	5'- UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT 3'-dTdTAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC A-5' +18 ^{AEA-Monoazid}	

5.2 EVALUIERUNG DER TRANSDIFFERENZIERUNG DURCH MODIFIZIERTE siRNAs

Nach erfolgreicher Synthese dieser Bibliothek wurden die unterschiedlichen siRNAs zu Fibroblasten Zellkulturen gegeben, was von *Fabio Spada* durchgeführt wurde. 72 h nach Beginn der siRNA-Behandlung wurde das relative Expressionslevel von PTBP1 mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmt. Um zu überprüfen, ob sich die Fibroblasten zu Neuronen differenzieren, wurde auch das relative Expressionslevel von PTBP2 bestimmt. Die Isolation der mRNA sowie die darauffolgende Quantifizierung durch *realtime* PCR erfolgte durch den Verfasser und *Florian Steinmann*. Als interner Standard wurde nach *Fu et al.* das mRNA Level von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) gewählt.^[8] Dieses Enzym katalysiert innerhalb der Glycolyse die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Die Expressionen von PTBP1 und PTBP2 werden also stets in Relation zu GAPDH betrachtet. Die Quantifizierung der mRNA-Regulationen erfolgte durch ein Kontroll-Experiment, in welchem das relative mRNA-Level von PTBP1 und PTBP2 ohne Behandlung mit siRNA bestimmt wurde. Zusätzlich wurde auch ein Vergleich mit dem Einfluss durch Liganden-modifizierte nonsense-siRNAs durchgeführt.

Da die siRNA-Sequenz von einer shRNA abgeleitet wurde, musste zunächst ihre biologische Aktivität untersucht werden. Dazu erfolgte zuerst eine *Lipofectamin RNAiMAX* vermittelte Transfektion der **PTBP1**-siRNA und der **nons**-siRNA ohne Liganden-Modifizierung. Bei der **PTBP1**-siRNA wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt (10, 20 nM) (Abbildung 30).

Wie in Abbildung 30 A) erkennbar, führte die Behandlung mit der **PTBP1**-siRNA dosisabhängig zu einer deutlich verringerten Expression von PTBP1. Gleichzeitig konnte eine deutlich verstärkte Expression von PTBP2 gemessen werden (Abbildung 30 B)). Somit konnte die Funktionsfähigkeit der aus der Literatur abgeleiteten Sequenz der **PTBP1**-siRNA auf der Proteinebene verifiziert werden.

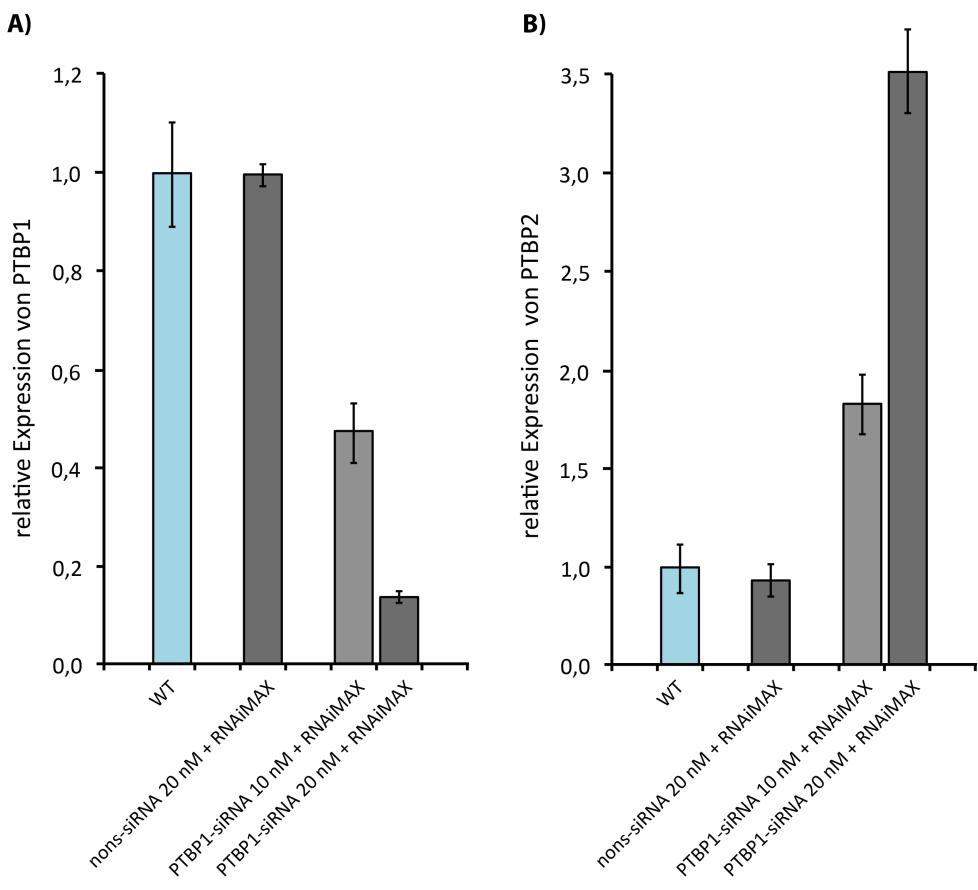


Abbildung 30: Regulation von PTBP1 in Fibroblasten durch unmodifizierte **PTBP1-siRNA**, welche mittels Lipofectamin RNAiMAX transfiziert wurden. Als Kontrollexperiment wurde auch eine unmodifizierte nons-siRNA mit Lipofectamin RNAiMAX transfiziert. Die relative Expression wurde über das relative mRNA-Level mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmt. A) relative Expression von PTBP1. B) relative Expression von PTBP2. Die eingesetzten siRNAs sind in Tabelle 8 näher beschrieben.

Nachdem die biologische Aktivität der Sequenz somit bestätigt werden konnte, wurden die beiden Liganden-modifizierten siRNAs **Glc-PTBP1-siRNA** und **AEA-PTBP1-siRNA** untersucht. Dazu wurden Fibroblasten mit den siRNA-Konjugaten in zwei unterschiedlichen Konzentrationen behandelt (250, 500 nM) und nach 72 h eine Lyse der Zellen und Isolation der RNA durchgeführt. Die mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmten relativen Expressionslevel von PTBP1 sind in den Abbildungen 31 und 32 wiedergegeben.

Bei der Behandlung mit der Glucose-modifizierten **Glc-PTBP1-siRNA** zeigte sich keine Veränderung der Expression von PTBP1 im Vergleich zu einer nicht regulatorisch aktiven siRNA **Glc-nons-siRNA** (Abbildung 31).

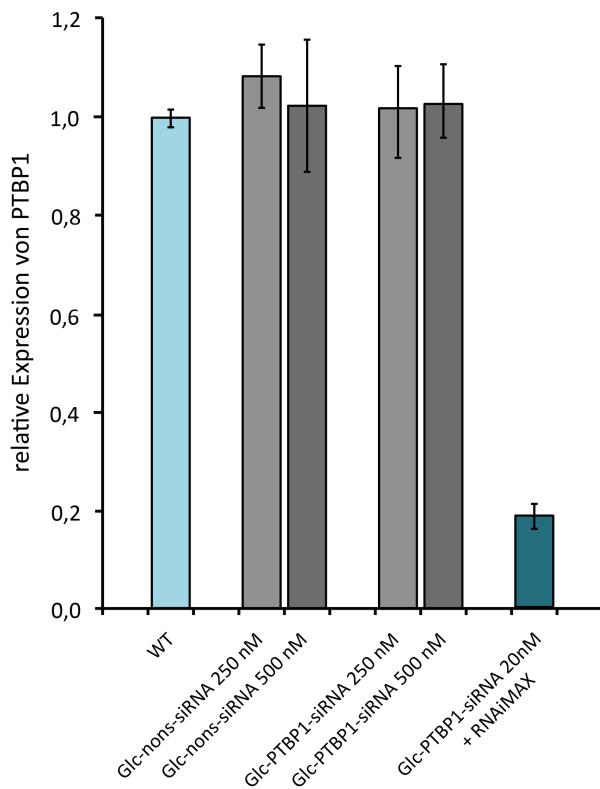


Abbildung 31: Regulation von PTBP1 in Fibroblasten durch Glucose-modifizierte **Glc-PTBP1-siRNA**. Die verwendete **Glc-PTBP1-siRNA** wurde auch mittels Lipofectamin RNAiMAX in die Zellen transfiziert. Als Kontrollexperiment wurden die Zellen auch mit einer **Glc-nons-siRNA** behandelt. Die relative Expression wurde über das relative mRNA-Level mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmt. Die eingesetzten siRNAs sind in Tabelle 8 näher beschrieben.

Daher wurde im nächsten Schritt die Funktionsfähigkeit Anandamid modifizierter siRNA untersucht. Wie in Abbildung 32 A) erkennbar, führte die Behandlung mit der Anandamid-modifizierten **AEA-PTBP1-siRNA** dosisabhängig zu einer deutlich verringerten Expression von PTBP1. Um einen Einfluss des Liganden auf die Differenzierung ausschließen zu können, wurde auch eine Anandamid-modifizierte nonsense-siRNA (**AEA-nons-siRNA**) eingesetzt. Diese führte allerdings zu keiner Veränderung der relativen Expression im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten.

Die Redifferenzierung zu Neuronen wurde durch Quantifizierung der PTBP2 mRNA untersucht. Dabei konnte erfolgreich eine deutlich verstärkte, dosisabhängige Expression von PTBP2 ausgelöst durch **AEA-PTBP1-siRNA** gemessen werden (Abbildung 32 B)). Auch in Bezug auf PTBP2 zeigte mit Anandamid-modifizierter nonsense-siRNA (**AEA-nons-siRNA**) kein Anstieg von PTBP2, wodurch der Einfluss der Liganden-Modifizierung auf die Differenzierung ausgeschlossen werden konnte.

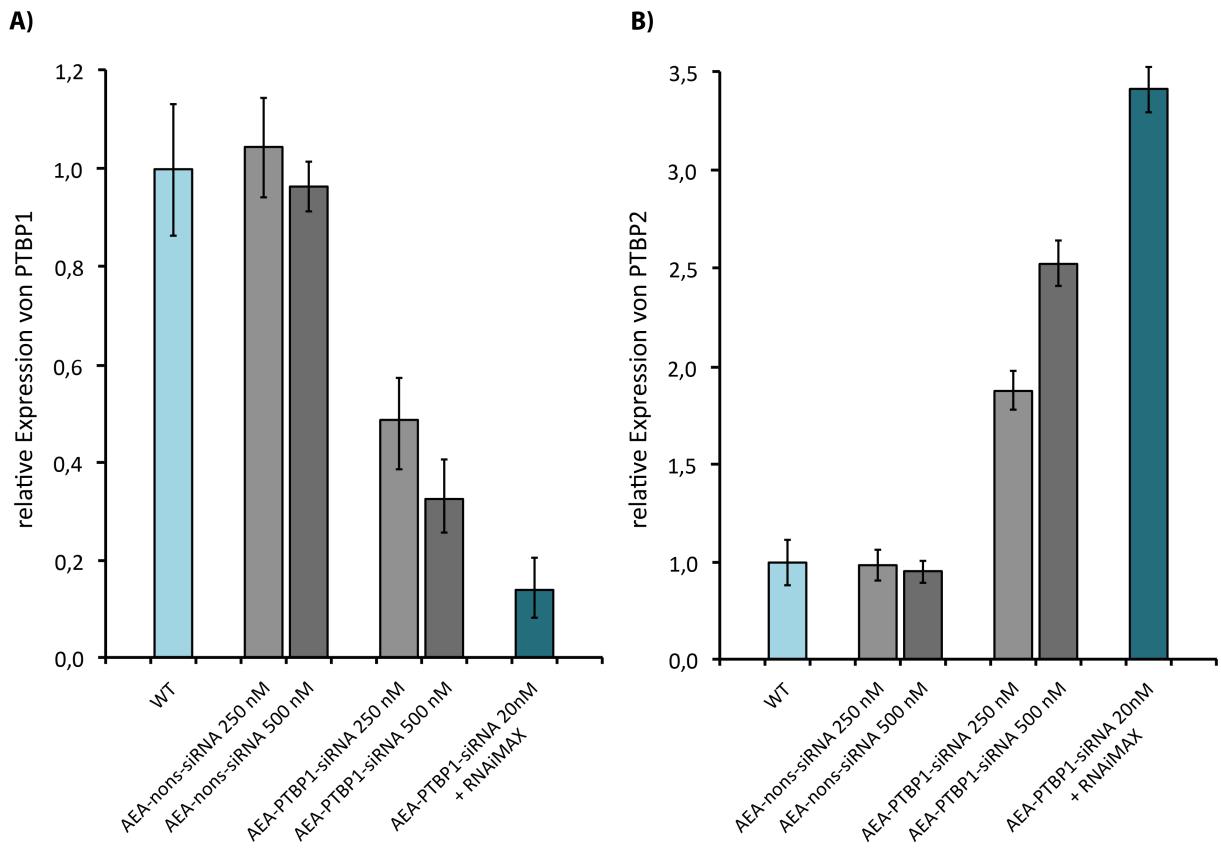


Abbildung 32: Regulation von PTBP1 in Fibroblasten durch Anandamid-modifizierte **AEA-PTBP1-siRNA**. A) relative Expression von PTBP1. B) relative Expression von PTBP2. Die verwendete **AEA-PTBP1-siRNA** wurde auch mittels Lipofectamin RNAiMAX in die Zellen transfiziert. Als Kontrollexperiment wurden die Zellen auch mit einer **AEA-nons-siRNA** behandelt. Die relative Expression wurde über das relative mRNA-Level mittels quantitativer *realtime PCR* bestimmt. Die eingesetzten siRNAs sind in Tabelle 8 näher beschrieben.

Somit konnte die aktive Regulation der Expression von PTBP1 und eine daraus resultierende neuronale Differenzierung der Fibroblasten durch die Behandlung mit **AEA-PTBP1-siRNA** gezeigt werden.

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Liganden-modifizierte siRNAs einen Weg eröffnen, Neuronen aus leicht zugänglichen Patientenzellen zu gewinnen. Diese Methode stellt somit eine neue Antwort auf diese herausfordernde Fragestellung der regenerativen Medizin dar.

6. ZELLSPEZIFISCHE AUFNAHME VON HOCHFUNKTIONALISIERTEN MESOPORÖSEN SILICA-NANOPARTIKELN

Die Entwicklung effektiver Methoden, Wirkstoffe gezielt in eine Zielzelle zu transportieren und zu einem definierten Zeitpunkt frei zu setzen, ist eine große Herausforderung. Unter Anderem kann auch die Nanowissenschaft hierzu einen Beitrag leisten. Mesoporöse Nanopartikel bieten die Möglichkeit erhebliche Mengen an Wirkstoffen aufzunehmen und zu transportieren. Darüber hinaus erregen sie kaum Immunreaktionen und es existieren viele Möglichkeiten ihre Oberfläche auf unterschiedlichste Art zu modifizieren.^[203]

In diesem Teil der Arbeit wurde, in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Bein*, eine Hybridstruktur aus gezielt modifizierten Enzymen mit Ligandenmodifikation sowie mesoporösen Silica-Nanopartikel (MSN) entwickelt, die einen zeitlich definierten und gezielten Transport von Wirkstoffen in Zielzellen und Gewebe ermöglichen (Abbildung 33).

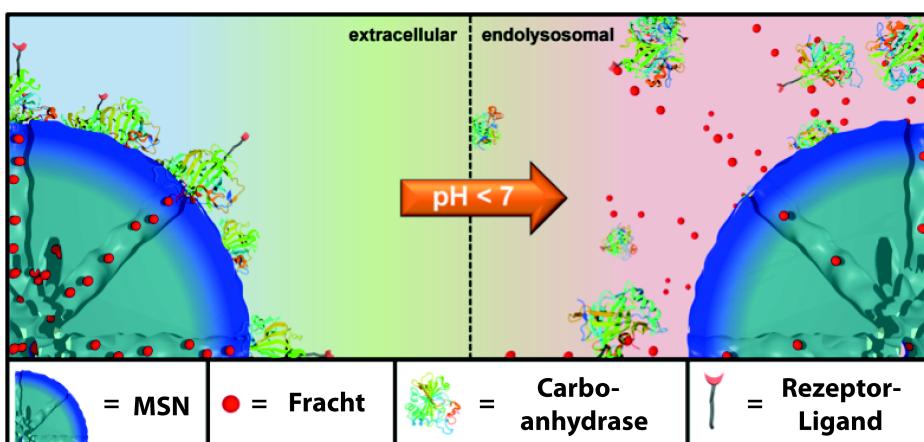


Abbildung 33: Schematische Darstellung des entwickelten pH-Wert-gesteuerten Transportsystems. Durch Benzolsulfonamide auf der Oberfläche der Mesoporöse Silica-Nanopartikel (MSN) kann eine Carboanhydrase gebunden werden. Durch die reversible Enzym/Substrat-Bindung an Sulfonamid werden die Poren effektiv verschlossen wodurch der eingelagerte Wirkstoff transportiert werden kann. Die verwendete Carboanhydrase wurde mittels *amber suppression* so verändert, dass eine Aminosäure mit Norbornen-Seitenkette an der dem Nanopartikel gegenüber liegenden Seite präsentiert wird. Diese Funktionalisierung ermöglicht eine Click-Reaktion mit einem Tetrazin-Liganden-Konjugat. Durch die Modifikation mit einem Rezeptor-Liganden wird die Spezifität der Aufnahme der Nanopartikel erhöht. Nach einer erfolgreichen Aufnahme sorgt der sinkende pH-Wert im Inneren von Endosomen zu einer Ablösung der Carboanhydrase und zu einer Freisetzung des in die Poren eingelagerten Wirkstoffs.

Dazu sollten MSN an der Oberfläche mit Sulfonamiden modifiziert werden. Diese Sulfonamide dienen als Bindestellen für eine Carboanhydrase. Durch die reversible Bindung dieses Enzyms werden die Poren des Nanopartikels verschlossen. Die Freisetzung der in die Poren eingelagerten Moleküle ist somit erst nach Abspaltung der Carboanhydrase durch sinkenden pH-Wert im Inneren der reifenden Endosomen möglich. Um einen zellspezifischen Transport bewerkstelligen zu können, wurde eine von *Michael Gattner* und *Milan Vrabel* genetisch veränderte Carboanhydrase verwendet. Dieses Enzym

wurde mittels der *amber suppression* Methode mit einer Norbornen-Funktionalität modifiziert. Diese unnatürliche Aminosäure ermöglichte eine bioorthogonale Modifikation mit Liganden wie Folsäure (FA) und Anandamid (AEA) durch Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA). Im Folgenden soll auf einige Aspekte der bioorthogonalen Chemie und im Speziellen auf die Verwendung von Diels-Alder Reaktionen in diesem Kontext eingegangen werden.

6.1 BIOORTHOGONALE CLICKREAKTIONEN

Das Interesse an den Abläufen im Inneren von lebenden Organismen hat in den letzten Jahren stetig zugenommen. Methoden auf chemischem Weg Biomoleküle schonend und gezielt zu markieren, um ihre Funktion, Lokalisation und Interaktionspartner zu verfolgen, sind daher von hohem Interesse. Besonderes Augenmerk liegt auf Strategien, diese Markierung im Inneren eines Organismus durchzuführen ohne diesen zu beeinflussen.

Neben [3+2] Cycloadditionen^[204] und Staudinger-Ligationen^[205] wurden besonders 1,3-dipolare Cycloadditionen^[206] und Diels-Alder Reaktionen^[207] als Kandidaten für bioorthogonale Reaktionen untersucht und optimiert. Besonders die Diels-Alder Reaktionen zwischen Tetrazinen und gespannten Alkenen erwiesen sich als sehr vielversprechend.^[208] Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab. Im ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt handelt es sich um eine Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA). Das gebildete, sehr gespannte bicyclische Intermediat durchläuft in einem zweiten Schritt eine retro-Diels-Alder Reaktion. Dabei wird ein Äquivalent N₂ freigesetzt und es entsteht ein 4,5-Dihydropyridazin, welches sich entweder zu dem entsprechenden 1,4-Dihydro-Isomer umlagert oder zu einem Pyridazin oxidiert wird (Abbildung 34). Während viele Diels-Alder Reaktionen reversibel sind, handelt es sich bei der inversen Diels-Alder Reaktion, gefolgt von einer retro-[4+2] Cycloaddition, um einen irreversiblen Vorgang. Ein großer Vorteil dieser Reaktion ist, dass sie durch das wässrige Medium um ein Vielfaches beschleunigt wird.^[209]

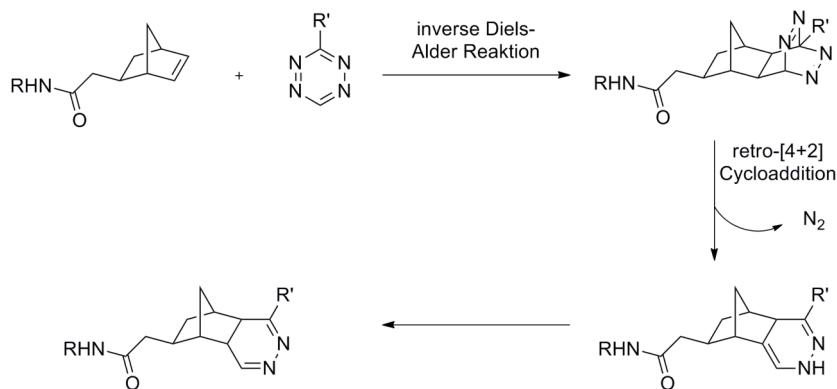


Abbildung 34: Reaktionen von Norbornenderivaten und Tetrazin.^[210]

Darüber hinaus kann die Reaktionsgeschwindigkeit sehr stark moduliert werden. Einen großen Einfluss hat hier die Struktur des Tetrazins. So konnte gezeigt werden, dass Substituenten mit elektronenziehendem Effekt zu einer deutlichen Beschleunigung der [2+4]-Cycloaddition führen.^[211] Ein Nachteil dieser Substituenten ist allerdings, dass mit zunehmendem Elektronenzug auch die Stabilität des Tetrazins unter physiologischen Bedingungen abnimmt. Um eine möglichst gute Balance zwischen Reaktivität und Stabilität zu erhalten, die für einen erfolgreichen Einsatz in lebenden Systemen notwendig ist, wurden unterschiedlichste Tetrazine entwickelt und auf ihre Reaktivität hin untersucht (Abbildung 35).^[212]

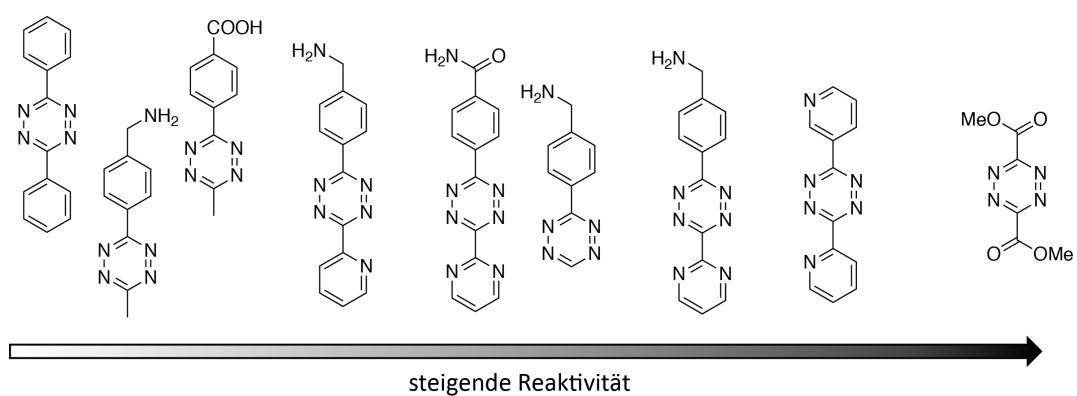


Abbildung 35: Vergleich der Reaktivität unterschiedlicher Tetrazine bezüglich der Reaktion *trans*-Cycloocten bei 37°C in PBS.^[212]

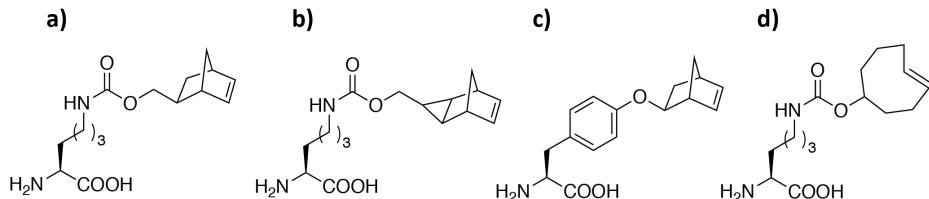


Abbildung 36: Auswahl einiger Dienophil-modifizierter Aminosäuren zur Funktionalisierung von Proteinen mittels *amber suppression*. a) und b) Norbornen-modifizierte Lysin-Derivate.^[213] c) Norbornen-modifiziertes Tyrosin-Derivat.^[214] d) *trans*-Cycloocten-modifiziertes Lysin-Derivat.^[215]

Neben dem Tetrazin spielt auch die Wahl des Dienophils eine große Rolle bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit. Das erste Dienophil, das zur Modifikation eines Proteins auf gentechnischem Weg mittels *amber suppression* publiziert wurde, war ein Norbornen-Derivat.^[216] Darüber hinaus konnte unter Mitarbeit des Autors dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch unterschiedliche Substituenten eine erhebliche Modulation der Reaktivität in IEDDA Reaktionen erreicht werden kann.^[208a] In der Folge etablierte sich die Verwendung von unterschiedlichen Norbornen-Derivaten zur Modifizierung von Biomolekülen (Abbildung 36 a)-c)).^[213, 217]

6.2 SYNTHESE EINES TETRAZIN-FUNKTIONALISIERTEN ANANDAMIDS

Die zellspezifische Aufnahme der mesoporöse Silica-Nanopartikel (MSN) sollte durch Folsäure und Anandamid an der Oberfläche erreicht werden. Dazu mussten zunächst Folsäure und Anandamid mit einem Tetrazin funktionalisiert werden (Abbildung 37).

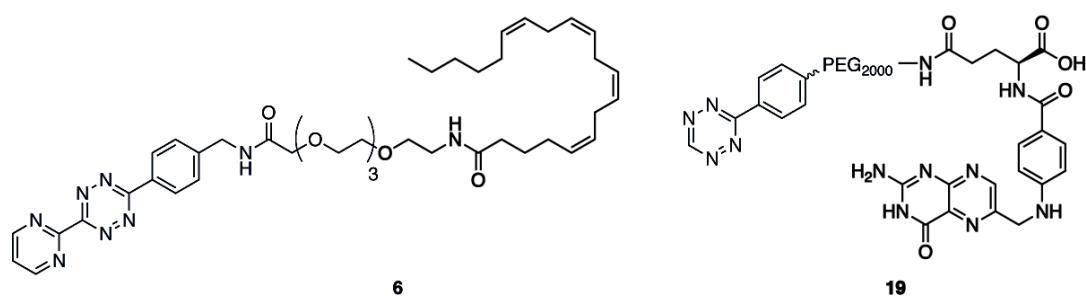


Abbildung 37: Verwendete Liganden-Tetrazin-Konstrukte. Das Folsäure-Tetrazin **19** wurde von *Milan Vrabel* zur Verfügung gestellt, während das Anandamid-Tetrazin-Konstrukt **6** durch den Verfasser dieser Arbeit hergestellt wurde.

Das Folsäure-Tetrazin **19** wurde von *Milan Vrabel* zur Verfügung gestellt. Die Darstellung des Tetrazin-Anandamid-Konstruktes **6** wurde in acht Stufen ausgehend von 4-(Aminomethyl)benzonitril erreicht.

In einem ersten Schritt wurde die Aminogruppe von 4-(Aminomethyl)benzonitril (**20**) mit Boc_2O geschützt, um in der folgenden Tetrazin-Synthese nicht als Nucleophil reagieren zu können (Abbildung 38 a). Für die darauffolgende Synthese des Tetrazins **21** wurde eine von *Overkleef et al.* eingesetzte Vorschrift modifiziert.^[218]

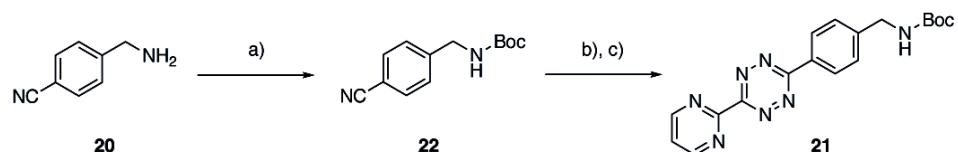


Abbildung 38: Synthese des Boc-geschützten Amino-Tetrazins **21**. a) Boc_2O , NEt_3 , CH_2Cl_2 , 0°C -RT, 93 %, b) 2-Pyridincarbonitrile, N_2H_4 , EtOH, 90°C .

Hierfür wurde **22** zusammen mit 2-Pyrimidincarbonitril und Hydrazinhydrat in Ethanol suspendiert und über Nacht erhitzt. Darauf folgt eine Oxidation durch Natriumnitrit und Essigsäure bei Raumtemperatur ohne zwischenzeitliche Aufreinigung (Abbildung 38 b,c)). Bei der Synthese asymmetrischer Tetrazine führt die Reaktion identischer Nitrile zur Bildung von symmetrischen Tetrazinen, die nur sehr schwer abtrennbar sind. Um dieses Problem möglichst gering zu halten, wurde die Reaktion mit unterschiedlichen Überschüssen eines der Edukte durchgeführt. Die Wahl fiel auf 2-Pyrimidincarbonitril, da hierbei eine Kupplung zweier identischer Nitrile zu einem Tetrazin führt, das einen relativ großen Polaritätsunterschied zu dem gewünschten Tetrazin **21** aufweist. Nach

Optimierung des Verhältnisses der Reaktionspartner konnte das geschützte Amino-Tetrazin isoliert werden.

Für die Synthese des Polyethylenglycol-Linkers (**23**) wurde von Tetraethylenglycolazid (**24**) ausgegangen.

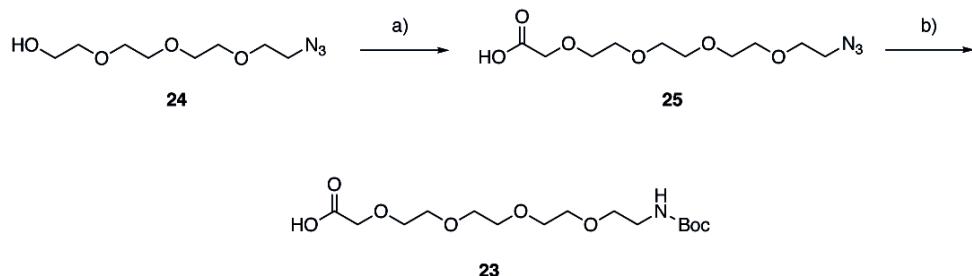


Abbildung 39: Synthese des Polyethylenglycol-Linkers. a) 2-Bromessigsäure, NaOH, DCM, 0 °C-RT, 70 %, b) Pd/C, H₂, Boc₂O, MeOH, 0 °C, 84 %.

Um die Carbonsäure-Funktionalität in **25** einzuführen, wurde das Tetraethylenglycolazid **24** mit Bromessigsäure umgesetzt. Anschließend erfolgte die Reduktion der Azidfunktionalität mit Wasserstoff, katalysiert durch Palladium auf Kohle in Anwesenheit von Boc-Anhydrid in einem Schritt (Abbildung 39).

Für die Umsetzung des so hergestellten Tetraethylenglycol-Linkers **23** mit dem Tetrazin **21**, wurde die Aminogruppe des Tetrazins mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan quantitativ entschützt.

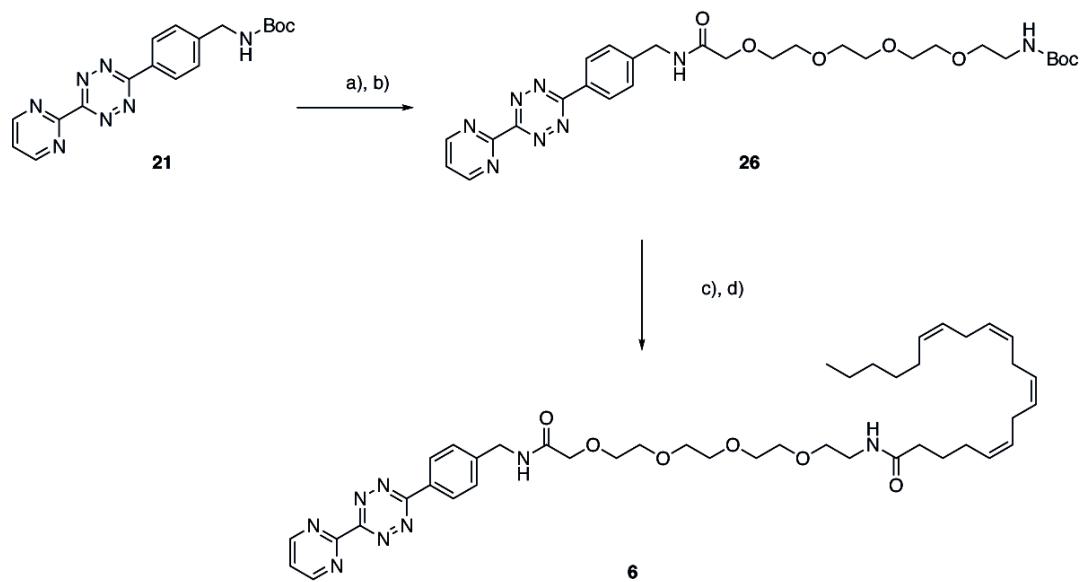


Abbildung 40: Synthese des Tetrazin-modifizierten Anandamids **6**. a) TFA, CH_2Cl_2 , 0 °C, quantitativ, b) HATU, HOEt, DIPEA, DMF, RT, 42 %, c) TFA, CH_2Cl_2 , 0 °C, quantitativ, d) HATU, HOEt, DIPEA, DMF, RT, 46 %.

Um einen nukleophilen Angriff des entschützten Amins auf das Tetrazin zu vermeiden, wurde auf eine wässrige Aufarbeitung verzichtet. Nach Entfernung der Trifluoressigsäure wurde das Rohprodukt anschließend einer Amidkupplung in DMF unterworfen (Abbildung 40). Die Aktivierung der Säure **23** erfolgte durch HATU und HOEt mit DIPEA als Base.^[219] Das Produkt der Amidkupplung **26** konnte

nach Aufreinigung mit einer Ausbeute von 42 % isoliert werden. Im nächsten Schritt sollte eine Kupplung von Arachidonsäure an das hergestellte, geschützte Amin erfolgen. Dazu wurde die Boc-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure quantitativ abgespalten und das Rohprodukt in einer Amidkupplung mit Arachidonsäure umgesetzt. Um möglichst milde Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, erfolgte die Aktivierung auch hier mit HATU und DIPEA in Anwesenheit von HOBr. Das Tetrazin-modifizierte Anandamid konnte in guter Ausbeute erhalten werden. Da die Konformation der Doppelbindungen im Arachidonyl-Rest für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Anandamid von essentieller Bedeutung ist,^[220] wurde die all-cis-Konformation der Doppelbindungen durch ¹³C-gekoppelte HSQC-NMR-Spektroskopie überprüft und bestätigt.

6.3 FUNKTIONALISIERUNG VON NANOPARTIKELN MIT FOLSÄURE UND ANANDAMID

Die hochfunktionalisierten Mesoporöse Silica-Nanopartikel wurden in zwei Stufen hergestellt. Durch *Stefan Datz* aus dem Arbeitskreis *Bein* wurden in einem ersten Schritt MSN mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 150 nm und 3.8 nm Porendurchmesser hergestellt, deren Oberfläche mit Benzolsulfonamiden funktionalisiert wurde.^[221] Benzolsulfonamid ist ein Inhibitor der Carboanhydrase (CA), der pH-abhängig in dessen aktivem Zentrum gebunden wird. Anschließend wurde an diese Oberflächenmodifikation Carboanhydrase gebunden. Ein vollständiger Verschluss der Poren der CA-MSN durch das gebundene Enzym konnte anschließend mithilfe von Fluorescein beladenen MSN bestätigt werden.^[222] Dabei zeigte sich keine Freisetzung von Fluorescein in HBSS Puffer bei einem pH-Wert von 7.4 über einen Zeitraum von 16 h. Um die pH-abhängige Öffnung der Poren der Nanopartikel zu überprüfen, wurden mit Fluorescein beladene MSN nach 3 h bei pH 7.4 in ein saures, dem Inneren des Endosoms entsprechenden Milieus überführt (pH 5.5). Dabei konnte prinzipiell eine Freisetzung des Farbstoffes im Endosom gezeigt werden.

Um die Spezifität der Aufnahme der MSN zu erhöhen, wurden die mit CA bedeckten Nanopartikel (CA-MSN) in einem zweiten Schritt mit den beiden Rezeptor-Liganden Folsäure und Anandamid modifiziert. Da die Oberfläche der Nanopartikel mit CA bedeckt sind, musste dazu die Carboanhydrase selbst mit dem jeweiligen Liganden versehen werden. Eine effektive Präsentation der Liganden auf der Oberfläche der CA-MSN musste sichergestellt werden. Daher wurde durch *Michael Gattner* und *Milan Vrabel* mittels *amber suppression* eine humane Carboanhydrase so verändert, dass sie eine Norbornen-Funktionalität aufweist.^[223] Dabei wurde darauf geachtet, dass das aktive Zentrum des Enzyms und die Norbornen-tragenden Aminosäure auf gegenüberliegenden Seiten der Sekundärstruktur liegen (Abbildung 41). Dies ermöglichte im nächsten Schritt eine Modifikation durch eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA).

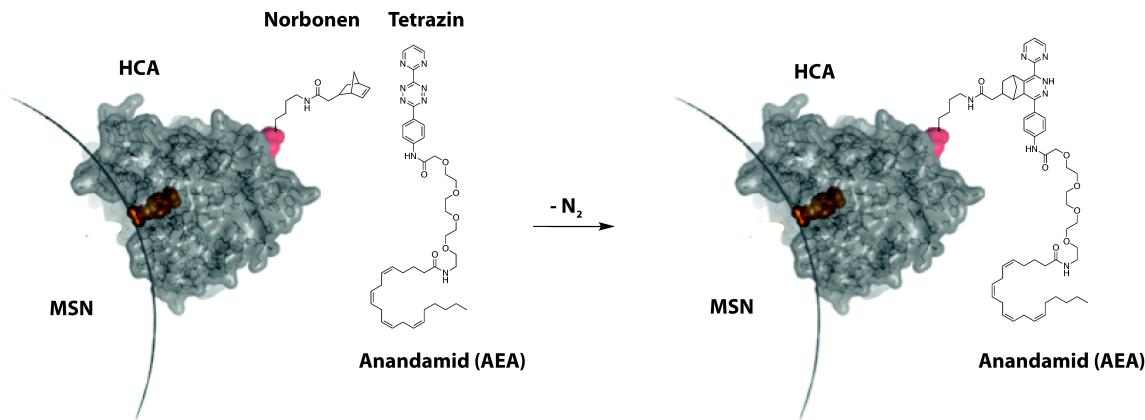


Abbildung 41: Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA) zur Modifikation von hochfunktionalisierten mesoporösen Silica-Nanopartikel (MSN). Eine Norbornen-funktionalisierte humane Carboanhydrase (grau) bindet mit ihrem aktivem Zentrum (orange) ein auf der Oberfläche eines MSN liegendes Benzolsulfonamid. Die Norbornen-modifizierte Aminosäure befindet sich an der gegenüberliegenden Seite der Sekundärstruktur des Enzyms (rot). Die bioorthogonale Click-Reaktion zwischen einem Tetrazin-modifizierten Rezeptorliganden (hier AEA-Tetrazin 6) und der Norbornen-Aminosäure führt zur Bildung eines Dihydropyridazins. Auf die gleiche Weise wurden mesoporöse Silica-Nanopartikel auch mit dem von *Milan Vrabel* zur Verfügung gestellten Folsäure-Tetrazin 19 modifiziert.

Nach der Bindung der Carboanhydrase an die Benzolsulfonamide der MSN erfolgte die Click-Modifikation mit beiden Tetrazin-modifizierten Liganden. Dazu wurden die CA-MSNs in HBSS-Puffer suspendiert (1 mg/mL) und ein Überschuss des Tetrazin-modifizierten Liganden zugegeben (1 µg/mL) zugegeben. Die so vollständig funktionalisierten Partikel (AEA-CA-MSN/FA-CA-MSN) wurden anschließend in Zellaufnahme-Experimenten untersucht.

6.4 REZEPTORVERMITTELTE AUFNAHME VON HOCHFUNKTIONALISIERTEN MESOPORÖSEN SILICA-NANOPARTIKELN

Um die Rezeptor-vermittelte Aufnahme der vollständig funktionalisierten Partikel zu untersuchen, wurden Aufnahmestudien in unterschiedlichen Zelllinien vorgenommen. Folsäure (Vitamin B9) ist ein Ligand, der besonders in der gezielten Krebstherapie Anwendung findet.^[187] Der Folat-Rezeptor wird durch Krebszellen deutlich verstärkt in einer Isoform präsentiert, die besonders gut für die Bindung von Folsäurekonjugaten zugänglich ist.^[192] Um die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Folsäure-modifizierten Nanopartikel (FA-CA-MSN) zu untersuchen, wurden KB-Zellen, welche diesen Rezeptor stark exprimieren, gewählt. FA-CA-MSNs, deren Poren mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Atto633) beladen worden waren, wurden dabei für 2 h, 5 h und 8 h mit den Zellen inkubiert (17 µg/mL). Nach diesen Zeiträumen wurden die nicht aufgenommenen Nanopartikel durch mehrmaliges Waschen entfernt, die Zellmembranen angefärbt und die lebenden Zellen mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Die Beobachtungen zeigten eine Aufnahme der Nanopartikel bereits

nach zwei Stunden. Über den Zeitraum von 5 h und 8 h konnte eine deutliche Zunahme der aufgenommenen Nanopartikel beobachtet werden.

In einem zweiten Experiment wurden die Folat-Rezeptoren vor der Inkubation mit den FA-CA-MSN abgesättigt. Dazu wurden die KB-Zellen für 2 h mit freier Folsäure (3 mM) inkubiert und nach mehrmaligem Waschen wie oben verfahren. Die konfokalmikroskopische Untersuchung zeigte hier auch nach 8 h keine nennenswerte Internalisierung der FA-CA-MSN. Diese Beobachtungen sind deutliche Hinweise auf die Rezeptor-vermittelte und somit selektive Aufnahme der Folsäure-modifizierten Nanopartikel.

In einem zweiten Schritt wurde auch die Aufnahme von Anandamid-modifizierten Nanopartikeln untersucht. Für Aufnahmestudien mit Anandamid-modifizierten Nanopartikeln (AEA-CA-MSN) wurden sowohl Plattenepithelkarzinom-Zellen (A431-Zellen) als auch neurale Stammzellen (ENC-1-Zellen) verwendet.

Mit Fluoreszenzfarbstoffen beladenen AEA-CA-MSNs, wurden für 3 h mit den A431-Zellen inkubiert (17 µg/mL). Nach diesen Zeiträumen wurden die nicht aufgenommenen Nanopartikel durch mehrmaliges Waschen entfernt, die Zellmembranen angefärbt und die lebenden Zellen mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich eine effiziente Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen (Abbildung 42 A)).

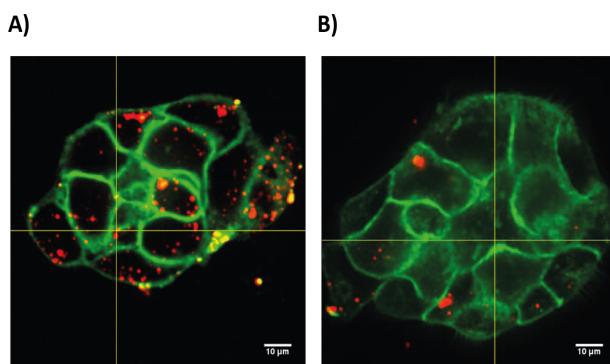


Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von A431-Zellen nach 3 stündiger Inkubation mit Anandamid-modifizierten mesoporösen Silica Nanopartikeln (AEA-CA-MSN). Die Poren der MSN waren in allen Fällen mit Atto633 beladen (rot). A) Inkubation mit Anandamid modifizierten MSN (AEA-CA-MSN). B) Inkubation mit AEA-CA-MSN nach zweistündiger Inkubation mit freiem Anandamid-Tetrazin. **Nach einer vorgelegerten Inkubation mit freiem Liganden konnte eine deutlich geringere Aufnahme der AEA-CA-MSN beobachtet werden.** Die Zellmembranen wurden mit *cell mask orange* angefärbt (grün).

Auch in diesem Fall wurde in einem Kontrollexperiment eine Absättigung der CB-Rezeptoren vor der Behandlung mit AEA-CA-MSNs vorgenommen. Dazu wurden A431-Zellen für 2 h mit dem Anandamid-Tetrazin-Konjugat **6** (33 mM) inkubiert. Ohne Waschschritt wurde anschließend AEA-CA-MSN (17 µg/mL) zugegeben und für 3 h mit den Zellen inkubiert. Dabei zeigte sich eine deutliche verringerte Aufnahme der AEA-CA-MSN (Abbildung 42 B)).

Wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte ermöglicht Anandamid eine gute Möglichkeit für einen gezielten Transport von Wirkstoffen in neuronale Stammzellen. Da diese Zellen durch konventionelle Methoden schlecht zu adressieren sind ist diese Strategie besonders interessant.^[12]

Daher wurde die Aufnahme der Anandamid-modifizierten Nanopartikel auch in diesen Zellen untersucht. Die zellbiologischen Arbeiten mit Stammzellen fanden in Zusammenarbeit mit *Fabio Spada* statt. Wie zuvor beschrieben wurden auch hier AEA-CA-MSN, deren Poren mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Atto633) beladen worden waren, für 3 h und 24 h mit den neuronalen Stammzellen inkubiert (17 µg/mL). Nach diesen Zeiträumen wurden die nicht aufgenommenen Nanopartikel durch mehrmaliges Waschen entfernt, die Zellmembranen angefärbt und die lebenden Zellen mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Nach drei Stunden konnte eine deutliche Anlagerung der Nanopartikel an die Zellmembranen der Stammzellen beobachtet werden. Nach Ablauf der 24 h zeigte sich eine erfolgreiche Aufnahme der AEA-CA-MSN in die Zellen (Abbildung 43 A)). In einem Kontrollexperiment wurden wie zuvor beschrieben die CB-Rezeptoren durch eine zweistündige Inkubation der Zellen mit freiem Anandamid-Tetrazin **6** (33 mM) möglichst abgesättigt, bevor die Stammzellen für 24 h mit den AEA-CA-MSN inkubiert wurden (Abbildung 43 B)). Hier konnte eine deutlich geringere Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen beobachtet werden. In einem weiteren Kontrollexperiment wurden die neuronalen Stammzellen mit Nanopartikeln behandelt, die nicht mit Anandamid modifiziert worden waren (Abbildung 43 C)). Auch hier konnte keine Aufnahme detektiert werden.

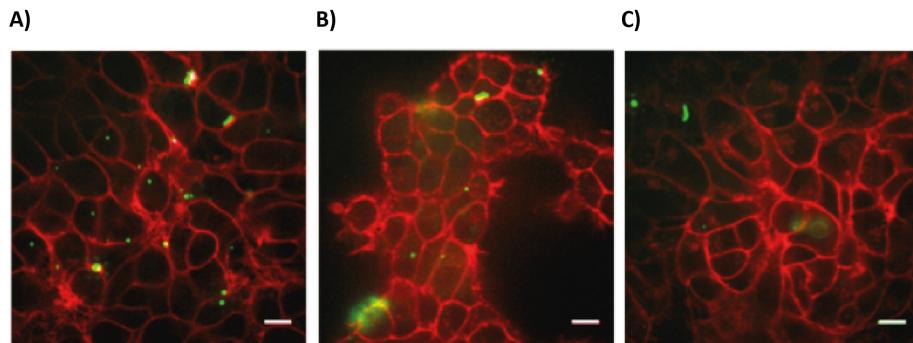


Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von neuronalen Stammzellen nach 24 stündiger Inkubation mit unterschiedlichen hochfunktionalisierten mesoporösen Silica Nanopartikeln (MSN). Die Poren der MSN waren in allen Fällen mit Calcein beladen (grün). A) Inkubation mit Anandamid modifizierten MSN (AEA-CA-MSN). B) Inkubation mit AEA-CA-MSN nach zweistündiger Inkubation mit freiem Anandamid-Tetrazin zur kompetitiven Hemmung der Aufnahme. C) Inkubation mit nicht Anandamid-modifizierten MSN (CA-MSN) zur Überprüfung einer unspezifischen Aufnahme. Die Zellmembranen wurden mit *cell mask deep red* angefärbt (rot).

Die Untersuchungen zeigten somit bei beiden verwendeten Liganden eine effektive Aufnahme der hochfunktionalisierten mesoporösen Silica Nanopartikeln mit erheblicher Spezifität.

Somit konnte mit dieser neuartigen Plattform eine pH-abhängige Freisetzung und eine gezielte Aufnahme demonstriert werden, die es ermöglicht unterschiedliche Wirkstoffe in Zielzellen und Gewebe zu transportieren.

7. AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das neuartige Konzept der trimeren siRNA-Liganden-Konjugate auch auf das von *Thomas Carell* zum Patent angemeldete Glucose-Liganden-System angewendet werden kann. Gerade vor dem Hintergrund der aktuellen Zulassung von siRNA-Liganden-Konjugaten wie *Patisiran* (*Alnylam Pharmaceuticals*) zur klinischen Anwendung scheint eine Steigerung der Effizienz des Liganden-vermittelten Transport von siRNA zunehmend an Relevanz zu gewinnen. Da alle bisherigen therapeutischen Anwendungen von siRNA auf einer lokalen Injektion des Wirkstoffs ausgerichtet sind, ist ein universelles Aufnahmesystem wie Glucose besonders attraktiv. Liganden wie Glucose, die eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen und effizient von einer Vielzahl an Zelltypen aufgenommen werden, erscheinen daher sehr vielversprechend.

Um die Ausdehnung der Anwendungsbereiche Liganden-modifizierter siRNAs zu ermöglichen, wurde in Zusammenarbeit mit der BASF die Möglichkeit einer systemischen RNAi in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die positiven Ergebnisse durch eine Aufnahme von Glucose-modifizierter siRNA über die Wurzeln zeigten dabei das Potential dieser Strategie. Aufgrund der zunehmenden Anwendung von RNAi in der Entwicklung verbesserter Pflanzensorten erscheint ein tieferer Einblick in die Aufnahmemechanismen modifizierter siRNAs und deren Transport in Pflanzen lohnenswert. Besonders im Hinblick auf das relativ neue Forschungsgebiet der *environmental RNA interference* (eRNAi, Kapitel 1.2.1.2) könnten diese Erkenntnisse eine gezielte Bekämpfung von Fressfeinden durch Liganden-modifizierte RNAs ermöglichen.

Ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter Anwendungsbereich Liganden-modifizierter siRNAs war die Redifferenzierung von Fibroblasten in Neuronen. Dabei konnte unter Einsatz Anandamid-modifizierter siRNA die Umstellung der Zellen auf ein für Neuronen typisches Expressionsverhalten erfolgreich gezeigt werden. Um eine vollständige Differenzierung zu reifen Neuronen bestätigen zu können, könnten die behandelten Fibroblasten schrittweise auf neuronenspezifische Wachstumsbedingungen umgestellt werden. Die so gewonnenen Neuronen könnten eine wertvolle Quelle von Zellen darstellen, die besonders im Bereich der regenerativen Medizin zur Behandlung von schweren Schädigungen des Nervensystems dringend benötigt werden.

Im vierten Teil der Arbeit wurde eine bioorthogonale Modifizierung von Proteinen mit Rezeptorliganden durchgeführt. Die Anwendbarkeit der so hergestellten Protein-Ligand-Hybridstrukturen wurde durch den selektiven Transport beliebig beladbarer Silica-Nanopartikeln für den gezielten Wirkstofftransport demonstriert. Diese neuartige Plattform für eine pH-abhängige Freisetzung und gezielte Aufnahme von unterschiedlichen Substanzen konnte *in vitro* erfolgreich gezeigt werden. Das Potential dieser Strategie könnte im nächsten Schritt durch *in vivo* Untersuchung mit therapeutisch relevanten Wirkstoffen wie Chemotherapeutika untersucht werden.

8. EXPERIMENTELLER TEIL

8.1.1 Material und Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden Aluminium-Fertigplatten mit Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* verwendet. Die Substanzen wurden unter UV-Licht (254 bzw. 366 nm) oder durch Anfärben mit Ninhydrin- (1.5 g Ninhydrin in 100 mL *n*-Butanol und 1 mL Eisessig), Anisaldehyd- (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL H₂SO₄) oder Cermolybdat-Tauchreagenz („Yellow-Spray“, 120 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·24H₂O, 5 g (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ in 800 mL 10 % H₂SO₄) mit anschließender Wärmebehandlung sichtbar gemacht.

¹H-Kernresonanzspektroskopie (¹H-NMR): ¹H-200 MHz-Kernresonanzspektren wurden bei Raumtemperatur auf einem *Varian Mercury 200VX* Gerät aufgenommen. Kernresonanzspektren höherer Messfrequenzen wurden von der Kernresonanzabteilung des Departments Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität an *Varian 300, Inova 400, Varian 600* aufgenommen. In Klammern sind die jeweiligen Messfrequenzen in MHz sowie das Lösungsmittel angegeben. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm (parts per million) relativ zu Tetramethylsilan (TMS) angegeben, wobei das Lösungsmittelsignal von CHCl₃ (δ =7.26) in CDCl₃ als interne Referenz dient. Die Signalmultiplizitäten werden als *s* (Singulett), *d* (Duplett), *t* (Triplet), *q* (Quartett) und *m* (Multiplett) sowie ggf. deren Kombinationen gekennzeichnet. Breiten Signalen wurde das Symbol *br.* vorangestellt. Die Signalzuordnung wurde unter Zuhilfenahme von COSY-, HMBC- und HSQC-Spektren durchgeführt.

¹³C-Kernresonanzspektroskopie (¹³C-NMR): ¹³C-Kernresonanzspektren wurden von der Kernresonanzabteilung des Departments Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität an *Varian 300, Inova 400, Varian 600* aufgenommen. In Klammern sind die jeweiligen Messfrequenzen in MHz sowie das Lösungsmittel angegeben. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm (parts per million) relativ zu Tetramethylsilan (TMS) angegeben, wobei das Lösungsmittelsignal von CHCl₃ (δ =77.16) in CDCl₃ als interne Referenz dient. Die genaue Zuordnung erfolgte mittels HMBC- und HSQC-Spektren.

Massenspektrometrie (MS): Massenspektren wurden von der Abteilung Massenspektrometrie des Departments Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München an *Thermo Finnigan LTQ FT* (Elektronensprayionisation, ESI) Geräten aufgenommen. MALDI-Massenspektrometrie zur Bestimmung der Masse von Oligonukleotiden wurde auf einem *Bruker 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 (900 µL einer gesättigten HPA-Lösung und 100 µL einer Diammoniumhydrogencitrat-Lösung (100 g/L) in MeCN/H₂O 1:1).

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

HPL-Chromatographie (HPLC): HPL-Chromatographien wurde 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 Triethylammoniumacetat in H₂O und Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat in 20 % Wasser und 80 % Acetonitril verwendet.

Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden: bei 260 nm wurden aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleoside (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. Für die alkinmodifizierten Nukleoside wurde der Koeffizient von T angenommen, der bei 260 nm nur geringfügig vom tatsächlichen Extinktionskoeffizienten abwich.

Oligonukleotidkonzentrationen: Die Konzentration von wässrigen Oligonukleotidlösungen wurden an einem *ND-1000* Spektrophotometer der Firma *NanoDrop Technologies* gemessen. Dabei wurde von folgender Korrelation ausgegangen:

$$\text{ssDNA: } 1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ ng/}\mu\text{L}$$

$$\text{RNA: } 1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ ng/}\mu\text{L}$$

Wässrige Lösungen von Oligonukleotiden wurden an einer *Savant Speedvac+SC 110A* oder *SPD 111V* oder einer *Christ RVC 2-25* oder *2-33* eingeengt. Sollte das Lösungsmittel vollständig entfernt werden, wurde ein *Christ-Alpha 2-4* Lyophilisator verwendet.

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 (stark), m (medium), w (schwach) unterteilt.

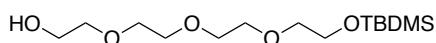
Schmelztemperaturen der neu hergestellten Substanzen wurden auf einer *Büchi B-540*-Schmelzpunktapparatur gemessen.

Lösungsmittel und Chemikalien: Bei den in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmitteln handelt es sich um trockene Lösungsmittel der Firma *Fluka* mit einem Wassergehalt kleiner als 50 ppm oder um Lösungsmittel von *Arcos*, *Aldrich*, *Fluka* oder *Merck* von technischer Qualität, die vor Gebrauch durch Destillation *in vacuo* gereinigt wurden. 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. Wässrige Proben wurden in Stickstoff eingefroren und lyophilisiert (*Christ ALPHA 2-4*).

8.2 SYNTHESEVORSCHRIFTEN

8.2.1 Synthese eines Glucose-Triazids

2,2,3,3-Tetramethyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-ol (18)



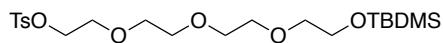
In einem 500 mL Rundkolben wurde Tetraethylenglykol (20.00 g, 103.0 mmol, 1.0 Äquiv.) in 160 mL trockenem DCM vorgelegt. Nach der Zugabe von Hünig-Base (19.26 mL, 113.3 mmol, 1.1 Äquiv.) und DMAP (1.26 g, 10.30 mmol, 0.1 Äquiv.) wurde auf 0°C abgekühlt und TBDMSCl (17.07 g, 113.3 mmol, 1.1 Äquiv.) in 100 mL trockenem DCM über einen Zeitraum von 1 h hinzugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde für 18 h gerührt. Die Reaktion wurde mit ges. NaHC₃O-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-Chromatographie (Silica, iHex:EtOAc 2:1 → 1:1) gereinigt, wobei 2,2,3,3-Tetramethyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-ol farbloses Öl erhalten wurde (11.47 g, 37.18 mmol, 36 %).

¹H-NMR (600 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.04 (*s*, 5H, 2x -Si-CH₃), 0.87 (*s*, 9H, 3x Si-C-CH₃), 2.63 (*t*, 1H, ³J = 5.7 Hz), 3.64 (*m*, 18H).

MS: [M + H]⁺: ber.: 309.2092; gef.: 309.2094.

IR (ATR, [cm⁻¹]: 3445 (*br w*), 2951 (*m*), 2928 (*m*), 2857 (*m*), 1471 (*m*), 1463 (*m*), 1388(*w*), 1251 (*m*), 1089 (*br s*), 938 (*m*), 825 (*vs*), 775 (*s*), 717 (*m*), 661 (*m*).

2,2,3,3-Tetramethyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-yl-4-methylbenzensulfonat (16)



2,2,3,3-Tetramethyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-ol (11.47 g, 37.18 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 35 mL trockenem MeCN gelöst und Triethylamin (10.37 mL, 74.36 mmol, 2.0 Äquiv.) zugegeben. Nach Abkühlen auf 0°C wurde TsCl (10.63 g, 55.77 mmol, 1.5 Äquiv.) in 35 mL trockenem MeCN über einen Zeitraum von 30 min zu der farblosen Lösung getropft. Die orange Reaktion wurde mit Wasser verdünnt und nach Rückextraktion mit EtOAc wurden die vereinigten org. Phasen über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (Silica, iHex:EtOAc 3:1) gereinigt, wobei 2,2,3,3-Tetramethyl-

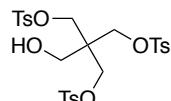
4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-yl-4-methylbenzensulfonat als farbloses Öl erhalten wurde (14.33 g, 31.01 mmol, 83 %).

¹H-NMR (600 Hz, CDCl₃, 25°C): δ [ppm] = 0.00 (s, 6H, -Si-CH₃), 0.83 (s, 9H, Si-C-CH₃), 2.39 (s, 3H, C_{arom.} -CH₃), 3.49 (m, 2H, -CH₂-CH₂-O-Si), 3.54 (m, 8H, 2x O-CH₂-CH₂-O), 3.63 (m, 2H, S-O-CH₂-CH₂-O), 3.70 (m, 2H, -CH₂-O-Si), 4.10 (m, 2H, S-O-CH₂-), 7.28 (d, ³J = 0.5 Hz 2H, CH_{arom}), 7.74 (d, ³J = 0.4 Hz 2H, CH_{arom}).

MS: [M + NH₄]⁺: ber.: 480.2446; gef.: 480.2448.

IR (ATR, [cm⁻¹]): 2952 (m), 2928 (m), 2857 (m), 1597 (w), 1471 (w), 1462 (w), 1357 (s), 1251 (m) 1189 (s), 1176 (vs), 1096 (vs), 1018 (m), 920 (s), 831 (vs), 774 (vs).

2-(Hydroxymethyl)-2-[(tosyloxy)methyl]propan-1,3-diyl bis(4-methylbenzenesulfonat)] (14)^[78]



Zu einer Lösung von Pentaerythritol (10.0 g, 73.5 mmol, 1 Äquiv.) in trockenem Pyridin (60 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre bei 0 °C eine Lösung von Tosylchlorid (42.0 g, 22.0 mmol, 3 Äquiv.) in trockenem Pyridin (80 mL) über einen Zeitraum von 1 h zugetropft. Die Reaktion wurde anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nach 15h wurde erneut Tosylchlorid (7.00 g, 3.67 mmol, 0.5 Äquiv.) in trockenem Pyridin (15 mL) zugetropft und für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde *in vacuo* eingeengt, und mit DCM (20 mL) verdünnt. Die org. Phase wurde mit Wasser und die vereinigten org. Phasen zweimal mit HCl (2 M) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ und Reinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (Silica, *i*-Hex/EtOAc, 5:1 → 1:1) wurde **14** als weißer kristalliner Feststoff (21.4 g, 35.7 mmol, 48 %) erhalten.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.75 – 7.67 (m, 6H, CH_{arom}), 7.35 (dd, ³J = 0.6 Hz, 8.6 Hz, 6H, CH_{arom}), 3.91 (s, 6H, 3xCH₂), 3.81 (s, 1H, OH), 3.51 (s, 2H, CH₂), 2.46 (s, 9H, 3xCH₂).

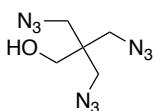
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 21.64, 44.71, 59.35, 66.63, 128.08, 130.21, 131.92, 145.61.

MS: [M + NH₄]⁺: ber.: 616.1339; gef.: 616.1340.

FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3542 (br, m), 2980 (w), 1598 (m), 1358 (s), 1192 (s), 1174 (s), 1096 (m), 1064 (m), 1020 (m), 990 (s), 968 (s), 864 (s), 848 (s).

Schmelzpunkt: 102-105 °C

3-Azido-2,2-bis(azidomethyl)propan-1-ol (12)



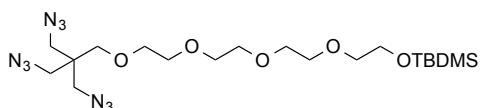
Pentaerythritoltritosylat (10.0 g, 16.70 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in einem 100 mL Rundkolben in 30 mL trockenem DMF gelöst und NaN₃ (6.51 g, 100.22 mmol, 6.0 Äquiv.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde 18 h bei 110°C unter Rückfluss gerührt. Der Ansatz wurde *in vacuo* eingeengt und in Wasser (30 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie (Silica, iHex:EtOAc 10:1) aufgereinigt. 3-Azido-2,2-bis(azidomethyl)propan-1-ol wurde als farbloses Öl erhalten (2.84 g, 13.46 mmol, 80.57%).

¹H-NMR (600 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.38 (s, 6H, 3x -CH₂-N₃), 3.55 (d, ³J = 0.5 Hz 2H, -CH₂-OH).

MS: [M+FA-H]⁻: ber.: 256.0912; gef.: 256.0916.

IR (ATR, [cm⁻¹]): 3383 (w), 2937 (w), 2874 (w), 2140 (vs), 1660 (vw), 1448 (m), 1356 (w), 1283 (s), 1123 (m), 1042 (s), 961 (m), 888 (m).

19-Azido-18,18-bis(azidomethyl)-2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10,13,16-pentaoxa-3-silanonadecan



3-Azido-2,2-bis(azidomethyl)propan-1-ol (1.50 g, 7.10 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden in 10 mL trockenem DMF gelöst. Nach der Zugabe von NaH (0.852 g, 21.30 mmol, 3.0 Äquiv.) und 15-Krone-5 (28.40 µL, 0.14 mmol) wurde für 5 min bei RT gerührt. Nach Abkühlung auf 0°C wurde unter Eiskühlung 2,2,3,3-Tetramethyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-yl-4-methylbenzensulfonat (6.57 g, 14.20 mmol, 2.0 Äquiv.) zugetropft. Die Reaktion wurde nach 18 h mit 10 mL Wasser quenched und mit 10 mL ges. NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie (Silica, iHex:EtOAc 6:1 → 5:1) gereinigt. 19-Azido-18,18-bis(azidomethyl)-2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10,13,16-pentaoxa-3-silanonadecan wurde als farbloses Öl erhalten (0.459 g, 0.9287 mmol, 35 %).

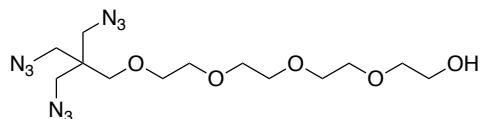
¹H-NMR (600 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.76 (*t*, 2H, ³J = 5.5 Hz, CH₃), 3.64 (*m*, 9H), 3.61 (*m*, 1H), 3.56 (*t*, 2H, ³J = 0.4 Hz, CH₂), 3.34 (*d*, ³J = 0.5 Hz, 7H), 0.89 (*s*, 9H, 3x C_{TBDMS}H₃), 0.06 (*s*, 6H, 2x C_{TBDMS}H₃).

¹³C-NMR (151 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 72.72 (-CH₂O-CH₂-CH₂), 70.69 (CH₂), 69.51 (CH₂), 62.69 (CH₂), 51.45 (CH₂), 44.72 (3x CH₂), 5.92(C_{TBDMS}H₃), -5.27 (2x C_{TBDMS}H₃).

MS: [M + NH₄]⁺: ber.: 519.3181; gef.: 519.3188.

IR (ATR, [cm⁻¹]): 2928 (*m*), 2858 (*m*), 2140 (*vs*), 1471 (*m*), 1449 (*m*), 1360 (*m*), 1350 (*m*), 1292 (*m*), 1251 (*m*), 1100 (*s*), 1006 (*m*), 939 (*m*), 832 (*s*), 776 (*s*), 718 (*w*), 661 (*m*).

15-Azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-1-ol (17)



19-Azido-18,18-bis(azidomethyl)-2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10,13,16-pentaoxa-3-silanonadecan (0.466 g, 0.929 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in einem 50 mL Falcon-Tube in 8.7 mL trockenem THF gelöst und TBAF (4.65 mL einer 1 M TBAF/THF-Lösung, 4.65 mmol, 5.0 Äquiv.) zugegeben. Nach 16 h wurde die Reaktion mit einer ges. NH₄Cl-Lösung gestoppt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie (Silica, DCM:MeOH 50:1) gereinigt, wodurch 15-Azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-1-ol als farbloses Öl erhalten wurde (0.3382 g, 0.8730 mmol, 94 %).

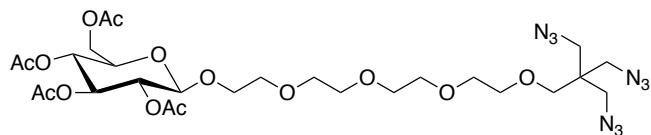
¹H-NMR (600 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.66-3.46 (*m*, 14H, C_{Ethylenglycol}H₂), 3.31-3.27 (*m*, 8H, -C_{Pentaerythritol}H₂), 2.51 (*br s*, 1H, -OH), 1.73-1.69 (*m*, 2H, O-CH₂-C_q).

¹³C-NMR (101 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 72.51 (CH₂), 70.80 (CH₂), 70.64 (CH₂), 70.62 (CH₂), 70.57 (CH₂), 70.35 (CH₂), 69.57 (CH₂-N₃), 62.20 (CH₂), 61.76 (CH₂), 51.59 (CH₂-N₃), 51.55 (CH₂-N₃), 44.72 (CH₂-OH), 44.59 (C_q).

MS: [M + NH₄]⁺: ber.: 405.2312; gef.: 405.2317.

IR (ATR, [cm⁻¹]): 3437 (*w*, OH), 2868 (*m*), 2097 (*vs*), 1754 (*vw*), 1754 (*vw*), 1646 (*vw*), 1451(*w*), 1347 (*m*), 1284 (*m*), 1249 (*m*), 1102 (*vs*), 1065 (*vs*), 934 (*m*), 885 (*m*), 832 (*m*).

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(Acetoxymethyl)-6-(14-azido-13,13-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyloxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyltriacetat



In einem ausgeheizten 25mL Schlenkkolben wurde unter N_2 α -Glucose-Pentaacetat (0,511 g, 1.309 mmol, 1.5 Äquiv.) in 4.37 mL trockenem DCM gelöst. Eine Lösung von 15-Azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapenta-decan-1-ol (0.338 g, 0.873 mmol, 1.0 Äquiv.) in 4.37 mL trockenem DCM zugetropft. Nach Abkühlen auf 0°C wurde $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (0.860 mL, 6.981 mmol, 5.3 Äquiv.) zugetropft. Nach 18 h wurden erneut $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (0.324 mL, 1.746 mmol, 2.0 Äquiv.) zugegeben. Nach 36 h wurde die Reaktion mit Wasser gequenched und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-Chromatographie (Silica, DCM:MeOH 100:1) aufgereinigt, wodurch (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(Acetoxymethyl)-6-(14-azido-13,13-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyloxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyltriacetat als farbloses Öl erhalten wurde (0.3251 g, 0.4530 mmol, 52%).

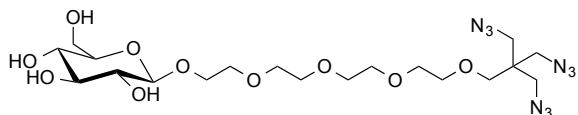
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.36 (*d*, $^3J = 3.7$ Hz, 1H, C1' GlucoseH), 5.50 (*t*, $^3J = 9.9$ Hz, 1H, C3' GlucoseH), 5.20 – 5.11 (*m*, 2H, C2' GlucoseH und C4' GlucoseH), 4.78 (*m*, 1H, C5' GlucoseH), 4.32 – 4.25 (*m*, 2H, C6' GlucoseH), 4.17 – 4.10 (*m*, 2H, C_{Pentaerytritol}H₂), 3.74 – 3.65 (*m*, 4H, 4x C_{Tetraethylenglycol}H₂), 3.41 – 3.33 (*m*, 12H, 6x C_{Tetraethylenglycol}H₂), 2.21 (*s*, 3H, C_{Acetyl}H₃), 2.12 – 2.03 (*m*, 9H, 3x C_{Acetyl}H₃), 1.59 (*s*, 6H, 3x C_{Pentaerytritol}H₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 Hz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.3 (CH₃, Ac), 170.8 (CH₃, Ac), 170.4 (CH₃, Ac), 169.8 (CH₃, Ac), 98.9 (CH, C1'), 73.5 (CH, C3'), 72.51 (CH₂), 71.1 (CH, C5'), 70.8 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.4 (CH₂), 69.6 (CH₂-N₃), 69.1 (CH, C2'), 68.5 (CH, C4'), 68.1 (CH₂), 62.3 (CH₂, C6'), 62.2 (CH₂), 61.8 (CH₂), 51.6 (CH₂-N₃), 51.6 (CH₂-N₃), 44.7 (CH₂-OH), 44.6 (C_q), 21.1 (C_q, Ac), 20.9 (C_q, Ac), 20.8 (C_q, Ac), 20.8 (C_q, Ac).

MS: $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$: ber.: 735.3267; gef.: 735.3293.

IR (ATR, [cm⁻¹]): 2966 (*w*), 2104 (*w*), 1738 (*s*), 1429 (*w*), 1374 (*m*), 1362 (*m*), 1230 (*vs*, Carbonyl-Einheit), 1167 (*m*), 1149 (*m*), 1136 (*m*), 1070 (*m*), 1035 (*s*), 982 (*m*), 937 (*m*), 908 (*m*), 887 (*m*), 845 (*w*), 746 (*w*), 684 (*w*).

(2R,3R,4S,5S,6R)-2-(14-Azido-13,13- bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyloxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (1)



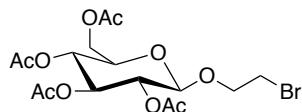
(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(Acetoxyethyl)-6-(14-azido-13,13-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyloxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyltriacetate (0.325 g, 0.452 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde vorgelegt und 9.7 mL einer 1 M NaOMe-Lösung in MeOH hinzugegeben. Nach 16 h wurde die Reaktion mit 2 M HCl auf pH 7 gebracht und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-Chromatographie (Silica, DCM:MeOH 10:1 → 5:1) aufgereinigt, wodurch (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((15-Azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)oxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol als weißes Öl erhalten wurde (22.59 mg, 0.411 mmol, 91 %).

¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ [ppm] = 5.41 (*d*, ³*J* = 2.1 Hz, 1H, C1'GlucoseH), 4.87 (*br s*, 1H, -OH), 4.77 (*br s*, 1H, -OH), 4.71 (*br s*, 1H, -OH), 3.93 - 3.89 (*m*, 3H, C2'GlucoseH, -OH), 3.78 (*s*, 2H, C_{Pentaerytritol}H₂), 3.71-3.69 (*m*, 1H, C3'GlucoseH), 3.62-3.59 (*m*, 2H, C4'GlucoseH, C5'GlucoseH), 3.57-3.51 (*m*, 18H, 8x C_{Tetraethylenglycol}H₂, C6'GlucoseH₂), 1.38 (*s*, 6H, 3x C_{Pentaerytritol}H₂).

¹³C-NMR (100 Hz, DMSO): δ [ppm] = 112.0 (CH, C1'), 81.5 (CH, C5'), 78.1 (CH, C3'), 73.9 (CH, C2'), 72.51 (CH₂), 71.4 (CH, C4'), 70.8 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.4 (CH₂), 69.6 (CH₂-N₃), 68.1 (CH₂), 62.3 (CH₂, C6'), 62.2 (CH₂), 61.8 (CH₂), 51.6 (CH₂-N₃), 51.6 (CH₂-N₃), 44.7 (CH₂), 44.6 (C_q).

MS: [M + NH₄]⁺: ber.: 567.2845 gef.: 567.2849.

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(Acetoxyethyl)-6-(2-bromoethoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetat^[183]



Unter Stickstoffatmosphäre wurden 3.27 g 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- α -D-glucopyranose (8.4 mmol) und 0.71 mL 2-Bromethanol (1.25 g, 10.0 mmol, 1.2 Äquiv.) in 20 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst. Zu der Lösung wurden 5.30 mL BF₃·OEt₂ (5.96 g, 42.0 mmol, 5 Äquiv.) bei 0 °C zugetropft. Die Reaktion wurde für 36 h bei RT gerührt und anschließend durch Zugabe von 30 mL Eiswasser beendet. Die Reaktionslösung wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert (3 × 40 mL), die vereinigten organischen

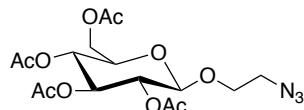
Phasen wurden mit Wasser (40 mL), ges. NaHCO₃-Lösung (40 mL) und ein weiteres Mal mit Wasser (40 mL) gewaschen und anschließend über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂:MeOH = 50/1) und 1.42 g (3.12 mmol, 37 %) der Zielverbindung isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.19 (*m*, 1H, C1'_{GlucoseH}), 5.08 (*m*, 1H, C3'_{GlucoseH}), 5.00 (*m*, 1H, C2'_{GlucoseH}), 4.55 (*d*, ³J = 7.9 Hz, 1H, C4'_{GlucoseH}), 4.21 (*m*, 1H, C6'_{GlucoseH}), 4.14 (*m*, 1H, C6'_{GlucoseH}), 4.10 (*m*, 1H, OCH₂CH₂Br), 3.79 (*m*, 1H, OCH₂CH₂Br), 3.68 (*m*, 1H, C5'_{GlucoseH}), 3.43 (*m*, 2H, OCH₂CH₂Br), 2.04 (*s*, 3H, Ac), 2.00 (*s*, 3H, C_{Acetyl}H₃), 1.99 (*s*, 3H, C_{Acetyl}H₃), 1.98 (*s*, 3H, C_{Acetyl}H₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.3 (CH₃, Ac), 170.8 (CH₃, Ac), 170.4 (CH₃, Ac), 169.8 (CH₃, Ac), 98.9 (C1'), 73.5 (C3'), 71.1 (C5'), 69.1 (C2'), 68.5 (C4'), 68.1 (OCH₂CH₂N₃), 62.2 (C6'), 30.3 (OCH₂CH₂Br), 21.1 (-COO-), 20.9 (-COO-), 20.8 (-COO-), 20.8 (-COO-).

MS: [M + Na]⁺: ber.: 477.0367; gef.: 477.0366.

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(Acetoxymethyl)-6-(2-azidoethoxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetat



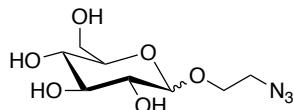
2-Bromethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranose (1.60 g, 3.51 mmol), 116 mg TBAB (0.36 mmol) und 710 mg Natriumazid (10.9 mmol) wurden in 10 mL DMF gelöst. Die resultierende Lösung wurde für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit 40 mL Wasser hydrolysiert und mit Ethylacetat (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Brine (100 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Silica, CH₂Cl₂:MeOH 80:1) wurden 1.36 g (3.26 mmol, 93 %) eines farblosen Harzes erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.19 – 5.16 (*m*, 1H, C1'_{GlucoseH}), 5.08 (*m*, 1H, C3'_{GlucoseH}), 4.99 (*m*, 1H, C2'_{GlucoseH}), 4.57 (*d*, ³J = 7.9 Hz, 1H, C4'_{GlucoseH}), 4.23 (*m*, 1H, C6'_{GlucoseH}), 4.13 (*m*, 1H, C6'_{GlucoseH}), 4.00 (*m*, 1H, OCH₂CH₂N₃), 3.67 (*m*, 1H, C5'_{GlucoseH}), 3.46 (*m*, 1H, OCH₂CH₂N₃), 3.26 (*m*, 2H, OCH₂CH₂N₃), 2.06 (*s*, 3H, C_{Acetyl}H₃), 2.02 (*s*, 3H, C_{Acetyl}H₃), 2.01 (*s*, 3H, C_{Acetyl}H₃), 1.97 (*s*, 3H, C_{Acetyl}H₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.8 (CH₃, Ac), 170.4 (CH₃, Ac), 169.8 (CH₃, Ac), 169.6 (CH₃, Ac), 100.8 (C1'), 73.0 (C3'), 72.1 (C5'), 70.0 (C2'), 68.7 (C4'), 68.5 (OCH₂CH₂N₃), 61.7 (C6'), 50.7 (CH₂CH₂N₃), 20.9 (-COO-), 20.9 (-COO-), 20.8 (-COO-), 20.8 (-COO-).

MS: [M + Na]⁺ ber.: 440.1276; gef.: 440.1273.

(3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-(2-Azidoethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (4)



2-Azidoethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranose (0.35 g, 0.84 mmol) wurde in 5 mL Methanol gelöst und eine 1.0 M Lösung von NaOMe in MeOH (0.8 mL, 0.40 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 14 h gerührt und durch Zugabe von Dowex HCR-W2 neutralisiert. Die feste Säure wurde abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeengt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Silica, CH₂Cl₂:MeOH = 5:1) und die Zielverbindung als klares Harz isoliert (194 mg, 0.78 mmol, 93 %).

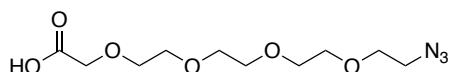
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 4.29 (*d*, 1H, ³J = 7.8 Hz, C1'_{GlucoseH}), 4.02 – 3.98 (*m*, 1H, OCH₂CH₂N₃), 3.85 (*dd*, 1H, ³J = 11.9 Hz, 1.8 Hz, C6'_{GlucoseH}), 3.75 – 3.70 (*m*, 1H, OCH₂CH₂N₃), 3.65 (*dd*, ³J = 11.9 Hz, 5.7 Hz, 1H, C6'_{GlucoseH}), 3.45 (*t*, ³J = 5.2 Hz, 2H, OCH₂CH₂N₃), 3.35 – 3.32 (*m*, 1H, C3'_{GlucoseH}), 3.31 – 3.27 (*m*, 1H, C5'_{GlucoseH}), 3.26 – 3.25 (*m*, 1H, C4'_{GlucoseH}), 3.18 (*dd*, ³J = 9.1 Hz, 7.8 Hz, 1H, C2'_{GlucoseH}).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 103.1 (C1'), 76.7 (C3'), 76.6 (C5'), 73.6 (C2'), 70.2 (C4'), 67.9 (OCH₂CH₂N₃), 61.4 (C6'), 50.6 (OCH₂CH₂N₃).

MS: [M + H]⁺: ber. : 248.0888; gef.: 248.0896.

8.2.2 Synthese eines Anandamid-Tetrazins

14-Azido-3,6,9,12-tetraoxytetradecansäure^[224] (25)



In einem einem 25 mL Rundkolben wurde Tetraethylenglycolmonoazid (**24**) (2.00 g, 9.12 mmol, 1 Äquiv.) vorgelegt und in 3 mL DCM gelöst. Nachdem die Lösung auf 0 °C abgekühlt worden war wurde unter Kühlung zuerst eine Lösung von 4.38 g NaOH (109.46 mmol, 12 Äquiv.) in 3.0 mL ddH₂O und anschließend *N*-tetrabutylammoniumbromid (0.74 g, 2.28 mmol, 0.25 Äquiv.) als Phasentransferkatalysator zugegeben. Nach 30 min wurde bei 0 °C langsam die Bromessigsäure zugetropft und die Reaktion über Nacht bei RT weitergerührt.

Da sich nach 12 h kein Edukt im DC mehr zeigte wurde durch Zugabe von 20 mL H₂O verdünnt und die wässrige Phase wurde drei Mal mit DCM (je 20 mL) und zwei Mal mit EtOAc (je 20 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde durch Zugabe von konz. HCl auf pH 2 eingestellt und anschließend erneut dreimal mit DCM (je 20 mL) und zweimal mit EtOAc (je 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen des zweiten Extraktionsschritts wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Reinigung mittels Flashchromatographie (Silica, DCM/MeOH, 10:1, 1 % AcOH) wurde die Säure als farbloses Öl erhalten (1.76 g, 6.35 mmol, 70 %).

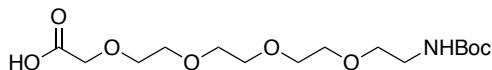
¹H-NMR (600 MHz, DMSO): δ [ppm] = 12.87 (*br s*, 1H, -COOH), 4.35 (*s*, 2H, HOCOCH₂CO), 3.77 – 3.58 (*m*, 14H, 7x C_{Tetraethylenglycol}H_{2s}), 3.43 – 3.34 (*m*, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz,): δ [ppm] = 172.98 (COOH), 72.6 (CH₂), 70.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.5 (CH₂), 70.2 (CH₂), 69.9 (CH₂), 67.4 (CH₂), 50.8 (CH₂).

MS: [M – H]⁻ ber.: 276.1201 gef.: 276.1230.

FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3342 (*br, w*), 2976 (*w*), 1706 (*m*), 1609 (*m*), 1513 (*m*), 1380 (*vs*), 1249 (*m*), 1167 (*s*), 1143 (*m*), 1048 (*m*), 822 (*w*).

2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5-Azanonadecan-19-Carbonsäure (23)



In einem ausgeheizten 10 mL Schlenkrohr wurde die 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxytetradecansäure (**25**) (100 mg, 0.36 mmol, 1 Äquiv.) vorgelegt und 1.8 mL trockenes MeOH zugegeben. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und im N₂-Gegenstrom Pd/C (20 mg) zugegeben.

Nach 5 min wurde Di-*tert*-butyldicarbonat (BocO₂) (208 µL, 212. mg, 0.97 mmol, 2.7 Äquiv.) zugetropft und 20 min bei 0 °C gerührt und die Reaktion anschließend unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Atmosphärendruck 12 h gerührt. Nachdem mittels DC kein Edukt mehr nachgewiesen werden konnte wurde die Reaktion filtriert und *in vacuo* eingeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Säulenchromatographie (Silica, EtOAc/DCM/MeOH, 40:40:1, 1 % AcOH). Das Bocgeschützte Amin wurde daraufhin als farbloses Öl erhalten (0.11 g, 0.30 mmol, 84 %).

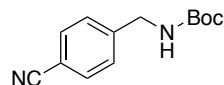
¹H-NMR (600 MHz, DMSO): δ [ppm] = 12.83 (br s, 1H, -OH), 6.76 (br s, 1H, -NH), 4.31 (s, 2H, HOOCCH₂CO), 3.67 (t, J = 4.8 Hz, 2H, CH₂), 3.56 – 3.47 (m, 12H, 6x C_{Tetraethylenglycol}H₂), 3.29 (dd, ³J = 5.2, 10.4, 2H, CH₂), 1.43 (s, 9H, 3xCH_{Boc}H₃).

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.9 (C=OOH), 155.9 (NH-C=O), 79.48 (C_q), 70.78 (CH₂), 70.63 (CH₂), 70.58 (CH₂), 70.54 (CH₂), 70.31 (CH₂), 70.22 (CH₂), 69.81 (CH₂), 67.43 (CH₂), 40.35(CH₂), 28.41 (3xCH₃).

MS: [M – H]⁺ ber.: 350.1820 gef.: 374.1758.

FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3532 (br, w), 3133 (m), 2876 (w), 1725 (m), 1309 (m), 1513 (m), 1249 (m), 1167 (s), 1143 (m), 1048 (m), 822 (w).

tert-Butyl-(4-cyanobenzyl)carbamat^[218] (22)



Es wurde 4-(Aminomethyl)benzonitrilhydrochlorid (**20**) (5.00 g, 29.7 mmol, 1 Äquiv.) in einem ausgeheizten Schlenkkolben vorgelegt, in 60 mL trockenem Dichlormethan gelöst und Triethylamin (10.5 mL, 74.1 mmol, 2.5 Äquiv.) hinzugegeben. Der Ansatz wurde auf 0 °C abgekühlt und Di-*tert*-butyldicarbonat (6.95 mL, 32.6 mmol, 1.1 Äquiv.) zugetropft. Nach 1 h wurde die weiße Suspension auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nachdem vollständiger Umsatz zu beobachten war, erfolgte die Reinigung mittels Flashchromatographie (Silica, DCM/iHex/MeOH, 100:50:1). Das Bocgeschützte Amin wurde als weißer Feststoff erhalten (6.41 g, 27.6 mmol, 93 %).

R_f = 0.74 (DCM/EtOAc, 20:1).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.60 (*d*, ³J = 8.3 Hz, 2H, 2x C_{arom}H), 7.36 (*d*, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2x C_{arom}H), 4.95 (*bs*, 1H, C_{arom}-CH₂-NH), 4.35 (*d*, ³J = 4.5 Hz, 2H, C_{arom}-CH₂-NH), 1.44 (*s*, 9H, CH₃-*t*Bu).^[225]

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 156.05 (O=C-O-*t*Bu), 144.83 (C_{arom}H), 132.62 (2x C_{arom}H), 128.00 (2x C_{arom}H), 118.97 (CN), 111.35 (C_{arom}), 80.29 (C_q), 44.43 (C_{arom}-CH₂-NH), 28.57 (CH₃-*t*Bu).^[225]

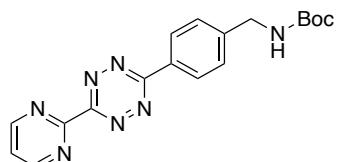
MS: [M + Na]⁺ ber.: 255.1104 gef.: 255.1183.

FT-IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 3511 (*m*), 3233 (*m*), 1634 (*m*), 1491 (*m*), 1429 (*m*), 1394 (*m*), 1246 (*m*), 1114 (*s*), 1072 (*s*), 1036 (*m*), 897 (*m*), 832 (*m*), 747 (*m*).

Schmelzbereich: 97.3 – 98.3 °C.

tert-Butyl (4-(6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)carbamat (21)

tert-Butyl (4-(6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)carbamat (21) wurde analog zu der von Willems et al. beschriebenen Methode hergestellt.^[218]



In einen ausgeheizten Rundkolben wurde 2-Pyrimidincarbonitril (2.99 g, 28.4 mmol, 2 Äquiv.) und *tert*-Butyl-4-cyanobenzylcarbamat (22) (3.30 g, 14.2 mmol, 1 Äquiv.) vorgelegt. Nach Suspendieren in 10 mL Ethanol wurde der Ansatz mit Hydrazinhydrat (11.0 mL, 227 mmol, 16 Äquiv.) versetzt und auf 90 °C erhitzt. Nach 47 h wurde die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt, unter Stickstoffatmosphäre mit 40 mL Essigsäure verdünnt und auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 25 mL einer 6 M NaNO₂-Lösung in Wasser (9.80 g, 142 mmol, 10 Äquiv.), die ebenfalls auf 0 °C abgekühlt wurde, langsam zugegeben, wobei ein Farbwechsel von orange nach violett zu beobachten war. Die Reaktionslösung rührte bei Raumtemperatur 1 h, bevor die Reaktion durch Verdünnen mit ddH₂O abgebrochen wurde. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Ethylacetat (je 50 mL) und zwei Mal mit Dichlormethan (je 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer ges. NaCl-Lösung (zwei Mal, je 50 mL) vorgetrocknet. Aufgrund der schlechten Phasentrennung wurde die wässrige Phase nochmals mit Dichlormethan (zwei Mal, je 20 mL) verdünnt und extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Flashchromatographie (Silica, DCM/MeOH, 100:1), wobei die zwei durch

Homokupplung entstandenen Tetrazine erfolgreich abgetrennt werden konnten. Zur weiteren Reinigung wurde das erhaltene Produkt schließlich in Methanol umkristallisiert, um das gewünschte Tetrazin **21** sehr rein als violetten Feststoff zu erhalten (162 mg, 0.610 mmol, 8 %). Zur Steigerung der Ausbeute wurde die Mutterlauge eingeengt und erneut zur Kristallisation gebracht.

R_f = 0.47 (DCM/EtOAc/MeOH, 10:10:1).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.11 (d, ³J = 4.8 Hz, 2H, 2x N_{arom}-C_{arom}**H**), 8.68 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, 2x C_{arom}**H**), 7.56 (t, ³J = 4.8 Hz, 1H, C_{arom}**H**), 7.52 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, 2x C_{arom}**H**), 5.00 (bs, 1H, Ar-CH₂-NH), 4.44 (s, 2H, Ar-CH₂-NH), 1.46 (s, 9H, 3x C_{Boc}**H**₃).

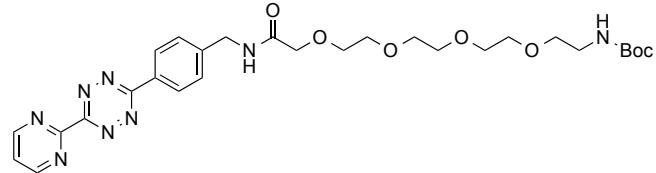
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 164.56 (O=C-O-*t*Bu), 163.29 (2x C_q), 159.81 (C_q), 158.60 (2x C_{arom}H), 130.50 (C_{arom}H), 129.34 (2x C_{arom}H), 128.37 (2x C_{arom}H), 122.66 (C_{arom}H), 44.64 (Ar-CH₂-NH), 28.61 (CH₃-*t*Bu).

MS: [M + NH₄]⁺ ber.: 383.1938 gef.: 384.9348.

FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3342 (br, w), 2976 (w), 1706 (m), 1609 (m), 1513 (m), 1380 (vs), 1249 (m), 1167 (s), 1143 (m), 1048 (m), 822 (w).

Schmelzbereich: 177 – 180 °C.

tert-Butyl (3-oxo-1-(4-(6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)carbamat (26)



tert-Butyl (4-(6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)carbamat (**21**) (162 mg, 0.160 mmol) wurde in 6.4 mL DCM gelöst und auf 0°C abgekühlt, woraufhin Trifluoressigsäure (1.6 mL) zugegeben wurde. Nachdem sich in vorangegangenen Reaktionen gezeigt hatte, dass sich das entschützte Tetrazin während der Aufreinigung zersetzt, wurde nach 45 min das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der violett-rote Rückstand ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5-azanonadecan-19-Carbonsäure (**23**) (228 mg, 0.649 mmol, 2.5 Äquiv.) wurde in 3.77 mL trockenem DMF gelöst und HATU (119 mg, 0.312 mmol, 1.2 Äquiv.), HOEt (102 mg, 0.780 mmol, 3 Äquiv.) und schließlich DIPEA (0.192 mL, 0.780 mmol, 3 Äquiv.) zugegeben. Nach 10 min wurde das entschützte Tetrazinamin (0.068 mg, 0.260 mmol, 1 Äquiv.) zu der Reaktionslösung gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit DCM verdünnt und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen

wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der verbleibende Rückstand mittels Flash-Chromatographie (Silica, DCM/EtOAc/MeOH, 5:5:1) gereinigt, wodurch *tert*-Butyl (3-oxo-1-(4-(6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)carbamat als violettes Öl erhalten wurde (66.0 mg, 0.110 mmol, 42 %).

R_f = 0.22 (CH₂Cl₂/EtOAc/MeOH, 5:5:1).

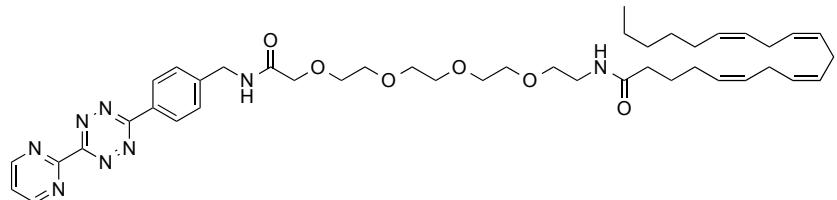
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.11 (*d*, ³J = 4.9 Hz, 2H, 2x C_{arom}H), 8.68 (*d*, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2x C_{arom}H), 7.59 – 7.54 (*m*, 1H, C_{arom}H), 4.61 (*d*, ³J = 6.2 Hz, 2H, Ar-CH₂-NH), 4.12 – 4.08 (*m*, 2H, C=O-CH₂-O), 3.73 – 3.50 (*m*, 14H, 7x C_{Tetraethylenglycol}H₂), 3.47 (*t*, ³J = 5.1 Hz, 2H, CH₂-NH), 1.40 (*s*, 9H, 3xCH₃-tBu).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 164.57(O=C-O), 163.32 (C_q), 159.82 (C_q), 159.81 (C_{arom}H), 158.62 (2x C_{arom}H), 129.33 (2x C_{arom}H), 128.77 (2x C_{arom}H), 122.68 (C_{arom}H), 70.62 (C_{Tetraethylenglycol}H₂), 70.36 (7x C_{Tetraethylenglycol}H₂), 42.76 (Ar-CH₂-NH), 28.64 (CH₃-tBu).

HR-MS (ESI): [M+Na]⁺ ber.: 621.2755, gef.: 621.2763.

FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3336 (*br, w*), 2921 (*w*), 1702 (*m*), 1676 (*m*), 1610 (*m*), 1563 (*m*), 1529 (*m*), 1434 (*m*), 1380 (*vs*), 1250 (*m*), 1144 (*m*), 1113 (*m*), 844 (*s*).

14-((5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenamido)-N-(4-(6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid (6)



tert-Butyl (3-oxo-1-(4-(6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)carbamat (26) (66.0 mg, 0.1103 mmol) wurde in 1.15 mL DCM gelöst und 0.30 mL Trifluoressigsäure zugegeben. Nach 45 min wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Arachidonsäure (54.6 µmol, 166 µmol, 1.5 Äquiv.) wurde in 0.7 mL trockenem DMF gelöst und HATU (50.3 mg, 132 µmol, 1.2 Äquiv.), HOBr (44.7 mg, 331 µmol, 3 Äquiv.) und DIPEA (56,3 µL, 332 µmol, 3 Äquiv.) zugegeben. Nach 10 min wurde das 14-Amino-N-(4-(6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid (55.0 mg, 110 µmol, 1 Äquiv.) in 0.6 mL trockenem DMF zugegeben und die Reaktion für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit DCM verdünnt und mit ges. NH₄Cl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der

Rückstand mittels Flash-Chromatographie (Silica, *i*Hex/EtOAc, 1:1 → DCM/EtOAc/MeOH, 10:10:1) gereinigt. Das Anandamid-Tetrazin wurde als violett-rotes Öl erhalten (39,6 mg, 50,6 µmol, 46 %).

R_f = 0.72 (CH₂Cl₂/EtOAc/MeOH, 2:2:1).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.11 (*d*, ³J = 4.8 Hz, 2H, 2x C_{arom}**H**), 8.67 (*d*, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2x C_{arom}**H**), 7.59 – 7.54 (m, 1H, C_{arom}**H**), 5.43 – 5.23 (m, 8H, 8x C_{arom}**H**), 4.61 (*d*, ³J = 6.2 Hz, 2H, Ar-CH₂-NH), 4.11 – 4.02 (m, 2H, C=O-CH₂-O), 3.73 – 3.36 (m, 18H, 8x C_{Tetraethylenglycol}**H**₂CH₂, CH₂-NH), 2.82 – 2.72 (m, 6H, 3x C_{Arachidonsäure}**H**), 2.18 – 2.12 (m, 2H, C_{Arachidonsäure}**H**), 2.09 – 1.99 (m, 4H, 2x C_{Arachidonsäure}**H**₂), 1.67 (*q*, ³J = 7.5 Hz, 2H, C_{Arachidonsäure}**H**₂), 1.37 – 1.20 (m, 6H, 3x C_{Arachidonsäure}**H**₂), 0.86 (*t*, ³J = 7.0 Hz, 3H, C_{Arachidonsäure}**H**₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.38 , 170.64, 164.54, 163.27, 159.72 (C_q), 158.64 (2x C_{arom}), 129.35 (CH), 129.33 (2x C_{arom}), 128.90, 128.81, 128.74, 128.43, 128.38, 128.06, 127.72 (7xCH), 126.95, 122.75 (C_{arom}), 71.30, 70.65, 70.60, 70.47, 70.34, 70.13 (8x C_{Tetraethylenglycol}H₂), 42.73 (CH₂-NH), 39.40, 36.21 (C_{Arachidonsäure}), 31.72 (C_{Arachidonsäure}), 29.92 (C_{Arachidonsäure}), 27.43 (C_{Arachidonsäure}), 26.91 (C_{Arachidonsäure}), 25.85 (C_{Arachidonsäure}), 25.83 (C_{Arachidonsäure}), 25.74 (C_{Arachidonsäure}), 22.79 (C_{Arachidonsäure}), 14.30 (C_{Arachidonsäure}).

MS: [M+H]⁺ ber.: 785.4709, gef: 785.4727.

FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3311 (m), 2923 (s), 1555 (s), 1413 (s), 1103 (s).

8.3 OLIGONUKLEOTIDSYNTHESE UND CLICK-MODIFIKATION

8.3.1 Oligonukleotidsynthese:

Sofern nicht anders angegeben wurden die RNA-Festphasensynthesen an einem ABI 394 Synthesizer (*Applied Biosystems*) im 200 nmol Maßstab durchgeführt, wobei kommerziell erhältliche 2'-TBDMS-Phosphoramidite eingesetzt wurden. TBDMS-Phosphoramidite (*Link Technologies*) wurden 0.2 M in Acetonitril (MeCN) angelöst. Es wurde eine Kupplungszeit von 10 min gewählt. Für die Alkinsonderbase wurde die Kupplungszeit auf 20 min erhöht. Als Träger wurde stets dT CPG-Material (500 Å, *Glen Research* bzw. *Prime Synthesis*) verwendet. In den erforderlichen Lösungen wurde MeCN mit einem Wassergehalt <10 ppm verwendet und alle Phosphoramiditlösungen mit Molsieb 3 Å getrocknet. Die RNA-Synthese fand unter folgenden Bedingungen statt:

Detrytylierung:	15 mL Dichloressigsäure in 100 mL Toluol
Aktivator:	0.50 M Ethylthiotetrazol (ETT) in Acetonitril
	0.25 M <i>Aktivator 42 (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)

8.3.2 Entschützung und Aufreinigung von Oligonukleotiden

Für die Entschützung von *tert*-Butyldimethylsilyl-geschützten (TBDMS-geschützten) Oligonukleotiden wurde das am CPG-Trägermaterial gebundene Oligonukleotid zunächst *in vacuo* getrocknet und anschließend vorsichtig in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2.0 mL) überführt. Für die Abspaltung der festen Phase sowie der TBDMS-Schutzgruppen von den Oligonukleotiden wurde anschließend 1 mL einer 1:1 Mischung von 28 %NH₃ (in H₂O) und 40 % Methylamin (in H₂O) zugeben und für 30 min bei 65 °C in einem *Eppendorf Thermomixer* geschüttelt. Durch Zentrifugation (13400 rpm, 5 min) und vorsichtigem Abnehmen des Überstands wurde das darin gelöste Oligonukleotid vom Trägermaterial abgetrennt. Die Trennung des Oligonukleotids vom CPG-Material wurde durch zweimaliges Waschen mit je 250 µL ddH₂O vervollständigt. Die so erhaltene wässrige Phase wurde anschließend *in vacuo* eingeengt und der Rückstand in 230 µL DMSO bei 65 °C gelöst. Die Abspaltung der TBDMS-Gruppen erfolgte anschließend durch Zugabe von 120 µL Triethylamin

(TEA) und 150 µL TEA • 3HF und Inkubation bei 65 °C für 2 h. Durch Zugabe von 50 µL NaOAc-Lösung (3 M) und 1 mL *n*-Buthanol und Inkubation bei -80 °C für 1 h wurde die entschützten RNA-Oligonukleotide gefällt und anschließend durch Zentrifugation (13400 rpm, 15 min) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 500 µL kaltem EtOH wurde die RNA bei RT getrocknet und in 500 µL ddH₂O gelöst.

8.3.3 Aufreinigung von Oligonukleotiden

Die vereinigten wässrigen Phasen der Entschützung wurden *in vacuo* eingeengt und mit einem 0.2 µm Nylon-Membranfilter filtriert. Das so erhaltene Roholigonukleotid wurde zunächst durch analytische *reversed phase*-HPLC untersucht und anschließend mittels präparativer *reversed phase*-HPLC gereinigt. Die gesammelten Fraktionen der chromatografischen Aufreinigung wurden anschließend mittels *MALDI-TOF* analysiert. Dazu wurden 2 µL der jeweiligen Fraktion auf einem 0.025 µm *VSWP Membranfilter* von *Milipore* 20 min über ddH₂O entsalzt und mit einer HPA-Matrix auf einem *AnchorChiptM Thin Layer* kristallisiert. Die Reinheit der, das Zielmolekül enthaltenden Fraktionen wurden mittels analytischer HPLC überprüft. Die berechneten sowie durch *MALDI-TOF*-Messungen bestimmten Massen der RNA-Stränge sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung der synthetisierten RNA-Oligonukleotide. Aufgeführt sind die Sequenzen sowie die berechneten und durch MALDI-TOF bestimmten Massen. Y = 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Strang	Sequenz	m/z (ber.)	m/z (gem.)
ORN1	5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CYdT-3'	6590	6589
ORN2	5'-GUA-GGA-GUA-GUG-AAA-GGC-CYdT-3'	6899	6897
ORN3	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT-3'	6670	6671
ORN4	5'-ACG-UGA-CAC-GUU-CGG-AGAA-YdT-3'	6819	6819
ORN5	5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CdTdT-3'	6502	6501
ORN6	5'-GUA-GGA-GUA-GUG-AAA-GGC-CdTdT-3'	6809	6805
ORN7	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UdTdT-3'	6582	6580
ORN8	5'-ACG-UGA-CAC-GUU-CGG-AGAA-dTdT-3'	6731	6734
ORN9	-	6652	6652
ORN10	-	6648	6645
ORN11	-	6827	6826
ORN12	-	6782	6778
ORN13	-	6859	6855
ORN19	5'-AAA-AAA-UAA-AAU-CUC-UGG-UYdT-3'	6667	6668
ORN20	5'-AAA-AAA-UAA-AAU-CUC-UGG-UdTdT-3'	6757	6757
ORN21	5'-ACC-AGA-GAU-UUU-AUU-UUU-UdTdT-3'	6593	6592

8.3.4 Click-Modifizierung von Oligonukleotiden

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten „Click“-Reaktionen an Oligonukleotiden wurde ein modifiziertes Protokoll der Firma *BaseClick* verwendet. Dabei unterschied sich das Vorgehen abhängig von der Anzahl der beabsichtigten Click-Reaktionen pro azidierten Liganden. Im Folgenden ist das Vorgehen bei einer Reaktion von einem Liganden mit einem Azid sowie von einem Liganden mit drei Aziden jeweils mit einem einfach alkinmodifizierten RNA-Oligonukleotid angegeben.

8.3.4.1 Click-Reaktionen von RNA-Oligomeren an einfach azidierten Substraten

Zu einer 2.0 mM Lösung des Oligonukleotids in DMSO/H₂O (1:1) wurden 10 Äquiv. des entsprechenden Monoazids in Form einer 100 mM Lösung in DMSO/tBuOH (3:1) gegeben. Anschließend wurden 10 Äquiv. an CuBr in Form einer frisch hergestellten Lösung von CuBr und TBTA im Molverhältnis 1:2 (50 mM (bezogen auf CuBr) in DMSO/tBuOH (3:1)) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde durchmischt und 5 h bei 30 °C mit Hilfe eines Thermomixers der Firma *Eppendorf* geschüttelt, wobei nach 1.5 h erneut 10 Äquiv. CuBr in der oben erwähnten Form zugegeben wurden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion mit 100 µL einer 0.3 M NaOAc-Lösung versetzt, weitere 10 min geschüttelt und das Oligonukleotid durch Zugabe von 1.0 mL kaltem EtOH gefällt. Nach Zentrifugation (13400 rpm, 15 min) wurde die überstehende Lösung abgenommen, der Rückstand *in vacuo* getrocknet und in 100 µL ddH₂O gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (13400 rpm, 5 min) wurde das Click-Produkt mittels analytischer *reversed phase* HPLC aufgereinigt, wobei die einzelnen erhaltenen Fraktionen wie im vorherigen Kapitel beschrieben mittels *MALDI-TOF* bzw. analytischer *reversed phase*-HPLC untersucht wurden. In Tabelle 10 sind die unterschiedlichen modifizierten RNA-Stränge zusammen mit ihrer theoretischen sowie durch MALDI-TOF bestimmten Massen aufgeführt.

Tabelle 10: Click-modifizierte Oligonukleotide mit den zugehörigen Sequenzen, den HPLC-Gratienten der Aufreinigung, den berechneten und gemessenen Massen (MALDI-TOF). Y = 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Strang	Sequenz	HPLC, 45min [% Puffer B]	m/z (ber.)	m/z (gem.)
ORN1 + 4	5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CYdT-3' +4 ^{Glc-Monoazid}	0-30	6825	6823
ORN3 + 4	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT +4 ^{Glc-Monoazid}	0-30	6905	6905
ORN9 + 4	-	0-30	6887	6885
ORN10 + 4	-	0-30	6883	6887
ORN11 + 4	-	0-30	7062	7061
ORN12 + 4	-	0-30	7017	7019
ORN13 + 4	-	0-30	7094	7097
ORN19 + 4	5'- AAA-AUA-AAA-TCT-CTG-GTC-TYdT -3' +4 ^{Glc-Monoazid}	0-30	6902	6959
ORN3 + 5	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT +5 ^{IAA-Monoazid}	0-60	7045	7049
ORN9 + 5	-	0-60	7027	7027
ORN10 + 5	-	0-60	7023	7024
ORN11 + 5	-	0-60	7202	7207
ORN12 + 5	-	0-60	7157	7164
ORN13 + 5	-	0-60	7234	7236
ORN4 + Alexa	5'-ACG-UGA-CAC-GUU-CGG-AGA-AYdT-3' +Alexa 647	0-50	7774	7771
ORN1 + 18	5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CYdT-3' +18 ^{AEA-Monoazid}	0-100	7094	7092
ORN3 + 18	5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT +18 ^{AEA-Monoazid}	0-100	7174	7175
ORN19 + 18	5'- AAA-AUA-AAA-TCT-CTG-GTC-TYdT -3' +18 ^{AEA-Monoazid}	0-100	7171	7158

8.3.4.2 Click-Reaktionen von RNA-Oligomeren an mehrfach azidierten Substraten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche alkinmodifizierte Oligonukleotide mit Arachidonsäuretriazid und Glucosetriazid zur Reaktion gebracht. Dabei wurde im wesentlichen eine konzentriertere Variante der oben angegebenen „Click“-Reaktion durchgeführt, die im Folgenden beschrieben wird.

Zu einer 8.0 mM Lösung des Oligonukleotids in DMSO/H₂O (1:1) wurden 0.25 Äquiv. des entsprechenden Azids in Form einer 100 mM Lösung in DMSO/tBuOH (3:1) gegeben. Im Falle des neunfach azidmodifizierten Arachidonsäureamids wurden 0.0714 Äquiv. des Azids zugegeben. Anschließend wurden 5 Äquiv. an CuBr in Form einer frisch hergestellten Lösung von CuBr und TBTA im Molverhältnis 1:2 (200 mM (bezogen auf CuBr) in DMSO/tBuOH (3:1)) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde durchmischt und 7 h bei 30 °C mit Hilfe eines Thermomixers der Firma *Eppendorf* geschüttelt, wobei nach 1, 3 und 5 h erneut je 5 Äquiv. CuBr in der oben erwähnten Form zugegeben wurden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion mit 100 µL einer 0.3 M NaOAc-Lösung versetzt, weitere 10 min geschüttelt und das Oligonukleotid durch Zugabe von 1.0 mL kaltem EtOH gefällt. Nach Zentrifugation (13400 rpm, 15 min) wurde die überstehende Lösung abgenommen, der Rückstand *in vacuo* getrocknet und in 100 µL ddH₂O gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (13400 rpm, 5 min) wurde das Click-Produkt mittels analytischer *reversed phase* HPLC aufgereinigt, wobei die einzelnen erhaltenen Fraktionen wie im vorherigen Kapitel beschrieben mittels *MALDI-TOF* bzw. analytischer *reversed phase*-HPLC untersucht wurden. In Tabelle 11 sind die unterschiedlichen modifizierten RNA-Stränge zusammen mit ihrer theoretischen sowie durch MALDI-TOF bestimmten Massen aufgeführt.

Tabelle 11: Mit Triaziden Click-modifizierte Oligonukleotide sowie den zugehörigen Sequenzen, den HPLC-Gradienten der Aufreinigung, den berechneten und gemessenen Massen (MALDI-TOF). Y = 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Strang	Sequenz	HPLC, 45min [% Puffer B]	m/z (ber.)	m/z (gem.)
(ORN1) ₃ + 1	+1 ^{Glc-Triazid} 5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CYdT-3'	0-30	20319	20320
(ORN3) ₃ + 1	+1 ^{Glc-Triazid} 5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT	0-30	20559	20564
(ORN1) ₃ + 2	Triazid +2 ^{AEA-} 5'-GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CYdT-3'	0-80	20443	20446
(ORN3) ₃ + 2	Triazid +2 ^{AEA-} 5'-UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UYdT	0-80	20683	20679

8.4 ZELL-, MIKRO- UND MOLEKULARBIOLOGISCHES ARBEITEN

8.4.1 Material und Methoden

Lumineszenz-Messungen: Zur quantitativen Bestimmung von Lumineszenz wurden ein *Tecan GENios Pro Injection Reader* und *MicroPlatten 96/V-PP* von *Eppendorf* bzw. *96 MircoPlatten* von *greiner bio-one* verwendet.

Konvokalmikroskopische Arbeiten: Zur Untersuchung von Zellen und Pflanzen mittels Konfokalmikroskopie wurde ein TCS SPE Spektral-Konfokalmikroskop (*Leica*) mit inversem Stativ und einem Inkubator der Firma *PECON* bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit verwendet. Die Helligkeit und der Kontrast, der in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen wurde mittels *Adobe Photoshop* bearbeitet.

Zellkultur: HeLa-Zellen wurden von *ATCC* bezogen und in 250 mL CELLSTAR® Zellkultur-Flaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche (T75) kultiviert. RBL-2H3-Zellen (*rat basophilic leukemia*, ACC 312) wurden von der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH* (DSMZ) bezogen und ebenfalls in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Für Lumineszenz-Messungen wurden HeLa- und RBL-2H3-Zellen in 96-well Platten von *TPP* ausgesät. Für das Kultivieren der Zellen wurden außerdem folgende Medien von *Invitrogen* bzw. *Thermo Scientific* verwendet:

- Trypsin, 0.25% (1x)
- Foetal Bovine Serum Origin: EU Approved (South American)
- RPMI-Medium 1640 (1x), liquid
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1x), liquid
- Antibiotic-Antimycotic (100x), liquid

Die Kultivierung von Fibroblasten der Linie NIH 3F3 erfolgte durch *Fabio Spada* und *Florian Steinmann* in einem modifizierten DMEM-Medium der folgenden Zusammensetzung:

- Penstrep, 1.0% (v/v)
- Foetal Bovine Serum Origin: EU Approved (South American) 10 % (v/v)
- L-Glutamin (L-Alanyl-L-Glutamin) 1 % (v/v)
- MEM 1 % (v/v)
- β-Mercaptoethanol (50 mM) 0.1 mM

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:

Transfektionsreagenz:	jetPRIME 0.1 ml von <i>peqlab</i> .
Quantifizierung der <i>Firefly</i> bzw. <i>Renilla</i> -Expression:	Dual-Luciferase® Reporter Assay von <i>Promega</i> .
Isolierung von zellulärer RNA:	peqGOLD Total RNA Kit (S-Line) von <i>peqlab</i>
DNAse-Verdau:	Turbo DNA-free-Kit von <i>Ambion</i>
Reverse Transkription:	i-Script cDNA Synthesis Kit von <i>BIO-RAD</i>
Quantitative RealTime PCR:	Sso EvaGreen Supermix von <i>BIO-RAD</i>

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

Verwendete Puffer:

TAE-Laupuffer:	pH 8.3, 40 mM Tris-Aacetat, 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-Aacetat, 1 mM EDTA

8.4.2 Zellkulturtechnik

8.4.2.1 Kultivieren von HeLa- und RBL-2H3-Zellen

RBL-2H3-Zellen und HeLa-Zellen wurden in RPMI-1640 Media mit 10 % fötalem Kälberserum sowie 0.10 % Antibiotic-Antimycotic in T75 Zellkulturflaschen in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und wurden alle 2 Tage bei einer optischen Konfluenz von 70 % bis 80 % passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit je 10 mL PBS Puffer gewaschen und 2.0 mL Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubation für 4 min bei 37 °C wurden 8 mL RPMI-Medium zugeben und diese Zellsuspension (**A**) in ein PP-Zentrifugenrörchen überführt. 1.0 mL dieser Suspension wurden in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit 18 mL RPMI-Medium verdünnt. Für das Aussähen von Zellen in 96-well Platten wurde die Zellkonzentration in der Zellsuspension **A** bestimmt. Dazu wurden 20 µL der Zellsuspension mit 20 µL Trypanblau-Lösung versetzt und 20 µL der Mischung in ein, mit einem

Deckglas versehenen Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) gegeben. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops mit 10er Objektiv. Dazu wurden 4 x 16 Kleinquadrate ausgezählt und das arithmetische Mittel Z für jedes der vier Großquadrate bestimmt. Da die Fläche eines Großquadrats 1 mm^2 und der Abstand zwischen Zählkammerboden und Deckglas 0.1 mm beträgt, entspricht das Volumen der so ausgezählten 1:1 mit Trypanblau verdünnten Zellsuspension 0.1 mm^3 . Daher ergibt sich die Gesamtzahl der Zellen in der Zellsuspension (**A**) aus Formel **W**.

$$Z(A) \times 2 \times \text{Volumen}(A) \times 10^4 = Z(\text{gesamt}) \quad \text{Formel W}$$

Nach Bestimmung der Zellkonzentration wurde ein entsprechendes Volumen der Zellsuspension (**A**) mit soviel in RPMI-1640 Media mit 10 % fötalem Kälberserum sowie 0.10 % Antibiotic-Antimycotic verdünnt, dass sich in dem jeweils benötigten Volumen die pro *Well* gewünschte Anzahl an Zellen befand.

8.4.2.2 Auftauen und Einfrieren von RBL-2H3-Zellen

Für die dauerhafte Lagerung von Zellen wurden, nach Zellzahlbestimmung und Zentrifugation (siehe oben), je 2.5×10^5 Zellen in 1.6 mL einer 1:1 Mischung von RPMI-1640 Medium und Einfriermedium (30 % (v/v) DMSO, 70 %(v/v) FBS) in 2 mL Kryoröhrchen in einem Kryostaten bei -80 °C für 18 h und anschließend dauerhaft bei -196 °C in flüssigen Stickstoff 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 durch Zentrifugation (10 min, 1000 rpm) pelettiert, in 20 mL frischem RPMI-1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum sowie 0.10 % Antibiotic-Antimycotic resuspendiert und in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät.

8.4.2.3 Dual-Luciferase Reporter Assay

Für die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen siRNA-Konstrukte auf die Expression von *Renilla*-Luciferase, wurde nach einem zuvor von Julian Willibald und Johannes Harder optimierten Protokoll vorgegangen. Dazu wurden 16 h vor Beginn des Experiments je 3×10^4 RBL-2H3-Zellen in 200 µL pro *Well* in 96-well Zellkulturplatten ausgesät.

Transiente Transfektion mit *psiCHECK™-2* mittels Transfektionsreagenz

Nach 16 h, bei einer optischen Konfluenz von 70 - 80 %, erfolgte eine Transfektion der Zellen mit *psiCHECK™-2*, um die Gene der beiden Luciferasen in die Zellen einzubringen.

Unmittelbar vor der Transfektion wurde dazu nach den Angaben des Herstellers (Peglab) die Transfektionslösung für eine Transfektion mit *jetPRIMETM* hergestellt. Dabei wurde eine Lösung des

Plasmids mit *jetPRIMETM Puffer* auf eine Konzentration von 10 ng/ μ L verdünnt und durch intensives Schütteln durchmischt. Zu der Lösung wurde soviel *jetPRIMETM Reagenz* gegeben, dass sich ein Verhältnis von 1:2 (w/v) von Plasmid zu *jetPRIMETM Reagenz* ergab. Anschließend wurde erneut intensiv durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte ein Medienwechsel, wobei die Zellen mit 100 μ L frischem RPMI-1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum sowie 0.10 % Antibiotic-Antimycotic überschichtet und 10 μ L (100 ng Plasmid) der Transfektionsstocklösung zu jedem *Well* gegeben wurden.

Cotransfektion von siRNA und Plasmid

Es wurden Lösungen der entsprechenden modifizierten Oligonukleotidkonstrukte und der gleichen Menge des entsprechenden komplementären Strangs (*Metabion*) hergestellt, wobei eine definierte Konzentration durch Zugabe von PBS eingestellt wurde. Die Stränge wurden anschließend durch Erhitzen auf 90 °C und anschließendes Abkühlen mit einem Temperaturgradienten von 1 °C pro Minute auf 4 °C mit Hilfe eines *Mastercycler personal* Thermocycler der Firma *Eppendorf* zu Doppelsträngen hybridisiert.

4 h nach Erfolgen der Transfektion mit *psiCHECK™* erfolgte ein erneuter Medienwechsel, wobei die Zellen mit 200 μ L frischem RPMI-1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum sowie 0.10 % Antibiotic-Antimycotic überschichtet wurden. Anschließend wurden je 10 μ L der entsprechenden siRNA-Lösung in jedes *Well* gegeben.

Auswertung des Einflusses von Oligonukleotidkonstrukten auf die Expression von *Renilla-Luciferase*

Zunächst wurden die für die Biolumineszenz-Messungen nötigen Substrate nach Angaben des Herstellers frisch angesetzt und bei Raumtemperatur verwendet.

Vor der Lyse der mit *psiCHECK™-2* und modifizierten Oligonukleotiden behandelten Zellen wurde das Medium abgenommen und mit 100 μ L PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 50 μ L passiv Lysispuffer und Inkubation für 30 min bei 25 °C auf einem Thermoschüttler. Je 20 μ L des Zelllysats wurden in das korrespondierende *Well* einer neuen 96-well Platte gegeben und die so behandelte Platte automatisiert mittels eines *Tecan Injection Readers* ausgelesen. Dabei wurden im ersten Schritt 50 μ L *Luciferase Assay Reagent II (LAR II)* durch das Gerät zugegeben und 5 s geschüttelt. Daraufhin wurde die Lumineszenz der *Firefly-Luciferase* ausgelesen und 50 μ L *Stop and Glo Reagent* zugegeben. Nach erneuten 5 s Schütteln wurde nun durch das Gerät die Lumineszenz der *Renilla-Luciferase* ausgelesen.

8.4.2.4 Quantitative RealTime PCR zur Bestimmung der Expression von PTBP1 und PTBP2

Dieses Verfahren dient zur Quantifizierung von spezifischen RNAs in einem RNA-Gemisch. Die Methode ist extrem sensitiv, sowohl zur Bestimmung von RNA-Mengen als auch zum Vergleich von Genexpressionsmustern. Die Quantifizierung basiert auf der Online-Fluoreszenzmessung von Fluorochromophoren. Diese können entweder direkt in die amplifizierte DNA eingebaut werden oder hybridisieren an die amplifizierte DNA. Bei den, im Rahmen dieser Arbeit, durchgeföhrten Reaktionen wurde dafür *EvaGreen®* (*BioRad*) verwendet, das nach Bindung an doppelsträngige DNA ein sehr starkes Fluoreszenzsignal abgibt. Daher kann durch Messen der Emission ($\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$) direkt auf die vorhandene DNA-Menge zurückgeschlossen werden. Das detektierte Fluoreszenzsignal ist damit direkt proportional zur Menge an entstandenem PCR-Produkt. Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression der Spleißinhibitoren PTBP1 und PTBP2 in mit siRNA gegen PTBP1 behandelten Fibroblasten (NIH 3F3) mittels quantitativer *realtime* PCR untersucht.

Dazu wurden in einer 6-well Zellkulturplatte 1.4×10^4 Zellen pro Well in 2.0 mL modifiziertem DMEM Medium ausgesät, 20 µL einer zuvor hybridisierten siRNA-Lösung zugegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert und, entsprechend dem Protokolle des *peqGOLD Total RNA Kits* (*Peqlab*), die gesamte RNA isoliert. Die auf diese Weise isolierte Nukleotidmenge wurde nun mittles eines *ND-1000* Spektrophotometers bestimmt.

Um etwaige Verunreinigungen mit genomicscher DNA zu eliminieren, wurde anschließend ein DNase-Verdau durchgeföhr. Dabei wurden 10 µg des isolierten Nukleotids mit einem TURBO DNA-free™ Kit (*Applied Biosystem*) verdaut und entsprechend dem Standardprotokoll des Herstellers verfahren. Um die so gewonnene RNA in DNA zu transkribieren, wurde eine reverse Transkription mit einem *i-Script cDNA Synthesis Kit* (*BIO-RAD*) vorgenommen. Dazu wurden 2 µg der zuvor verdauten RNA gemäß dem Herstellerprotokoll behandelt und der Ansatz anschließend 1:1 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Mit der so hergestellte cDNA wurde nun eine RealTime PCR durchgeföhr, wobei *Sso EvaGreen Supermix* (*BIO-RAD*) eingesetzt wurde. Dazu wurden die Ansätze für die cDNA entspreched dem von Hersteller empfohlenen Standardprotokolls hergestellt und als Negativkontrolle eine 1:1 Verdünnung der RNA-Lösung nach DNase-Verdau verwendet. Die Amplifikation wurde mit Hilfe eines *Eppendorf Mastercycler® realplex⁴* durchgeföhr, wobei das in Tabelle 12 dargestellte Programm verwendet wurde.

Tabelle 12: Verwendetes Programm der *RealTime* PCR. Nach jedem Zyklus wurde nach Anregung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 494$ nm die Emission bei $\lambda = 521$ nm bestimmt.

Temperatur [°C]	Dauer [s]	
95	120	40 Zyklen
95	15	
55	15	
72	35	

Nach jedem Amplifikationszyklus wurde die Emission bei $\lambda = 521$ nm nach einer Anregung bei $\lambda = 494$ nm gemessen, um die Menge an doppelsträngiger DNA zu bestimmen. Die so gewonnenen Daten über die Menge an cDNA wurden gegen die Expression von GAPDH normalisiert. Die dabei verwendeten Primerpaare zur Amplifikation von PTBP1, PTBP2 und GAPDH sind in Tabelle 13 angegeben. Die Expressionslevel von PTBP1 und PTBP2 und der internen Kontrolle wurden aus je drei Einzelmessungen extrapoliert und mittels Gene Expression Macro™ (*BioRad*) ermittelt.

Tabelle 13: Primer-Sequenzen für die quantitative realtime PCR^[9]

Primer für GAPDH (<i>housekeeping gen</i>)	
forward	5'-CAT-GGC-CTT-CCG-TGT-TCC-TA-3'
reverse	5'-CTT-CAC-CAC-CTT-CTT-GAT-GTC-ATC-3'
Primer des Zielgens PTBP1	
forward	5'-AGT-GCG-CAT-TAC-ACT-GTC-CA -3'
reverse	5'-CTT-GAG-GTC-GTC-CTC-TGA-CA-3'
Primer des Zielgens PTBP2	
forward	5'-TGG-CTA-TTC-CAA-ATG-CTG-CT-3'
reverse	5'-TCC-CAT-CAG-CCA-TCT-GTA-TC-3'

8.5 ARBEITEN MIT ARABIDOPSIS THALIANA

8.5.1 Material und Methoden

Konfokalmikroskopische Arbeiten: Zur Untersuchung von Zellen und Pflanzen mittels Konfokalmikroskopie wurde ein TCS SPE Spektral-Konfokalmikroskop (*Leica*) mit inversem Stativ und einem Inkubator der Firma *PECON* bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit verwendet. Die Helligkeit und der Kontrast, der in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen wurde mittels *Adobe Photoshop* bearbeitet.

Für die Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* wurde ein Phyto-Agar auf Basis von *Murashige & Skoog Medium (Duchefa Biochemie)* verwendet:

- ½ *Murashige & Skoog Medium*
- Saccharose 1 % (w/w)
- B5-Phytovitamine (*Duchefa Biochemie*) 1 % (v/v)
- Phytoagar (*Duchefa Biochemie*) 0.8 % (w/w)
- mit KOH auf pH 5.8

8.5.2 Kultivieren von *Arabidopsis thaliana*

8.5.2.1 Kultivieren von *Arabidopsis thaliana* auf Phyto-Agar-Platten

Arabidopsis thaliana wurden auf rechteckigen Kulturplatten mit einer Phytoagar Auflage ausgesät. Die Pflanzen wurden im oberen Drittel ausgesät und die Platten aufrecht stehend in einem Inkubator (*Innova® 44, New Brunswick Scientific*) bei 23 °C, 24 h Beleuchtung (Langtag) und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Für konfokalmikroskopische Untersuchungen der Aufnahme von RNA über die Wurzeln wurden die jungen Pflanzen nach 8 Tagen vorsichtig aus dem Agar präpariert und auf einen mit PBS beschichteten Objektträger gelegt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die gesamte Struktur des Wurzelgewebes unbeschädigt blieb, um einen Eintrag der fluoreszenzmarkierten RNA in die Leitbündel ohne aktiven Transport durch den Casparischen Streifen zu vermeiden. Auf die Wurzeln der Pflanzen wurden anschließend 20 µL einer 0.9 µM Lösung der Liganden-modifizierten RNA-Doppelstränge mit Fluoreszenzlabel gegeben, die 0.05 % Silwet enthielt. Um die Wurzeln vor Austrocknung zu schützen, wurde ein Deckglas aufgelegt und die Pflanzen in einem Inkubator bei 23 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit konfokalmikroskopisch untersucht (Abbildung 22). Dazu wurden

im Abstand von 2 min über einen Zeitraum von 15 min Aufnahmen gemacht, um die zeitliche Veränderung der Fluoreszenz zu dokumentieren.

8.5.2.2 Kultivieren von *Arabidopsis thaliana* in Pipettenspitzen

Um die Auswirkungen einer Aufnahme von siRNA-Konjugaten über die Wurzel zu untersuchen, wurden 200 µL Pipettenspitzen vor der Autoklavierung die untersten 2 mm entfernt, um eine größere Öffnung zu schaffen. Anschließend wurden diese unter sterilen Bedingungen mit Phyto-Agar befüllt. Nach Aushärten des Agars wurden die Samen auf die Oberfläche des Agars aufgebracht. Um eine gleichmäßige Versorgung mit Wasser und Nährsalzen zu ermöglichen, wurden die Pipettenspitzen in einer abgeschlossenen und lichtdurchlässigen Box so platziert, dass die untere Öffnung in Murashige & Skoog-Medium (MS-Medium) getaucht war (Abbildung 44). Die auf diese Weise ausgesäten Pflanzen wurden nun für 8 Tage bei 23 °C, 24 h Beleuchtung (Langtag) und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, wobei das Medium alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Nach dieser Zeit hatten die meisten Keimlinge Wurzeln ausgebildet, die aus der unteren Öffnung der Pipettenspitzen herausragten.



Abbildung 44: Exemplarische Darstellung von *Arabidopsis thaliana* in 200 µL Pipettenspitzen zur Untersuchung der Aufnahme von siRNA über die Wurzeln.

8.5.3 Untersuchung der Aufnahme von modifizierten siRNA

8.5.3.1 Untersuchung der Aufnahme von siRNA über die Wurzeln

Die in Pipettenspitzen ausgesäten *Arabisopsis thaliana* wurden nach 8 Tagen in passende Eppendorf-Gefäße mit 200 µL einer Lösung der jeweiligen Liganden-modifizierten siRNA (1.0 µM) in MS-Medium überführt. Pflanzen, die mit siRNA-freiem MS-Medium behandelt wurden, dienten als

Vergleich zur Beurteilung der Veränderungen des Phänotyps. Nach diesem Wechsel des Nährmediums wurden die Pflanzen erneut bei 23 °C, 24 h Beleuchtung und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Untersuchung des Phänotyps erfolgte nach 48, 72 und 96 h.

Um ein besseres Eindringen der siRNA-Lösung zu ermöglichen, wurden unterschiedliche Zusätze verwendet. Dabei wurde anfangs Silwet in Konzentrationen zwischen 0,05 % und 0,5 % eingesetzt. Unter Verwendung dieses Zusatzes konnte allerdings weder durch die Glucose- noch durch die IAA-modifizierten siRNAs ein veränderter Phänotyp beobachtet werden. In einem nächsten Schritt wurde ein kommerziell erhältliches Transfektionsreagenz (*jetPRIME*) den siRNA-Lösungen in einer Konzentration von 0,01 % zugesetzt.

8.5.3.2 Untersuchung der Aufnahme von siRNA über die Blätter

Für eine Untersuchung der Aufnahme von siRNA über die Blätter wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt.

Arabidopsis thaliana wurden wie zuvor beschrieben in 200 µL Pipettenspitzen ausgesät, die zuvor mit Phytoagar gefüllt worden waren. Die ausgesäten Pflanzen wurden für 10 Tage bei 23 °C, 24 h Beleuchtung (Langtag) und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 20 µL der jeweiligen siRNA-Lösung auf die Blätter der jungen Pflanzen gegeben. In einem weiteren Experiment wurden die Pflanzen kopfüber in ein Eppendorfgefäß mit der jeweiligen siRNA-Lösung getaucht, wobei darauf geachtet wurde, dass lediglich die Blätter vollständig benetzt wurden.

Auch wurden *Arabidopsis* auf diese beiden Weisen mit siRNA-freiem MS-Medium behandelt, um eine Beurteilung der Veränderungen des Phänotyps zu ermöglichen. Nach der Behandlung der Blätter wurden die Pflanzen erneut bei 23 °C, 24 h Beleuchtung und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Veränderungen im Erscheinungsbild wurden anschließend im Abstand von 24 h untersucht.

Um eine bessere Benetzung der Blätter zu erreichen, wurde auch hier Silwet in Konzentrationen zwischen 0,05 % und 0,5 % zugesetzt. Aufgrund der positiven Erfahrungen durch Zugabe von 0,01 % *jetPRIME* in den Experimenten zur Aufnahme der siRNA über die Wurzeln wurde auch hier ein solcher Zusatz verwendet.

Für eine Untersuchung der Aufnahme von siRNA in adulten Pflanzen wurden *Arabidopsis thaliana* auf autoklavierter, kommerziell erhältlicher Anzuchterde ausgesät und 3 Wochen bei 23 °C und 18 h Belichtung pro Tag angezogen. Nach dieser Zeit wurden die Blätter je einer Pflanze mit Lösungen der Glucose- oder IAA-modifizierten siRNAs behandelt. Um das Eindringen der Lösungen in das Gewebe der Blätter zu erleichtern, wurde durch Reiben die mechanische Belastung erhöht. Dabei wurde darauf geachtet die Struktur der Blätter nicht zu zerstören. Daraufhin wurde das Erscheinungsbild der Pflanzen in Abständen von 24 h untersucht, um eine Veränderung des Phänotyps beurteilen zu können.

8.6 BIOORTHOGONALE MODIFIKATION VON NANOPARTIKELN

Die hochfunktionalisierten Mesoporöse Silica-Nanopartikel wurden in zwei Stufen hergestellt. Durch *Stefan Datz* aus dem Arbeitskreis *Bein* wurden in einem ersten Schritt MSN mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 150 nm und 3.8 nm Porendurchmesser hergestellt, deren Oberfläche mit Benzolsulfonamiden funktionalisiert wurde.^[221] Benzolsulfonamid ist ein Inhibitor der Carboanhydrase (CA), der pH-abhängig in dessen aktivem Zentrum gebunden wird. Anschließend wurde an diese Oberflächenmodifikation Carboanhydrase gebunden. Ein vollständiger Verschluss der Poren der CA-MSN durch das gebundene Enzym konnte anschließend mithilfe von Fluorescein beladenen MSN bestätigt werden.^[222] Dabei zeigte sich keine Freisetzung von Fluorescein in HBSS Puffer bei einem pH-Wert von 7.4 über einen Zeitraum von 16 h. Um die pH-abhängige Öffnung der Poren der Nanopartikel zu überprüfen, wurden mit Fluorescein beladene MSN nach 3 h bei pH 7.4 in ein saures, dem Inneren des Endoms entsprechendes Milieu überführt (pH 5.5). Dabei konnte eine Freisetzung des Farbstoffes gezeigt werden.

In einem zweiten Schritt wurde die reversibel gebundene Carboanhydrase mit den beiden Rezeptor-Liganden Folsäure und Anandamid modifiziert. Durch *Michael Gattner* und *Milan Vrabel* wurde mittels *amber suppression* eine humane Carboanhydrase so verändert, dass sie eine Norbornen-Funktionalität aufweist.^[223] Diese Funktionalität wurde nun mit den Tetrazin-Liganden-Konjugaten modifiziert. Dazu wurden die CA-MSN in HBSS-Puffer suspendiert (1 mg/mL) und ein Überschuss des Tetrazin-modifizierten Liganden zugegeben (1 µg/mL) zugegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Nanopartikel durch Zentrifugation von der Lösung abgetrennt und viermal mit HBSS-Puffer gewaschen.

Um die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Folsäure-modifizierten Nanopartikeln (FA-CA-MSN) zu untersuchen, wurden KB-Zellen, welche diesen Rezeptor stark exprimieren, gewählt. FA-CA-MSNs, deren Poren mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Atto633) beladen worden waren, wurden dabei für 2 h, 5 h und 8 h mit den Zellen inkubiert (17 µg/mL). Nach diesen Zeiträumen wurden die nicht aufgenommenen Nanopartikel durch mehrmaliges Waschen entfernt, die Zellmembranen mit WGA 488 angefärbt und die lebenden Zellen mittels Konfokalmikroskopie untersucht. In einem zweiten Experiment wurden die Folat-Rezeptoren vor der Inkubation mit den FA-CA-MSN abgesättigt. Dazu wurden die KB-Zellen für 2 h mit freier Folsäure (3 mM) inkubiert und nach mehrmaligem Waschen wie oben verfahren.

In einem zweiten Schritt wurde auch die Aufnahme von Anandamid-modifizierten Nanopartikeln untersucht. Aufnahmestudien mit Anandamid-modifizierten Nanopartikeln (AEA-CA-MSN) wurden sowohl mit Plattenepithelkarzinom-Zellen (A431-Zellen) als auch in neuralen Stammzellen (ENC-1-Zellen) durchgeführt. Die zellbiologischen Arbeiten erfolgten dabei durch *Fabio Spada*. Mit Fluoreszenzfarbstoffen beladenen AEA-CA-MSNs wurden für 3 h mit den A431-Zellen inkubiert (17 µg/mL). Nach diesen Zeiträumen wurden die nicht aufgenommenen Nanopartikel durch mehrmaliges Waschen entfernt, die Zellmembranen angefärbt und die lebenden Zellen mittels

Konfokalmikroskopie untersucht. Auch in diesem Fall wurde in einem Kontrollexperiment eine Absättigung der CB-Rezeptoren vor der Behandlung mit AEA-CA-MSNs vorgenommen. Dazu wurden A431-Zellen für 2 h mit dem Anandamid-Tetrazin-Konjugat **6** (33 mM) inkubiert. Ohne Waschschrift wurde anschließend AEA-CA-MSN (17 µg/mL) zugegeben und für 3 h mit den Zellen inkubiert.

Für Aufnahmestudien in neuronale Stammzellen wurden AEA-CA-MSNs, deren Poren mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Atto633) beladen worden waren, für 3 h und 24 h mit den Stammzellen inkubiert (17 µg/mL). Nach diesen Zeiträumen wurden die nicht aufgenommenen Nanopartikel durch mehrmaliges Waschen entfernt, die Zellmembranen angefärbt und die lebenden Zellen mittels Konfokalmikroskopie untersucht. In einem Kontrollexperiment wurden wie zuvor beschrieben die CB-Rezeptoren durch eine zweistündige Inkubation der Zellen mit freiem Anandamid-Tetrazin **6** (33 mM) möglichst abgesättigt, bevor die Stammzellen für 24 h mit den AEA-CA-MSN inkubiert wurden.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. Z. Fire, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6966-6984.
- [2] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- [3] D. Castanotto, J. J. Rossi, *Nature* **2009**, *457*, 426-433.
- [4] P. Löffler, *Springer* **2014**, 199-200.
- [5] aT. Ulmasov, G. Hagen, T. J. Guilfoyle, *Science* **1997**, *276*, 1865-1868; bP. Kerchev, P. Muhlenbock, J. Denecker, K. Morreel, F. A. Hoeberichts, K. Van Der Kelen, M. Vandorpe, L. Nguyen, D. Audenaert, F. Van Breusegem, *Plant Cell Environ.* **2015**, *38*, 253-265; cY. Zhao, *Annu Rev Plant Biol* **2010**, *61*, 49-64.
- [6] G. Poschet, B. Hannich, S. Raab, I. Jungkunz, P. A. Klemens, S. Krueger, S. Wic, H. E. Neuhaus, M. Buttner, *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 1664-1676.
- [7] S. M. Sherson, H. L. Alford, S. M. Forbes, G. Wallace, S. M. Smith, *J. Exp. Bot.* **2003**, *54*, 525-531.
- [8] Y. Xue, K. Ouyang, J. Huang, Y. Zhou, H. Ouyang, H. Li, G. Wang, Q. Wu, C. Wei, Y. Bi, L. Jiang, Z. Cai, H. Sun, K. Zhang, Y. Zhang, J. Chen, X. D. Fu, *Cell* **2013**, *152*, 82-96.
- [9] E. V. Makeyev, J. Zhang, M. A. Carrasco, T. Maniatis, *Mol Cell* **2007**, *27*, 435-448.
- [10] S. Zheng, E. E. Gray, G. Chawla, B. T. Porse, T. J. O'Dell, D. L. Black, *Nat Neurosci* **2012**, *15*, 381-388, S381.
- [11] Q. Li, S. Zheng, A. Han, C. H. Lin, P. Stoilov, X. D. Fu, D. L. Black, *Elife* **2014**, *3*, e01201.
- [12] K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Mockl, C. Brauchle, K. K. Conzelmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1946-1949.
- [13] B. C. Doak, B. Over, F. Giordanetto, J. Kihlberg, *Chem Biol* **2014**, *21*, 1115-1142.
- [14] C. F. Bennett, E. E. Swayze, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2010**, *50*, 259-293.
- [15] M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**, *75*, 285-288.
- [16] aM. Matsui, D. R. Corey, *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16*, 167-179; bA. Huttenhofer, P. Schattner, N. Polacek, *Trends Genet* **2005**, *21*, 289-297.
- [17] aS. H. Ku, K. Kim, K. Choi, S. H. Kim, I. C. Kwon, *Adv Healthc Mater* **2014**, *3*, 1182-1193; bJ. C. Burnett, J. J. Rossi, K. Tiemann, *Biotechnol J* **2011**, *6*, 1130-1146; cS. H. Lee, Y. Y. Kang, H. E. Jang, H. Mok, *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *104*, 78-92; dK. A. Whitehead, J. R. Dorkin, A. J. Vegas, P. H. Chang, O. Veiseh, J. Matthews, O. S. Fenton, Y. Zhang, K. T. Olejnik, V. Yesilyurt, D. Chen, S. Barros, B. Klebanov, T. Novobrantseva, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat Commun* **2014**, *5*, 4277; eJ. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378-1398.
- [18] J. Conde, N. Artzi, *Trends Biotechnol* **2015**, *33*, 141-144.
- [19] C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell* **1990**, *2*, 279-289.
- [20] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, *75*, 843-854.
- [21] M. M. Waldrop, *Science* **1989**, *246*, 325.
- [22] R. W. Carthew, E. J. Sontheimer, *Cell* **2009**, *136*, 642-655.
- [23] M. Gooding, M. Malhotra, J. C. Evans, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *Eur J Pharm Biopharm* **2016**, *107*, 321-340.
- [24] M. T. Tse, *Nat Rev Drug Discov* **2012**, *11*, 674.
- [25] C. C. Mello, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985-6994.
- [26] aP. M. Waterhouse, M. B. Wang, T. Lough, *Nature* **2001**, *411*, 834-842; bO. Voinnet, *Trends Genet* **2001**, *17*, 449-459; cC. Wilkins, R. Dishongh, S. C. Moore, M. A. Whitt, M. Chow, K. Machaca, *Nature* **2005**, *436*, 1044-1047; dX. H. Wang, R. Aliyari, W. X. Li, H. W. Li, K. Kim, R. Carthew, P. Atkinson, S. W. Ding, *Science* **2006**, *312*, 452-454.
- [27] T. M. Rana, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 23-36.
- [28] aV. Ambros, *Nature* **2004**, *431*, 350-355; bE. J. Sontheimer, R. W. Carthew, *Cell* **2005**, *122*, 9-12.
- [29] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Science* **2001**, *294*, 853-858.

- [30] A. Kozomara, S. Griffiths-Jones, *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, D152-157.
- [31] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, V. N. Kim, *EMBO J* **2004**, *23*, 4051-4060.
- [32] S. Lin, R. I. Gregory, *Nat Rev Cancer* **2015**, *15*, 321-333.
- [33] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281-297.
- [34] aR. I. Gregory, K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, R. Shiekhattar, *Nature* **2004**, *432*, 235-240; bA. M. Denli, B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting, G. J. Hannon, *Nature* **2004**, *432*, 231-235.
- [35] M. T. Bohnsack, K. Czaplinski, D. Gorlich, *RNA* **2004**, *10*, 185-191.
- [36] Y. Tomari, P. D. Zamore, *Genes Dev* **2005**, *19*, 517-529.
- [37] aM. Robbins, A. Judge, I. MacLachlan, *Oligonucleotides* **2009**, *19*, 89-102; bM. J. Clemens, A. Elia, *J Interferon Cytokine Res* **1997**, *17*, 503-524.
- [38] H. Scott M, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5822-5829.
- [39] I. J. Macrae, K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. N. Brooks, W. Z. Cande, P. D. Adams, J. A. Doudna, *Science* **2006**, *311*, 195-198.
- [40] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- [41] S. Weitzer, J. Martinez, *Nature* **2007**, *447*, 222-226.
- [42] T. P. Chendrimada, R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, R. Shiekhattar, *Nature* **2005**, *436*, 740-744.
- [43] E. J. Sontheimer, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, *6*, 127-138.
- [44] G. Meister, T. Tuschl, *Nature* **2004**, *431*, 343-349.
- [45] C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, P. D. Zamore, *Cell* **2005**, *123*, 607-620.
- [46] 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.
- [47] J. Kurreck, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378-1398.
- [48] G. Hutvagner, P. D. Zamore, *Science* **2002**, *297*, 2056-2060.
- [49] aR. I. Gregory, T. P. Chendrimada, N. Cooch, R. Shiekhattar, *Cell* **2005**, *123*, 631-640; bJ. Liu, M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon, R. Parker, *Nat Cell Biol* **2005**, *7*, 719-723.
- [50] E. C. Lai, *Nat Genet* **2002**, *30*, 363-364.
- [51] C. Zhang, *Curr Opin Mol Ther* **2009**, *11*, 641-651.
- [52] H. B. Houbaviy, M. F. Murray, P. A. Sharp, *Dev Cell* **2003**, *5*, 351-358.
- [53] N. Xu, T. Papagiannakopoulos, G. Pan, J. A. Thomson, K. S. Kosik, *Cell* **2009**, *137*, 647-658.
- [54] Y. Cheng, X. Liu, J. Yang, Y. Lin, D. Z. Xu, Q. Lu, E. A. Deitch, Y. Huo, E. S. Delphin, C. Zhang, *Circ Res* **2009**, *105*, 158-166.
- [55] C. Esau, X. Kang, E. Peralta, E. Hanson, E. G. Marcusson, L. V. Ravichandran, Y. Sun, S. Koo, R. J. Perera, R. Jain, N. M. Dean, S. M. Freier, C. F. Bennett, B. Lollo, R. Griffey, *J Biol Chem* **2004**, *279*, 52361-52365.
- [56] I. Naguibneva, M. Ameyar-Zazoua, A. Polesskaya, S. Ait-Si-Ali, R. Groisman, M. Souidi, S. Cuvelier, A. Harel-Bellan, *Nat Cell Biol* **2006**, *8*, 278-284.
- [57] M. T. Le, H. Xie, B. Zhou, P. H. Chia, P. Rizk, M. Um, G. Udolph, H. Yang, B. Lim, H. F. Lodish, *Mol Cell Biol* **2009**, *29*, 5290-5305.
- [58] aD. Huangfu, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, M. Snitow, A. E. Chen, D. A. Melton, *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 795-797; bD. Huangfu, K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, W. Muhlestein, D. A. Melton, *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1269-1275.
- [59] K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell* **2006**, *126*, 663-676.
- [60] J. E. Babiarz, J. G. Ruby, Y. Wang, D. P. Bartel, R. Blelloch, *Genes Dev* **2008**, *22*, 2773-2785.
- [61] R. L. Judson, J. E. Babiarz, M. Venere, R. Blelloch, *Nat Biotechnol* **2009**, *27*, 459-461.
- [62] F. Anokye-Danso, C. M. Trivedi, D. Juhr, M. Gupta, Z. Cui, Y. Tian, Y. Zhang, W. Yang, P. J. Gruber, J. A. Epstein, E. E. Morrisey, *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 376-388.
- [63] L. Warren, P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y. H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandal, Z. D. Smith, A. Meissner, G. Q. Daley, A. S. Brack, J. J. Collins, C. Cowan, T. M. Schlaeger, D. J. Rossi, *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 618-630.

- [64] aA. Moretti, M. Bellin, C. B. Jung, T. M. Thies, Y. Takashima, A. Bernshausen, M. Schiemann, S. Fischer, S. Moosmang, A. G. Smith, J. T. Lam, K. L. Laugwitz, *FASEB J* **2010**, 24, 700-711; bA. Moretti, M. Bellin, A. Welling, C. B. Jung, J. T. Lam, L. Bott-Flugel, T. Dorn, A. Goedel, C. Hohnke, F. Hofmann, M. Seyfarth, D. Sinnecker, A. Schomig, K. L. Laugwitz, *N Engl J Med* **2010**, 363, 1397-1409; cA. Raya, I. Rodriguez-Piza, S. Navarro, Y. Richaud-Patin, G. Guenechea, A. Sanchez-Danes, A. Consiglio, J. Bueren, J. C. Izpisua Belmonte, *Nat Protoc* **2010**, 5, 647-660; dK. Si-Tayeb, F. K. Noto, M. Nagaoka, J. Li, M. A. Battle, C. Duris, P. E. North, S. Dalton, S. A. Duncan, *Hepatology* **2010**, 51, 297-305.
- [65] aM. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Curr Biol* **2002**, 12, 735-739; bC. Conaco, S. Otto, J. J. Han, G. Mandel, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 2422-2427; cM. Deo, J. Y. Yu, K. H. Chung, M. Tippens, D. L. Turner, *Dev Dyn* **2006**, 235, 2538-2548.
- [66] N. Ballas, C. Grunseich, D. D. Lu, J. C. Speh, G. Mandel, *Cell* **2005**, 121, 645-657.
- [67] D. L. Black, *Annu Rev Biochem* **2003**, 72, 291-336.
- [68] aD. D. Licatalosi, R. B. Darnell, *Neuron* **2006**, 52, 93-101; bD. Lipscombe, *Curr Opin Neurobiol* **2005**, 15, 358-363.
- [69] aL. C. Cheng, E. Pastrana, M. Tavazoie, F. Doetsch, *Nat Neurosci* **2009**, 12, 399-408; bY. Watanabe, S. Kameoka, V. Gopalakrishnan, K. D. Aldape, Z. Z. Pan, F. F. Lang, S. Majumder, *Genes Dev* **2004**, 18, 889-900.
- [70] aI. Amit, M. Garber, N. Chevrier, A. P. Leite, Y. Donner, T. Eisenhaure, M. Guttman, J. K. Grenier, W. Li, O. Zuk, L. A. Schubert, B. Birditt, T. Shay, A. Goren, X. Zhang, Z. Smith, R. Deering, R. C. McDonald, M. Cabili, B. E. Bernstein, J. L. Rinn, A. Meissner, D. E. Root, N. Hacohen, A. Regev, *Science* **2009**, 326, 257-263; bG. C. Coutinho-Mansfield, Y. Xue, Y. Zhang, X. D. Fu, *Genes Dev* **2007**, 21, 1573-1577; cA. Carracedo, P. P. Pandolfi, *Oncogene* **2008**, 27, 5527-5541; dK. L. Auld, P. A. Silver, *Cell Cycle* **2006**, 5, 1503-1505.
- [71] A. K. Leung, P. A. Sharp, *Mol Cell* **2010**, 40, 205-215.
- [72] Q. Ali, M. K. Daud, M. Z. Haider, S. Ali, M. Rizwan, N. Aslam, A. Noman, N. Iqbal, F. Shahzad, F. Deeba, I. Ali, S. J. Zhu, *Plant Physiol Biochem* **2017**, 119, 50-58.
- [73] D. P. Bebber, S. J. Gurr, *Fungal Genet Biol* **2015**, 74, 62-64.
- [74] A. Younis, M. I. Siddique, C. K. Kim, K. B. Lim, *Int J Biol Sci* **2014**, 10, 1150-1158.
- [75] S. Saurabh, A. S. Vidyarthi, D. Prasad, *Planta* **2014**, 239, 543-564.
- [76] A. Khalid, Q. Zhang, M. Yasir, F. Li, *Front Microbiol* **2017**, 8, 43.
- [77] M. J. Axtell, *Annu Rev Plant Biol* **2013**, 64, 137-159.
- [78] aN. P. Achkar, D. A. Cambiagno, P. A. Manavella, *Trends Plant Sci* **2016**, 21, 1034-1044; bA. Molnar, C. Melnyk, D. C. Baulcombe, *Genome Biol* **2011**, 12, 215; cL. Wu, Q. Zhang, H. Zhou, F. Ni, X. Wu, Y. Qi, *Plant Cell* **2009**, 21, 3421-3435; dL. Wu, H. Zhou, Q. Zhang, J. Zhang, F. Ni, C. Liu, Y. Qi, *Mol Cell* **2010**, 38, 465-475; eM. Megraw, J. S. Cumbie, M. G. Ivanchenko, S. A. Filichkin, *Plant Cell* **2016**, 28, 286-303; fM. A. Matzke, T. Kanno, A. J. Matzke, *Annu Rev Plant Biol* **2015**, 66, 243-267.
- [79] aK. Yamada, J. Lim, J. M. Dale, H. Chen, P. Shinn, C. J. Palm, A. M. Southwick, H. C. Wu, C. Kim, M. Nguyen, P. Pham, R. Cheuk, G. Karlin-Newmann, S. X. Liu, B. Lam, H. Sakano, T. Wu, G. Yu, M. Miranda, H. L. Quach, M. Tripp, C. H. Chang, J. M. Lee, M. Toriumi, M. M. Chan, C. C. Tang, C. S. Onodera, J. M. Deng, K. Akiyama, Y. Ansari, T. Arakawa, J. Banh, F. Banno, L. Bowser, S. Brooks, P. Carninci, Q. Chao, N. Choy, A. Enju, A. D. Goldsmith, M. Gurjal, N. F. Hansen, Y. Hayashizaki, C. Johnson-Hopson, V. W. Hsuan, K. Iida, M. Karnes, S. Khan, E. Koesema, J. Ishida, P. X. Jiang, T. Jones, J. Kawai, A. Kamiya, C. Meyers, M. Nakajima, M. Narusaka, M. Seki, T. Sakurai, M. Satou, R. Tamse, M. Vaysberg, E. K. Wallender, C. Wong, Y. Yamamura, S. Yuan, K. Shinozaki, R. W. Davis, A. Theologis, J. R. Ecker, *Science* **2003**, 302, 842-846; bY. Zhang, X. S. Liu, Q. R. Liu, L. Wei, *Nucleic Acids Res* **2006**, 34, 3465-3475.
- [80] O. Borsani, J. Zhu, P. E. Verslues, R. Sunkar, J. K. Zhu, *Cell* **2005**, 123, 1279-1291.
- [81] aE. Zubko, P. Meyer, *Plant J* **2007**, 52, 1131-1139; bM. Ron, M. Alandete Saez, L. Eshed Williams, J. C. Fletcher, S. McCormick, *Genes Dev* **2010**, 24, 1010-1021.
- [82] Q. Fei, R. Xia, B. C. Meyers, *Plant Cell* **2013**, 25, 2400-2415.
- [83] aX. Song, D. Wang, L. Ma, Z. Chen, P. Li, X. Cui, C. Liu, S. Cao, C. Chu, Y. Tao, X. Cao, *Plant J* **2012**, 71, 378-389; bC. Johnson, A. Kasprzewska, K. Tennessem, J. Fernandes, G. L.

- Nan, V. Walbot, V. Sundaresan, V. Vance, L. H. Bowman, *Genome Res* **2009**, *19*, 1429-1440; cR. Komiya, *J Plant Res* **2017**, *130*, 17-23.
- [84] aF. F. Felippes, D. Weigel, *EMBO Rep* **2009**, *10*, 264-270; bR. Rajagopalan, H. Vaucheret, J. Trejo, D. P. Bartel, *Genes Dev* **2006**, *20*, 3407-3425; cM. J. Axtell, C. Jan, R. Rajagopalan, D. P. Bartel, *Cell* **2006**, *127*, 565-577.
- [85] aJ. Liu, X. Cheng, D. Liu, W. Xu, R. Wise, Q. H. Shen, *PLoS Genet* **2014**, *10*, e1004755; bX. M. Wu, S. J. Kou, Y. L. Liu, Y. N. Fang, Q. Xu, W. W. Guo, *Plant Biotechnol J* **2015**, *13*, 383-394; cY. Liu, L. Ke, G. Wu, Y. Xu, X. Wu, R. Xia, X. Deng, Q. Xu, *Plant J* **2017**, *92*, 263-275.
- [86] Q. Guo, Q. Liu, N. A. Smith, G. Liang, M. B. Wang, *Curr Genomics* **2016**, *17*, 476-489.
- [87] P. S. Jaiwal, L.; Singh,N. D.; Singh,R. P., *Curr. Sci.* **2002**, *83*, 128-136.
- [88] A. Dalakouras, M. Wassnenegger, J. N. McMillan, V. Cardoza, I. Maegele, E. Dadami, M. Runne, G. Krczal, M. Wassnenegger, *Front Plant Sci* **2016**, *7*, 1327.
- [89] S. Osorio, R. Alba, C. M. Damasceno, G. Lopez-Casado, M. Lohse, M. I. Zanor, T. Tohge, B. Usadel, J. K. Rose, Z. Fei, J. J. Giovannoni, A. R. Fernie, *Plant Physiol* **2011**, *157*, 405-425.
- [90] A. S. Xiong, Q. H. Yao, R. H. Peng, X. Li, P. L. Han, H. Q. Fan, *Plant Cell Rep* **2005**, *23*, 639-646.
- [91] R. G. Atkinson, K. Gunaseelan, M. Y. Wang, L. Luo, T. Wang, C. L. Norling, S. L. Johnston, R. Maddumage, R. Schroder, R. J. Schaffer, *J Exp Bot* **2011**, *62*, 3821-3835.
- [92] S. G. Johansson, T. Bieber, R. Dahl, P. S. Friedmann, B. Q. Lanier, R. F. Lockey, C. Motala, J. A. Ortega Martell, T. A. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. Van Cauwenberge, H. C. Williams, *J Allergy Clin Immunol* **2004**, *113*, 832-836.
- [93] L. J. Gilissen, S. T. Bolhaar, C. I. Matos, G. J. Rouwendal, M. J. Boone, F. A. Krens, L. Zuidmeer, A. Van Leeuwen, J. Akkerdaas, K. Hoffmann-Sommergruber, A. C. Knulst, D. Bosch, W. E. Van de Weg, R. Van Ree, *J Allergy Clin Immunol* **2005**, *115*, 364-369.
- [94] H. W. Dodo, K. N. Konan, F. C. Chen, M. Egnin, O. M. Viquez, *Plant Biotechnol J* **2008**, *6*, 135-145.
- [95] S. Y. Gao, Q. J. Wang, Y. B. Ji, *World J Gastroenterol* **2006**, *12*, 3359-3367.
- [96] S. Sawai, K. Ohyama, S. Yasumoto, H. Seki, T. Sakuma, T. Yamamoto, Y. Takebayashi, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Aoki, T. Muranaka, K. Saito, N. Umemoto, *Plant Cell* **2014**, *26*, 3763-3774.
- [97] C. Simon-Mateo, J. A. Garcia, *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1809*, 722-731.
- [98] S. W. Ding, *Curr Opin Biotechnol* **2000**, *11*, 152-156.
- [99] aI. B. Andika, H. Kondo, T. Tamada, *Mol Plant Microbe Interact* **2005**, *18*, 194-204; bA. K. Missiou, K.; Boutla, A.; Tzortzakaki, S.; Tabler, M.; Tsagris, M., *Molecular Breeding* **2004**, *14*, 185-197.
- [100] J. S. Whangbo, C. P. Hunter, *Trends Genet* **2008**, *24*, 297-305.
- [101] aT. Sijen, J. Fleenor, F. Simmer, K. L. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R. H. Plasterk, A. Fire, *Cell* **2001**, *107*, 465-476; bI. Nuez, M. A. Felix, *PLoS One* **2012**, *7*, e29811.
- [102] M. Darrington, T. Dalmary, N. I. Morrison, T. Chapman, *Entomol Exp Appl* **2017**, *164*, 155-175.
- [103] D. L. McEwan, A. S. Weisman, C. P. Hunter, *Mol Cell* **2012**, *47*, 746-754.
- [104] J. Li, T. C. Todd, H. N. Trick, *Plant Cell Rep* **2010**, *29*, 113-123.
- [105] S. R. Tamilarasan, M. V., *Cell Dev Biol* **2013**, *2*.
- [106] K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 129-138.
- [107] L. Aagaard, J. J. Rossi, *Adv Drug Deliv Rev* **2007**, *59*, 75-86.
- [108] A. L. Jackson, J. Burchard, J. Schelter, B. N. Chau, M. Cleary, L. Lim, P. S. Linsley, *RNA* **2006**, *12*, 1179-1187.
- [109] J. X. Wei, J. Yang, J. F. Sun, L. T. Jia, Y. Zhang, H. Z. Zhang, X. Li, Y. L. Meng, L. B. Yao, A. G. Yang, *PLoS One* **2009**, *4*, e5382.
- [110] L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell, *Nature* **2001**, *413*, 732-738.
- [111] S. Li, G. A. Peters, K. Ding, X. Zhang, J. Qin, G. C. Sen, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 10005-10010.
- [112] T. Kawai, S. Akira, *Ann NY Acad Sci* **2008**, *1143*, 1-20.

- [113] aL. Cekaite, G. Furset, E. Hovig, M. Sioud, *J Mol Biol* **2007**, *365*, 90-108; bS. Hamm, E. Latz, D. Hangel, T. Muller, P. Yu, D. Golenbock, T. Sparwasser, H. Wagner, S. Bauer, *Immunobiology* **2010**, *215*, 559-569.
- [114] aJ. Elmen, 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; bN. Langkjaer, A. Pasternak, J. Wengel, *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*, 5420-5425.
- [115] aO. R. Mook, F. Baas, M. B. de Wissel, K. Fluiter, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 833-843; bJ. 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.
- [116] aM. Monaghan, A. Pandit, *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, *63*, 197-208; bA. de Fougerolles, H. P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 443-453; cM. P. Czech, M. Aouadi, G. J. Tesz, *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *7*, 473-484; dK. Tiemann, J. J. Rossi, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 142-151; eD. Castanotto, J. J. Rossi, *Nature* **2009**, *457*, 426-433.
- [117] D. Ferber, *Science* **2001**, *294*, 1638-1642.
- [118] C. X. Li, A. Parker, E. Menocal, S. Xiang, L. Borodyansky, J. H. Fruehauf, *Cell Cycle* **2006**, *5*, 2103-2109.
- [119] aY. Ding, Z. Jiang, K. Saha, C. S. Kim, S. T. Kim, R. F. Landis, V. M. Rotello, *Mol Ther* **2014**, *22*, 1075-1083; bH. Meng, M. Liong, T. Xia, Z. Li, Z. Ji, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2010**, *4*, 4539-4550; cA. T. Press, A. Traeger, C. Pietsch, A. Mosig, M. Wagner, M. G. Clemens, N. Jbeily, N. Koch, M. Gottschaldt, N. Beziere, V. Ermolayev, V. Ntziachristos, J. Popp, M. M. Kessels, B. Qualmann, U. S. Schubert, M. Bauer, *Nat Commun* **2014**, *5*, 5565.
- [120] aV. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *120*, 1402 - 1416; bC. Scholz, E. Wagner, *J Control Release* **2012**, *161*, 554-565.
- [121] aA. V. Kabanov, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1597-1621; bS. Akhtar, I. Benter, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 164-182.
- [122] M. J. Tiera, F. O. Winnik, J. C. Fernandes, *Curr. Gene Ther.* **2006**, *6*, 59-71.
- [123] aO. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7297-7301; bB. Abdallah, A. Hassan, C. Benoist, D. Goula, J. P. Behr, B. A. Demeneix, *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 1947-1954; cS.-M. Zou, P. Erbacher, J.-S. Remy, J.-P. Behr, *J. Gene Med.* **2000**, *2*, 128-134.
- [124] B. Urban-Klein, S. Werth, S. Abuharbeid, F. Czubayko, A. Aigner, *Gene therapy* **2004**, *12*, 461-466.
- [125] F. Liu, C. Wang, Y. Gao, X. Li, F. Tian, Y. Zhang, M. Fu, P. Li, Y. Wang, F. Wang, *Mol Diagn Ther* **2018**.
- [126] aA. Kichler, C. Leborgne, E. Coeytaux, O. Danos, *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 135-144; bN. D. Sonawane, F. C. Szoka, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44826-44831; cA. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, R. Langer, *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 657-663; dY. Xu, F. C. Szoka, Jr., *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616-5623.
- [127] aL. Wightman, R. Kircheis, V. Rössler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kursa, E. Wagner, *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 362-372; bS. Werth, B. Urban-Klein, L. Dai, S. Höbel, M. Grzelinski, U. Bakowsky, F. Czubayko, A. Aigner, *J. Controlled Release* **2006**, *112*, 257-270; cV. Russ, H. Elfberg, C. Thoma, J. Kloeckner, M. Ogris, E. Wagner, *Gene therapy* **2007**, *15*, 18-29; dY. Omidi, A. J. Hollins, M. Benboubetra, R. Drayton, I. F. Benter, S. Akhtar, *J. Drug Target* **2003**, *11*, 311-323.
- [128] aH. Hatakeyama, H. Akita, H. Harashima, *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, *63*, 152-160; bF. Liu, L. Huang, *J Control Release* **2002**, *78*, 259-266.
- [129] M. G. Stanton, S. L. Colletti, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7887-7901.
- [130] O. Zelphati, F. C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 11493-11498.
- [131] aA. D. Judge, V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 457-462; bH. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100-109; cR. Kedmi, N. Ben-Arie, D. Peer, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6867-6875.
- [132] Y. Jiang, R. Tang, B. Duncan, Z. Jiang, B. Yan, R. Mout, V. M. Rotello, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 506-510.
- [133] aH. J. Gabius, H. C. Siebert, S. Andre, J. Jimenez-Barbero, H. Rudiger, *Chembiochem* **2004**, *5*, 740-764; bA. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.

- [134] T. S. Zatsepin, T. S. Oretskaya, *Chem Biodivers* **2004**, *1*, 1401-1417.
- [135] aF. Staud, M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1427*, 183-192; bA. N. Zelensky, J. E. Gready, *FEBS J* **2005**, *272*, 6179-6217.
- [136] L. Zhu, Z. Ye, K. Cheng, D. D. Miller, R. I. Mahato, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *19*, 290-298.
- [137] L. Zhu, R. I. Mahato, *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21*, 2119-2127.
- [138] E. Vengut-Climent, M. Terrazas, R. Lucas, M. Arevalo-Ruiz, R. Eritja, J. C. Morales, *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, *23*, 4048-4051.
- [139] A. Aviñó, S. Ocampo, R. Lucas, J. Reina, J. Morales, J. Perales, R. Eritja, *Mol. Diversity* **2011**, *15*, 751-757.
- [140] aY. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327; bY. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lonngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lonn, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 199-202; cJ. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578; dY. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lonngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lonn, *J Biol Chem* **1983**, *258*, 199-202.
- [141] aM. Dubber, J. M. J. Fréchet, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *14*, 239-246; bB. a. Ugarte-Uribe, S. Pérez-Rentero, R. Lucas, A. Aviñó, J. J. Reina, I. Alkorta, R. n. Eritja, J. C. Morales, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1280-1287; cJ. C. Morales, J. J. Reina, I. Díaz, A. Aviñó, P. M. Nieto, R. Eritja, *Chem.--Eur. J.* **2008**, *14*, 7828-7835; dM. A. Maier, C. G. Yannopoulos, N. Mohamed, A. Roland, H. Fritz, V. Mohan, G. Just, M. Manoharan, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *14*, 18-29; eY. Singh, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.
- [142] A. Avino, S. M. Ocampo, R. Lucas, J. J. Reina, J. C. Morales, J. C. Perales, R. Eritja, *Mol Divers* **2011**, *15*, 751-757.
- [143] J. K. Nair, J. L. Willoughby, A. Chan, K. Charisse, M. R. Alam, Q. Wang, M. Hoekstra, P. Kandasamy, A. V. Kel'in, S. Milstein, N. Taneja, J. O'Shea, S. Shaikh, L. Zhang, R. J. van der Sluis, M. E. Jung, A. Akinc, R. Hutabarat, S. Kuchimanchi, K. Fitzgerald, T. Zimmermann, T. J. van Berkel, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Manoharan, *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 16958-16961.
- [144] aC. Yan, R. H. Costa, J. E. Darnell, Jr., J. D. Chen, T. A. Van Dyke, *EMBO J* **1990**, *9*, 869-878; bK. Higuchi, J. C. Monge, N. Lee, S. W. Law, H. B. Brewer, Jr., A. Y. Sakaguchi, S. L. Naylor, *Biochem Biophys Res Commun* **1987**, *144*, 1332-1339.
- [145] M. Manoharan, K. L. Tivel, T. P. Condon, L. K. Andrade, I. Barber-Peoch, G. Inamati, S. Shah, V. Mohan, M. J. Graham, C. F. Bennett, S. T. Crooke, P. D. Cook, *Nucleosid. Nucleotid.* **1997**, *16*, 1129-1138.
- [146] aH. Jeon, S. C. Blacklow, in *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 74, Annual Reviews, Palo Alto, **2005**, pp. 535-562; bA. Nykjaer, T. E. Willnow, *Trends Cell Biol.* **2002**, *12*, 273-280; cA. Patwa, A. Gissot, I. Bestel, P. Barthelemy, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5844-5854.
- [147] C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H. P. Vornlocher, C. Unverzagt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4975-4977.
- [148] N. S. Petrova, I. V. Chernikov, M. I. Meschaninova, I. S. Dovydenko, A. G. Venyaminova, M. A. Zenkova, V. V. Vlassov, E. L. Chernolovskaya, *Nucleic Acids Res.* **2011**.
- [149] 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.
- [150] C. R. Dass, *J Pharm Pharmacol* **2002**, *54*, 593-601.
- [151] S. L. Hofmann, D. W. Russell, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 6312-6316.
- [152] J. F. Alterman, L. M. Hall, A. H. Coles, M. R. Hassler, M. C. Didiot, K. Chase, J. Abraham, E. Sottosanti, E. Johnson, E. Sapp, M. F. Osborn, M. Difiglia, N. Aronin, A. Khvorova, *Mol Ther Nucleic Acids* **2015**, *4*, e266.
- [153] M. Hällbrink, A. Florén, A. Elmquist, M. Pooga, T. Bartfai, Ü. Langel, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1515*, 101-109.
- [154] K. Nishina, T. Unno, Y. Uno, T. Kubodera, T. Kanouchi, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 734-740.
- [155] K. Nishina, T. Unno, Y. Uno, T. Kubodera, T. Kanouchi, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol Ther* **2008**, *16*, 734-740.

- [156] J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K. K. Conzelmann, T. Carell, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 12330-12333.
- [157] 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.
- [158] aL. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, T. I. Bonner, *Nature* **1990**, *346*, 561-564; bC. C. Felder, K. E. Joyce, E. M. Briley, J. Mansouri, K. Mackie, O. Blond, Y. Lai, A. L. Ma, R. L. Mitchell, *Mol Pharmacol* **1995**, *48*, 443-450.
- [159] aA. B. Lynn, M. Herkenham, *J Pharmacol Exp Ther* **1994**, *268*, 1612-1623; bL. Facci, R. Dal Toso, S. Romanello, A. Buriani, S. D. Skaper, A. Leon, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 3376-3380.
- [160] aC. J. Hillard, W. S. Edgemon, A. Jarrahian, W. B. Campbell, *J Neurochem* **1997**, *69*, 631-638; bB. F. Cravatt, K. Demarest, M. P. Patricelli, M. H. Brace, D. K. Giang, B. R. Martin, A. H. Lichtman, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 9371-9376.
- [161] aF. Fezza, S. Oddi, M. Di Tommaso, C. De Simone, C. Rapino, N. Pasquariello, E. Dainese, A. Finazzi-Agro, M. Maccarrone, *J Lipid Res* **2008**, *49*, 1216-1223; bS. Muthian, K. Nithipatikom, W. B. Campbell, C. J. Hillard, *J Pharmacol Exp Ther* **2000**, *293*, 289-295.
- [162] M. Beltramo, E. di Tommaso, D. Piomelli, *FEBS Lett* **1997**, *403*, 263-267.
- [163] S. H. Ku, S. D. Jo, Y. K. Lee, K. Kim, S. H. Kim, *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *104*, 16-28.
- [164] C. M. Paulos, J. A. Reddy, C. P. Leamon, M. J. Turk, P. S. Low, *Mol Pharmacol* **2004**, *66*, 1406-1414.
- [165] 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.
- [166] aA. Nath, K. L. Tyler, *Annals of neurology* **2013**, *74*, 412-422; bI. Posadas, F. J. Guerra, V. Cena, *Nanomedicine (Lond)* **2010**, *5*, 1219-1236.
- [167] aY.-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; bG. 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; cE. 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; dP. 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.
- [168] Y. Ando, T. Coelho, J. L. Berk, M. W. Cruz, B. G. Ericzon, S. Ikeda, W. D. Lewis, L. Obici, V. Plante-Bordeneuve, C. Rapezzi, G. Said, F. Salvi, *Orphanet J Rare Dis* **2013**, *8*, 31.
- [169] D. A. Braasch, Z. Paroo, A. Constantinescu, G. Ren, O. K. Oz, R. P. Mason, D. R. Corey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1139-1143.
- [170] aD. Adams, C. Cauquil, C. Labeyrie, *Curr Opin Neurol* **2017**, *30*, 481-489; bB. Bettencourt, *US10060921B2* **2018**, Alnylam Pharmaceuticals Inc.
- [171] aT. Coelho, D. Adams, A. Silva, P. Lozeron, P. N. Hawkins, T. Mant, J. Perez, J. Chiesa, S. Warrington, E. Tranter, M. Munisamy, R. Falzone, J. Harrop, J. Cehelsky, B. R. Bettencourt, M. Geissler, J. S. Butler, A. Sehgal, R. E. Meyers, Q. Chen, T. Borland, R. M. Hutabarat, V. A. Clausen, R. Alvarez, K. Fitzgerald, C. Gamba-Vitalo, S. V. Nochur, A. K. Vaishnaw, D. W. Sah, J. A. Gollob, O. B. Suhr, *N Engl J Med* **2013**, *369*, 819-829; bO. B. Suhr, T. Coelho, J. Buades, J. Pouget, I. Conceicao, J. Berk, H. Schmidt, M. Waddington-Cruz, J. M. Campistol, B. R. Bettencourt, A. Vaishnaw, J. Gollob, D. Adams, *Orphanet J Rare Dis* **2015**, *10*, 109.
- [172] S. T. Crooke, J. L. Witztum, C. F. Bennett, B. F. Baker, *Cell Metab* **2018**, *27*, 714-739.
- [173] aK. G. Rajeev, *WO 2015/042564 A1* **2015**, Alnylan Pharmaceuticals; bA. Akin, *US20170159053A1* **2015**, Genzyme Corp.
- [174] P. G. M. V. Ragni, T. Mant, M. D. Creagh, T. Lissitchkov, D. Bevan, S. Austin, C. R. Hay, I. Hegemann, R. Kazmi, et al., *Blood* **2016**, *128*, 2572.
- [175] N. Machin, M. V. Ragni, *J Blood Med* **2018**, *9*, 135-140.
- [176] J. K. Nair, H. Attarwala, A. Sehgal, Q. Wang, K. Aluri, X. Zhang, M. Gao, J. Liu, R. Indrakanti, S. Schofield, P. Kretschmer, C. R. Brown, S. Gupta, J. L. S. Willoughby, J. A.

- Boshar, V. Jadhav, K. Charisse, T. Zimmermann, K. Fitzgerald, M. Manoharan, K. G. Rajeev, A. Akinc, R. Hutabarat, M. A. Maier, *Nucleic Acids Res* **2017**, *45*, 10969-10977.
- [177] aA. Akbarzadeh, R. Khalilov, E. Mostafavi, N. Annabi, E. Abasi, T. Kafshdooz, R. Herizchi, T. Kavetskyy, S. Saghi, A. Nasibova, S. Davaran, *Exp Oncol* **2018**, *40*, 178-183; bI. A. Khalil, Y. Yamada, H. Harashima, *Expert Opin Drug Deliv* **2018**, *15*, 1053-1065.
- [178] T. Carell, **2015**, WO/2015/107115.
- [179] M. Durymanov, J. Reineke, *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 971.
- [180] aG. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 1398-1399; bJ. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org Lett* **2006**, *8*, 3639-3642; cP. M. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- [181] J. Willibald, PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München **2013**.
- [182] E. R. Wilson, M. B. Frankel, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3211-3212.
- [183] T. C. Shiao, R. Rej, M. Rose, G. M. Pavan, R. Roy, *Molecules* **2016**, *21*, 448.
- [184] J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330-12333.
- [185] M. J. McFarland, E. L. Barker, *Pharmacol Ther* **2004**, *104*, 117-135.
- [186] aM. Herkenham, A. B. Lynn, B. R. de Costa, E. K. Richfield, *Brain Res.* **1991**, *547*, 267-274; bB. F. Thomas, X. Wei, B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *263*, 1383-1390; cT. M. Westlake, A. C. Howlett, T. I. Bonner, L. A. Matsuda, M. Herkenham, *Neuroscience* **1994**, *63*, 637-652.
- [187] aC. P. Leamon, P. S. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 5572-5576; bW. Xia, P. S. Low, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6811-6824.
- [188] P. J. Stover, *Nutr. Rev.* **2004**, *62*, S3-S12.
- [189] A. Antony, *Blood* **1992**, *79*, 2807-2820.
- [190] aR. Zhao, S. H. Min, Y. Wang, E. Campanella, P. S. Low, I. D. Goldman, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4267-4274; bA. 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.
- [191] B. A. Kamen, A. Capdevila, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 5983-5987.
- [192] aH. Elnakat, M. Ratnam, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1067-1084; bM. A. Salazar, M. Ratnam, *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 141-152; cS. Chatterjee, E. R. Smith, K. Hanada, V. L. Stevens, S. Mayor, *EMBO J.* **2001**, *20*, 1583-1592; dS. Sabharanjak, S. Mayor, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1099-1109; eJ. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J.-X. Cheng, P. S. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13872-13877; fJ. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J.-X. Cheng, P. S. Low, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 462-468.
- [193] S. G. Patching, *Mol Neurobiol* **2017**, *54*, 1046-1077.
- [194] A. K. Bresinsky, C.; Kadereit, J. W.; Neuhaus, G.; Sonnewald, U., *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg* **2008**.
- [195] L. Z. Taiz, E., *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg* **1999**.
- [196] M. Buttner, *FEBS Lett* **2007**, *581*, 2318-2324.
- [197] R. S. Mahla, *Int J Cell Biol* **2016**, *2016*, 6940283.
- [198] C. Mason, P. Dunnill, *Regen Med* **2008**, *3*, 1-5.
- [199] M. Caiazzo, M. T. Dell'Anno, E. Dvoretskova, D. Lazarevic, S. Taverna, D. Leo, T. D. Sotnikova, A. Menegon, P. Roncaglia, G. Colciago, G. Russo, P. Carninci, G. Pezzoli, R. R. Gainetdinov, S. Gustincich, A. Dityatev, V. Broccoli, *Nature* **2011**, *476*, 224-227.
- [200] R. Spellman, C. W. Smith, *Trends Biochem Sci* **2006**, *31*, 73-76.
- [201] aT. J. Price, G. Helesic, D. Parghi, K. M. Hargreaves, C. M. Flores, *Neuroscience* **2003**, *120*, 155-162; bG. Moldrich, T. Wenger, *Peptides* **2000**, *21*, 1735-1742.
- [202] C. Fede, G. Albertin, L. Petrelli, M. M. Sfriso, C. Biz, R. De Caro, C. Stecco, *Eur J Histochem* **2016**, *60*, 2643.
- [203] aZ. X. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2590-2605; bJ. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *Small* **2010**, *6*, 1952-1967; cJ. M. Rosenholm, V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Linden, *Nanomedicine* **2012**, *7*, 111-120; dC. Argyo, V. Weiss, C. Bräuchle, T. Bein, *Chemistry of Materials* **2014**, *26*, 435-451; eA. Ott, X. Yu, R. Hartmann, J. Rejman, A. Schutz, M. Ochs, W. J. Parak, S. Carregal-Romero, *Chemistry of Materials* **2015**, *27*, 1929-1942.

- [204] aN. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem Biol* **2006**, *1*, 644-648; bJ. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem Soc Rev* **2010**, *39*, 1272-1279; cJ. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [205] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [206] aJ. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. Hendriks, F. P. Rutjes, J. C. van Hest, D. J. Lefever, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422-9425; bX. Ning, R. P. Temming, J. Dommerholt, J. Guo, D. B. Ania, M. F. Debets, M. A. Wolfert, G. J. Boons, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3065-3068; cC. P. Ramil, Q. Lin, *Chem Commun (Camb)* **2013**, *49*, 11007-11022.
- [207] aM. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 13518-13519; bN. K. Devaraj, R. Weissleder, *Acc Chem Res* **2011**, *44*, 816-827; cN. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [208] aM. Vrabel, P. Kolle, K. M. Brunner, M. J. Gattner, V. Lopez-Carrillo, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Chemistry* **2013**, *19*, 13309-13312; bR. A. C. a. R. V. L. Jr., *J Am Chem Soc* **1959**, *81*, 4342-4346.
- [209] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [210] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chemical Communications* **2010**, *46*, 1589-1600.
- [211] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjug Chem* **2011**, *22*, 2263-2270.
- [212] A. C. Knall, C. Slugovc, *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 5131-5142.
- [213] S. Schneider, M. J. Gattner, M. Vrabel, V. Flugel, V. Lopez-Carrillo, S. Prill, T. Carell, *Chembiochem* **2013**, *14*, 2114-2118.
- [214] Y. Kurra, K. A. Odoi, Y. J. Lee, Y. Yang, T. Lu, S. E. Wheeler, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, W. R. Liu, *Bioconjug Chem* **2014**, *25*, 1730-1738.
- [215] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymanski, R. Mueller, M. Wiessler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4166-4170.
- [216] aE. Kaya, M. Vrabel, C. Deiml, S. Prill, V. S. Fluxa, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4466-4469; bK. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat Chem* **2012**, *4*, 298-304.
- [217] aJ. R. Kramer, B. Onoa, C. Bustamante, C. R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 12574-12579; bB. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem Soc Rev* **2017**, *46*, 4895-4950.
- [218] L. I. Willems, N. Li, B. I. Florea, M. Ruben, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 4431-4434.
- [219] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 441-445.
- [220] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem Biodivers* **2006**, *3*, 509-514.
- [221] V. Cauda, A. Schlossbauer, J. Kecht, A. Zurner, T. Bein, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 11361-11370.
- [222] A. Schlossbauer, J. Kecht, T. Bein, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3092-3095.
- [223] M. J. Gattner, M. Ehrlich, M. Vrabel, *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 12568-12571.
- [224] N. D. Bogdan, M. Matache, V. M. Meier, C. Dobrota, I. Dumitru, G. D. Roiban, D. P. Funeriu, *Chemistry* **2010**, *16*, 2170-2180.
- [225] J. Ilas, D. Kikelj, *Helvetica Chimica Acta* **2008**, *91*, 654-664.