

KOMPLEXIERUNG VON SIRNA ZUM
SPEZIFISCHEN KNOCK-DOWN VON
LUCIFERASE IN SKOV-3/LUC- UND 3T3-
ZELLEN

von

Olivia Monika Merkel

aus Villingen-Schwenningen

vorgelegt

am Fachbereich Pharmazie

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Pharmazeutin

Marburg im Juni 2006

Gutachter: **Prof. Dr. T. Kissel**

Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Technologie und
Biopharmazie

Prof. Dr. K. Mäder

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazeutische
Technologie und Biopharmazie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Erfolge und Ziele der Gentherapie	1
1.2	Nicht-virale Vektoren	3
1.3	Mechanismus der RNAi	5
1.4	Verwendung von Reportergenen	8
1.5	Ziele der vorliegenden Diplomarbeit	9
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Materialien	11
2.1.1	Verwendete Substanzen und deren Bezugsquellen.....	11
2.1.2	Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen.....	14
2.1.3	Verwendete Geräte.....	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Zellkultur	18
2.2.2	PCR-Methode zur spezifischen Mykoplasmen-detektion.....	20
2.2.3	Verwendung der konstitutiv Luciferase exprimierenden Zelllinie SKOV-3/Luc	22
2.2.4	Transfektion von 3T3-Zellen mit pCMV-Luc zur transienten Luciferase- Expression.....	23
2.2.5	Immunocytochemie.....	24
2.2.6	Luciferase-Assay.....	25
2.2.7	BCA-Assay.....	26
2.2.8	Herstellung der Komplexe	27
2.2.9	Agarose Gel Retardation Assay.....	29
2.2.10	PCS.....	29
2.2.11	Doppelmarkierung der siRNA-Polymer-Komplexe	30
2.2.12	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	31
2.2.13	Transfektionsexperimente.....	33

3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	34
3.1	Charakterisierung der Zelllinie SKOV-3/Luc.....	34
3.1.1	Untersuchung auf Mykoplasmenkontamination	34
3.1.2	Untersuchungen zur Immunfluoreszenz mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	34
3.1.3	Quantifizierung der Luciferase-Expression.....	35
3.2	Optimierung der Wachstumsbedingungen und Luciferase-Expression der Zelllinie SKOV-3/Luc.....	36
3.2.1	Zelldichte.....	36
3.2.2	FKS-Anteil im Medium	38
3.2.3	Kultivierungszeit	39
3.3	Etablierung eines Kotransfektionsmodells mit NIH-3T3 -Zellen	39
3.4	Ermittlung der benötigten Menge siRNA	41
3.5	Kinetik-Betrachtungen	44
3.6	Bestimmung der Spezifität des Knock-Downs	48
3.7	Physikochemische Charakterisierung	49
3.7.1	Agarose Gel Retardation Assay.....	49
3.7.2	Serum-Stabilität.....	54
3.7.3	Dynamische Lichtstreuung	55
3.8	Transfektionsexperimente.....	57
3.8.1	Transfektionsexperimente mit PEI 25	58
3.8.2	Transfektionsexperimente mit LMW-PEI.....	65
3.8.3	Transfektionsexperimente mit PEG-PEI	71
3.8.4	Transfektionsexperimente mit ePEI	73
3.9	Aufnahmeuntersuchungen.....	78
3.10	Vergleich beider Systeme: Stabil transfizierte Zelllinie vs. Kotransfektion.....	85
3.10.1	RNAi in einer stabil transfizierten Zelllinie SKOV-3/Luc.....	85
3.10.2	RNAi nach zeitlich versetzter Kotransfektion von NIH-3T3 –Zellen	86

4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	88
4.1	Zusammenfassung.....	88
4.2	Ausblick.....	89
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	93
6	DANKSAGUNG	101
7	ERKLÄRUNG.....	102

1 Einleitung

1.1 Erfolge und Ziele der Gentherapie

Seit der Sequenzierung des menschlichen Genoms durch das Human Genom Project, das im April 2003 beendet wurde, hat unser Wissen um Gendefekte, die gewissen Erbkrankheiten zugrunde liegen, stark zugenommen [1-4]. Durch die folgende Analyse der Genfunktionen sowie mittels Gentests konnten außerdem Mutationen festgestellt werden, die bei Patienten mit nicht-vererbaren Krankheiten, vor allem vielen Krebsleiden, gehäuft auftreten. Aufgrund dieser wachsender Erkenntnis entstand die Idee der Gentherapie, bei der funktionsfähige Gene mittels Genfähren, so genannter Vektoren, in die vom Gendefekt betroffenen Zellen eingeschleust werden sollen. In den meisten Fällen soll durch Gentherapie ein therapeutisches Gen Ersatz leisten. Andere Möglichkeiten sind der Austausch mutierter durch funktionelle Gene mittels homologer Rekombination, die Reparatur und die Regulation der Genexpression.

Zur Wiederherstellung physiologischer Körperfunktionen bietet sich die somatische Gentherapie an, bei der die Korrektur nur in den Körperzellen stattfindet. Eine Keimbahntherapie, die aus ethischen und praktischen Gründen nicht vertretbar ist, wurde in der Bundesrepublik Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz von 1991 verboten.

Für eine therapeutische Anwendung der somatischen Gentherapie sind sichere und effiziente Methoden zum Transfer von Genen in Körperzellen notwendige Voraussetzung. Während beim *ex vivo*-Ansatz dem Patienten Zellen entnommen, *in vitro* modifiziert und selektiert werden, um anschließend durch aufwendige Methoden als Gentherapeutikum reimplantiert zu werden [5], verfolgt der *in vivo*-Ansatz die Idee, Gene in „nackter“ Form oder mittels Vektoren direkt am Patienten zu applizieren. (Abbildung 1.1).

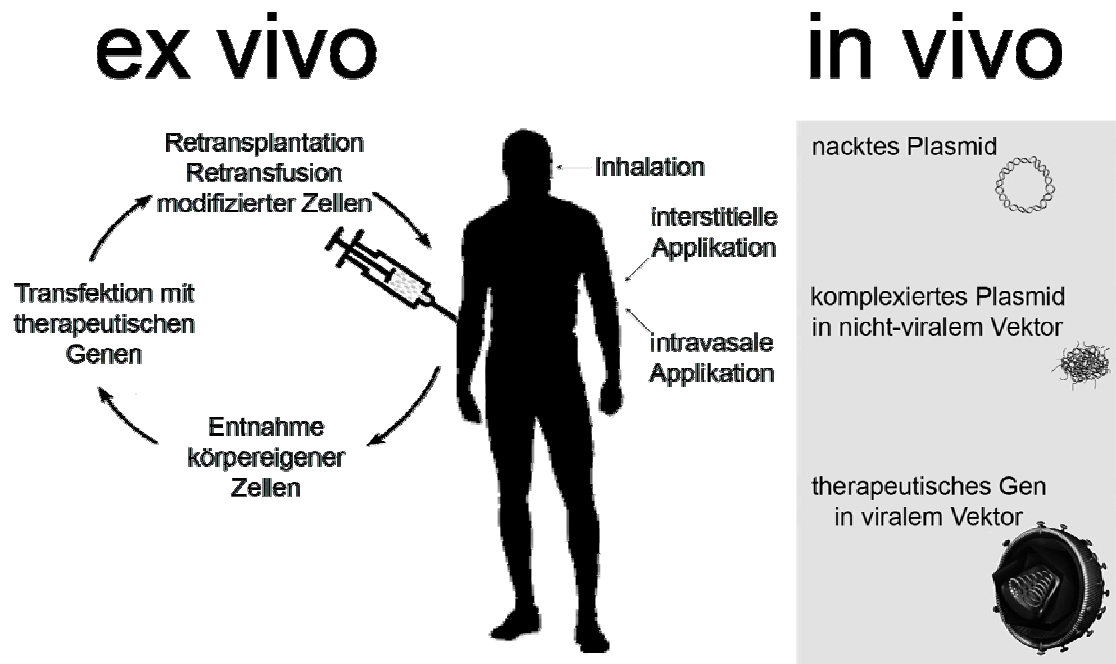


Abbildung 1.1: Strategien des somatischen Gentransfers nach [6]

Während sich „nackte“ Gene aufgrund ihrer Anfälligkeit für den Abbau durch DNAsen nur für eine direkte intramuskuläre Mikroinjektion anbieten [7], gibt es verschiedene Methoden für den ungezielten Transfer therapeutischer Gene. Neben physikalischen Methoden wie Elektroporation oder Particle gun-Beschuss sind chemische Transfektionsmethoden wie die Zerstörung der Zellmembran durch Calciumphosphat aufzuzählen.

Ein natürlich vorkommender Gentransport ist die Transduktion, bei der ein Virus genetisches Material in die Zelle verbringt. Diese Methode kann nach Austausch der pathogenen Sequenzen des Virusgenoms gegen therapeutische Sequenzen für die klinische Behandlung ausgenutzt werden. Hierfür werden hauptsächlich Retroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte und Herpes-simplex Viren verwendet [8]. Mit viralen Vektorsystemen wurden bereits erste klinische Studien durchgeführt [9, 10], und in China wird „Gendicine“, das erste kommerzielle Gentherapie-Produkt bereits auf den Markt gebracht [11].

Das Verfahren der viralen Gentherapie birgt jedoch trotz hoher Effizienz viele Nachteile: Neben den Risiken immunologischer Komplikationen [12, 13], kann es zu Rekombination des Virus mit dem ursprünglichen und pathogenen Virus sowie zu anderen Mutationen im Virusgenom und zur unkontrollierten Integration in das Wirtsgenom kommen. Außerdem weisen DNA-Viren nur ein begrenztes Fassungsvermögen auf [8], bei Verwendung von

RNA-Viren wird die freie RNA in der Zielzelle schnell abgebaut und ist zudem nur sehr kurzfristig therapeutisch wirksam. Retroviren benötigen teilungsaktive Zellen und können bei ihrer Vermehrung im Körper Krebs auslösen [12, 14, 15].

1.2 Nicht-virale Vektoren

Neben den genannten viralen Vektorsystemen und nicht-viralen Methoden hat sich die Verwendung nicht-viraler Vektoren zur viel versprechenden Alternative entwickelt. Nicht-virale Vektoren entstehen durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen negativen Nukleinsäuren und Polykationen oder durch Einschluss von Nukleinsäuren in Liposomen. Elektrostatische Interaktionen zwischen DNA und Proteinen konnten schon von Tang et. al. [16] beobachtet werden. Nicht-virale Vektoren müssen jedoch noch weitere Voraussetzungen aufweisen als eine positive Ladung und Wechselwirkung mit Nukleinsäuren. Sie müssen diese außerdem stabil komplexieren und vor enzymatischem Abbau schützen, sie sollten weder toxisch noch immunogen sein und sollten hohe eine Transfektionseffizienz aufweisen. Bisher ist jedoch kein System gefunden worden, das all diese Voraussetzungen zu vollster Zufriedenheit bedient [8].

Während kationische Lipide einer ersten Generation von Genfähern zugeordnet werden, zählen Polymere zur zweiten Generation. Unter der Vielzahl der bereits eingesetzten Stoffe [17-22] hat sich das Polyamin Polyethylenimin (PEI) aufgrund von einfacher Handhabung und Modifizierbarkeit als günstiges Ausgangsmaterial herausgestellt. Aber auch PEI weist eine relativ niedrige Transfektionseffizienz im Vergleich zu viralen Vektoren auf, welche jedoch zum Beispiel durch Kopplung an Substrate bestimmter Rezeptoren wesentlich verbessert werden kann [23]. Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Aufnahmemechanismen von unveränderten DNA-PEI-Komplexen und zielgerichteten Komplexen erklären: Während erstere unspezifisch aufgrund ihrer positiven Ladung mit negativ geladenen Glykoproteinen und Proteoglykanen auf der Zelloberfläche wechselwirken und hauptsächlich durch Adsorptions-vermittelte Endozytose aufgenommen werden, gelangen letztere durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle. Daraufhin befinden sich die Komplexe, unabhängig vom Endozytose-Mechanismus, eingeschlossen in Endosomen, welche mit lysosomalen Vesikeln verschmelzen und sich perinukleär anordnen. Aufgrund des „proton-sponge-effects“, der PEI zugeschrieben wird [24, 25], kann das Polymer durch Protonierung der Stickstoffatome ins Endosom einströmende Protonen abpuffern. Das pH-Optimum der

endosomalen beziehungsweise lysosomalen Nucleasen wird daher nicht erreicht und die im Endolysosom eingeschlossenen Nucleinsäuren bleiben geschützt. Durch einen den Protonen folgenden Chlorid- und Wasser-Einstrom ins Endolysosom platzt dieses schließlich, wobei die PEI-Polyplexe ins Zytoplasma freigelassen und anschließend in den Kern transportiert werden [26] (Abbildung 1.2).

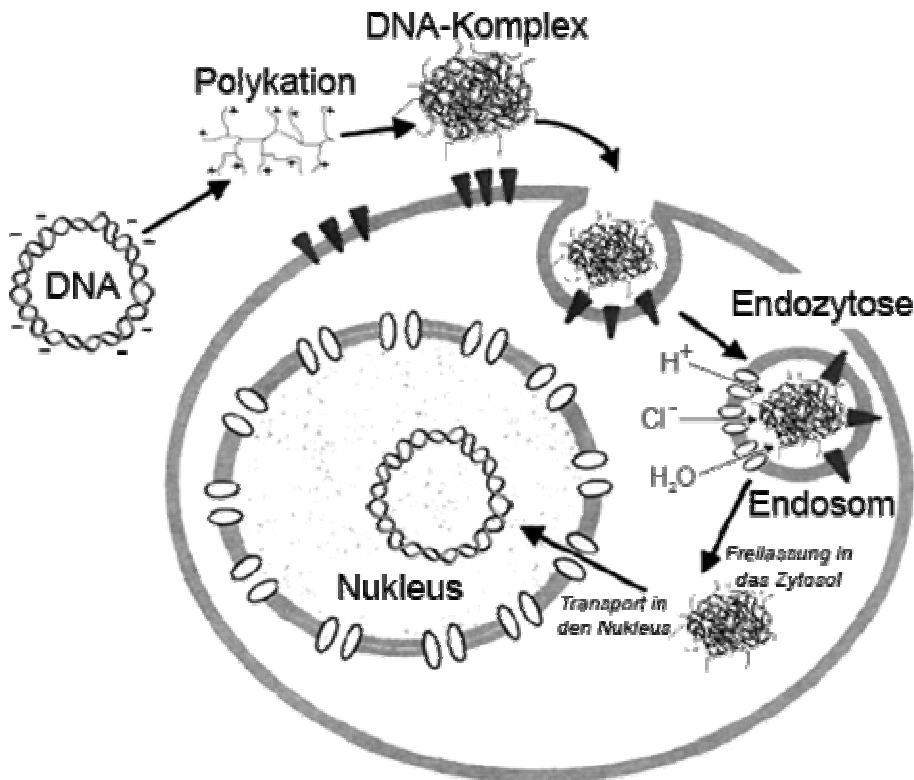


Abbildung 1.2: Schematischer Ablauf des Gentransfers mit polykationischen Vektoren nach [27]

Die Verwendung von PEI birgt zwei offensichtliche Nachteile: Zum einen ist die Transfektionseffizienz nicht optimal. Verschiedene PEIs mit linearer, verzweigter Struktur, PEIs verschiedener Molekulargewichte und Copolymere wurden hinsichtlich Transfektionseffizienz und Zytotoxizität untersucht [28-30]. Allerdings konnte nicht festgestellt werden, dass eine bestimmte Form prinzipiell höhere Transfektionseffizienz aufwies [31]. Das zweite Problem von PEI als Vektor für die Gentherapie ist seine Zytotoxizität. Die positive Ladung der Komplexe verursacht Wechselwirkungen mit Blutkomponenten und Zellmembranen und kann das Komplementsystem aktivieren. Außerdem verfügt der menschliche Körper über kein System, das PEI abbauen könnte. Hinsichtlich der Zytotoxizität ist jedoch ein eindeutiger Trend feststellbar. Durch die PEGylierung von PEI können unter anderem bioabbaubare Polymere entstehen, deren

positive Ladung abgeschirmt ist („stealth effect“). Dies resultiert in verlängerter Zirkulationszeit und verbesserter Verträglichkeit *in vivo* [30]. Allerdings beruht die Adsorptions-vermittelte Endozytose ungerichteter Komplexe gerade auf Wechselwirkungen mit Zellmembranen, so dass bei PEGylierten PEIs die Transfektionseffizienz Einbußen erleidet. Einen Ansatz zur Vermeidung unerwünschter Effekte und gleichzeitigen Steigerung der Spezifität der Aufnahme verfolgt die Ligandenkopplung.

Ob sich jedoch die Beobachtungen bei der Charakterisierung von Vektoren für DNA auf siRNA übertragen lassen, muss sich noch herausstellen.

1.3 Mechanismus der RNAi

Unter RNA-interference, kurz RNAi, versteht man das Silencing oder auch den Knock-Down eines bestimmten Gens aufgrund komplementärer Basenabfolge von short interfering RNA, kurz siRNA, und Ziel-mRNA. Dieses Phänomen wurde 1998 von Fire et. al. [32] nach Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Natürliches Vorkommen in Eukaryonten zum Schutze des Genoms gegen das Eindringen fremden Erbmateriale wie Transposons oder Viren wurde daraufhin von anderen Gruppen berichtet [33, 34]. Seitdem wurde versucht, sich RNAi als Werkzeug zum Ausschalten von zellulären aber auch viralen Genen für experimentelle oder therapeutische Zwecke zunutze zu machen.

Die Anwesenheit von langer dsRNA löst in der Zelle einen Signalweg aus, der zu verminderter Expression des Produkts des Zielgens führt. Hierbei wird lange dsRNA durch ein Dicer genanntes Enzym der RNase III-Familie in kurze Fragmente einer Länge von 21-23 Nukleotiden geteilt, welche an beiden 3'-Enden kurze einsträngige Überhänge erhalten [35, 36]. Diese kurzen RNA-Duplexe ergeben zusammen mit einer Vielzahl von Proteinen den RNA-induced Silencing Complex, kurz RISC. Nach Aufreinigung der Proteine des RISC konnten Hammond et. al. [37] zeigen, dass ein Bestandteil des aktiven Ribonucleoproteinkomplexes ein Protein der Argonaute-Familie ist [38]. Durch die Aufnahme eines Strangs des auslösenden RNA-Duplexes in den RISC erhält dieser seine Spezifität. Eine Basenfolge-spezifische Nuklease baut daraufhin mRNA mit Homologie zur in den RISC aufgenommenen RNA ab.

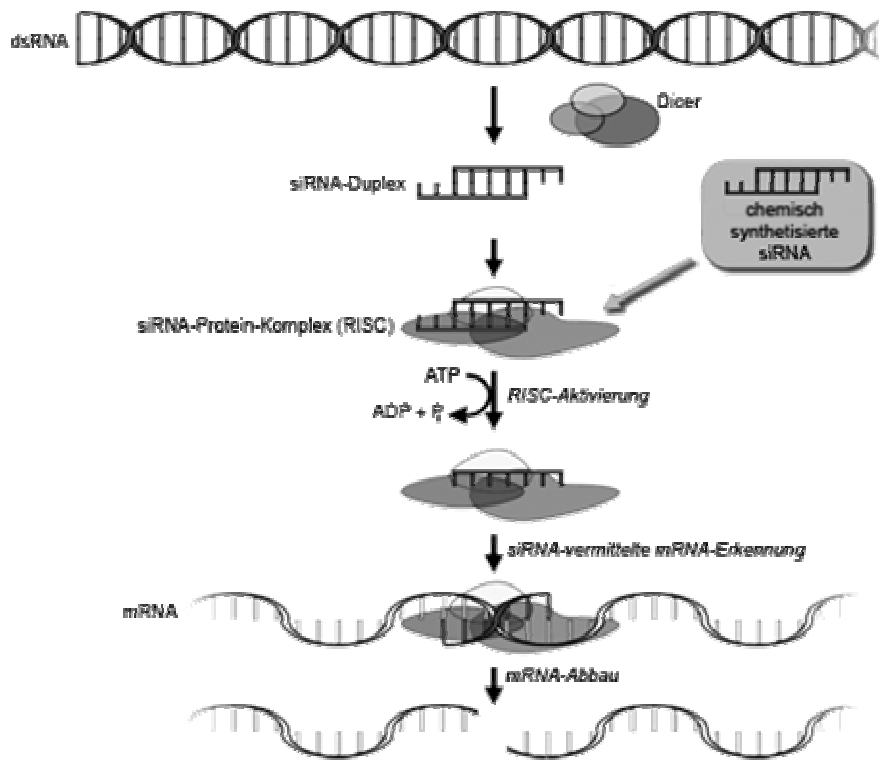


Abbildung 1.3: Ablauf des spezifischen mRNA-Abbaus (nach Promega)

Eine weitere Klasse der Genexpression regulierenden RNA-Moleküle sind die microRNAs, kurz miRNAs, die aus einer Haarnadel-RNA, einer short hairpin RNA, kurz shRNA, mit Stamm-Schleife-Struktur, ähnlich der tRNA, bestehen. miRNAs sind durch Beeinflussung der Translation maßgeblich an der Entwicklung von Tier- und Pflanzenzellen beteiligt, in denen sie verursachen, dass mRNA bestimmter Gene abgebaut oder deren Translation unterdrückt wird [39, 40]. Die Fähigkeit, die Translation zu unterbinden, wird nur den miRNAs zugeschrieben, während miRNAs und siRNAs viele andere Elemente des RNAi-Systems gemeinsam haben [41].

Die Anwendung langer dsRNA für die Aufklärung, welche Rolle einzelne Gene spielen („functional genomics“), sowie für therapeutische Zwecke warf jedoch anfangs große Probleme auf. Die Spezifität des Silencing, die bei *Caenorhabditis elegans* entdeckt worden war, konnte in Zellen von Säugetieren nicht erreicht werden. Da durch die lange dsRNA verschiedene Signalwege aktiviert wurden, wie das Interferonsystem über Toll-like-Rezeptoren, das Komplementsystem, und schließlich die Apoptose, waren hier die unerwünschten Wirkungen größer als die erwünschten. Mit der Aktivierung des Toll-Like-Rezeptor-3, was über die Aktivierung von NF- κ B und der Produktion von IL-1 und Zytokinen mit einer Aktivierung des Interferonsystems einhergeht [39, 42], beginnt eine

Kettenreaktion. Wie bei einer Virusinfektion werden unspezifisch über die Aktivierung der 2'5'-Oligoadenylatsynthetase Nukleinsäuren abgebaut, und über die Aktivierung der Proteinkinase R, die Initiationsfaktoren phosphoryliert, auch die Translation von mRNA für physiologisch notwendige Proteine angehalten [43]. Dies resultiert in einer unspezifischen Abnahme des Gesamtproteingehalts der Zelle. Von einem spezifischen Knock-Down kann nicht mehr die Rede sein. Nachdem Elbashir et. al. [44] herausgefunden hatten, dass durch das Einbringen von kurzen Duplexen, short interfering RNA (siRNA), die Expression des Zielgens herunterreguliert werden konnte, ohne dass Zelltod hervorgerufen wurde, wurde damit begonnen, Methoden für das Design [45] und die Verwendung von synthetischen siRNAs für die Aufklärung der Funktion einzelner Gene zu entwickeln [46].

Das bei der Anwendung von Gentherapie übliche Problem des Transfers in die Zielzelle ergab sich nun auch für siRNA. Besonders bei Säugetierzellen stellt dieses Problem eine Herausforderung dar, weil die Anwendung von Liposomen sich meist zytotoxisch auswirkt [47]. Neben viralen und nicht-viralen Vektoren, unter anderem PEI, Cardiolipin [48], Dextran-Spermin [18], Lipid-Polymer-Gemische [49], wurde auch von High Pressure Tail Vene (HPTV) Injection [50], Electroporation [51], Surfection [52] und Osmotischem Transfer [53] berichtet.

Derzeit wird unter größtem Einsatz darauf hingearbeitet, spezifische RNAi auch *in vivo* zu erreichen [54], mit dem Fernziel einer therapeutischen Anwendung am Menschen. Besondere Bedeutung darf hier dem Silencing von pathologisch überexprimierten Genen zugewiesen werden. Anwendungen hierfür fänden sich vor allem im Bereich der Krebstherapie [55-61], aber auch der Knock-Down von Genen, die von Viren exprimiert werden, ist ein Angriffsziel. Erfolgreich wurde bereits die HI-Virus-Fusion [62], die Replikation und die Expression von Genen des Respiratory-Syncytical-Virus [63] unterdrückt. Allerdings stellt die schnelle Anpassung des Genoms von Viren und die Entwicklung von Resistenzen ein Problem dar [64].

Für eine Anwendung am Menschen offenbaren sich noch weitere Hürden. Zum einen verwenden die meisten bisherigen *in vivo*-Studien Maus-Modelle. Hauptenthal et. al. [65] konnten jedoch zeigen, dass siRNAs durch humanes Serum sehr viel stärker angegriffen und abgebaut werden als durch Mäuse-Serum. Deshalb und auch aus dem Grund heraus, dass synthetische siRNA nur einen vorübergehenden Effekt auslösen könnten, bieten sich für einen zukünftigen Einsatz der RNAi eher Vektor-basierende shRNA-Modelle an [66, 67].

1.4 Verwendung von Reportergenen

Um den Effekt von RNAi zu quantifizieren, kann entweder auf Ebene der mRNA oder auf Proteinlevel gemessen werden. Die Quantifizierung von mRNA wird meist mittels Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) durchgeführt. Dieses Verfahren erlaubt es, jede Sequenz zu vervielfachen, für die spezifische Primer vorhanden sind. Jedoch ist es hier notwendig, die erhaltene mRNA durch Verwendung von „Housekeeping Genes“ zu normieren. Housekeeping Genes sind Gene, deren Expression unabhängig von Zellart und Herkunft relativ konstant ausfällt [68].

Wird aber auf Proteinlevel gemessen, so kann nicht die Expression eines jeden Gens durch einfache Methoden quantifiziert werden. Hier bietet sich die Verwendung von Reportergenen an. Reportergene sind Gene oder Gen-Fragmente, die mit anderen Genen gekoppelt werden, um deren Aktivitäten nachweisbar zu machen. Der Vorteil ihrer Verwendung liegt darin, dass ihre Expression einfach, schnell und spezifisch quantifiziert werden kann. Reportergene, die häufig verwendet werden, sind Sequenzen, die für Renilla (RLuc) oder Firefly-Luciferase (GL2, GL3, GL4), Green Fluorescent Protein (GFP) oder β -Galactosidase (LacZ) codieren. Bei der Auswahl eines geeigneten Reportergens sind je nach Anwendung verschiedene Qualitäten zu berücksichtigen. Sollen Zellen stabil transfiziert werden, so muss das Reportergen in das Genom der Zellen integriert und an die Tochtergenerationen weitergegeben werden, um permanente Expression zu gewährleisten. Bezüglich GFP hatten Kirsch et. al. verschwindende Expression nach stabiler Transfektion [69] berichtet. Zum anderen fanden sich bei ATCC (CRL-2200 glial cell, CRL-2199 glial cell) und bei der Literaturrecherche stabil transfizierte Zelllinien, die permanent β -Galactosidase exprimieren [70] (orbigen: 3T3/lacZ). Eine weitere Möglichkeit stellte die Zelllinie SKOV-3/Luc dar, die bereits als permanent Luciferase-exprimierende Zelllinie in der Literatur beschrieben worden war [71, 72]. Bei der Quantifizierung der Luciferase-Expression wird dem das Enzym Luciferase enthaltenden Zelllysate dessen Substrat Luciferin, ATP und Magnesium zugesetzt. Das Enzym baut in Sekundenschnelle Luciferin zu Oxiluciferin ab, wobei Lichtquanten entstehen. Diese sehr spezifische Reaktion kann durch Messung der Relative Light Units (RLU) am Luminometer sehr leicht quantifiziert werden und liefert genaue und reproduzierbare Daten. Ein weiterer Vorteil der Luciferase in RNAi-Modellen ist ihre relativ kurze Halbwertszeit von etwa 3 Stunden [73, 74]. Diese ist besonders bei Verwendung von stabil transfizierten Zellen günstig, da Proteine mit langen

Halbwertszeiten akkumulieren und bei Proteinquantifizierung nach siFektion fälschlich hohe Werte ergeben.

Für analytische Zwecke stellt die Zelllinie SKOV-3/Luc also ein gutes Modell dar.

1.5 Ziele der vorliegenden Diplomarbeit

In den letzten Jahren konnte mit Polyethylenimin verschiedener Molekulargewichte sowie mit funktionalisiertem und copolymerisiertem Polyethylenimin als nicht-virale Vektoren für Plasmid-DNA eine Vielzahl somatischer Zellen mit hoher Effizienz transfiziert werden [26]. Untersuchungen zur Zytotoxizität belegen die Eignung verschiedener PEIs für die Anwendung in der Gentherapie [29], wobei gezeigt werden konnte, dass durch PEGylierung von PEI nicht nur die Oberfläche der Komplexe durch Verminderung des Zetapotentials stabilisiert wird, sondern auch unspezifische Wechselwirkungen mit Blutkomponenten vermindert werden [30] und dadurch eine *in vivo* Applikation möglich wird [75].

Da die Zielkompartimente eines Transfers von pDNA und siRNA jedoch unterschiedliche sind [39] und sich Komplexe aus PEI und den beiden Nukleinsäuren vor allem in ihren hydrodynamischen Durchmessern unterscheiden, kann nicht davon ausgegangen werden, dass sich ein für Plasmid-DNA etablierter Vektor auch zwingend für den Transfer von siRNA eignet.

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb Assays zur Untersuchung von Polyethylenimin verschiedener Molekulargewichte sowie von funktionalisiertem und copolymerisiertem Polyethylenimin als nicht-virale Vektoren für siRNA entwickelt werden. Hierbei sollte verzweigtes Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 25 kDa (PEI 25) als Kontrolle dienen, während Low-Molecular-Weight-PEI (LMWPEI) mit geringerer Verzweigung und einem Molekulargewicht von 5 kDa sowie mit 550 Da Polyethylenglykol PEGyliertes PEI (PEGPEI) der Formel $\text{PEI}(25)\text{-g-PEG}(550)_{35}$ mit schwächerer Komplexierung [76] und ethoxyliertes PEI (ePEI) mit kleinerem pK_a -Wert und stärkerer Protonierung im Endosom [77, 78] als aussichtsreichere Vektoren zur Einschleusung ins Zytosol angesehen wurden. Grund dieser Annahme war, dass sich bei der Komplexierung von DNA mit dem beschriebenen PEGPEI Komplexe gebildet hatten, die ihrer Form und Stabilität nach für die Transfektion von DNA in den Zellkern ungeeignet waren. Da das Zielkompartiment für Transfektionen mit siRNA jedoch das Zytoplasma ist, in welches im Kern gebildete mRNA geschleust wird, wurde nach

Polymeren gesucht, die komplexierte siRNA nach der Entlassung aus dem Endosom durch Zerfall des Komplexes ins Zytosol freilassen würden. Deshalb könnten sich die Eigenschaften des PEGPEIs, das weniger stabile Komplexe bildet, und des ePEIs, das durch die stärkere Protonierung leichter für das Platzen des Endosoms sorgt, für siFektionen anbieten.

Teil der Entwicklung solcher Assays war die Charakterisierung der verwendeten Zellen durch Visualisierung der Luciferase-Expression mittels Immun-Fluoreszenz-Mikroskopie und Quantifizierung der Luciferase-Expression mittels Chemolumineszenz-Assay einerseits und Optimierung der Wachstumsbedingungen der Zellen, der Transfektionsbedingungen und des N/P-Verhältnisses sowie die physiko-chemische Charakterisierung der Polyplexe andererseits. Hierunter fiel die Untersuchung der Komplexierung und der Stabilität der Komplexe in Anwesenheit von Serum mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers mittels PCS. Außerdem musste die Spezifität des Knock-Downs durch Messung unspezifischer Silencing-Effekte mit Kontroll-siRNA abgewandelter Sequenz abgeklärt werden. Schließlich sollte die Lokalisierung der Komplexe und Verfolgung des Zerfalls mittels Fluoreszenz-Labelings und Konfokal-Mikroskopie Aufschluss über das Schicksal der Komplexe geben. Abschließend sollte ein Vergleich der Effektivität der RNAi nach Transfektion einer konstitutiv Luciferase exprimierenden Zelllinie SK-OV-Luc einerseits beziehungsweise nach Kotransfektion mit pDNA andererseits angestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Substanzen und deren Bezugsquellen

Name	Molmasse [g/mol]	verwendete Abkürzung / Synonyme	Lieferant / Hersteller	Katalog- nummer
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	238,3	HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim	H4034
4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	350,25	DAPI	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	D1306
Aqua destillata	18,01	Aqua dest.		ohne
Agarose			Merck, Darmstadt	101236
Anti-Luciferase pAB		anti-luc Ak	Promega, Mannheim	G7451
Bovines Serum Albumin		BSA	Merck, Darmstadt	112018
Bromphenolblau Natriumsalz	691,94	Bromphenol- blau	Merck, Darmstadt	111746
Calciumchlorid-Dihydrat	147,02		Merck, Darmstadt	102382
Cell Culture Lysis Reagent		CCLR	Promega, Mannheim	E1531
Cy3-Luciferase GL2 Duplex	13824,79	Cy3-siGL2	Dharmacon Inc, Chicago, IL, USA	D- 001110- 01-05
D(+)-Glucose-Monohydrat	198,17	D-Glucose	Merck, Darmstadt	108346
Dimethylsulfoxid	78,13	DMSO	Merck, Darmstadt	102931
Ethidiumbromid	394,32	EthBr	Merck, Darmstadt	111615

Name	Molmasse [g/mol]	verwendete Abkürzung / Synonyme	Lieferant / Hersteller	Katalog- nummer
Ethylendiamintetraessigsäure- di-Natriumsalz Dihydrat	372,24	EDTA	Merck, Darmstadt	159294
Fetales Kälber Serum		FKS	Cytogen, Sinn	ohne
Fluorescein 5(6)-isothiocyanat	389,38	FITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	46950
Fluorescein-conjugated AffiPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)		FITC-anti- goat Ak	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc, West Grove	705-095- 147
FluorSave™ Reagent			Calbiochem, San Diego	
Glycerin			Merck, Darmstadt	104091
Jodacetamid	184,96	IAA	Merck, Darmstadt	804744
Kaliumacetat	98,15		Merck, Darmstadt	104820
Kaliumchlorid	74,55		Merck, Darmstadt	104935
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09		Merck, Darmstadt	104871
Kupfer(II)-acetat-Monohydrat	199,65	Kupfer(II)- acetat	Merck, Darmstadt	102710
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent		LF	Invitrogen, Karlsruhe	11668- 027
L-Glutamin	146,15		Merck, Darmstadt	100286
Luciferase Assay Reagent		LAR	Promega, Mannheim	E1483

Name	Molmasse [g/mol]	verwendete Abkürzung / Synonyme	Lieferant / Hersteller	Katalog- nummer
Luciferase GL3 Duplex	13302,1	siGL3	Dharmacon Inc, Lafayette, CO, USA	D- 001400- 01-20
Luciferase GL2 Duplex	13317,2	siGL2	Dharmacon Inc, Lafayette, CO, USA	D- 001100- 01-05
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	203,3	MgCl ₂	Merck, Darmstadt	105832
Mykoplasmandetektions- Probekit VenorGeM®			Minerva Biolabs, Berlin	Probe
Natriumchlorid	58,44	NaCl	Merck, Darmstadt	106400
Natriumdihydrogenphosphat- Dihydrat	156,01		Merck, Darmstadt	106345
Natriumhydrogencarbonat	84,01		Merck, Darmstadt	106323
Paraformaldehyd			Merck, Darmstadt	104005
pCMV-Luc		Luciferase- Plasmid	The Plasmid Factory, Bielefeld	ohne
Phenolrot	354,38		Merck, Darmstadt	159375
Polyethylenglykol 550 Da	550	PEG 550	Aldrich, Milwaukee, WI, USA	
Polyethylenimin 25 kDa "Polymin"	25000	PEI 25	BASF, Ludwigshafen	ohne
Polyethylenimin 5 kDa "Low- Molecular-Weight PEI"	5000	LMWPEI		
Polyethylenimine, 80% ethoxylated solution	50000	ePEI	Sigma-Aldrich, Steinheim	306185

Name	Molmasse [g/mol]	verwendete Abkürzung / Synonyme	Lieferant / Hersteller	Katalog- nummer
Polyethylenimin-graft- poly(ethylene glycol) "PEI(25k)- g-PEG(550)30"		PEGPEI		
Tris(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid	157,6	TRIS-HCl	Merck, Darmstadt	108219
TRITON[®] X-100 Detergent, Molecular Biology Grade	646,85	Triton X 100	Calbiochem, San Diego	648466- 50ML
Trypsin			Merck, Darmstadt	124590

Tabelle 2.1: Verwendete Substanzen

2.1.2 Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen

5x siRNA-Puffer

HEPES	7,15 g
KCl	7,46 g
MgCl ₂	0,20 g
Aqua steril.	ad 1000 ml
pH	7,5 einstellen mit KOH

DAPI-Stammlösung

DAPI	6 mg
Aqua dest.	ad 1000 ml
Aliquots zu je 1 ml herstellen, Lagerung im Gefrierschrank	

DAPI-Arbeitslösung

DAPI-Stammlösung	30 µl
PBS-M	ad 1 ml
Herstellung unmittelbar vor Gebrauch	

Einbettungslösung für Mikroskopie

Glycerol	1 T
PBS-M	2 T

EBSS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

Kaliumchlorid	0,2 g
Natriumchlorid	3,4 g
Natriumhydrogencarbonat	1,1 g
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	0,07 g
D-Glucose	0,5 g
Phenolrot	0,005 g
Aqua dest.	ad 500 ml
pH	7,0 einstellen

Kulturmedium SK-OV-3/Luc

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	500 ml
FKS (Fetales Kälberserum)	50 ml
L-Glutamin	150 mg

Kulturmedium NIH-3T3

DMEM (Dulbecco' Modified Eagle-Medium)	500 ml
FKS (Fetales Kälberserum)	50 ml
L-Glutamin	150 mg

Kupferacetatlösung

Kupfer(II)-acetat	3,99 g
Kaliumacetat	50 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH	5,5 einstellen

Loading Buffer

Glycerol	5 ml
EDTA	37,22 mg
Bromphenolblau	40 mg
TAE-Puffer	ad 100 ml

Natriumhydrogencarbonatpuffer

Natriumhydrogencarbonat	8,40 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH	9,0 einstellen

Paraformaldehydlösung 3%

Paraformaldehyd	3 g
PBS-M	ca. 80 ml
pH	ca. 11 einstellen

wenn Paraformaldehyd vollständig gelöst ist, auf 100 ml Gesamtvolumen mit PBS-M auffüllen.

PBS (Phosphate Buffered Saline) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (zukünftig PBS-O)

Kaliumchlorid	0,20 g
Natriumchlorid	7,55 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,20 g
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	1,14 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH	7,4 einstellen

PBS (Phosphate Buffered Saline) mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (zukünftig PBS-M)

Zusammensetzung siehe PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, zusätzlich

Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,10 g
Calciumchlorid-Dihydrat	0,13 g

TAE-Puffer

Tris-HCl	6,3 g
Essigsäure	10 ml
EDTA	0,37 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Tris-HCl Puffer

Tris-HCl	47,28 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
ph	8,6 einstellen

Triton-X 0,1 % in PBS-M

Triton X 100	0,1 ml
PBS-M	ad 100 ml

2.1.3 Verwendete Geräte

Name	Typbezeichnung	Hersteller
Amicon Zelle	Amicon 8010	Millipore GmbH, Schwalbach
CLSM	Axiovert 100 M und CLSM 510 Scanning Device	Zeiss, Oberkochen
CO₂-Inkubator (Heraeus)	HeraCell	Heraeus, Hanau
CO₂-Inkubator (Integra)	CellSafe	Integra Biosciences, Fernwald
Elektrophoresekammer	Blue Marine 100	Serva, Heidelberg
ELISA-Plattenlesegerät	Titertek plus MS 212	ICN, Meckenheim
Fluoreszenz-Platten- Lesegerät	LS 50 B	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Geldokumentation	BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen
Haemocytometer	Neubauer Haemocytometer	Menzel Gläser, Braunschweig

Name	Typbezeichnung	Hersteller
Kompaktschüttler mit Inkubationshaube	KS 15 und TH 15	Edmund Bühler, Hechingen
Luminometer	Sirius	Berthold, Pforzheim
Magnetrührer	IKAMAG RCT	IKA, Stauffen
Rundkolben	Rundkolben M.NS, Duran, Volumen: 50	Schott, Mainz
Spannungsquelle für die Gelelektrophorese	LKB 2197	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermocycler	TGradient Thermocycler	Whatman Biometra, Göttingen
UV-VIS-Spektrometer	UV-160	Shimadzu, Duisburg
Vortex-Mixer	VF	IKA, Stauffen
Zentrifuge (Heraeus)	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Zetasizer	Nano Series	Malvern Instruments, Herrenberg

Tabelle 2.2: Verwendete Geräte

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

SK-OV-3/Luc (humanes Ovarialkarzinom, stabile Luciferase-Expression) Zellen wurden von Dr. Achim Aigner, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt und auf Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, supplementiert mit 10% fetalem Kälber Serum (FCS) bei 37 °C, 8,5% CO₂ kultiviert. NIH-3T3 (Fibroblasten, ATCC CRL-1658) Zellen wurden von ATCC, Teddington, UK bezogen und auf Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10% FCS bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Zur Kultivierung wurden SK-OV-3/Luc und NIH-3T3 mit einer Zelldichte von $3,5 \cdot 10^3$ Zellen/cm² in Petrischalen (10 cm Durchmesser, Nunclon Dishes, Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Zur Fütterung der Zellen wurde alle 2 Tage das verbrauchte Kulturmedium durch je 10 ml des entsprechenden frischen Mediums ersetzt. Bei ausreichender Zelldichte

wurden die Kulturen nach etwa 7 Tagen gesplittet. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit 10 ml EBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen, bevor mit 1 ml Trypsin ohne EDTA 5-10 Minuten inkubiert wurde, bis sich die Zellen ablösten. Nach Zugaben von 9 ml Kulturmedium wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (10 ml Centrifuge Tubes, Nunc, Wiesbaden) überführt. Ein Aliquot wurde entnommen und in eine Zählkammer gegeben, worin durch Auszählen die Zelldichte bestimmt wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1000 U/min und 21 °C zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau) und nach Absaugen des überstehenden Mediums in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Das entsprechende Volumen der resuspendierten Zelllösung wurde in Petrischalen gegeben und mit Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt.

Alle Zelllinien wurden routinemäßig beim Splitten per DAPI-Kernfärbung auf Mykoplasmen untersucht. Zusätzlich wurde regelmäßig per PCR auf vorhandene Mykoplasmen DNA untersucht.

DAPI bindet spezifisch an Adenin-Thymidin-Regionen der DNA, womit also die Chromosomen im Zellkern sowie fremde DNA sichtbar gemacht werden kann.

Hierfür wurden die Zellen auf 8-well chamber-slides (LabTek, Nunc, Wiesbaden) mit einer Zelldichte von 50000 Zellen je well ausgesät und, mit 300 µl Kulturmedium versehen, 24 h lang kultiviert.

Nach Absaugen des Mediums wurde zweimal mit je 300 µl PBS-M gewaschen, die gewaschenen Zellen wurden durch 20-minütiges Einwirken von je 300 µl Paraformaldehyd-Lösung 3% bei Raumtemperatur auf den Objektträger-slides fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit je 300 µl PBS-M wurde 20 min mit je 300 µl DAPI-Arbeitslösung bei Raumtemperatur inkubiert.

Auch nach dieser Inkubation wurde zweimal mit je 300 µl PBS-M gewaschen, wonach die Zellen zum Schutz des DAPI-Fluorophors in FluorSave™ Reagent eingebettet und mit Deckgläschen bedeckt wurden.

Die Zellen wurden anschließend am Fluoreszenzmikroskop (Filterblock BP 365 FT395 LP 397 (DAPI) und BP 485 FT 510 LP 515-565 (FITC, GFP), Zeiss, Oberkochen) untersucht. Im Falle einer Mykoplasmenkontaminationen wäre durch die DAPI-Anfärbung von DNA extrachromosomales Erbgut sichtbar in Form von kleinen, gleichmäßigen extranukleären aber intrazellulären Punkten.

Eine Mykoplasmenkontamination konnte auf diese Weise zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

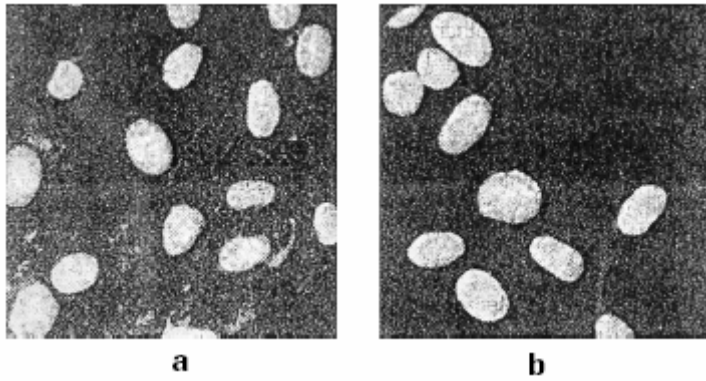


Abbildung 2.1: positiver (a) und negativer (b) Mykoplasmentest

2.2.2 PCR-Methode zur spezifischen Mykoplasmen-detektion

Um eventuelle Interpretationsprobleme der DAPI-Methode zur Untersuchung auf Mykoplasmen auszuräumen, wurde mit der Wiedereinführung der PCR als Standardmethode begonnen. Zum einen ist die PCR eine sichere Methode, geringste Mykoplasmenkontaminationen der in Kultur befindlichen Zellen frühzeitig zu erkennen. Zum anderen ist die RT-PCR eine geeignete Methode, um RNAi-bedingten Knockdown auf der Ebene der mRNA zu quantifizieren, vor allem, wenn – im Hinblick auf weitere Versuche – nicht mehr mit Reportergenen wie der Luciferase gearbeitet wird.

Die PCR ist ein enzymatisches Verfahren zum Amplifizieren von DNA. Hierbei wird aus wenig Probematerial durch Zugabe des Enzyms Taq-Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) sowie bestimmter PCR-Primer (kurze, gegenläufige Oligonukleotide mit Homologie zum linken bzw. rechten Ende der Zielsequenz) und ausreichender Mengen Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in wenigen Stunden genügend Material für die genetische Analyse der gesuchten Nukleinsäuresequenzen gewonnen.

Zur Mykoplasmen-detektion wurden mit einem Probekit VenorGeM® und MB TAQ DNA Polymerase von Minerva Biolabs die in Kultur befindlichen Zelllinien untersucht.

Der Versuch wurde nach dem Protokoll von Minerva Biolabs für das Probekit durchgeführt.

Zur Probengewinnung wurden 3-4 Tage nach dem letzten Mediumwechsel je 100 µl Zellkultur-Überstand jeder Zelllinie in je ein steriles E-Cup gefüllt und 5 min im Wasserbad auf einer Heizplatte gekocht, anschließend 5 sec bei 13000 U/min und 21 °C zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau). 2 µl des Überstand wurde später für die PCR eingesetzt.

Vorerst mussten die Reagenzien nach dem im Protokoll angegebenen Pipettierschema mit DNA-freiem Wasser (Aqua ad inj.) rehydratisiert und gevortext (Vortex-Mixer VF, IKA, Stauffen) werden.

Der PCR-Reaktionsmix (Mastermix), bestehend aus Nukleotiden, Primern und Polymerase, wurde nach dem Pipettierschema in der Vorschrift angesetzt und mit den wie oben beschrieben hergestellten Proben sowie mit einer Positiv- und einer Negativprobe gemischt. Der Thermocycler (TGradient Thermocyclers, Whatman Biometra, Göttingen) wurde wie folgt programmiert:

Programm	Anzahl der Zyklen	Dauer und Temperatur
Vorheizen	1 Zyklus	94 °C für 5 min
Standardprogramm	1 Zyklus	94 °C für 2 min
		55 °C für 2 min
		72 °C für 2 min
	34 Zyklen	94 °C für 30 sec
		55 °C für 1 min
		72 °C für 1 min
	1 Zyklus	72 °C für 4 min
		auf 4-8 °C abkühlen

Tabelle 2.3: Programmablauf des Thermocyclers

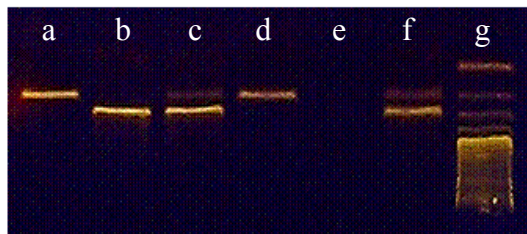
Im Vorheizschritt wurde die Polymerase, die aus Stabilitätsgründen und zum Schutz vor self-annealing blockiert geliefert wurde, durch Hitze aktiviert. Anschließend liefen die temperaturabhängigen Vorgänge ab: Im ersten Schritt, der Denaturierung bei 94 °C, wurden die DNA-Doppelstränge getrennt. Im zweiten Schritt, dem Annealing bei 55 °C, wurden die Primer an die homologen Bereiche der Zielsequenz angelagert. Die Annealing-Temperatur ist davon abhängig, wie viele Basenpaarungen zwischen G&C (3 Wasserstoffbrücken) bzw. zwischen A&T (2 Wasserstoffbrücken) der komplementären Stränge stattfinden müssen. Im dritten Schritt, der Polymerisation bei 72 °C, wurde durch die Taq-Polymerase, ausgehend von den Primermolekülen, die Zielsequenz synthetisiert. Anschließend wurden in den weiteren 4 min bei 72 °C freie Enden mit Nukleotiden aufgefüllt. Im vierten Schritt, dem Hold bei 4-8 °C, wurde die Kettenreaktion angehalten.

Da in jedem Polymerisationsschritt die Zielsequenz verdoppelt wird, entstanden bei diesem Versuch 2^{35} -DNA-Doppelstränge ($=3,45 \cdot 10^{10}$), die im Agarosegel sichtbar gemacht werden konnten.

Hierfür wurde ein 1,5%iges Agarose-Gels mit 975 mg Agarose auf 65 ml TAE hergestellt, in dem 4 μ l Ethidiumbromid im noch flüssigen Zustand verteilt wurden. Vor dem Erstarren wurde ein Kamm eingesetzt, das Gel wurde zum Lichtschutz mit einer Plastikwanne abgedeckt.

In der Zwischenzeit wurden die aufzutragenden Proben vorbereitet. Dazu wurden je 50 μ l PCR-Ansatz mit je 5 μ l Loading Buffer gemischt. Hiervon wurden nach Erstarren des Gels, Entfernen des Kamms und Einsetzen in die Elektrophorese-Kammer je 5 μ l in die Taschen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese-Anlage wurde vor dem Einsetzen des Gels bis zur Markierung mit TAE-Puffer befüllt, so dass das Gel nach dem Einsetzen von Puffer bedeckt war. Die Elektroden wurden an die Spannungsversorgung (LKB 2197 Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) angeschlossen, das Gel bei 100 V 20-30 min entwickelt, so dass eine Wegstrecke von 2 cm zu erkennen war.

Die Auswertung wurde mit der Geldokumentationsanlage (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen) vorgenommen. Das zu erwartende Ergebnis lässt sich wie folgt interpretieren:



- a) Bande bei 191 bp (Internal Control)
- b) Bande bei 270 bp: starke Kontamination
- c) Bande bei 191 bp und 270 bp: schwache Kontamination
- d) Bande bei 191 bp: Negativ-Kontrolle
- e) Inhibierte Probe
- f) Bande bei 191 bp und 270 bp: Positiv-Kontrolle
- g) 100 bp DNA-Leiter

Abbildung 2.2: Auswertung des PCR-Mykoplasmentests

2.2.3 Verwendung der konstitutiv Luciferase exprimierenden Zelllinie SKOV-3/Luc

Wie in der Einleitung besprochen, wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit Reportergenen gearbeitet. Der Vorteil hierbei liegt zweifelsohne in der schnellen und einfachen Analytik, die sich bei endogenen Genen viel aufwendiger gestaltet und durch viele Arbeitsschritte Fehlerquellen bietet. Um jedoch mit einem Zellmodell arbeiten zu können, was physiologischen Verhältnissen nahe kommt, bot es sich an, eine Zelllinie zu verwenden, die ein Reporter gen konstitutiv exprimiert. Die Zelllinie SKOV-3/Luc wurde bereits in der Literatur [71] [72] als stabil mit dem Plasmid pGL3 (Promega, Mannheim) transfizierte Zelllinie beschrieben, die permanent Luciferase exprimiert. Um eine stabile Zelllinie zu erhalten, wird der Vektor, hier pGL3, üblicherweise an einer nicht-funktionellen Stelle

geschnitten und linearisiert. Dies garantiert, dass das Plasmid nicht etwa auf eine Weise integriert wird, bei der die Zielsequenz unterbrochen wird. Das Plasmid trägt außerdem einen NFκB-Promotor und zur Selektion erfolgreich transformierter *E. coli* eine Ampicillin-Resistenz. Da eukaryontischer Zellen aber durch Ampicillin nicht selektiert werden können, wurde zusätzlich eine G-418-Resistenz eingefügt. Das Antibiotikum Geneticin (G-418) interferiert mit der Funktion der 80S Ribosomen und der Proteinbiosynthese in eukaryontischen Zellen. Durch Supplementierung des Kulturmediums mit Geneticin überleben nur die Klone, die das Plasmid integriert haben.

2.2.4 Transfektion von 3T3-Zellen mit pCMV-Luc zur transienten Luciferase-Expression

Zum Vergleich der Knock-Down-Effektivität wurden außerdem NIH-3T3-Zellen cotransfiziert. Unter einer Co-Transfektion versteht man die gleichzeitige Transfektion mit Plasmid und siRNA oder auch mit Plasmid und shRNA, die intrazellulär siRNA erzeugt. Da zwischen der Transfektion mit Plasmid und der mit siRNA immer ein zeitlicher Abstand eingehalten wurde, um ein messbares Level von degradierbarer mRNA zu erhalten, muss in diesem Fall von einer „sequentiellen Co-Transfektion“ gesprochen werden. Die Vorgehensweise für die Transfektion des Plasmids pCMV-Luc (The Plasmid Factory, Bielefeld) mit LF wurde an das Standardprotokoll von Invitrogen (Cell Line Application Data for NIH 3T3) angelehnt. Hierfür wurden 150000 Zellen NIH-3T3 pro well im 24-well-Format ausgesät und 24 Stunden im üblichen 3T3-Medium kultiviert. Nach der Inkubation wurde das serumhaltige 3T3-Medium abgesaugt und durch 0,5 ml DMEM pro well ersetzt. Zur Herstellung der Plasmid-Komplexe wurden entweder je 0,8 µg Plasmid in 50 µl Medium (DMEM) mit 2 µl LF in 50µl Medium (DMEM) oder je 1,6 µg Plasmid in 50 µl Medium (DMEM) mit 4 µl LF in 50µl Medium (DMEM) durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in einem Eppendorfcups (Standard Reaktionsgefäß 3810x, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; nachfolgend Eppendorfcup) gemischt, 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und ins serumfreie Medium getropft. Die Platte wurde zum Verteilen der Komplexe vorsichtig geschwenkt und dann für 4 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Das pDNA-LF-Komplex-haltige Medium wurde danach abgesaugt und durch frisches serumhaltiges 3T3-Medium ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt wurde auf einen Teil der wells Komplexe aus siRNA gegeben, ein anderer Teil wurde, um Kontrollwerte zu erhalten, nur

mit frischem Medium versorgt und 24 Stunden lang bis zur Lyse der Zellen weiter kultiviert.

2.2.5 Immunocytochemie

Um die Frage zu beantworten, ob alle Zellen gleichmäßig Luciferase exprimierten, oder ob es eventuell ab einer bestimmten Passagenzahl oder Zelldichte Klone gibt, die das Gen für die Luciferase nicht mehr tragen, wurde der Immunocytochemie-Versuch durchgeführt.

Der Versuchablauf wurde dem Protokoll von Promega (Antibody Assistant, Immunocytochemistry with the Anti-Luciferase pAb) angelehnt. Allerdings wurde kein Pre-Blocking unspezifischer Bindungsstellen mit Esel-Serum vorgenommen. Anstelle wurde, wie unten beschrieben, untersucht, ob es zu unspezifischer Bindung oder Eigenfluoreszenz kam.

Für den Versuch wurden an verschiedenen Tagen verschiedene Zelldichten in die Kammern von 8-chamber-slides ausgesät: An Tag 1 wurden je 25.000 Zellen pro Kammer und an Tag 3 je 15.000 Zellen pro Kammer ausgesät und mit je 250µl Kulturmedium SKOV-3/Luc bedeckt.

An Tag 6 wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit je 250 µl PBS-M gewaschen. Danach wurden die Zellen mit je 250 µl Paraformaldehyd 3% in PBS-M auf den chamber-slides fixiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit je 250 µl PBS-M gewaschen, die Zellen wurden dann mit je 250 µl 0,1%igem Triton-X 100 permeabilisiert und nach erneutem Waschen mit je 250 µl PBS-M für 2 Stunden mit je 250 µl des primären Antikörper Anti-Luciferase pAb (Promega, G7451) (20 µg/ml) behandelt.

Auf jedem 8-chamber-slide wurden nur 4 Kammern mit dem primären Antikörper inkubiert. Zwei weitere sollten als Negativkontrolle und Bestimmung etwaiger Eigenfluoreszenz dienen und wurden weder mit primärem noch mit sekundärem Antikörper behandelt, die letzten beiden sollten nur mit sekundärem Antikörper behandelt werden, um unspezifische Bindungen aufzuzeigen.

Nach der Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die ersten vier Kammern wieder mit je 250 µl PBS-M gewaschen und anschließend diese so wie die letzten beiden Kammern eine Stunde lang mit je 250 µl des sekundären, FITC-gelabelten Antikörper anti-goat IgG-FITC (Jackson ImmunoLabs, Cat. 705-095-147) (1:200-Verdünnung in PBS-M) inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit je 250 µl PBS-M wurde in allen Kammern eine DAPI-Färbung vorgenommen. Dazu wurde 20 min mit je 250 µl DAPI-Arbeitslösung bei Raumtemperatur inkubiert.

Auch nach dieser Inkubation wurde zweimal mit je 250 µl PBS-M gewaschen, wonach die Kammern abgenommen und Deckgläschen mit FluorSave™ Reagent, Calbiochem, zur Konservierung der Fluoreszenz aufgeklebt wurden.

Die Zellen wurden anschließend am Fluoreszenzmikroskop (Filterblock BP 365 FT395 LP 397 (DAPI) und BP 485 FT 510 LP 515-565 (FITC), Zeiss, Oberkochen) betrachtet.

2.2.6 Luciferase-Assay

Die Luciferase-Quantifizierung entspricht einer Chemolumineszenz-Messung. Da die Zellen das Enzym Luciferase exprimieren, wird zugefügtes Luciferin in Anwesenheit von ATP, was für die Enzymreaktion benötigt wird, zu Oxiluciferin und Lichtquanten umgesetzt, die am Luminometer erfasst werden können.

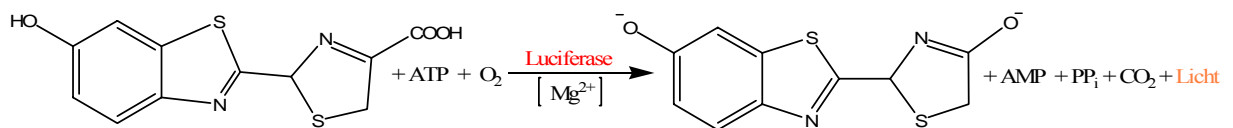


Abbildung 2.3: Umsetzung von Luciferin zu Oxiluciferin

Für einen reproduzierbaren Luciferase-Assay können nur Zell-freie Lysate verwendet werden. Die Zellen wurden deshalb vor Durchführung des Assays zur besseren Adhäsion zweimal mit 0,5 ml PBS-M gewaschen, dann mit jeweils 200 µl CCLR lysiert und in Eppendorfcups überführt. Dazu wurden die mit CCLR bedeckten Zellen 5 min auf dem Kompaktschüttler bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde die Zelldebris mit der Pipettenspitze vom Boden abgekratzt und mit dem Lysat dreimal über den Boden gespült. Die Zelllysate wurden 5 min bei 15000 UpM bei 21°C abzentrifugiert.

Der Luciferase Assay wurde mit Hilfe des Luciferase Assay Systems (Promega, Mannheim) durchgeführt. Hierfür wurden 20 µl Zelllysate in einem Luminometerröhrchen mit 100 µl LAR versetzt und sofort am Luminometer (Sirius, Berthold, Pforzheim) über 10 s mit einer Verzögerung von 2 s vermessen.

Die Relative Light Unit (RLU)-Werte wurden mit Hilfe einer Kalibrationskurve mit rekombinater Luciferase (Promega, Mannheim) in ng Luciferase je ml Zelllysate umgerechnet. Dabei entsprachen $8,33 \times 10^5$ RLU einer Luciferasekonzentration von 1 ng/ml.

2.2.7 BCA-Assay

Der BCA-Assay, benannt nach der Bicinchononic Acid, ist eine hoch empfindliche und spezifische Methode zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge [79]. Er beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine im Alkalischen in Anwesenheit von Na^+/K^+ -Tartrat und ist angelehnt an die Biuret-Bestimmung von Proteinen.

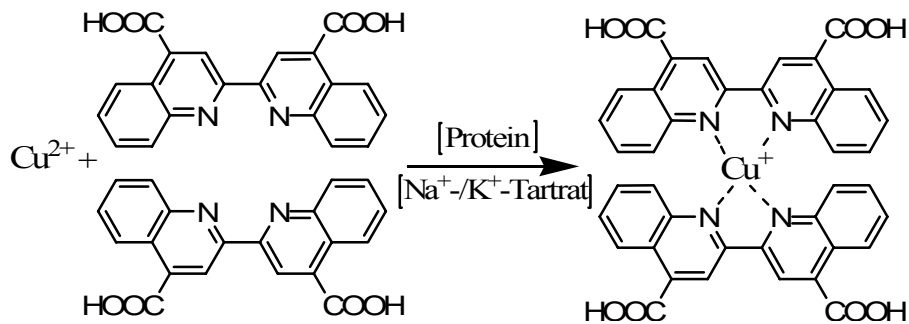


Abbildung 2.4: BCA-Reaktion

Na^+/K^+ -Tartrat dient als Chelator und Stabilisator, da es das Ausfallen von $\text{Cu}(\text{OH})_2$ verhindert.

Die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ wird maßgeblich durch die Anwesenheit der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin oder Tryptophan beeinflusst. Um jedoch die Oxidation freier Thiole zu Disulfiden zu vermeiden, was die Messwerte erheblich verfälschen würde, werden diese zuvor mit Jodacetamid alkyliert.

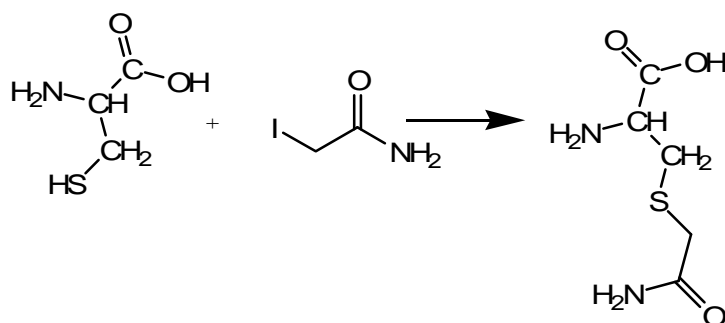


Abbildung 2.5: Alkylierung am Beispiel von Cystein

Zur Normierung der gemessenen Luciferase-Mengen auf die Gesamtproteinkonzentration wurde nach jedem Luciferase-Assay mit den gleichen Lysaten ein BCA-Assay (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt [80].

Dafür wurden 5 μl 0,1 M Jodacetamid in den Vertiefungen einer klaren 96-well-Platte (Immuno Plate MaxiSorp, Nunc, Wiesbaden) vorgelegt, mit 25 μl Zelllysat gemischt und

20 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 200 µl frisch hergestelltes BCA Working Reagent (50 Teile BCA Reagent A + 1 Teil BCA Reagent B) hinzugefügt und 40 min bei 37 °C inkubiert. Die Vermessung erfolgte, sobald keine Blasen mehr erkennbar waren, bei 570 nm mit einem ELISA-Reader (Titertek plus MS 212, ICN, Meckenheim). Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde zusätzlich Bovines Serum Albumin (BSA) in den Konzentrationen von 0,2 bis 0,8 mg/ml im Triplikate mitvermessen. Aus den Messpunkten konnte mittels Linearer Regression eine Kalibrationskurve erzeugt werden, durch die die Gesamtproteingehalte der Proben durch Interpolation errechnet werden konnten.

Aus den Ergebnissen des Luciferase-Assays und des BCA-Assay wurde die Luciferase-Expression in ng Luciferase pro mg Protein errechnet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden statistisch mit Origin 6.0 ausgewertet. One-Way Analysis of Variance (ANOVA) wurde je nach Zweck nach Bonferroni oder Dunnett durchgeführt.

2.2.8 Herstellung der Komplexe

Vor der Herstellung der Komplexe wurde aus dem siRNA-Lyophilisat eine Stammlösung durch Aufnahme in siRNA-Puffer hergestellt. Der mitgelieferte 5x siRNA-Puffer wurde durch Verdünnen mit Aqua ad inj. auf einfache Konzentration verdünnt und durch einen Filter (0,22µm, steril, Fisherbrand, Cat. No. 09-719A) sterilfiltriert. Die 20 nmol siRNA (siGL3, Dharmacon Inc, Lafayette, CO, USA) wurden in 1 ml einfach konzentriertem Puffer zu einer Endkonzentration von 20 µM verdünnt. Dabei wurde nicht gevortext sondern nur durch saches Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend 20 min lang bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Für die Herstellung der Komplexe mit LF wurde entsprechend dem Protokoll von Invitrogen (Transfecting siRNA into Mammalian Cells Using Lipofectamine 2000) vorgegangen. Laut Protokoll wurde für 20 pmol siRNA oder 0,4 µg pDNA 1 µl LF verwendet.

Für die Polymer-Komplexe wurden die notwendigen Mengen in Abhängigkeit des jeweiligen N/P-Verhältnisses, wie von Boussif et. al. beschrieben [25], bestimmt. Bei der Berechnung der N/P-Verhältnisse wurde von einem Molekulargewicht von 316,71 g/mol je Wiederholungseinheit für die verwendete siRNA und von 43,1 g/mol je Wiederholungseinheit für PEI ausgegangen. Bei den anderen Polymeren konnte nicht rein rechnerisch vorgegangen werden. Die benötigte Menge eines anderen Polymers als PEI zur Herstellung eines Komplexes eines gewünschten N/P-Verhältnisses kann nur dann sinnvoll

berechnet werden kann, wenn bekannt ist, zu welchem Grad die Stickstoffatome des Polymers protoniert vorliegen und welcher Anteil davon zur Komplexbildung zur Verfügung steht. Deshalb wurde der Anteil von Stickstoffatomen, die zur Bildung eines Cupprammonium-Komplexes fähig sind, bei verschiedenen Polymeren spektrometrisch bestimmt und mit den bei PEI erhaltenen Werten verglichen. Für diese Messung wurden 50 µl der Polymer-Lösung bekannter Konzentration mit 50 µl Kupferacetatlösung (0,02 M Kupfer(II)acetat, 5% Kaliumacetat, pH 5,5) in einer 96-well ELISA-Platte (Immuno Plate MaxiSorp, Nunc, Wiesbaden) gemischt und die Absorption bei 690 nm auf einem ELISA-Plattenlesegerät (Titertek plus MS 212, ICN, Meckenheim) vermessen. Mittels einer Kalibrationskurve aus 5 bekannten PEI-Konzentrationen zwischen 0,1 mg/ml und 2 mg/ml wurden Äquivalenzwerte für die anderen Polymere bestimmt [81]. Für PEGPEI ergaben sich 76,287 g/mol, für ePEI 114,12 g/mol.

Die siRNA wurde im jeweiligen serumfreien Medium (RPMI für SKOV-3/Luc, respektive DMEM für NIH-3T3) in Eppendorfcups (Standard Reaktionsgefäß 3810x, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; nachfolgend Eppendorfcup) so verdünnt, dass die für ein well bestimmte Menge im Gesamtvolumen von 50 µl gelöst war.

Die entsprechenden Menge LF oder Polymer wurden ebenfalls im jeweiligen serumfreien Medium in Eppendorfcups so verdünnt, dass die für ein well bestimmten Mengen im Gesamtvolumen von je 50 µl gelöst waren. Um eine gleichmäßig verdünnte Lösung zu erhalten wurde sachte auf- und abpipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden Lösungen zur Komplexbildung vereint, durch erneutes Auf- und Abpipettieren gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Transfektions-Experimente wurden 24-well-Platten (24 well Multidish Nunclon, Nunc, Wiesbaden) verwendet, wobei nach Optimierung der notwendigen Menge siRNA üblicherweise 20 oder 50 pmol und die entsprechende Menge LF oder Polymer pro well nach Vereinigung der Lösungen in einem Gesamtvolumen von 100 µl verwendet wurden.

Beim Agarose Gel Retardation Assay wurde insgesamt mit kleineren Volumina gearbeitet, wobei jedoch die Konzentration der Komplexe angeglichen wurde. Nach Ermittlung der gerade sichtbaren Menge siRNA, welche sich auf 15 pmol belief, wurde daraufhin diese Menge zur Komplexbildung eingesetzt und in einem Gesamtvolumen von 20 µl, was gerade dem Volumen der Taschen im Gel entsprach, verdünnt. Die hier verwendete Konzentration lag also etwas höher als in den Transfektionsversuchen, ergab sich jedoch als Kompromiss aus gerade sichtbarer Menge siRNA und noch möglichem Volumen.

Die Komplexe wurden so hergestellt, dass je 15 pmol siRNA mit serumfreiem Medium oder siRNA-Verdünnungspuffer zu einem Gesamtvolumen von 10 µl gelöst wurden. Die dem N/P-Verhältnis entsprechende Menge Polymer wurde auch mit Medium oder Puffer auf 10 µl verdünnt, die einzelnen Lösungen wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden Lösungen miteinander vereint und nach sachtem Auf- und Abpipettieren 20 min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung stehengelassen. Für die Dynamische Lichtstreuung wurden analog den Transfektionsversuchen je 100 µl (siRNA-Konzentration 0,5 pmol/µl, Polymer-Konzentration entsprechend N/P-Verhältnis) der Lösungen allerdings in 5 %iger Glukose-Lösung hergestellt.

2.2.9 *Agarose Gel Retardation Assay*

Da es sich bei siRNA um doppelstrangige RNA handelt, kann Ethidiumbromid mit siRNA interkalieren und diese bei UV-Anregung sichtbar machen. Negativ geladene siRNA wandert beim Anlegen eines Spannungsfelds zur positiven Anode, so dass nach 20-minütigem Entwickeln des Gels freie siRNA auf der Wegstrecke zwischen Tasche und Anode sichtbar wird. Neben einer Vergleichsprobe aus 15 pmol siRNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden Proben aus je 10 µl der siRNA-Lösung (1,5 pmol/µl siRNA) und 10 µl der Polymerlösung (siehe Abschnitt 2.2.8, Konzentration entsprechend N/P-Verhältnis) in Eppendorfcups hergestellt und 20 min lang inkubiert. Danach wurden 2 µl Loading Buffer zugegeben und die Proben in die Taschen eines 2% Agarose-Gels gefüllt. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,3 g Agarose in 65 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und vor dem Erkalten mit 4 µl Ethidiumbromid gemischt. Das Sol wurde in die Form einer Gelelektrophoresekammer (Blue Marine 100, Serva, Heidelberg) gegossen. Bis zum Erstarren wurde ein Kamm eingesetzt und das Gel wurde mit einer Plastikwanne abgedeckt. Dann wurde der Kamm entfernt, die Elektrophorese-Anlage bis zur Markierung mit TAE-Puffer befüllt, so dass das Gel nach dem Einsetzen von Puffer bedeckt war. Die Elektroden wurden an die Spannungsversorgung (LKB 2197 Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) angeschlossen, das Gel bei 100 V 30 min lang entwickelt. Die Auswertung wurde mit der Geldokumentationsanlage (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen) vorgenommen [29].

2.2.10 *PCS*

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren zur Bestimmung von Partikelgrößen im Submikrometerbereich [82].

Diese Partikel bewegen sich, wenn in einem Medium dispergiert, entsprechend der Brown'schen Diffusion infolge von Kollision mit anderen Partikeln oder Mediummolekülen ungeordnet in Abhängigkeit ihres hydrodynamischen Durchmessers, des Diffusionskoeffizienten, der Viskosität des Dispersionsmittels, der absoluten Temperatur und der Boltzmann-Konstante.

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} ; \text{ wobei } d_h: \text{ hydrodynamischer Durchmesser,}$$

k: Boltzmann-Konstante,

T: absolute Temperatur

η : Viskosität des Dispersionsmittels

D: Diffusionskoeffizient

Infolge dieser der Stokes-Einstein-Beziehung folgenden Diffusion ändert sich die Intensität des gemessenen Streulichts zeitabhängig. Die Autokorrelation, die das Gerät vornimmt, besteht im zeitabhängigen Vergleich der Messsignale. Neben dem mittleren Teilchendurchmesser wird außerdem der Polydispersitätsindex, also die Breite der Teilchengrößenverteilung, gemessen. Der Polydispersitätsindex (PI) sollte im Bereich zwischen 0 und 0,5 liegen, wobei im Falle $PI = 0$ von einer monodispersen Lösung gesprochen werden kann. Für $PI > 0,5$ ist die Partikelgrößenverteilung so weit gestreut, dass eine Auswertung nicht sinnvoll ist.

Wie bereits oben erwähnt, wurden die Komplexe für die PCS in 5 %iger Glukose-Lösung hergestellt, da bei Verwendung des 1x siRNA-Puffers die Komplexe innerhalb kürzester Zeit aggregiert hatten und eine sinnvolle Messung so nicht mehr möglich war.

Die Messungen wurden am Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Herrenberg) durchgeführt. Bei diesem Gerät wird die Probe in die optimale Position gefahren und die Messung vollautomatisch vorgenommen. Jede Probe wurde im Triplikat vermessen, wobei jede Messung 60 Sekunden lang lief. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte im GENERAL PURPOSE-Modus der Dispersion Technology Software, Malvern Instruments, Herrenberg.

2.2.11 Doppelmarkierung der siRNA-Polymer-Komplexe

Für die Aufnahmeuntersuchungen wurden doppelmarkierte Komplexe mit zwei verschiedenen Fluoreszenzmarkern hergestellt. Hierfür wurde die bereits mit Cy3-gelabelte siRNA (Dharmacon Inc, Lafayette, CO, USA) verwendet und die verschiedenen Polymere mit FITC markiert. Die Markierung wurde entsprechend dem Protokoll von Molecular Probes (Amine-Reactive Probes) vorgenommen. Hierfür wurden 3 mg FITC in 300 μ l

DMSO gelöst. Es wurden Lösungen von PEI, ePEI und LMWPEI mit je 10 mg/ml Polymer in Natriumhydrogencarbonatpuffer, pH 9, hergestellt. Je 1 ml Polymerlösung wurde mit je 100 µl FITC-Lösung (0,1 mg/ml FITC) gemischt und 4 Stunden lang im mit Alufolie gegen Licht geschützten Rundkolben (Rundkolben M.NS, Duran, Volumen: 50, Schott, Mainz) gerührt (Magnetrührer, IKAMAG RCT, IKA, Stauffen). Anschließend wurden die Lösungen aufgereinigt und von ungebundenem FITC getrennt. Dies geschah beim LMWPEI aufgrund des kleinen Molekulargewichts in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon 8010, Millipore, Schwalbach) mit 1 kDa Membran (Diaflo YM 1, Amicon, Schwalbach), die anderen Polymerlösungen (PEI 25, ePEI) wurden über eine PD 10-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) getrennt. Während der Trennungen wurde gleichzeitig auf 1x siRNA-Puffer umgepuffert, so dass das Eluat gleich verwendungsfähig für die Komplexierung mit siRNA erhalten wurde. Für die Trennung in der Amicon-Zelle wurde der Filter eingelegt, zunächst mit 5 ml 1x siRNA-Puffer gespült und dann die Probe aufgetragen. Es wurde so lange Puffer nachgefüllt, bis mit Hilfe des Fluoreszenzreaders keine Fluoreszenz mehr im Diafiltrat messbar war. Bei der Trennung über die PD 10-Säule wurde diese mit 25 ml 1x siRNA-Puffer equilibriert. Danach wurde 1 ml der Polymer-Label-Lösung aufgetragen und der erste ml Eluat verworfen. Danach wurden 3 ml 1x siRNA-Puffer aufgetragen und das Eluat aufgefangen. Dem Prinzip der Gelfiltration entsprechend, verblieben FITC-Moleküle, die nicht reagiert hatten, in den Poren der Säule, während das gelabelte Polymer eluiert wurde. Die tatsächliche Polymerkonzentration der Eluate wurde nach Sterilfiltration mit Hilfe von Vergleichslösungen am Plattenleser bestimmt, vgl. unter 2.2.8. Da der Anteil gelabelten Polymers für die Aufnahmeuntersuchungen keine Rolle spielte, wurde die Messung dessen nicht vorgenommen.

Die Komplexe für den Versuch wurden hergestellt, wie unter 2.2.8 beschrieben. Als Lösungsmittel diente sowohl für die siRNA als auch für die Polymerlösungen 1x siRNA-Puffer. Aufgrund der viel kleineren Fläche in den Kammern der chamberslides und der geringeren Zellzahl wurden alle Volumina sowie die Menge an siRNA und entsprechend die Polymermengen auf 8,4 pmol siRNA und je 40 µl fertige Komplexlösung pro Kammer angeglichen.

2.2.12 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Zur konfokalen Mikroskopie wurde ein Zeiss Axiovert 100 M Mikroskop verwendet, an das zum Scannen ein Zeiss LSM 510 Scanning Device angeschlossen ist.

Für die Immunfluoreszenzversuche wurden die Zellen mit Zelldichten von 25.000 Zellen und 15.000 Zellen pro Kammer eines 8 well chamber slides (LabTek, Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Für die Aufnahmeuntersuchungen wurden 15.000 Zellen pro Kammer eines 8 well chamber slides ausgesät.

Bei den Immunfluoreszenzversuchen wurden verschiedene Kultivierungsdauern untersucht. Bei den Aufnahmeuntersuchungen wurden jedoch, so wie bei den Transfektionsversuchen vorgegangen wurde, bereits 6 Stunden nach der Aussaat Komplexe auf die SKOV-3/Luc-Zellen gegeben. Die NIH-3T3-Zellen wurden, wie bei den Transfektionsversuche auch, am Vortag ausgesät und erst nach 28 Stunden mit Komplexen aus Polymer und siRNA behandelt. Eine vorherige Transfektion mit LF-pDNA wurde nicht vorgenommen, da es in diesem Versuch um die Lokalisierung der siRNA-Komplexe sowie um deren Zerfall ging. Um eine Zeitfolge untersuchen zu können, wurden die Zellen nach 15 min, 30 min, 60 min und 150 min auf den Objektträger-Slides fixiert.

Zum Fixieren wurde nach der jeweiligen Kultivierungsdauer das Medium entfernt und zweimal mit 250 µl PBS-M gewaschen, anschließend 20 min mit je 250 µl Paraformaldehyd 3% in PBS-M inkubiert. Bei den Immunfluoreszenzversuchen wurde nun, wie unter 2.2.5 beschrieben, mit den Antikörpern inkubiert. Bei den Aufnahmeversuchen waren die Komplexe zuvor doppelmarkiert worden, so dass nun nur noch die DAPI-Färbung durchgeführt werden musste. Dazu wurde nach dreimaligem Waschen mit je 250 µl PBS-M 20 min lang mit je 250 µl DAPI-Arbeitslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Auch nach dieser Inkubation wurde zweimal mit je 250 µl PBS-M gewaschen, wonach die Kammern abgenommen und Deckgläschen mit FluorSaveTM Reagent, Calbiochem 345789, zur Konservierung der Fluoreszenz aufgeklebt wurden.

Zur Fluoreszenzanregung wurde für FITC ein Argonlaser mit einer Excitationswellenlänge von 488 nm, für DAPI ein Entertiselaser mit einer Excitationswellenlänge von 364 nm und für Cy3 ein Helium-Neon-Laser mit einer Excitationswellenlänge von 543 nm benutzt. Die Fluoreszenz wurde bei FITC durch einen 505-525 nm Bandpassfilter, bei DAPI durch einen 385 nm Langpassfilter und bei Cy3 durch einen 560-615 nm Bandpassfilter detektiert. Die FITC-, DAPI- sowie die Cy3- Fluoreszenz bei den Aufnahmeuntersuchungen und die Überlagerung von Durchlichtbild und Fluoreszenzbild wurden aufgezeichnet.

2.2.13 Transfektionsexperimente

Für die Transfektionsexperimente wurden nach Optimierung der Parameter SKOV-3/Luc Zellen immer mit einer Zelldichte von 70.000 Zellen/well und NIH-3T3 Zellen immer mit einer Zelldichte von 150.000 Zellen/well in 24 well Platten (24 well Multidish Nunclon, Nunc, Wiesbaden) ausgesät.

SKOV-3/Luc Zellen wurden 6 Stunden nach Aussaat mit je 100 µl Komplexlösung pro well behandelt und 24 Stunden lang bei 37 °C im CO₂-Inkubator kultiviert.

NIH-3T3 Zellen wurden 24 Stunden kultiviert, danach wurde das serumhaltige Medium durch reines DMEM ersetzt und die Zellen wurden mit pDNA-LF-Komplexen in je 100 µl pro well transfiziert. Nach vierstündiger Inkubation im CO₂-Inkubator bei 37 °C wurde das serumfreie Medium abgesaugt und durch Kulturmedium ersetzt. In dieses Medium wurden dann je 100 µl siRNA-Komplexlösung getropft, die Platte wurde zum Verteilen der Komplexe vorsichtig geschwenkt und dann für 24 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Komplexe wurden wie unter 2.2.8 beschrieben hergestellt. Nach der jeweils 24-stündigen Inkubation mit den siRNA-Komplexen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS-O gewaschen. Anschließend wurden mit je 100 µl CCLR Zelllysate für die Luciferase- und BCA-Assays hergestellt, wie unter 2.2.6 beschrieben. Es wurden jeweils beide Assays durchgeführt und zur Auswertung die gefundenen Luciferase-Werte auf den Gesamtproteingehalt bezogen. Alle Versuche fanden im Triplikat statt.

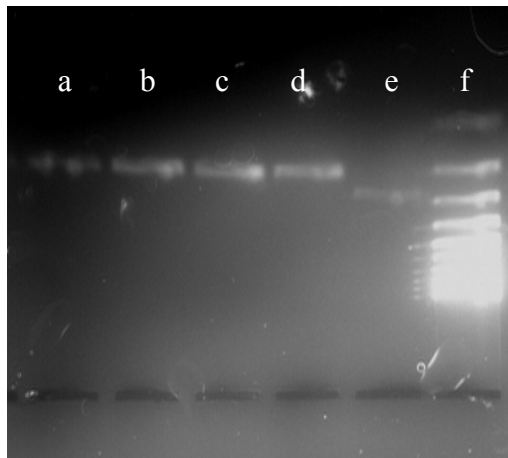
3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Zelllinie SKOV-3/Luc

3.1.1 Untersuchung auf Mykoplasmenkontamination

Die von Dr. Achim Aigner, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität Marburg, erhaltenen Zellen SKOV-3/Luc wurden zunächst mittels PCR auf Mykoplasmenkontamination untersucht. Außerdem wurden die zwei weiteren sich zu diesem Zeitpunkt in Kultur befindlichen Zelllinien überprüft und eine Positiv- sowie eine Negativkontrollprobe mitlaufen gelassen. Für die Proben wurde Zellkulturüberstand verwendet und nach Aufkochen und Zentrifugation mit Primern, Polymerase und internem Standard versetzt.

Der Versuch wurde wie unter 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Digitalisierung des Ergebnisses der Agarose-Gel-Elektrophorese fand an der Geldokumentationsanlage (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen) statt.



- a) Bande bei 191 bp (Internal Control)
- b) Zelllinie MG: Bande bei 191 bp → negativ
- c) Zelllinie SKOV-3/Luc: Bande bei 191 bp → negativ
- d) Zelllinie NIH-3T3/LacZ: Bande bei 191 bp → negativ
- e) Bande bei 270 bp für die Positiv-Kontrolle
- f) 100 bp DNA-Leiter

Abbildung 3.1: Auswertung der Gelelektrophorese nach PCR-Untersuchung auf Mykoplasmen

Keine der Zelllinien wies eine Bande bei 270 bp auf. Es konnte keine Kontamination mit Mykoplasmen nachgewiesen werden, die neue Zelllinie konnte also ohne Bedenken weiter kultiviert werden und wurde für Versuche freigegeben.

3.1.2 Untersuchungen zur Immunfluoreszenz mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Bevor mit Knock-Down-Versuchen begonnen wurde, musste die Zelllinie auf die Expression von Luciferase untersucht werden. Hierfür wurde eine

Immunfluoreszenzmethode mit einem spezifischen Antikörper gegen Firefly-Luciferase und einem sekundären, FITC-gelabelten Antikörper herangezogen. Die Versuchsdurchführung wurde, wie oben beschrieben, an das Protokoll von Promega (Antibody Assistant, Immunocytochemistry With the Anti-Luciferase pAb) angelehnt. Die Zellen wurden an zwei verschiedenen Tagen mit verschiedenen Zellzahlen ausgesät und 3, respektive 5 Tage bis zur Durchführung des Versuchs kultiviert. Anschließend wurden Aufnahmen mit dem CLSM gemacht.

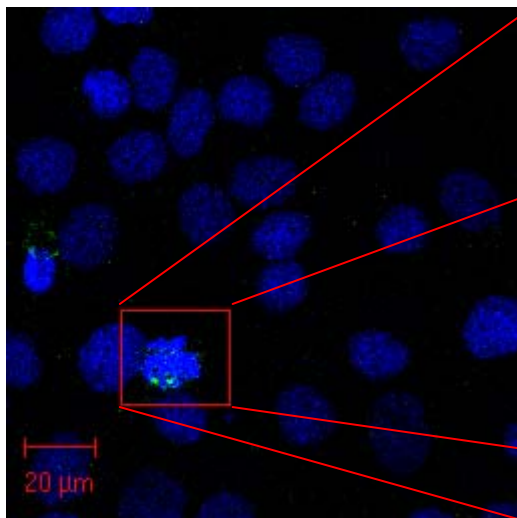


Abbildung 3.2: Hohe Zelldichte (25.000 Zellen), Positivkontrolle (beide Antikörper) in Übersicht

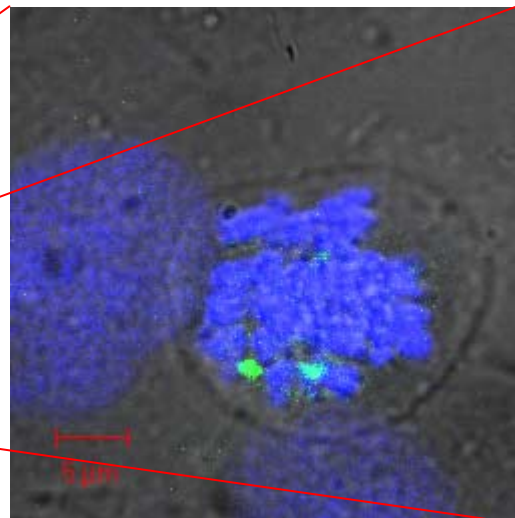


Abbildung 3.3: Hohe Zelldichte (25.000 Zellen), Positivkontrolle, (beide Antikörper) in Detail

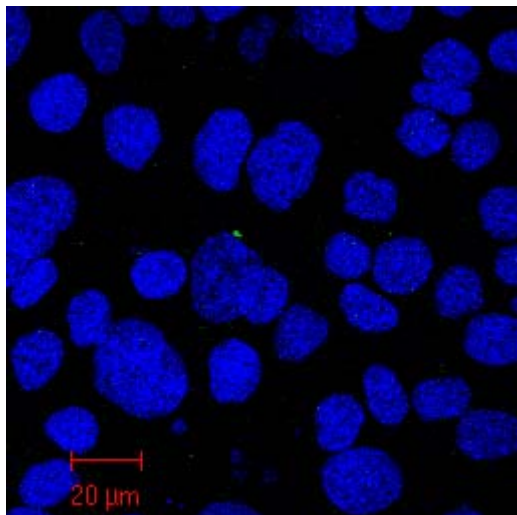


Abbildung 3.4: Hohe Zelldichte (25.000 Zellen), Negativkontrolle

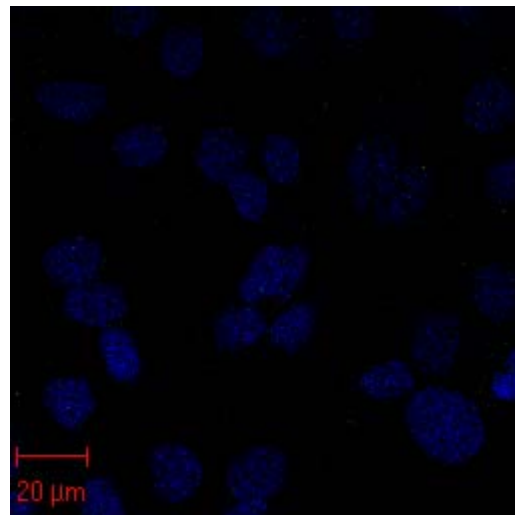


Abbildung 3.5: Hohe Zelldichte (25.000 Zellen), Kontrolle unspezifischer Bindung des sekundären Antikörpers

Zur Auswertung ist zu sagen, dass die früher ausgesäten Zellen nur wenig Fluoreszenz zeigten, da sie eventuell schon zu dicht für den Versuch waren (siehe Abbildungen 3.2-3.3). Die Konzentration der Triton-X-Lösung hätte in Übereinstimmung mit [83-85] ausreichen sollen, um die Zellen genügend zu permeabilisieren. Es ist jedoch möglich, dass nur Zellen,

die sich gerade in der Zellteilungsphase befanden, und deren Zellmembranen aufgrund dieser Tatsache kollabiert waren, den Antikörper aufnehmen konnten (siehe Abbildung 3.3). In den Kontrollversuchen konnten weder bedeutende Eigenfluoreszenz noch unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers festgestellt werden. Leichtes Hintergrundrauschen könnte unter anderem durch Kristalle hervorgerufen worden sein und kann vernachlässigt werden.

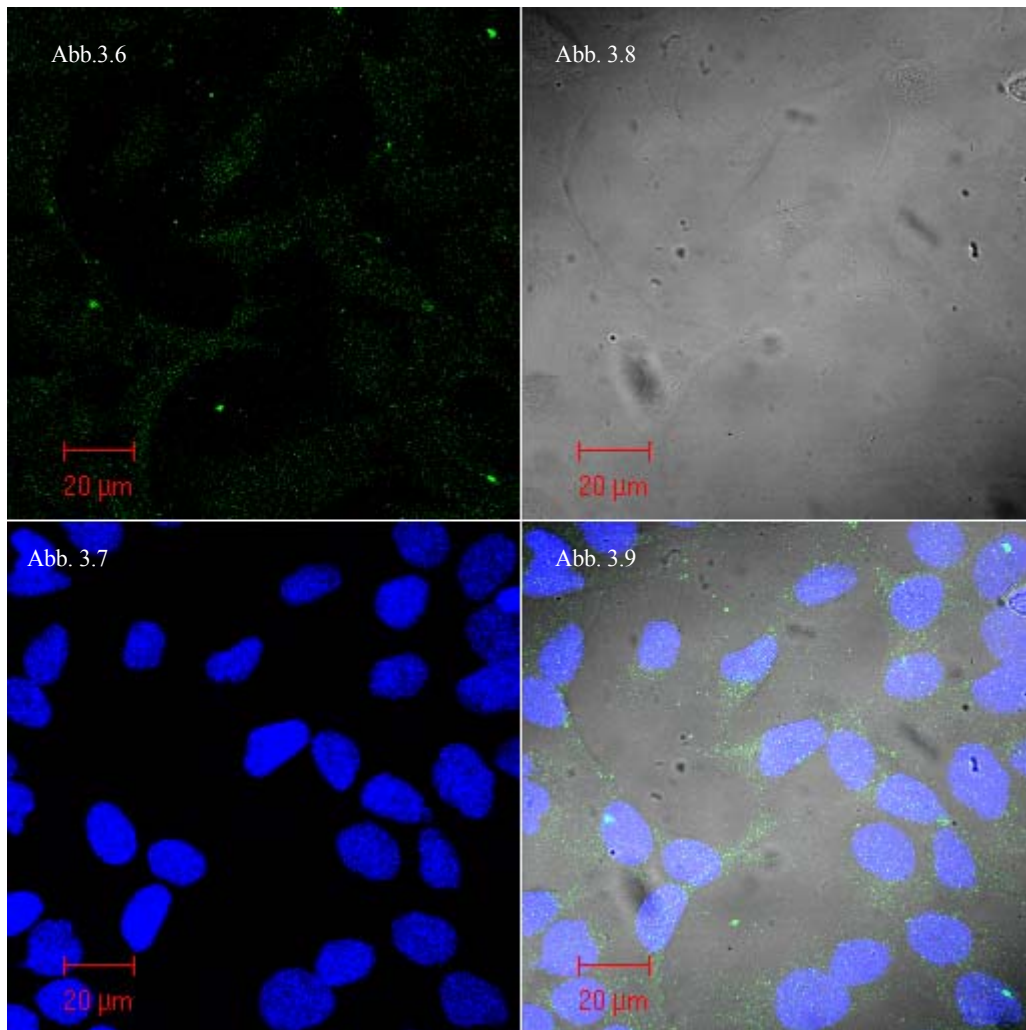


Abbildung 3.6: Niedrige Zelldichte (15.000 Zellen), Positivkontrolle

Abbildung 3.8: FITC-Anregung zur Visualisierung des gelabelten sekundären Antikörpers

Abbildung 3.7: Durchlicht zur Visualisierung der Zellen

Abbildung 3.9: DAPI-Anregung zur Visualisierung der Zellkern

Overlay der drei Kanäle:

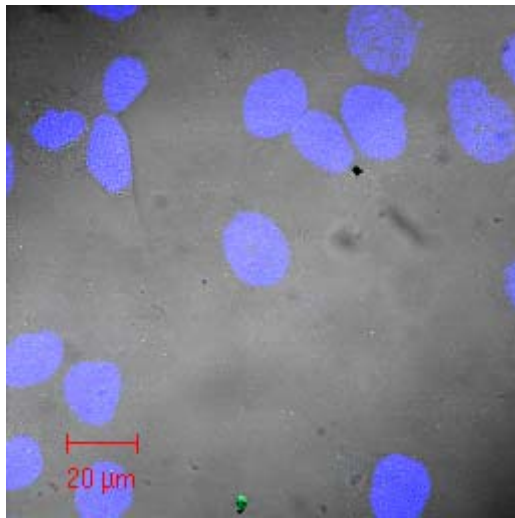


Abbildung 3.10: Niedrige Zelldichte (15.000 Zellen), Negativkontrolle

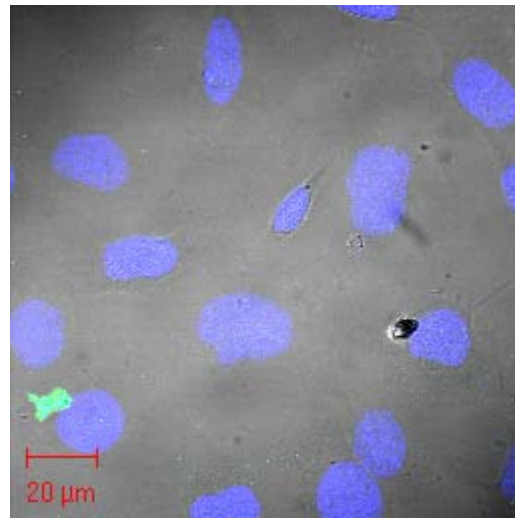


Abbildung 3.11: Niedrige Zelldichte (15.000 Zellen), Kontrolle unspezifischer Bindung des sek. Antikörpers

Mit den zum späteren Zeitpunkt ausgesäten Zellen konnten bessere Ergebnisse erzielt werden: Bei den mit beiden Antikörpern behandelten Zellen konnte gezeigt werden, dass Luciferase im gesamten Zytosol der Zellen verteilt vorkommt, und dass jede einzelne Zelle Luciferase exprimiert (siehe Abbildung 3.6 und 3.9). Dickere grüne Flecken könnten Ribosomen darstellen.

Bezüglich der Eigenfluoreszenz und der unspezifischen Bindungen gab es keine neuen Ergebnisse (Abbildungen 3.10-3.11). Da allerdings die Fluoreszenz auch bei der Positivkontrolle der dünner ausgesäten Zellen sehr schwach war, musste davon ausgegangen werden, dass vielleicht auch hier die Permeabilisierung der Zellmembranen nicht ideal war oder die Zellen eventuell nur sehr wenig Luciferase exprimiert hatten. Ein weiterer Erklärungsansatz ist eine vielleicht nicht ausreichend lange Inkubationszeit mit dem primären und sekundären Antikörper.

3.1.3 Quantifizierung der Luciferase-Expression

Aufgrund der sichtbaren aber schwachen Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Luciferase-Assays eine Quantifizierung der Luciferase-Expression vorgenommen. Hierfür wurden 70000 Zellen pro well im 24-well-Format 48 Stunden kultiviert [71] und bei Konfluenz nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml PBS-M durch je 100 μ l CCLR lysiert. Mit den Lysaten wurde nach Abtrennen von Zellbestandteilen durch Zentrifugation der Luciferase-Assay durchgeführt, wie unter 2.2.6 beschrieben. Zur Normierung der erhaltenen Werte auf

den Gesamtproteingehalt wurde anschließend, wie unter 2.2.7 beschrieben, ein BCA-Assay aller Proben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung 3.12 dargestellt.

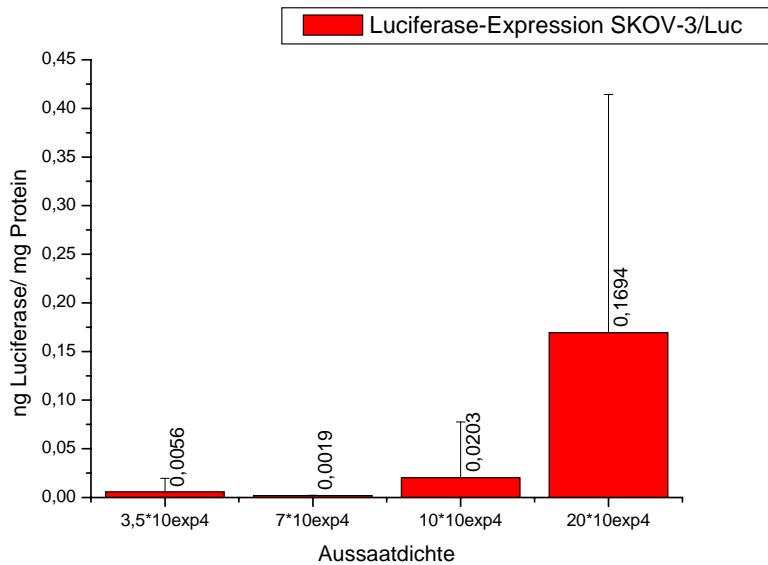


Abbildung 3.12: Luciferase-Expression in Abhängigkeit der Zellaussaatdichte

Die Messwerte waren jedoch, in Abhängigkeit von der Aussaatdichte, kaum nachweisbar bis äußerst gering und stark schwankend, so dass zuerst eine Optimierung der Zellkultivierung vorgenommen werden musste.

3.2 Optimierung der Wachstumsbedingungen und Luciferase-Expression der Zelllinie SKOV-3/Luc

3.2.1 Zelldichte

Da die Luciferase-Expression anscheinend von der Aussaatdichte der Zellen abhing, wurde zunächst versucht, diesen Parameter zu optimieren. Da jedoch nur, wenn die Zellen in Medium mit doppeltem FKS kultiviert wurden, wie dies direkt nach dem Auftauen gehandhabt wurde, höhere Luciferase-Expression erreicht werden konnte, wurde dazu übergegangen, permanent Medium mit 20% FKS zur Kultivierung der SKOV-3/Luc zu verwenden. Tatsächlich stieg die Luciferase-Expression innerhalb eines Monats deutlich an. Für alle Versuche wurden in je 6 wells SKOV-3/Luc mit den Zelldichten von 35.000, 70.000, 100.000 oder 200.000 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für Luciferase- und BCA-Assays lysiert.

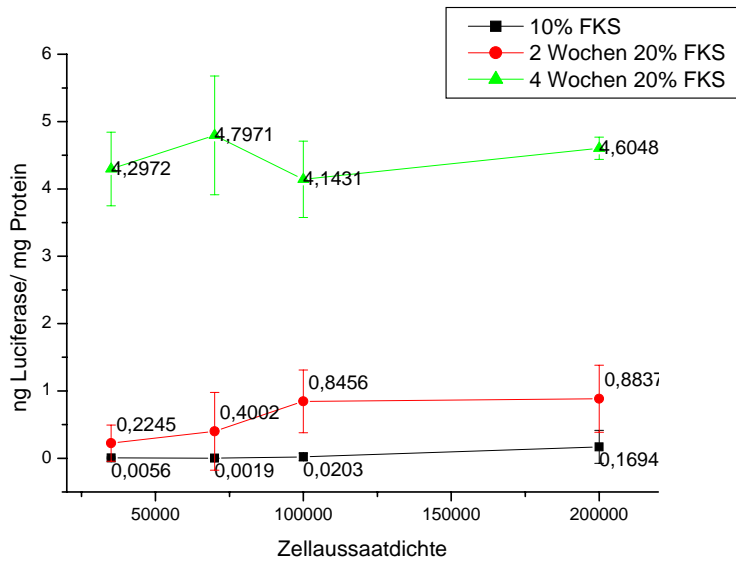


Abbildung 3.13: Luciferase-Expression in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer in 20% FKS-haltigem Medium

Bereits nach zweiwöchiger Kultivierung in 20 % FKS-haltigem Medium konnte ein deutlicher Anstieg der Luciferase-Expression gezeigt werden. Daraufhin wurde ausschließlich SKOV-3/Luc-Medium mit 20 % FKS verwendet, so dass die Parentalgenerationen also von Anfang an nur noch dieses erhielten. Beim nächsten Versuch mit insgesamt vier Wochen lang in 20 % FKS-haltigem Medium kultivierten Zellen konnte ein weiterer Anstieg der Luciferase-Expression gezeigt werden. Ein besseres Wachstum konnte zum Teil auch am gesteigerten Gesamtproteingehalt der Zellen nachgewiesen werden.

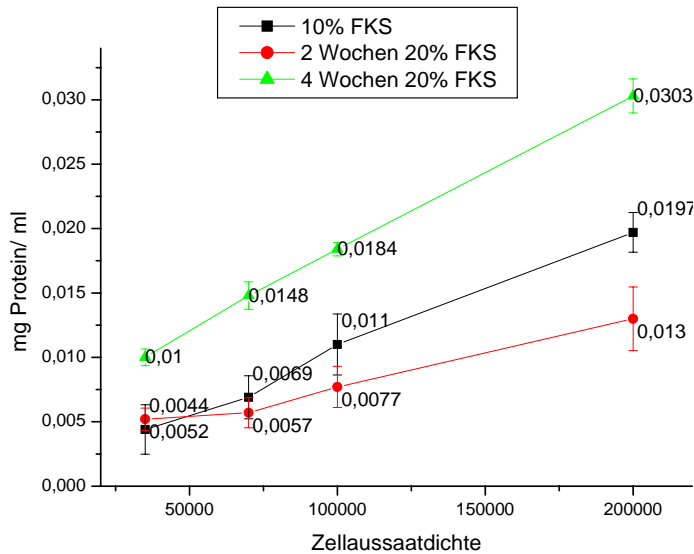


Abbildung 3.14: Gesamtproteingehalt in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer in 20% FKS-haltigem Medium

Nach der Auswertung stellte sich für eine Aussaatdichte von 70000 Zellen pro well mit 4,7971 ng/mg das günstigste Verhältnis von ng Luciferase/ mg Protein heraus. Aus diesem Grund wurde diese Zellaussaatdichte allein für die darauf folgenden Knock-Down-Versuche verwendet.

3.2.2 FKS-Anteil im Medium

Um zu untersuchen, ob ein noch höherer Anteil FKS ein noch besseres Ergebnis erzielen könnte, wurde eine Reihenuntersuchung mit ansteigenden FKS-Anteilen durchgeführt. Dazu wurden 70.000 Zellen je well auf einer 24-well Platte ausgesät. Je sechs wells wurden mit 20 %, 30 %, 40 % oder 50 % FKS-haltigem Medium versorgt. Die Zellen in je drei der sechs wells wurden nach 24 Stunden, die Zellen in den anderen 3 wells wurden nach 48 Stunden zur anschließenden Durchführung der Luciferase- (siehe unter 2.2.6) und BCA-Assays (siehe unter 2.2.7) lysiert. Auf diese Weise konnten mit einem Versuch die Abhängigkeit der Luciferase-Expression vom FKS-Anteil am Medium sowie der zeitliche Verlauf der Luciferase-Menge pro Protein untersucht werden.

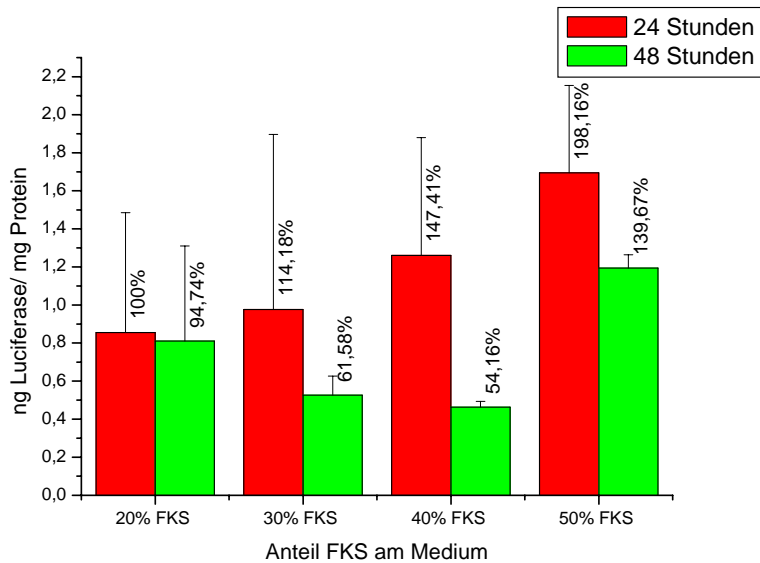


Abbildung 3.15: Vergleich der Luciferase-Expression in Abhängigkeit der Kulturdauer und des FKS-Anteils im Medium

Nach statistischer Auswertung (One Way Analysis of Variance, Bonferroni Multiple Comparisons Test) konnte für $P > 0,05$ kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten für die 24-stündige Kultivierung in verschiedenen Medien festgestellt werden. Auch bei den 48-Stunden-Werten war für $P > 0,05$ kein signifikanter Unterschied vorhanden.

3.2.3 Kultivierungszeit

Selbst zwischen dem jeweiligem 24- und 48-Stunden-Wert bestand kein signifikanter Unterschied, $P > 0,05$. Aufgrund dieser Indifferenz wurde für die nächsten Versuche eine Dauer von 24 Stunden für den Zeitraum bis zur Lyse gewählt, um schnell Ergebnisse zu erhalten. Aufgrund der kleineren Standardabweichungen wäre aber eine Inkubation von 48 Stunden möglicherweise günstiger gewesen.

3.3 Etablierung eines Kotransfektionsmodells mit NIH-3T3 -Zellen

Wie unter 2.2.4 beschrieben, sollten NIH-3T3-Zellen einer „verzögerten Co-Transfektion“ unterzogen werden. Zur Ermittlung der notwendigen Menge Plasmid-DNA (p-CMVLuc, The Plasmid Factory, Bielefeld) für eine Kotransfektion sowie zur Ermittlung der optimalen Menge siRNA für einen möglichst vollständigen Knock-Down wurde ein Versuch konzipiert, der beide Parameter gegenüberstellen konnte. Für diesen Versuch wurde eine

24-well-Platte mit je 150.000 NIH 3T3 Zellen pro well in Kulturmedium NIH-3T3 ausgesät. 24 Stunden nach Aussaat wurde mit der Transfektion der Plasmid-Polyplexe begonnen. Die Transfektion wurde, wie unter 2.2.4 beschrieben, an das Protokoll von Invitrogen (Cell Line Application Data for NIH 3T3) angelehnt. Dazu wurde das serumhaltige 3T3-Medium abgesaugt und durch 0,5 ml DMEM pro well ersetzt. Auf die eine Hälfte der Platte wurden Komplexe aus LF und 0,8 µg pDNA, auf die andere Hälfte Komplexe aus LF und 1,6 µg pDNA pro well aufgetragen.

Die Komplexe wurden so hergestellt, dass für die eine Hälfte der Platte (0,8 µg pDNA pro well) eine Lösung von 500 µl mit 16 µg/ml pDNA und für die andere Hälfte (1,6 µg pDNA pro well) eine Lösung von 500 µl mit 32 µg/ml pDNA hergestellt wurde.

4 Stunden nach der Transfektion der 3T3-Zellen mit den pDNA-LF-Komplexen wurde das serumfreie Medium (DMEM) abgesaugt und durch 0,5 ml serumhaltiges NIH-3T3-Kulturmedium pro well ersetzt. Nach der Inkubationszeit der siRNA-LF-Komplexe wurden je 100 µl Komplexlösung pro well mit ansteigenden Mengen siGL3 (20, 50, 100 pmol) in das serumhaltige Medium getropft. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und mit den Lysaten ein Luciferase- (siehe unter 2.2.6) sowie ein BCA-Assay (siehe unter 2.2.7) durchgeführt.

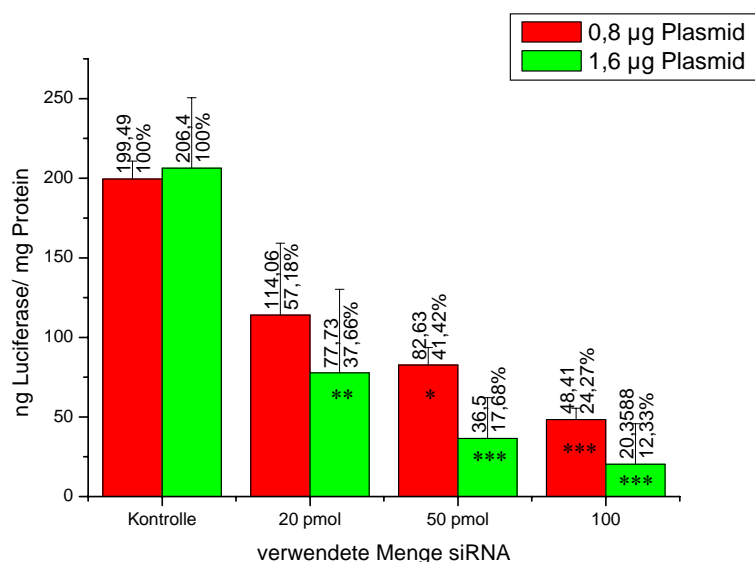


Abbildung 3.16: Austitration der optimalen Mengen Plasmid sowie siRNA für das Kotretransfektionssystem

Bei diesem Co-transfektionsversuch war ein Knock-Down deutlich erkennbar.

Obwohl die Luciferase-Expression bei Verwendung der doppelten Menge an pDNA kaum erhöht schien, war der Knock-Down bei gleichen Mengen siRNA vollständiger.

Nach statistischer Auswertung ist zu sagen, dass bei Verwendung von 1,6 µg Plasmid schon nach Zusatz von 20 pmol komplexierter siRNA ein signifikanter Unterschied (** P < 0,01) in der messbaren Luciferase-Menge vorliegt. Für 50 pmol komplexierte siRNA ist der Knock-Down für *** P < 0,001 signifikant, gleiches gilt für 100 pmol siRNA. Bei Verwendung von 1,6 µg Plasmid und 100 pmol spezifischer siRNA wurde zwar ein maximaler Knock-Down von 87,67 % erreicht, jedoch ist auch anzumerken, dass in diesem Fall die Gesamtproteinexpression von durchschnittlich 0,120mg/ml auf 0,065mg/ml, also auf 54,17% des Proteingehalts unbehandelter Zellen gesunken war. Daher sollte unbedingt die Auswirkung unspezifischer siRNA auf die Zellproliferation sowie Zytotoxizität, und eine eventuelle Aktivierung des Interferon-Systems als Ursache der Abnahme der Gesamtproteinmenge in Betracht gezogen werden. Da zwischen den Werten für 50 pmol und 100 pmol jedoch kein signifikanter Unterschied zu zeigen war, wurde von einer Verwendung von 100 pmol siRNA pro well für die folgenden Versuche abgesehen.

Bei den mit 0,8 µg pDNA transfizierten Zellen konnte ein signifikanter Knock-Down für *P < 0,05 erst bei 50 pmol komplexierter siRNA verzeichnet werden, für ***P < 0,001 bei 100 pmol.

Für die folgenden Co-Transfektionen wurden deshalb pro well mit 70.000 Zellen NIH-3T3 1,6 µg Plasmid und 50 pmol siRNA verwendet.

3.4 Ermittlung der benötigten Menge siRNA

Da nicht davon ausgegangen werden konnte, dass die für die NIH-3T3-Zellen ermittelte Menge siRNA auch für das Knock-Down-System mit den SKOV-3/Luc-Zellen die optimale Menge sein würde, wurde auch mit diesen Zellen eine Concentration-Response-Analyse durchgeführt. Für diesen Versuch wurde mit LF gearbeitet, da der Versuch dann entsprechend dem Protokoll von Invitrogen (Transfecting siRNA into Mammalian Cells Using Lipofectamine 2000) durchgeführt werden konnte, ohne dass weitere Parameter als die bereits untersuchten, hätten bestimmt werden müssen. Es wurde eine 24-well-Platte mit 70.000 SKOV-3/Luc-Zellen pro well ausgesät. Die Komplexe wurden mit steigenden Mengen siRNA (5, 10, 20, 40, 50, 75 und 100 pmol siGL3), jedoch mit einem konstanten Verhältnis siRNA:LF hergestellt. Alle Lösungen wurden bei diesem Versuch mit serumfreiem Medium (RPMI) hergestellt. Sechs Stunden nach der Aussaat wurden je 100µl Komplexlösung mit Komplexen aus siRNA und LF pro well in das serumhaltige Medium getropft. Die Platte wurde zum Verteilen der Komplexe vorsichtig geschwenkt und dann für

24 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für die Durchführung der Luciferase- sowie ein BCA-Assays lysiert (siehe hierzu unter 2.2.6-2.2.7).

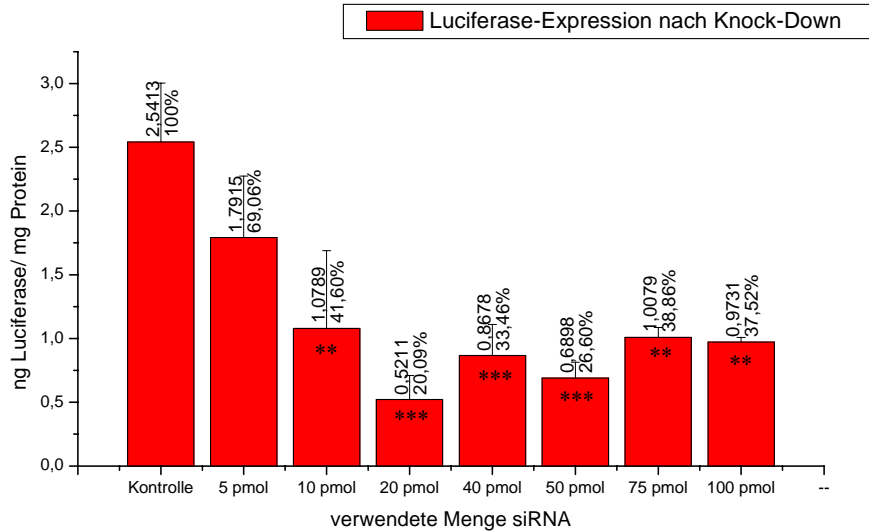


Abbildung 3.17: Austitration der optimalen Menge siRNA für das SKOV-3/Luc-System

Nach Normierung der gemessenen Luciferase-Aktivitäten auf die Gesamtproteinmengen war ein Knock-Down eindeutig zu erkennen. Nach statistischer Auswertung muss allerdings angemerkt werden, dass es sich bei den für 5 pmol siRNA gefundenen Werten um nicht signifikant von der Kontrolle unterschiedliche handelt. Erst ab der Verwendung von 10 pmol unterscheiden sich die Werte für $**P < 0,01$ und ab 20 pmol für $***P < 0,001$. Bei der Verwendung von 75 oder 100 pmol siRNA pro well stiegen die normierten Messwerte wieder an, ein signifikanter Unterschied ist hier nur für $**P < 0,01$ gegeben. Dies kann allerdings durch die Abnahme der Gesamtproteinmenge auf weniger als 0,3 mg/ml im Durchschnitt ab einer verwendeten Menge von 40 pmol siRNA erklärt werden. Zu erwähnen ist außerdem, dass der Unterschied zwischen den Werten für 10, 20, 40, 50, 75 und 100 pmol siRNA mit $P > 0,05$ nicht signifikant ist.

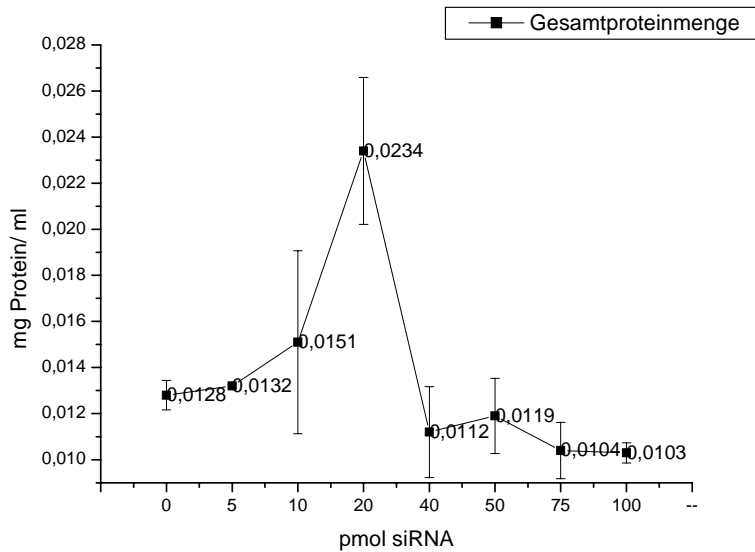


Abbildung 3.18: Gesamtproteinmenge der Zelllysate nach Knock-Down

Eine signifikante Unterschied in der Gesamtproteinmenge der Zelllysate kann beim Vergleich der Werte für 20 pmol mit den Werten für 40, 50, 75 und 100 pmol für $P < 0,001$ beobachtet werden und könnte auf eine Aktivierung antiproliferativer sowie zytotoxischer Effekte zurückgeführt werden.

Ob dieser Effekt auch durch unspezifische siRNA hervorgerufen wird, wurde in einem späteren Versuch untersucht.

Da hier die Gesamtproteinmenge der Zelllysate jedoch starke Schwankungen zeigte, ist in diesem Fall sinnvoll, die absoluten Messwerte des Luciferase-Assays gegenüberzustellen.

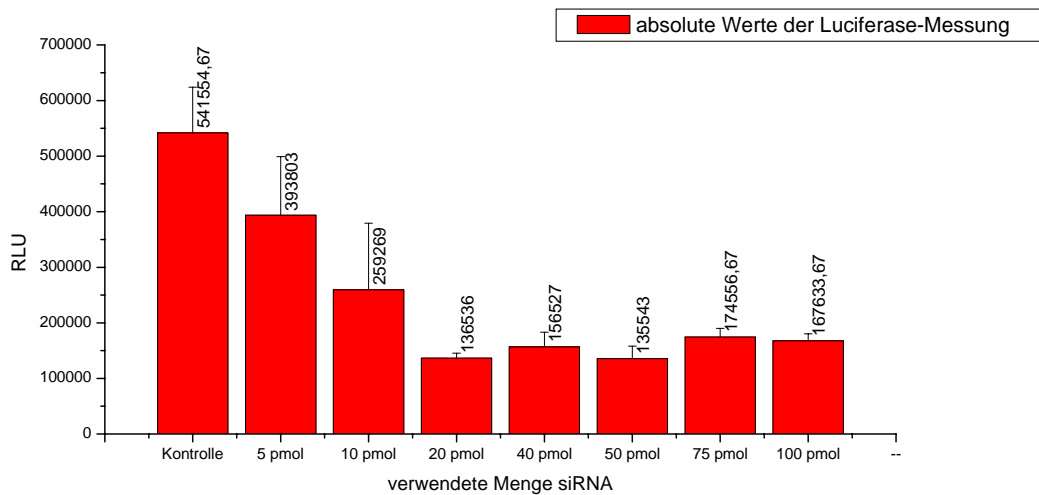


Abbildung 3.19: Darstellung der Luciferase-Expression in RLU

Aus diesem Versuch war zu schließen, dass beim SKOV-3/Luc-System 20 pmol siRNA pro well und 70.000 Zellen für einen maximalen Knock-Down bei Behandlung der Zellen mit siRNA 6 Stunden nach Aussaat ausreichen.

3.5 Kinetik-Betrachtungen

Unter Kinetik-Betrachtungen versteht man die Aufzeichnung von Konzentrationsänderungen mit der Zeit. Um die Knock-Down-Wirkung verschiedener Mengen siRNA in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Behandlung untersuchen zu können, wurde eine Time-course-Betrachtung der Luciferase-Expression vorangestellt. Die Zeitanhängigkeit der Luciferasemenge im Zelllysate wurde so untersucht, dass eine 24-well-Platte SKOV-3/Luc mit 70.000 Zellen pro well ausgesät wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen in je drei wells lysiert. Die Werte der im Luciferase-Assay gemessenen Relativen Licht-Einheiten (RLU) sowie die auf den Gesamtproteingehalt der Lysate normierten Werte wurden über die Kultivierungsdauer aufgetragen.

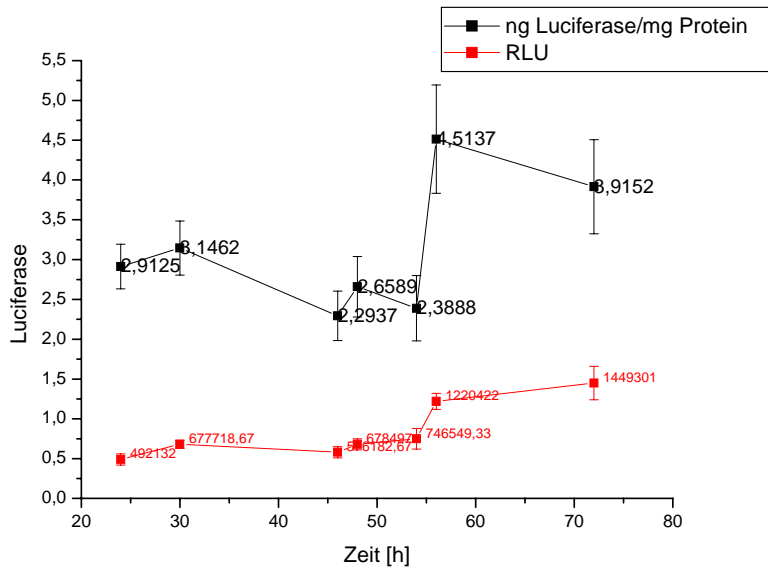


Abbildung 3.20: Kinetik-Betrachtung der Luciferase-Expression

Hier konnte gezeigt werden, dass nach einer anfänglichen lag-Phase die Luciferase-Gesamtmenge im Zelllysate exponentiell ansteigt, nach 50 Stunden Kultivierung aber verhältnismäßig weniger zunimmt als die Gesamtproteinmenge. Grund der Abnahme der auf den Gesamtproteingehalt normierten Kurve könnte allerdings auch die kurze Halbwertszeit der Luciferase von nur drei Stunden [74] im Gegensatz zu den Halbwertszeiten anderer in den Zellen produzierter Struktur- und Funktionsproteine sein. Von einer Zelltod-Phase kann aufgrund weiterhin ansteigender Proteinmengen nicht ausgegangen werden.

Um nun die Auswirkung des Zeitpunkts der Transfektion mit siRNA-Komplexen zu untersuchen, wurden im folgenden Versuch die Zellen nicht 6 sondern erst 30 Stunden nach Aussaat mit siRNA behandelt. Zu diesem Zeitpunkt war also schon Luciferase in den Zellen exprimiert worden. Um dies feststellen zu können, wurden zum Zeitpunkt der Transfektion mit den siRNA-Komplexen die Zellen in 3 wells lysiert, die Lysate abzentrifugiert und bis zur Auswertung des Versuchs eingefroren. Drei weitere wells wurden zu Kontrollzwecken unbehandelt weiterkultiviert. Die Zellen der anderen wells wurden mit siRNA-LF-Komplexen mit ansteigenden Mengen siRNA behandelt und 24 Stunden inkubiert. Die Komplexe wurden mit Lösungen der gleichen Konzentrationen wie unter 3.4 beschrieben hergestellt, allerdings wurden nur Komplexe aus 5, 10, 20, 40, 50 und

75 pmol siRNA hergestellt. Nach der Inkubation, also 54 Stunden nach Aussaat wurden auch die restlichen Zellen zur Durchführung der Luciferase- und BCA-Assays lysiert.

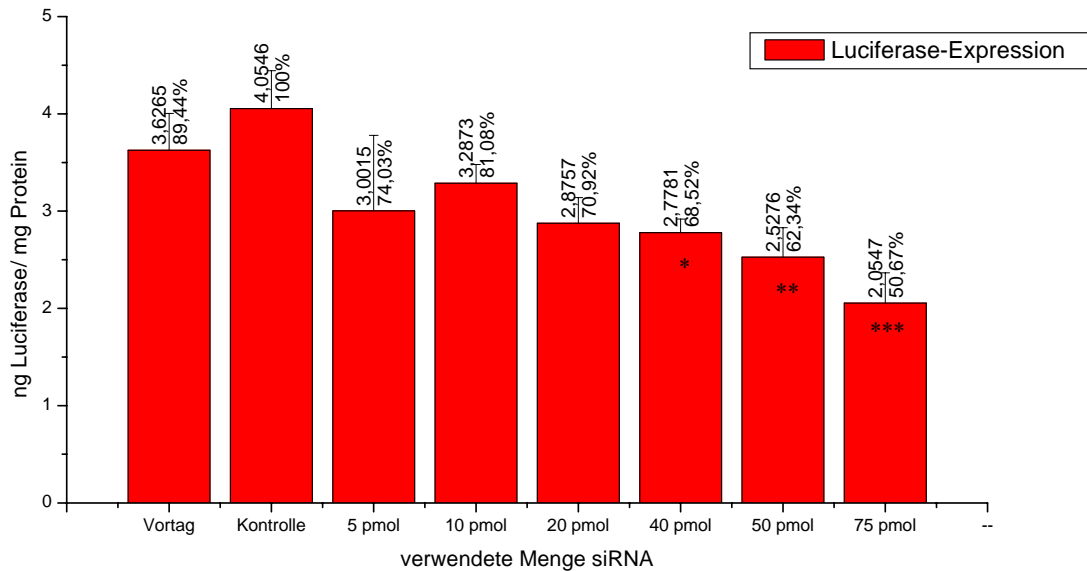


Abbildung 3.21: Luciferase-Expression nach Knock-Down

Nach statistischer Auswertung der auf die Gesamtproteinmengen normierten Luciferase-Aktivitäten konnte diesmal ein Knock-Down für * $P < 0,05$ erst bei 40 pmol, für ** $P < 0,01$ erst bei 50 pmol und für *** $P < 0,001$ nur bei 75 pmol siRNA beobachtet werden.

Im Vergleich zum Wert der nach 30 Stunden lysierten Zellen war die Luciferase-Expression nach 54 Stunden nicht signifikant höher, obwohl die Lyse der Zellen hier im steilsten Punkt der Zunahme der Luciferase-Expression (siehe Abb. 3.20) stattfand. Da der Knock-Down jedoch selbst bei Verwendung größerer Mengen siRNA weniger vollständig ausfiel, ist davon auszugehen, dass bereits höhere mRNA-Level erreicht worden waren. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass die Zellen kurz nach der Aussaat die Komplexe aufgrund einer höheren Zellteilungsrate besser aufnehmen als nach 30-stündiger Kultivierung.

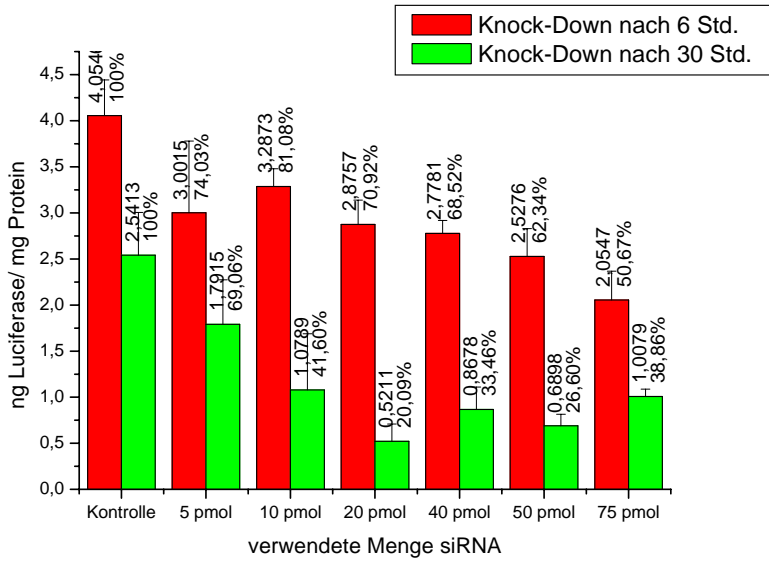


Abbildung 3.22: Luciferase-Expression nach Knock-Down

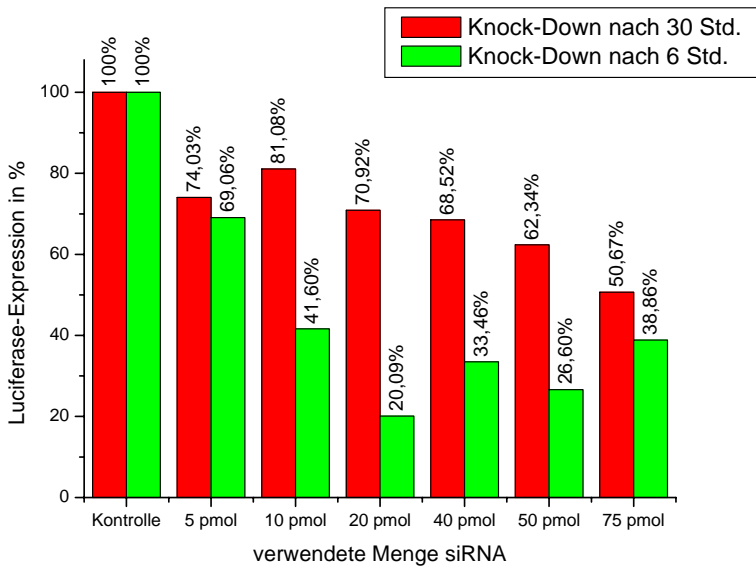


Abbildung 3.23: Vergleich der prozentualen Luciferase-Expression

Bei der Gegenüberstellung beider Versuche wird deutlich, dass bei geringeren mRNA-Levels, wie sie etwa 6 Stunden nach Aussaat der stabil transfizierten Zellen vorliegen, bereits 20 pmol für einen 80%igen Knock-Down ausreichen, wohingegen bei hohen mRNA-Levels und bereits entstandenem Protein, wie etwa 30 Stunden nach Aussaat der

gleichen Zellen, ein Knock-Down nicht mehr gleichermaßen vollständig sein kann. Der maximale Knock-Down in diesem Fall betrug knapp 50% bei Verwendung von 75 pmol siRNA.

Aufgrund dieser Ergebnisse müsste davon ausgegangen werden können, dass ein Knock-Down bei Messung auf Proteinebene bei Kotransfektion viel vollständiger sein kann als bei physiologischer oder gentechnisch bedingter Expression eines Gens.

3.6 Bestimmung der Spezifität des Knock-Downs

Um abzuklären, ob der in den vorangegangenen Versuchen mit Komplexen aus siRNA und LF beobachtete Knock-Down tatsächlich auf spezifischen mRNA-Abbau zurückzuführen war, wurden in einem nächsten Versuch unspezifischer Silencing-Effekte mit Kontroll-siRNA abgewandelter Sequenz untersucht. Besonders die Beobachtung der verringerten Gesamtproteinmengen in den Zelllysaten (vgl. unter 3.4) hatte die Frage aufgeworfen, ob es sich hier eventuell um unspezifische oder zytotoxische Effekte gehandelt hatte. Für kurze siRNA mit einer Länge von 21 Nukleotiden ist zwar nicht bekannt, dass sie das Interferonsystem über den Toll-Like-Rezeptor-3 aktivieren [86], jedoch können trotzdem eine Reihe unspezifischer Effekte hervorgerufen werden. Semizarov et. al. [87] berichten zum Beispiel von der Anlagerung an zelluläre Proteine, von der Aktivierung Apoptose-verwandter Gene wie BAK, Bcl-2 und DAPK sowie der Aktivierung von Genen wie GADD, p38, und MAP-Kinasen als Antwort auf Stress der Zellen. All das könnte auch in einer signifikanten Abnahme der Gesamtproteinmenge der Zellen und schließlich im Zelltod resultieren. Deshalb sollte in diesem Versuch die Auswirkung unspezifischer siRNA im Vergleich zu spezifischer siRNA in steigenden Mengen auf die Luciferase-Expression sowie auf die Gesamtproteinexpression der Zellen untersucht werden.

Hierfür wurde eine 24-well Platte mit 150.000 Zellen NIH-3T3 pro well ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurden das serumhaltige Medium von den Zellen abgesaugt und durch 0,5ml DMEM pro well ersetzt. Es wurden Komplexe aus je 1,6 µg Plasmid und LF hergestellt, wie unter 2.2.4 beschrieben. Die Zellen wurden 4 Stunden lang mit den Komplexen inkubiert, danach wurde das serumfreie DMEM durch je 0,5 ml Kulturmedium ersetzt und es wurden je 100 µl Komplexlösung aus siRNA und LF in des Medium getropft. Die Komplexe wurden hergestellt wie unter 2.2.8 beschrieben. Es wurden Komplexe aus 20, 50 und 75 pmol spezifischer (siGL3, Dharmacon Inc, Lafayette, CO, USA) sowie

unspezifischer (siGL2, Dharmacon Inc, Lafayette, CO, USA) siRNA hergestellt. Die Zellen in 6 wells wurden nur mit pDNA transfiziert und dienten als Kontrolle.

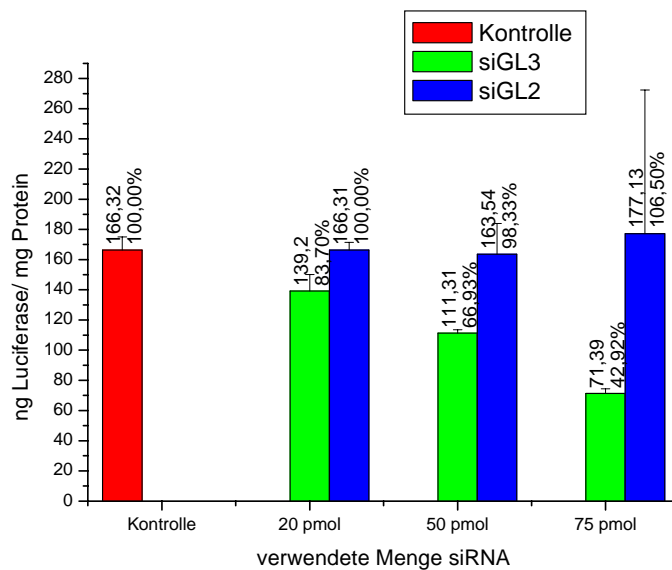


Abbildung 3.24: Vergleich der Auswirkung von spezifischer und unspezifischer siRNA

In diesem Versuch wurde deutlich, dass der beobachtete Knock-Down tatsächlich durch spezifische Silencing-Effekte zustande gekommen war. Jedoch fiel auf, dass auch hier bei Verwendung von 75 pmol siRNA die Gesamtproteinmenge der Zellysate ungleichmäßig war, so dass es bei den mit unspezifischer siRNA behandelten Zellen zu einer besonders großen Standardabweichung kam. Grund der schwankenden Gesamtproteinmenge könnten unspezifische Effekte der sehr hoch gewählten siRNA-Konzentration sein.

3.7 Physikochemische Charakterisierung

3.7.1 Agarose Gel Retardation Assay

In einem Vorversuch sollte herausgefunden werden, welche Bedingungen für einen erfolgreichen Elektrophorese-Versuch gewählt werden müssten.

Dazu wurden verschiedene Mengen freie siRNA mit 1x siRNA-Puffer verdünnt, mit 2 µl loading buffer gemischt und auf das Agarose-Gel aufgetragen. Dadurch sollte gezeigt werden, wie viel freie siRNA für eine deutlich sichtbare Interkalation mit Ethidiumbromid notwendig sein würden und welche Volumina in die Taschen gefüllt werden können.

Es wurde ein 2%iges Ethidiumbromid-haltiges Agarose-Gel hergestellt, das 30 min bei 100 V entwickelt wurde.

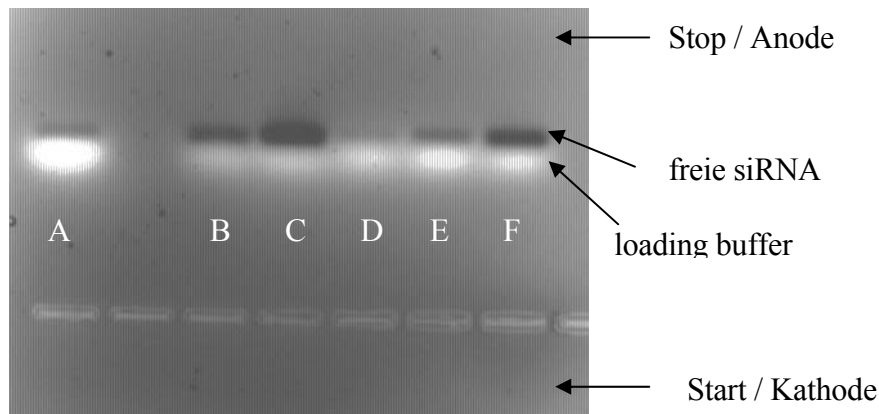


Abbildung 3.25: Gel Retardation Assay für freie siRNA
 Menge freie siRNA: A: 10pmol; B: 16pmol; C:30pmol; D: 6pmol; E: 12pmol; F: 30pmol

Durch diesen Vorversuch wurde festgestellt, dass das Volumen der Taschen 15 - 20 μ l fasst. Außerdem wurde ein Hinweis darauf erhalten, dass 6 pmol (D) und 10 pmol siRNA (A) noch nicht, 16 pmol siRNA (B) jedoch gut ausreichen, um eine deutliche Interkalation hervorzurufen. Für die nächsten Versuche wurden deshalb 15 pmol siRNA verwendet.

Zur Untersuchung der Stabilität der Komplexe und des Komplexierungsvermögens der verschiedenen verwendeten Polymere wurden Komplexe verschiedener N/P-Verhältnissen hergestellt und in die Taschen eines 2 %igen Ethidiumbromid-haltigen Gels gefüllt. Zum Vergleich wurden in eine Tasche 15 pmol freie siRNA, verdünnt auf 20 μ l, gegeben. Für die Herstellung der Komplexe wurden je 15 pmol siRNA in 10 μ l 1x siRNA-Puffer verdünnt und mit 10 μ l Polymerlösung gemischt. Die verwendete Menge Polymer richtete sich nach Art des Polymers und dem gewünschten N/P-Verhältnis. Es wurden Komplexe aus PEI 25 und LMWPEI hergestellt, außerdem wurde eine weitere Verdünnungsreihe freier siRNA aufgetragen. Diese Verdünnungen sowie die Komplexlösungen wurden jeweils mit 2 μ l loading buffer gemischt. Da jedoch bekannt war, dass es zwischen Nukleinsäuren und Bromphenolblau zu Wechselwirkungen kommen kann, wurde außerdem eine Verdünnungsreihe mit den gleichen siRNA-Konzentrationen ohne den Zusatz von loading buffer aufgetragen. Das Gel wurde 30 min bei 100 V entwickelt.

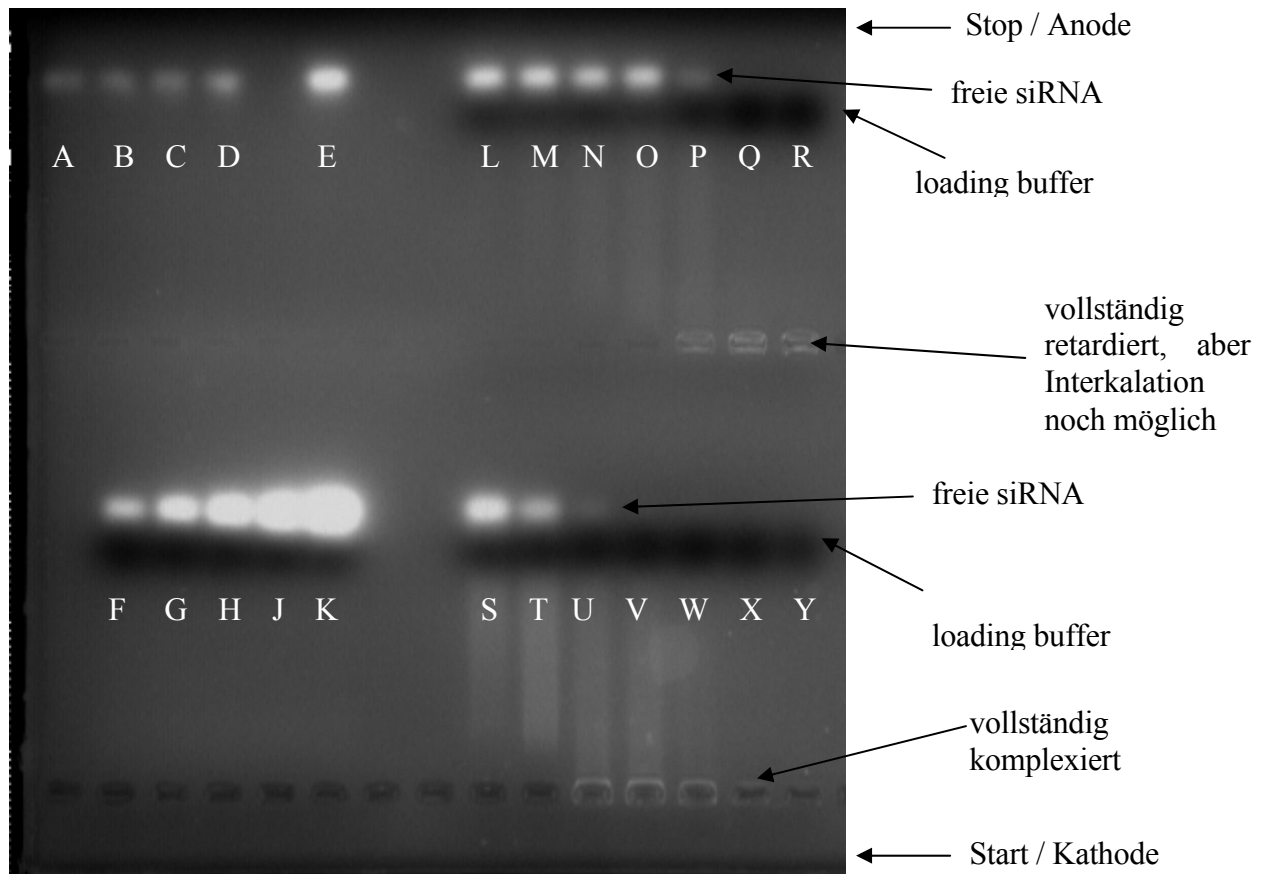


Abbildung 3.26: Gel Retardation Assay für freie und komplexierte siRNA
freie siRNA in pmol: A:5; B:10; C:15; D:20; E:40
freie siRNA in pmol (mit loading buffer): F:5; G:10; H:15; J:20; K:40
Komplexe aus 15 pmol siRNA und LMWPEI, N/P:
 L:0,6; M:1,2; N:1,8; O:2; P:3; Q:6; R:10
Komplexe aus 15 pmol siRNA und PEI 25:
 S: 0,6; T:1,2; U:1,8; V:2; W:3; X:6 ; Y:10

Was auf diesem Gel gut sichtbar wurde, ist, dass die in den Bahnen A-E aufgetragene freie, verdünnte und mit loading buffer versetzte siRNA starke Interkalation zeigte. Bereits 5pmol siRNA ergaben eine gut sichtbare Bande. Im Gegensatz dazu war die auf nur 2µM verdünnte siRNA stärker gegen Interkalation geschützt. Erst 20 pmol ergaben eine deutliche Bande. Dies lässt darauf schließen, dass der loading buffer mit der doppelsträngigen siRNA wechselwirkt und diese für Interkalation mit Ethidiumbromid zugänglicher macht.

Die mit PEI 25 komplexierte siRNA zeigte bei N/P-Verhältnis 0,6 und 1,2 starke Interkalation, die mit LMW-PEI komplexierte siRNA jedoch bis zu einem N/P-Verhältnis von 2. Das heißt, dass die PEI 25-Komplexe bei niedrigen N/P-Verhältnissen stabiler sind als die LMWPEI-Komplexe.

Aufgrund dieser Erkenntnis wurde in den darauf folgenden Transfektionsversuchen siRNA mit LMWPEI mit den N/P-Verhältnissen 10, 15 und 20 komplexiert.

Was bei dem Gel weiterhin auffiel, ist die sichtbare Interkalation auf der gesamten Wanderungsstrecke bei den PEI 25-Komplexen mit N/P=0,6-2 und den LMWPEI-Komplexen mit N/P=1,8-3. Diese Interkalation könnte durch größere Komplexe verursacht werden, deren elektrophoretische Beweglichkeit aufgrund ihrer Durchmesser kleiner ist und die deshalb langsamer wandern.

Außerdem fiel Interkalation in den Taschen bei den PEI 25-Komplexen mit N/P=1,8-3 und den LMWPEI-Komplexen mit N/P=3-10 auf. Hier ist zumindest ein Teil der Komplexe nicht gewandert, und die siRNA scheint nicht ausreichend stabil komplexiert zu sein, da Interkalation mit Ethidiumbromid stattfinden konnte. Von vollständiger Komplexierung und Retardierung kann nur bei den Komplexen aus PEI 25 mit den N/P-Verhältnissen 6 und 10 gesprochen werden.

Dieser aufschlussreiche Versuch wurde mit Komplexen aus ePEI und PEGPEI wiederholt, bevor mit Transfektionen begonnen wurde, um hierdurch bereits günstige N/P-Verhältnisse abstecken zu können. Dafür wurden Komplexe aus 15 pmol siRNA je Tasche und verschiedenen Polymerlösungen hergestellt. In diesem Versuch wurden die vier Polymere PEI 25, LMWPEI, PEGPEI und ePEI gegenübergestellt. Es wurden immer 15 pmol siRNA in 10 µl 1x siRNA-Puffer mit 10 µl Polymerlösung gemischt, wobei die Konzentration der Polymerlösung vom gewünschten N/P-Verhältnis abhing. Die Komplexe wurden 20 min lang inkubiert und dann auf ein 3 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Konzentration des Gels wurde erhöht, um damit die Schärfe der Banden zu steigern. Bei diesem Versuch wurde kein loading buffer verwendet. Das Gel wurde 30 min bei 100 V entwickelt.

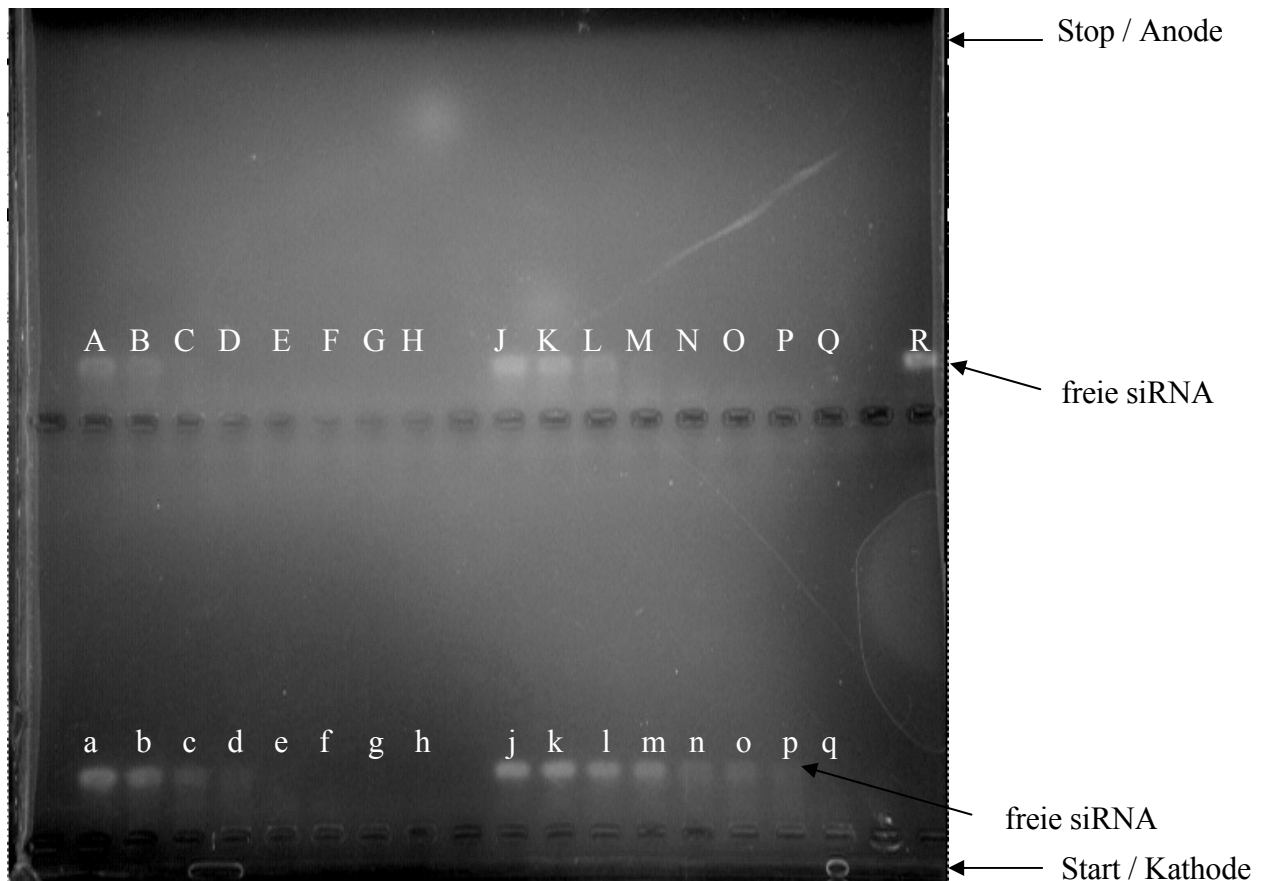


Abbildung 3.27: Gel Retardation Assay für mit verschiedenen Polymeren komplexierte siRNA
Komplexe aus 15 pmol siRNA und ePEI, N/P:
A: 0,75; B:1; C:1,5; D:2; E:2,5; F:3; G:4; H:5
PEGPEI, N/P:
J: 0,75; K:1; L:1,5; M:2; N:2,5; O:3; P:4; Q:5
PEI 25, N/P:
a: 0,75; b:1; c:1,5; d:2; e:2,5; f:3; g:4; h:5
LMWPEI, N/P:
j: 0,75; k:1; l:1,5; m:2; n:2,5; o:3; p:4; q:5
freie siRNA: R:15 pmol

Die Ergebnisse für PEI 25 und LMWPEI bestätigten die im vorhergegangenen Versuch erhaltenen Erkenntnisse, dass Komplexe aus PEI 25 ab einem N/P-Verhältnis von 2 stabil sind, solche aus LMWPEI jedoch bei N/P 4 noch nicht vollständig. ePEI betreffend konnte gezeigt werden, dass Komplexe ab N/P 2 stabil sind, für PEGPEI ergab sich ein N/P-Verhältnis von 3 als kleinstes für stabile Komplexe.

In den Transfektionsversuchen sollten nun Komplexe mit N/P-Verhältnissen unter- und oberhalb des kritischen N/P-Verhältnisses verwendet werden, da Komplexe, die nicht vollständig stabil sind eventuell leichter die komplexierte siRNA im Zytosol wieder freigeben.

3.7.2 Serum-Stabilität

Mit einem weiteren Agarose-Retardation-Assay wurde die Serum-Stabilität der Komplexe aus siRNA und Polymeren untersucht. Da bekannt ist, dass LF-Komplexe in Gegenwart von Serum instabil sind [65, 88], PEI-Komplexe mit DNA jedoch auch in serumhaltigen Medien nur langsam zersetzt werden, wurde untersucht, wie es sich mit siRNA verhielt. In diesem Versuch wurden neben der Serumstabilität außerdem eventuelle Auswirkungen des Verdünnens in 1x siRNA-Puffer sowie Wechselwirkungen mit dem loading buffer untersucht.

Da die höhere Agarose-Konzentration des Gels im vorhergehenden Versuch keine erhöhte Schärfe der Banden gebracht hatte, wurde wieder zum 2%igen Gel übergegangen. Auf das Gel wurde freie siRNA (2 μ M, ohne weiteren Verdünnungsschritt), freie siRNA (2 μ M mit Zusatz von 10% loading buffer), freie siRNA (verdünnt mit 1x siRNA-Puffer auf 10 μ l 1 μ M bzw. 1,5 μ M zur Angleichung des Endvolumens), mit PEI 25 in 1x siRNA-Puffer komplexierte siRNA (N/P 6), mit PEI 25 in DMEM komplexierte siRNA (N/P 6), mit PEI 25 in RPMI komplexierte siRNA (N/P 6) und mit PEI 25 in Kulturmedium NIH-3T3 komplexierte siRNA (N/P 6) aufgetragen. Es wurden nebeneinander je einmal 10 pmol siRNA und einmal 15 pmol siRNA aufgetragen. Das Gel wurde 30 min bei 100 V entwickelt.

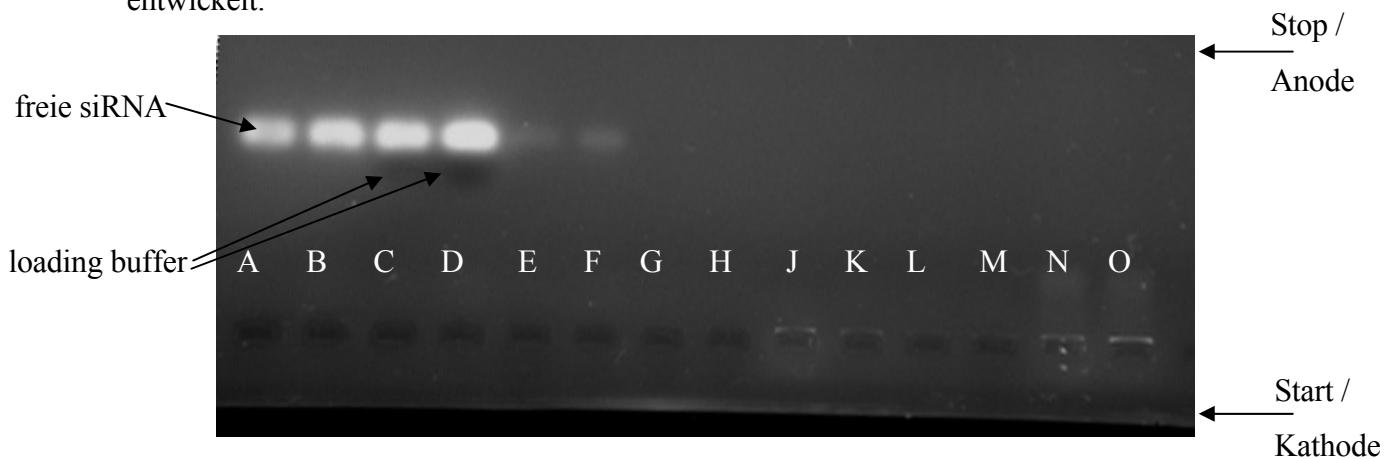


Abbildung 3.28: Gel Retardation Assay mit freier und komplexierter siRNA in verschiedenen Lösungsmitteln
freie siRNA

2 μ M, ohne weiteren Verdünnungsschritt: A:10 pmol; B:15 pmol

2 μ M mit Zusatz von 10% loading buffer: C:10 pmol; D:15 pmol

verdünnt mit 1x siRNA-Puffer auf 10 μ l 1 μ M bzw. 1,5 μ M: E:10 pmol; F:15 pmol

mit PEI 25 komplexierte siRNA (N/P 6):

in 1x siRNA-Puffer: G: 10 pmol; H:15 pmol

in DMEM: J: 10 pmol; K:15 pmol

in RPMI: L:10 pmol; M:15 pmol

in Kulturmedium NIH-3T3: N: 10 pmol; O:15 pmol

Bei diesem Versuch konnte beobachtet werden, dass bei der Wahl des N/P-Verhältnisses von 6 die Komplexstabilität weitgehend unabhängig vom Lösungsmittel ist. Es wurde jedoch auch deutlich, dass bei Verwendung von serumhaltigem Medium die Stabilität der Komplexe beeinträchtigt ist, was durch die leichte Fluoreszenz auf der Wegstrecke oberhalb der Taschen N und O zum Ausdruck kommt. Auch hier konnten Wechselwirkungen zwischen Bromphenolblau-haltigem loading buffer und doppelsträngiger RNA gezeigt werden.

3.7.3 *Dynamische Lichtstreuung*

Die hydrodynamischen Durchmesser der Komplexe aus je 25 pmol siRNA und den jeweiligen Polymeren sind in Abbildung 3.30 dargestellt.

Die Komplexe wurden anfangs aus je 50 µl siRNA-Lösung (1 pmol/µl siRNA) in 1x siRNA-Puffer und 50 µl Polymerlösung, deren Konzentrationen vom gewünschten N/P-Verhältnis abhängig waren, durch Mischen und 20 minütiges Inkubieren hergestellt. Bei dieser Vorgehensweise entstanden aus den Komplexen Aggregate im µm-Bereich, deren Messung per dynamischer Lichtstreuung nicht mehr sinnvoll erschien. Daher wurde dazu übergegangen, die Komplexe nur 5 min lang vor der Messung zu inkubieren. Doch auch bei dieser Methode wurden hauptsächlich Aggregate gefunden. Da bekannterweise Komplexe aus Nukleinsäuren und PEI in Lösungsmitteln hoher Ionenstärke zur Aggregation neigen, wurden die Komplexe für einen neuen Versuch je 50 µl siRNA-Lösung (1 pmol/µl siRNA) in 5 %iger Glucose-Lösung (pH 7,4) und 50 µl Polymerlösung mit den N/P-Verhältnissen 1; 2; 3; 6; 8 und 10 hergestellt. Doch auch bei diesem Versuch musste festgestellt werden, dass es bereits während der Messungen zu deutlicher Aggregation kam, was sich darin auswirkte, dass sich die Verteilung der Partikelgrößen fortlaufend in Richtung µm-Bereich verschob. Dies soll hier am Beispiel von Komplexen mit PEI 25 N/P 3 nach fünfminütiger Inkubation verdeutlicht werden (Abb. 3.29)

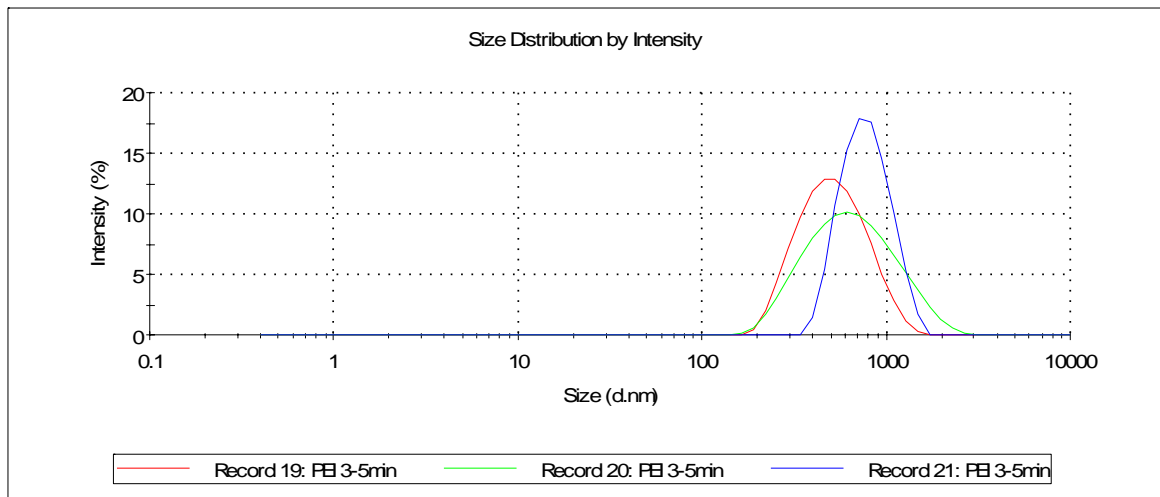


Abbildung 3.29: Vergleich der hydrodynamischen Durchmesser der Komplexe aus PEI 25 bei drei aufeinander folgenden Messungen nach fünfminütiger Inkubation

Da also auch bei diesen Versuchsbedingungen kein aussagekräftiges Ergebnis gefunden werden konnte, wurden für eine weitere Messung Komplexe aus 25 pmol siGL3 und den verschiedenen Polymeren in einem Gesamtvolumen von 100 μ l hergestellt. Bei diesem Versuch wurden ab einem N/P-Verhältnis von 3 für alle Polymere Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser von < 200 nm erhalten (Abb. 3.30). Bei kleineren N/P-Verhältnissen wurden größere Partikel gefunden, was auf nicht vollständige Komplexierung zurückzuführen ist. Mit zunehmendem N/P-Verhältnis war eine Größenabnahme zu beobachten, welche sich durch eine zunehmend bessere Komplexierung der siRNA erklären lässt. Hierbei ist zu bemerken, dass für die beiden nicht modifizierten PEIs (PEI 25 und LMWPEI) bei N/P 8 ein Minimum der Komplexgröße erreicht war, während bei ePEI und PEGPEI noch kleinere Komplexe bei N/P 10 gefunden werden konnten.

Es muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass für Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung ideal-sphärische Partikel angenommen werden. Mit dieser Methode lässt sich auch keine Aussage über die tatsächliche Form der Partikel machen. In Studien mit pDNA wurde bereits mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie [89] und Kraftfeld-Mikroskopie [76] gezeigt, dass die Form von verschiedenen DNA-PEG-PEI Komplexen teilweise deutlich von der für die PCS vorausgesetzten idealen Kugelform abweicht. Daher könnten nicht-monomodale Verteilungen und unterschiedliche gemessene Größen auch durch die Streuung an unsymmetrischen Partikeln verursacht worden sein.

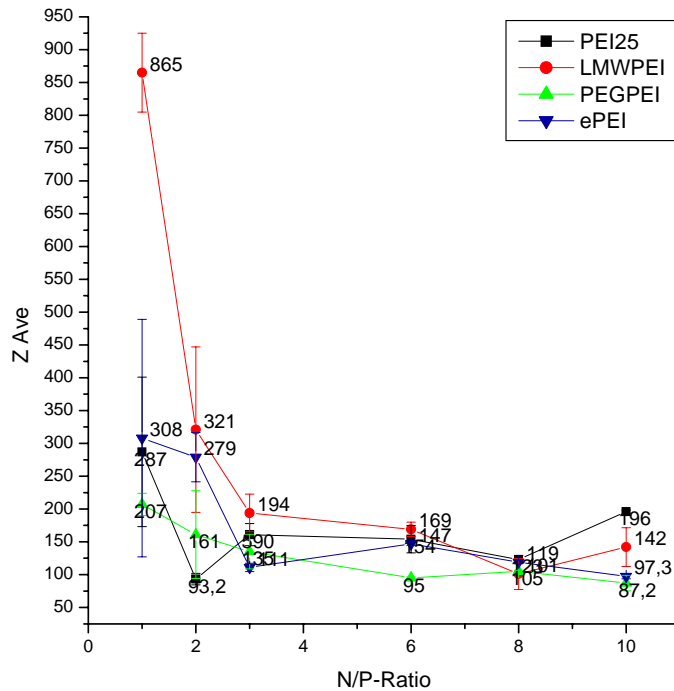


Abbildung 3.30: Vergleich der hydrodynamischen Durchmesser der Komplexe aus PEI 25, LMWPEI, PEGPEI und ePEI

Um eine Aufnahme in die Zelle via Endozytose zu gewährleisten, sollten Polymer/siRNA-Komplexe eine Größe von 200 nm nicht überschreiten [90]. Diese Voraussetzung ist bei Verwendung von 25 pmol siRNA in 100µl Glucose 5 % für Komplexe mit $N/P \geq 3$ für alle Polymere gegeben.

Da in den Transfektionsexperimenten die Komplexe jedoch in 1x siRNA Puffer hergestellt wurden, ist davon auszugehen, dass es zur Ausbildung größerer Aggregate gekommen war. Dies könnte einen weiteren Grund für das Ausbleiben des Knock-Downs sein.

3.8 Transfektionsexperimente

Nachdem alle oben beschriebenen Parameter untersucht worden waren, sollten nun die vier Polymere PEI 25, LMWPEI, PEGPEI und ePEI als Vektoren eingesetzt werden. Die neu erhaltenen Erkenntnisse wurden in den Transfektionsversuchen umgesetzt. So wurden NIH-3T3-Zellen zur Kotransfektion immer mit 150.000 Zellen und SKOV-3/Luc-Zellen immer mit 70.000 Zellen pro well im 24-well-Format ausgesät. NIH-3T3-Zellen wurden 24 Stunden nach der Aussaat mit je 1,6 µg pDNA pro well und LF transfiziert und 4 Stunden später mit siRNA-Komplexen behandelt. Bei den SKOV-3/Luc-Zellen fand die siFektion 6

Stunden nach der Aussaat statt. Sowohl NIH-3T3 als auch SKOV-3/Luc wurden nach der siFektion 24 Stunden lang bei 37 °C im CO₂-Schrank inkubiert. Die LF-Komplexe wurden aufgrund des Hinweises im Protokoll von Invitrogen in serumfreies Medium getropft. Da die siRNA-Polymer-Komplexe im Agarosegel-Versuch keine bedeutende Instabilität in Gegenwart von Serum gezeigt hatten, wurden sie in 1x siRNA-Puffer hergestellt und 20 min lang inkubiert, dann aber in serumhaltiges Kulturmedium getropft. Bei den SKOV-3/Luc fand also bis zur Lyse kein Mediumwechsel statt, bei den NIH-3T3 wurde vor Transfektion mit den pDNA-LF-Komplexen das Kulturmedium gegen DMEM getauscht, zur siFektion wurden die Zellen aber wieder mit Kulturmedium versorgt. Zur Herstellung der Komplexe wurden bei den NIH-3T3 je 50 pmol, bei den SKOV-3/Luc je 20 pmol siRNA pro well verwendet. Alle Versuche wurden im Triplikate durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Luciferase- und BCA-Assays mit den nach 24-stündiger Kultivierung hergestellten Lysaten. Die gefundene Luciferase-Expression wurde auf den Gesamtproteingehalt normiert und auf die Werte der nicht mit siRNA behandelten Zellen bezogen, deren Luciferase-Expression als 100 % angesehen wurde.

3.8.1 Transfektionsexperimente mit PEI 25

3.8.1.1 Versuche mit SKOV-3/Luc Zellen

Für den ersten Versuch wurden Komplexe aus 20 pmol siGL3 und PEI 25 mit den N/P-Verhältnissen 3, 6 und 9 hergestellt. Die Komplexe wurden 20 min lang inkubiert und 6 Stunden nach Aussaat auf die Zellen gegeben. Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen im CO₂-Schrank wurden die Lysate hergestellt, mit denen Luciferase- und BCA-Assay durchgeführt wurden. Die Lysate der Zellen in den 3 wells, die nicht mit siRNA behandelt worden waren, galten als Kontrolle mit 100 %iger Luciferase-Expression. Das Ergebnis ist in Abb. 3.31 dargestellt.

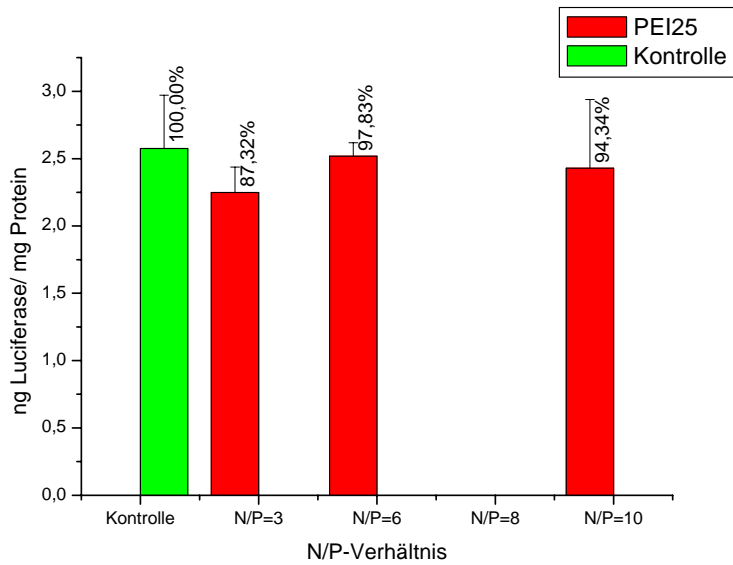


Abbildung 3.31: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und PEI 25 der angegebenen N/P-Verhältnisse

Ein signifikanter Knock-Down der Luciferase-Expression war hier bei keinem der verwendeten N/P-Verhältnisse erkennbar. Da die Komplexe, wie im Agarosegel-Versuch gezeigt werden konnte, bereits ab N/P 1,8 stabil waren, sollte in einem nächsten Versuch die Wirkung von Komplexen mit noch kleineren N/P-Verhältnissen als 3 untersucht werden.

Dazu wurden Komplexe aus 20 pmol siGL3 und PEI 25 mit den N/P-Verhältnissen 1; 1,5; 2; 2,5 und 3 hergestellt, 20 min inkubiert und auf die 6 Stunden vorher ausgesäten Zellen gegeben. Die Zellen wurden bis zur Lyse 24 Stunden lang im CO₂-Inkubator kultiviert. Luciferase- und BCA-Assay wurden, wie unter 2.2.6 und 2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung verlief wie beim vorherigen Versuch durch Normierung aller Luciferase-Messwerte auf die Gesamtproteingehalte der entsprechenden Zelllysate und anschließendes Beziehen auf den 100 %-Wert der Kontroll-Zelllysate. Das Ergebnis ist in Abb. 3.32 dargestellt.

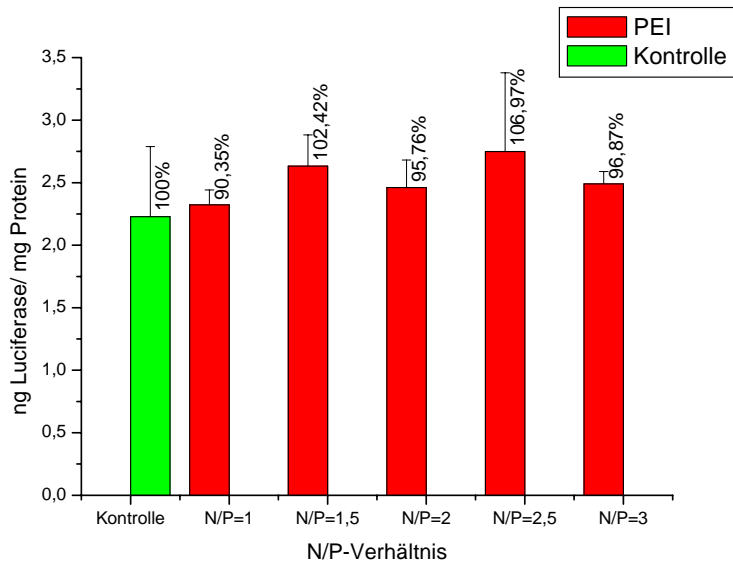


Abbildung 3.32: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und PEI 25 der angegebenen N/P-Verhältnisse

Da auch in diesem Versuch kein Knock-Down erfolgt hatte, wurden die Komplexe im nächsten Versuch, wie von Urban-Klein et. al. beschrieben [72], eine Stunde lang inkubiert, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden. Auch hier wurden die Zellen 24 Stunden lang vom Zeitpunkt der Behandlung mit den siRNA-Komplexen an kultiviert und dann lysiert. Die Auswertung fand entsprechend der bereits beschriebenen Versuche statt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.33 dargestellt.

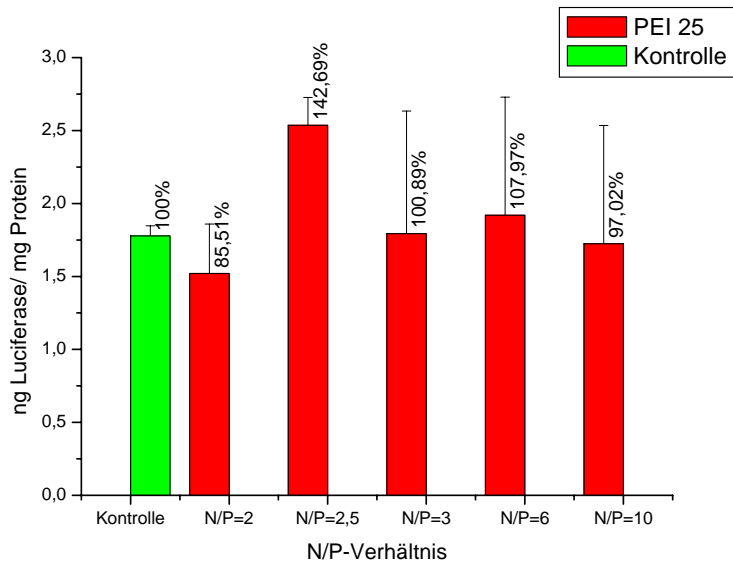


Abbildung 3.33: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und PEI 25 der angegebenen N/P-Verhältnisse nach einstündiger Inkubation der siRNA-PEI-Komplexe

Auch hier konnte kein signifikanter Knock-Down festgestellt werden. Da jedoch davon ausgegangen wurde, dass die Komplexe ausreichend stabil und klein genug für die Aufnahme per Endozytose waren, wurde vermutet, dass der Grund des ausbleibenden Knock-Downs ein Problem im späteren Schicksal der Komplexe war. Um jedoch zu überprüfen, ob die Komplexe von den SKOV-3/Luc-Zellen auch tatsächlich aufgenommen wurden, wurde zu einem späteren Zeitpunkt ein Aufnahmeversuch mit Dokumentation einer Zeitserie durchgeführt. Um die Frage zu klären, ob es sich um ein Zell-spezifisches Problem handelte, wurden Versuche mit siGL3 und PEI 25 auch mit NIH-3T3-Zellen nach Kotransfektion durchgeführt.

3.8.1.2 Versuche nach Kotransfektion mit NIH-3T3 Zellen

Wie bereits unter 3.8 beschrieben, wurden für die Transfektionsversuche mit den NIH-3T3-Zellen diese 24 Stunden nach Aussaat mit LF-pDNA-Komplexen transfiziert und 4 Stunden später mit Komplexen aus 50 pmol siGL3 und der entsprechenden Menge Polymer behandelt. Auch hier wurden die Komplexe anfangs 20 min lang inkubiert. Für den ersten Versuch wurden die gleichen N/P-Verhältnisse (3, 6 und 9) gewählt, die schon bei den SKOV-3/Luc-Zellen untersucht worden waren. Die Zellen wurden nach Behandlung mit den siRNA-Komplexen 24 Stunden lang inkubiert und anschließend lysiert. Die

Auswertung fand nach Durchführung von Luciferase- und BCA-Assay wie oben beschrieben statt. Das Ergebnis wird von Abb. 3.34 wiedergegeben.

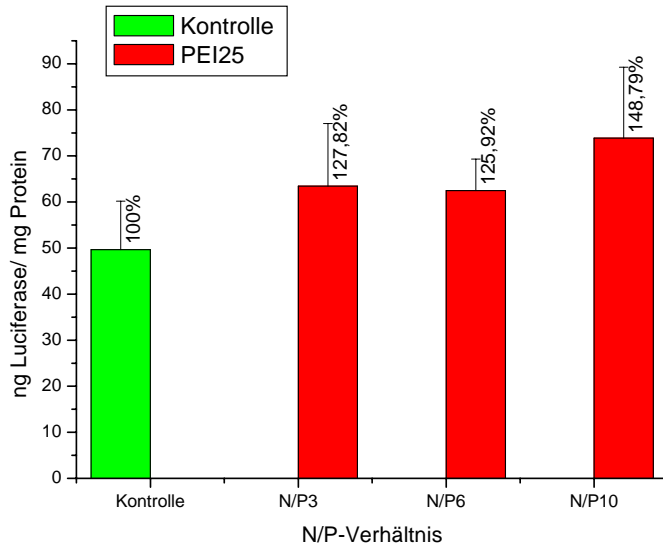


Abbildung 3.34: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und PEI 25 der angegebenen N/P-Verhältnisse

Auch mit diesem System konnte kein Knock-Down erreicht werden, weshalb der Versuch nach 30-minütiger Inkubation der Komplexe mit den gleichen N/P-Verhältnissen wiederholt wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 3.35 dargestellt und zeigt, genau wie im vorherigen Versuch, keinen Knock-Down. Erstaunlicherweise wurde in beiden Versuchen ein Anstieg der Luciferase-Expression mit dem N/P-Verhältnis der siRNA-Komplexe beobachtet. Nachdem Godbey et. al. zeigen konnten, dass PEI 25 eine gewisse Targeting-Aktivität in den Zellkern aufweist [26], könnte ein Grund für die erhöhte Luciferase-Expression sein, dass im Zytosol vorliegende pDNA aus der vorangegangenen Transfektion mit LF durch PEI 25 erneut komplexiert wurde und deshalb ein noch größerer Anteil des verwendeten Plasmids in den Kern transportiert wurde. Diese Vermutung könnte dadurch bekräftigt werden, wenn in einer so genannten „mock-Transfektion“ nur die entsprechende Menge PEI 25 auf die vorher mit pDNA transfizierten Zellen gegeben würde und die dadurch messbare Luciferase-Expression mit der von Kontroll-Zellen verglichen würde, die nach der Transfektion mit pDNA nicht weiter behandelt wurden.

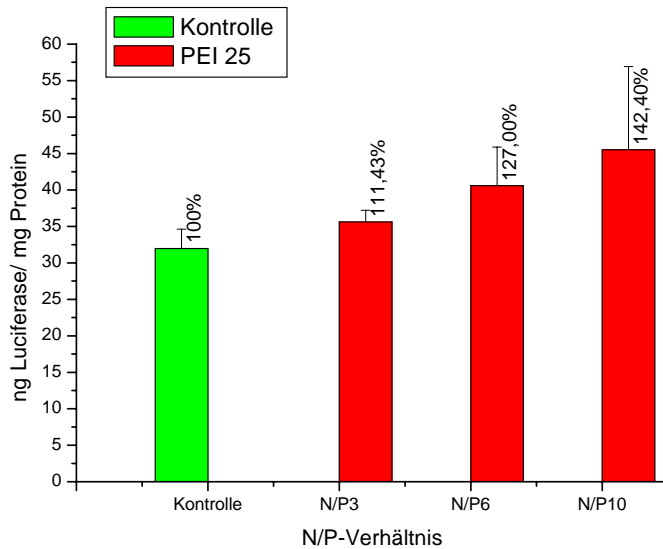


Abbildung 3.35: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und PEI 25 der angegebenen N/P-Verhältnisse nach 30-minütiger Inkubation der siRNA-PEI-Komplexe

Nachdem sich bestätigt hatte, dass kein Knock-Down-Effekt mit den verwendeten N/P-Verhältnissen erzielt werden konnte, wurden auch beim NIH-3T3-System kleinere N/P-Verhältnisse angewandt. Es wurde wieder dazu übergegangen, die Komplexe 20 min lang zu inkubieren, da dieser Zeitraum für die Komplexierung mit LF für einen erfolgreichen Knock-Down ausgereicht hatte und auch nach 20-minütiger Komplexierung Stabilität der Komplexe im Agarosegel-Versuch gezeigt werden konnte. Beim folgenden Versuch wurde vorgegangen wie bisher. Die Komplexe aus 50 pmol siGL3 und den entsprechenden Mengen PEI 25 wurden 4 Stunden nach Transfektion der Zellen mit dem Plasmid ins serumhaltige Medium getropft. Die Zellen wurden anschließend 24 Stunden lang kultiviert, danach lysiert, und mit den Lysaten wurden Luciferase- und BCA-Assay durchgeführt. Die Auswertung erfolgte bei allen Versuchen, der Vergleichsweise halber, auf dieselbe Art und Weise. Das Ergebnis des Transfektionsversuchs mit den N/P-Verhältnissen 1; 1,5; 2; 2,5 und 3 ist in Abbildung 3.36 dargestellt.

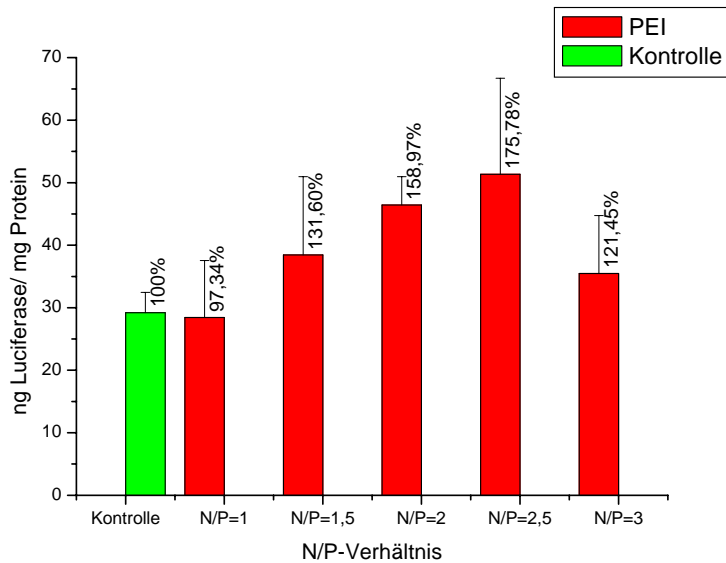


Abbildung 3.36: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und PEI 25 der angegebenen N/P-Verhältnisse

Die Beobachtung der zunehmenden Luciferase-Expression nach Behandlung mit den Komplexen aus siRNA und PEI 25 zeigte sich auch in diesem Versuch wieder, wobei auch hier kein Knock-Down stattgefunden hatte.

Im nächsten Versuch wurden Komplexe der N/P-Verhältnisse 2; 2,5; 3; 6 und 9 hergestellt und 1 Stunde lang inkubiert. Auch in diesem Versuch wurde vorgegangen wie in allen anderen bereits beschriebenen Versuchen. Auch die Auswertung fand entsprechend statt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.37 dargestellt. Es zeigt, dass nach einstündiger Inkubation der Komplexe zwar auch hier kein Knock-Down stattfand, die Komplexe allerdings so stabil sind, dass es nicht zu einem möglicherweise verbesserten Transport von pDNA in den Zellkern und dadurch erhöhter Luciferase-Expression kam. Dies könnte daran liegen, dass die Komplexe nun so stabil waren, dass sie nicht leicht genug zerfallen konnten. Das wiederum könnte ein Grund für das Ausbleiben des Knock-Downs sein.

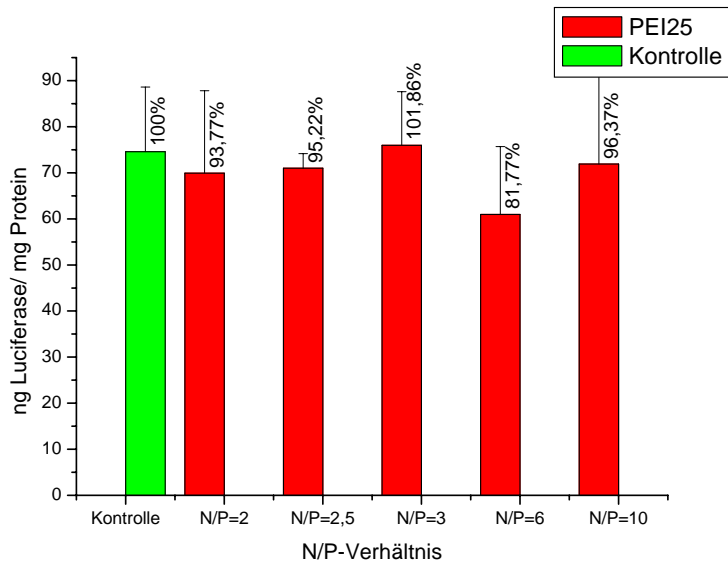


Abbildung 3.37: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und PEI 25 der angegebenen N/P-Verhältnisse nach einstündiger Inkubation der siRNA-PEI-Komplexe

3.8.2 Transfektionsexperimente mit LMW-PEI

Da bereits berichtet wurde, dass bei unterschiedlichen Molekulargewichten wie auch unterschiedlichem Verzweigungsgrad die Transfektionseffizienz von PEI-pDNA-Komplexen beeinflusst werden konnte [29], sollten auch die Fähigkeiten von LMWPEI als Vektor für siRNA untersucht werden.

3.8.2.1 Versuche mit SKOV-3/Luc Zellen

Da in derselben Quelle gezeigt wurde, dass die Zytotoxizität von LMWPEI weitaus geringer ist als die von höhermolekularem, wurden für den ersten Versuch mit LMWPEI und siRNA N/P-Verhältnisse von 3, 6, 8 und 10 gewählt. Für das SKOV-3/Luc-System wurden Komplexe aus 20 pmol siGL3 durch 20-minütiges Inkubieren hergestellt. Durchführung und Auswertung entsprachen den bereits beschriebenen Versuchen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.38 wiedergegeben.

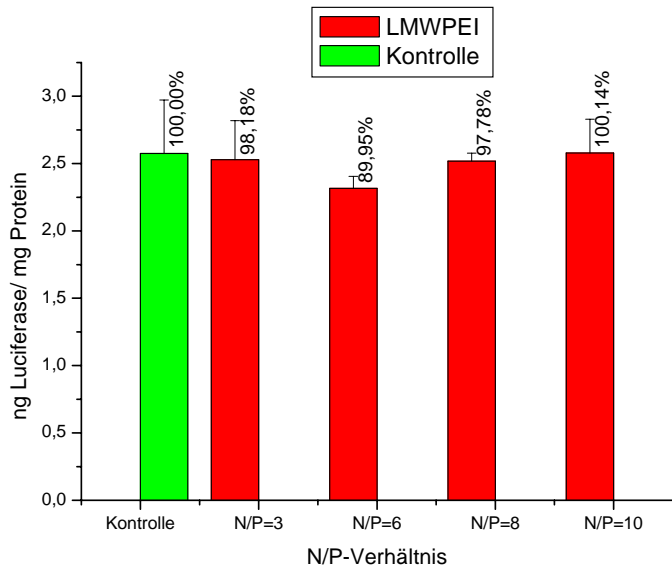


Abbildung 3.38: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und LMWPEI der angegebenen N/P-Verhältnisse

Da im diesen Versuch bei den gewählten N/P-Verhältnissen kein Knock-Down-Effekt festgestellt werden konnte, wurden in einem nächsten Versuch die Auswirkungen von Komplexen aus LMWPEI und 20 pmol siGL3 mit kleineren N/P-Verhältnissen untersucht. Da im Agarosegel-Versuch Komplexe aus LMWPEI bereits ab N/P 2,5 nur noch geringe Instabilität und durch Interkalation verursachte Fluoreszenz zeigten, sich aber erst bei N/P 4 als stabil erwiesen hatten, sollte untersucht werden, ob vielleicht gerade solche nicht völlig stabilen Komplexe einen leichteren Zerfall im Zytosol und damit gesteigerte Knock-Down-Aktivität aufweisen konnten. Deshalb wurden Komplexe mit N/P 2; 2,5; 3; 4 und 5 hergestellt, die nach 20-minütiger Inkubation auf die Zellen in serumhaltigem Medium getropft wurden. Die Auswertung nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen (siehe Abb. 3.39) ließ jedoch eher vermuten, dass die Komplexe nicht ausreichend stabil gewesen waren, um die siRNA vor Abbau durch RNAsen im Medium zu schützen.

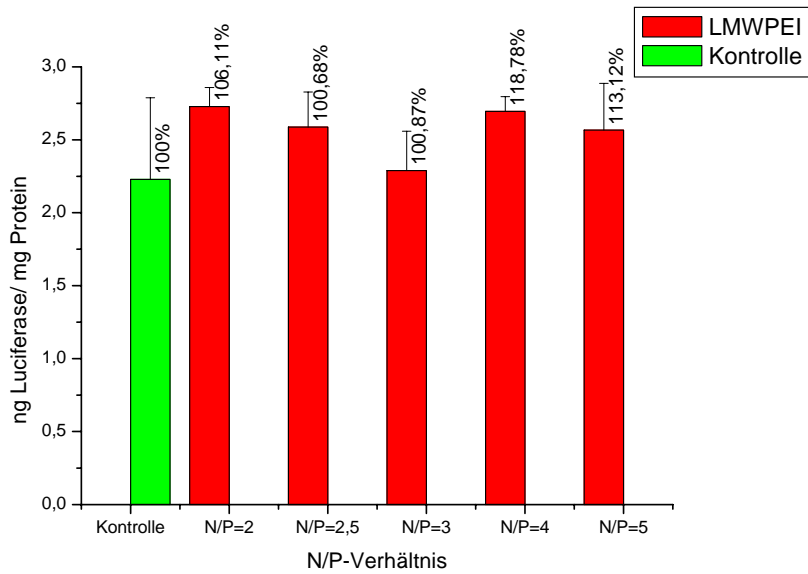


Abbildung 3.39: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und LMWPEI der angegebenen N/P-Verhältnisse

Da in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass einstündige Inkubation der Komplexe ihre Stabilität erhöhen konnte, sollten nun die Auswirkungen von Komplexen bereits untersuchter N/P-Verhältnisse, jedoch nach einstündiger Inkubation der Komplexe, untersucht werden. Tatsächlich konnte teilweise niedrigere Luciferase-Expression gezeigt werden, die sich jedoch nach statistischer Auswertung der Mittelwerte unter Berücksichtigung der Standardabweichungen als nicht signifikant erwies.

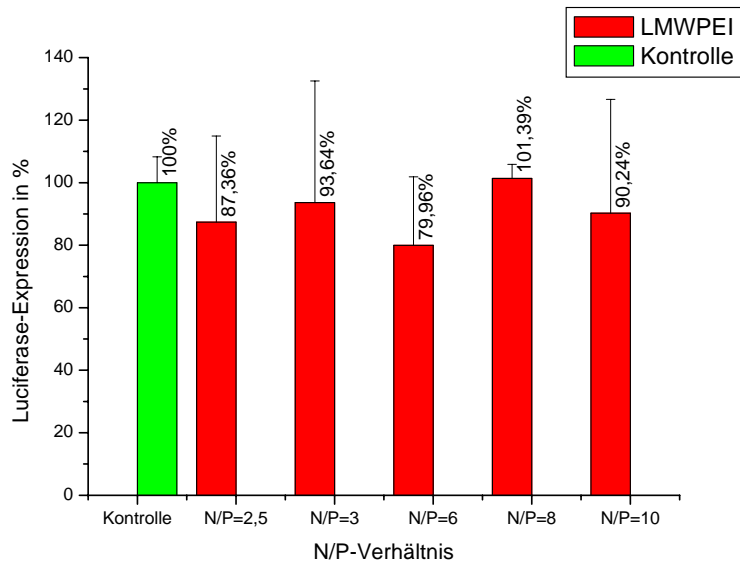


Abbildung 3.40: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und LMWPEI der angegebenen N/P-Verhältnisse nach einstündiger Inkubation der siRNA-PEI-Komplexe

3.8.2.2 Versuche nach Kotransfektion mit NIH-3T3 Zellen

Nachdem die Versuche mit LMWPEI-siRNA-Komplexen im SKOV-3/Luc-System wenig Erfolg gezeigt hatten, wurden vorerst auch Komplexe mit kleinen N/P-Verhältnissen im NIH-3T3-System verwendet. Hierfür wurden 50 pmol siGL3 mit der entsprechenden Menge LMWPEI (für N/P 3, 6 und 9) 20 min lang inkubiert und 4 Stunden nach der Transfektion mit LF-pDNA auf die Zellen gegeben. Nach der Auswertung (Ergebnisse siehe Abb. 3.41) konnte gezeigt werden, dass bei Transfektion mit Komplexen eines N/P-Verhältnisses von 6 ein geringer aber signifikanter Knock-Down (*P < 0,05) stattgefunden hatte.

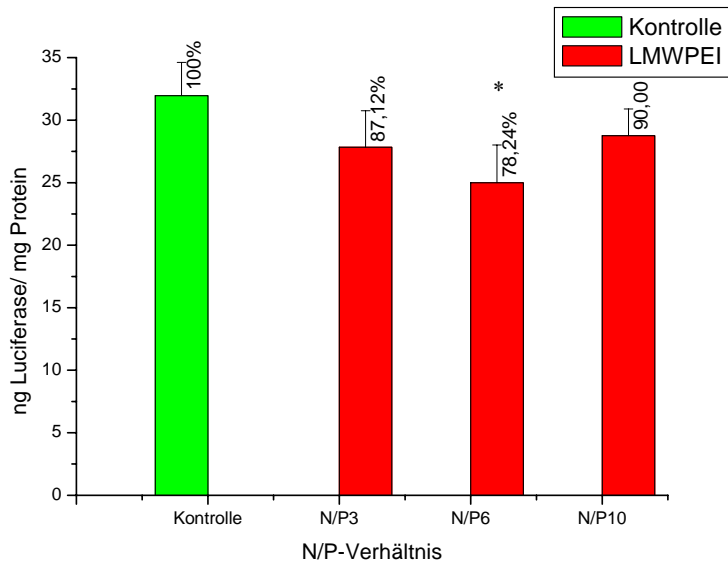


Abbildung 3.41: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und LMWPEI der angegebenen N/P-Verhältnisse

Aufgrund der gefundenen Ergebnisse und der Tatsache, dass bei LMWPEI selbst größere Mengen noch keinen zytotoxischen Effekt aufweisen [29], wurden nun Komplexe mit noch größeren N/P-Verhältnissen (10, 15 und 20) aus LMWPEI und 50 pmol siGL3 hergestellt, 20 min lang inkubiert und auf die 4 Stunden vorher mit pDNA transfizierten Zellen gegeben. Das Ergebnis nach Auswertung von Luciferase- und BCA-Assay, dargestellt in Abb. 3.42, zeigte jedoch keinen signifikanten Knock-Down. Was bereits im vorangegangenen Versuch gezeigt worden war, bestätigte sich in diesem Versuch: Bei Verwendung von Komplexen mit einem N/P-Verhältnissen von 10 oder höher war kein Knock-Down mehr möglich.

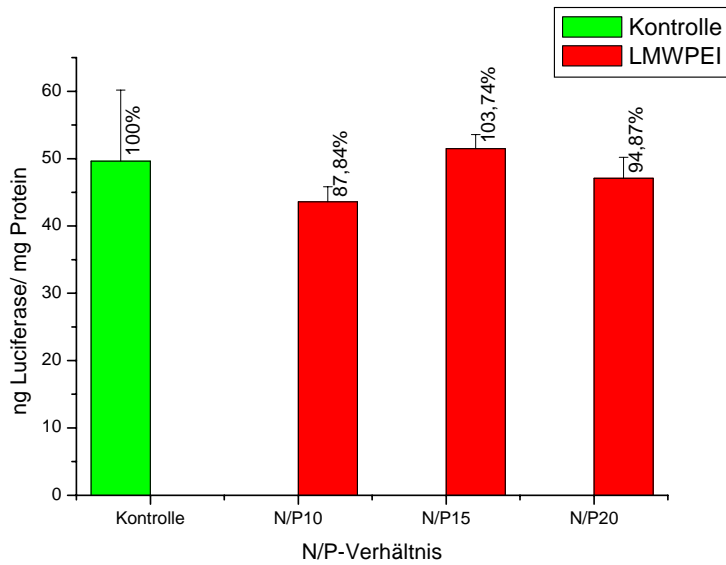


Abbildung 3.42: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und LMWPEI der angegebenen N/P-Verhältnisse

Auch mit LMWPEI wurden Komplexe hergestellt, die 1 Stunde lang inkubiert wurden. Es wurde auch bei diesem Versuch vorgegangen wie bei allen anderen bereits beschriebenen. Nach Auswertung (siehe Abb. 3.43) konnte zwar ein Knock-Down für N/P 8 beobachtet werden, der sich jedoch nach statistischer Betrachtung nicht als signifikant erwies. Was besonders auffiel, war die Tatsache, dass die Luciferase-Expression nach Inkubation mit Komplexen des N/P-Verhältnisses von 10 signifikant angestiegen war. Dies könnte daran gelegen haben, dass ein Überschuss an LMWPEI die Transfektionseffizienz von LF aus der Transfektion mit pDNA verbessert hatte und nun deutlich mehr Plasmid in den Zellkern aufgenommen worden war.

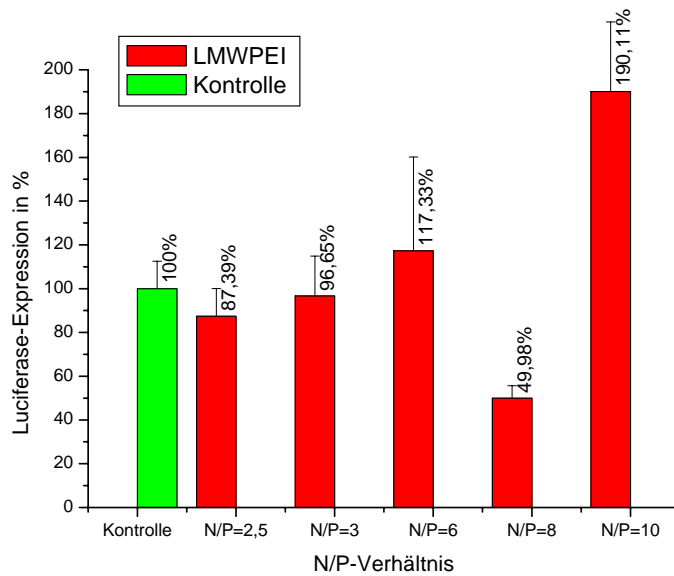


Abbildung 3.43: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und LMWPEI der angegebenen N/P-Verhältnisse nach einstündiger Inkubation der siRNA-PEI-Komplexe

3.8.3 Transfektionsexperimente mit PEG-PEI

Wie bereits unter 1.5 beschrieben, sollte untersucht werden, ob ein PEGyliertes PEI der Form PEI(25k)-g-PEG(550)30, das bei der Komplexierung von DNA mit kleinen bis mittleren N/P-Verhältnissen (4,5-9) keine bis nur geringe Transfektionseffizienz gezeigt hatte [76], sich für Transfektionen von siRNA, deren Zielkompartiment das Zytosol ist, besser eignen würde.

3.8.3.1 Versuche mit SKOV-3/Luc Zellen

Für einen Versuch mit PEGPEI wurden Komplexe aus 20 pmol siGL3 und der entsprechenden Menge PEGPEI hergestellt. Da sich im Agarose-Gel-Elektrophorese-Versuch ein N/P-Verhältnis von 3 als stabil erwiesen hatte, wurden Komplexe der N/P-Verhältnisse von 2; 2,5; 3; 6 und 10 hergestellt und eine Stunde inkubiert. So sollte untersucht werden, ob die Komplexe mit kleinem N/P-Verhältnis, die nach 20-minütiger Inkubation noch nicht ausreichend stabil gewesen waren, nun nach einstündiger Inkubation stabil genug zum Schutze der siRNA und labil genug zum Zerfall im Zytosol waren. Nach Durchführung und Auswertung des Versuchs ergaben sich die in Abb. 3.44 gezeigten Ergebnisse:

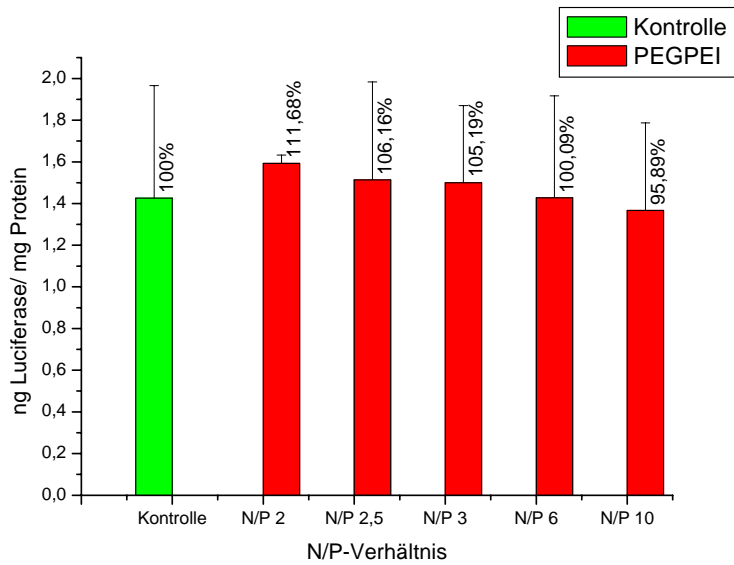


Abbildung 3.44: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und PEGPEI der angegebenen N/P-Verhältnisse nach einstündiger Inkubation der siRNA-PEI-Komplexe

Leider konnte bei keinem der verwendeten N/P-Verhältnisse ein signifikanter Knock-Down-Effekt beobachtet werden. Eventuell könnte es auch bei der Komplexierung von siRNA mit dem verwendeten Copolymer nötig sein, auf höhere N/P-Verhältnisse auszuweichen. Andererseits könnte auch eine Inkubationsdauer von einer Stunde eine ungünstige Bedingung für die Herstellung von gerade ausreichend stabilen sowie gerade notwendig labilen Komplexen gewesen sein.

3.8.3.2 Versuche nach Co-Transfektion mit NIH-3T3 Zellen

Auch für das NIH-3T3-Modell sollten Komplexe aus PEGPEI und siRNA hergestellt werden. Um die Effekte der Komplexe auf die unterschiedlichen Zelllinien vergleichen zu können, wurden Komplexe aus 50 pmol siGL3 und PEGPEI mit den gleichen N/P-Verhältnissen hergestellt und auch eine Stunde lang inkubiert. Die Komplexe wurden vier Stunden nach Lipofektion mit pDNA auf die Zellen gegeben, diese wurden 24 Stunden lang kultiviert und danach lysiert. Nach der Durchführung der Luciferase- und BCA-Assays mit den Zelllysaten wurden die Ergebnisse ausgewertet und graphisch dargestellt (Abb. 3.45).

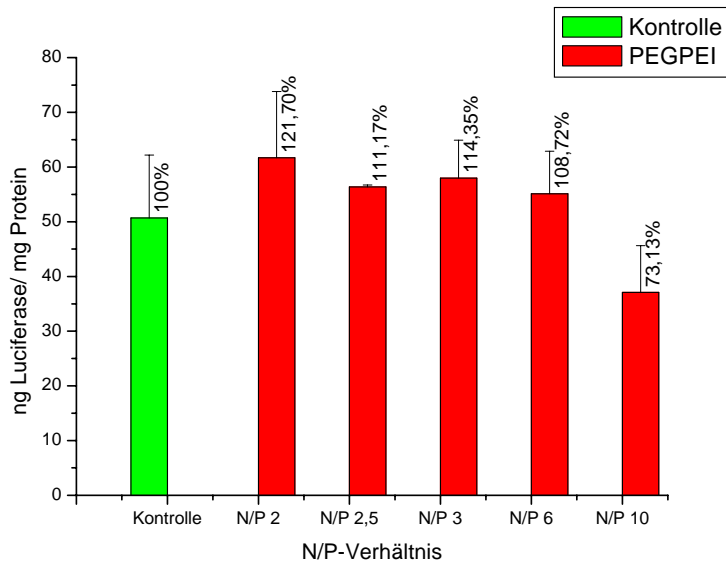


Abbildung 3.45: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und PEGPEI der angegebenen N/P-Verhältnisse nach einstündiger Inkubation der siRNA-PEI-Komplexe

Der anscheinend beobachtbare Knock-Down bei Verwendung von Komplexen mit N/P 10 erwies sich nach statistischer Auswertung der Mittelwerte und Standardabweichungen als nicht signifikant. Auch hier könnten einerseits die N/P-Verhältnisse zu niedrig gewählt worden sein, andererseits könnte sich auch die lange Inkubationszeit der Komplexe von einer Stunde ungünstig ausgewirkt haben.

3.8.4 Transfektionsexperimente mit ePEI

Als weiterer möglicher Vektor wurde ethoxyliertes PEI, ePEI, verwendet, das aufgrund seines kleineren pK_a -Werts und seiner deshalb stärkerer Protonierung im Endosom [77, 78] darauf schließen ließ, besonders gut aus dem Endosom ins Zytosol freigesetzt werden zu können. ePEI hatte im Agarose-Gel-Elektrophorese-Versuch schon bei einem N/P-Verhältnis von 2 stabile Komplexe gebildet, weshalb in den Transfektionsversuchen anfangs mit sehr niedrigen N/P-Verhältnissen gearbeitet wurde.

3.8.4.1 Versuche mit SKOV-3/Luc Zellen

Für die Transfektion von SKOV-3/Luc-Zellen wurden 20 pmol siGL3 mit der entsprechenden Menge ePEI für die N/P-Verhältnisse 0,75; 1; 1,5 und 2 gemischt und 20 min lang inkubiert. Die Komplexe wurden 6 Stunden nach der Aussaat auf die Zellen

gegeben, welche dann 24 Stunden lang kultiviert wurden, bis die Lyse stattfand. Mit den Lysaten wurden Luciferase- und BCA-Assay durchgeführt. Das Ergebnis der Auswertung ist in Abb. 3.46 dargestellt.

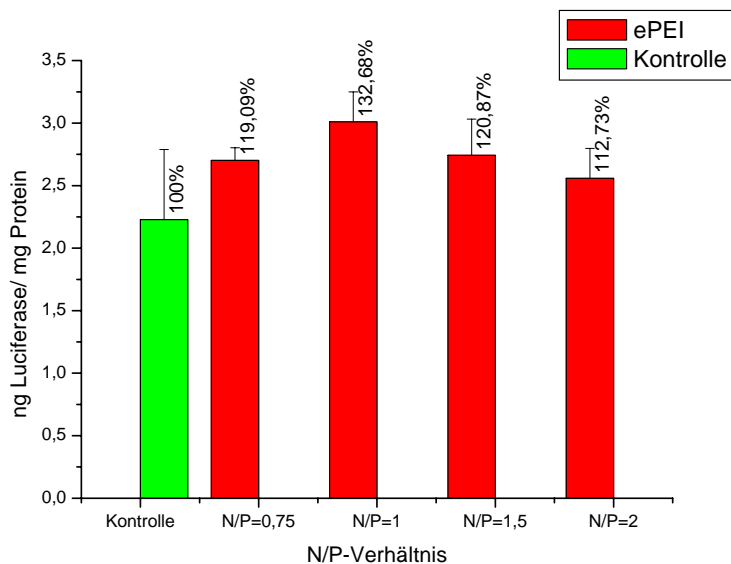


Abbildung 3.46: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und ePEI der angegebenen N/P-Verhältnisse

Da in diesem Versuch kein Knock-Down erkennbar war, wurde er mit höheren N/P-Verhältnissen zur Komplexierung von je 20 pmol siGL3 und einstündiger Inkubation der Komplexe wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.47 wiedergegeben und zeigen leider auch keinen signifikanten Knock-Down.

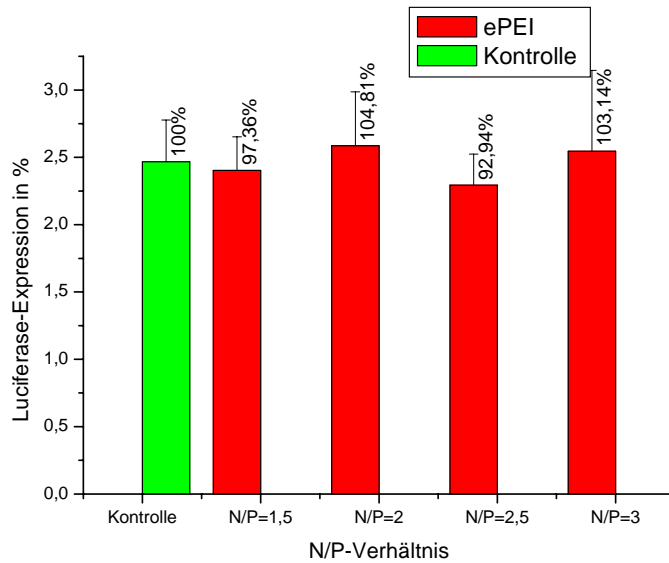


Abbildung 3.47: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und ePEI der angegebenen N/P-Verhältnisse nach einstündiger Inkubation der Komplexe

3.8.4.2 Versuche nach Co-Transfektion mit NIH-3T3 Zellen

Auch mit dem NIH-3T3-System sollten Transfektionen mit ePEI durchgeführt werden. Die Zellen wurden auch hier 24 Stunden nach der Aussaat mit pDNA-LF-Komplexen transfiziert, um 4 Stunden später mit Komplexen aus 50 pmol siGL3 und der entsprechenden Menge ePEI behandelt zu werden. Um Vergleiche zwischen den Systemen anstellen zu können, wurden beim ersten Versuch die gleichen N/P-Verhältnisse (0,75; 1; 1,5 und 2) verwendet wie beim SKOV-3/Luc-System, die Komplexe wurden ebenfalls 20 min lang inkubiert. Nach der Auswertung der Luciferase- und BCA-Assays wurde zwar kein Effekt bei Verwendung von Komplexen mit den N/P-Verhältnissen 0,75 und 1 gefunden, jedoch ein Knock-Down von 89,28 % für N/P 1,5 und 90,04 % für N/P 2 (Abb. 3.48). Da jedoch sehr erstaunlich war, dass zwischen N/P 1 und N/P 1,5 ein so großer Unterschied lag, wurde der Versuch mit N/P-Verhältnissen ab 1,5 und einstündiger Komplexierung der Komplexe wiederholt.

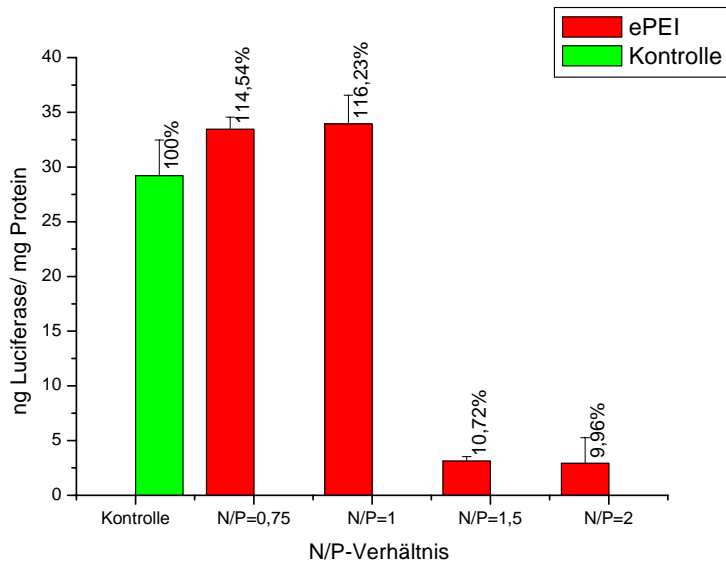


Abbildung 3.48: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und ePEI der angegebenen N/P-Verhältnisse

Im folgenden Versuch wurden Komplexe mit N/P-Verhältnissen von 1,5; 2; 3 und 6 hergestellt und eine Stunde lang inkubiert, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden.

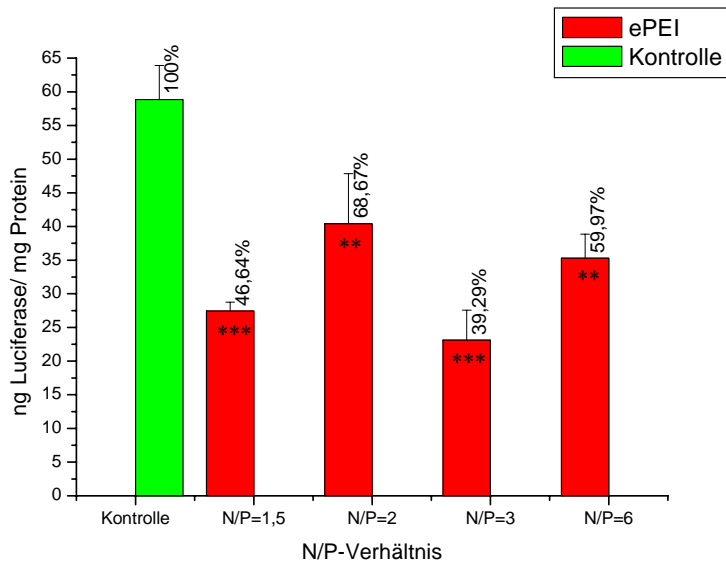


Abbildung 3.49: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und ePEI der angegebenen N/P-Verhältnisse nach einstündiger Inkubation der Komplexe

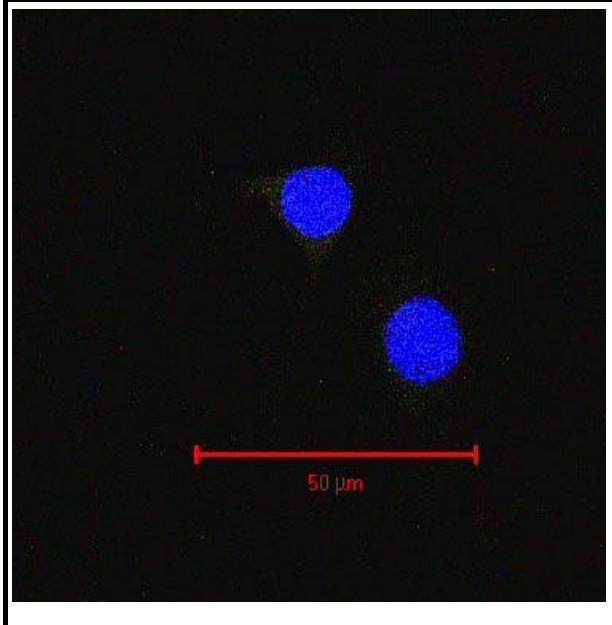
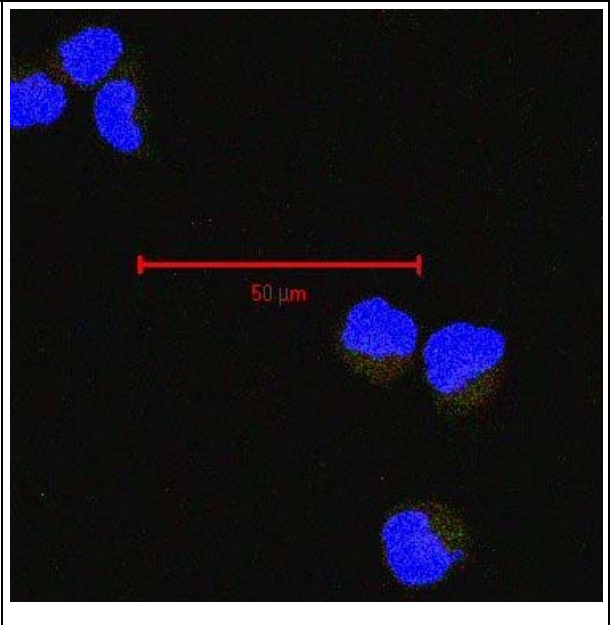
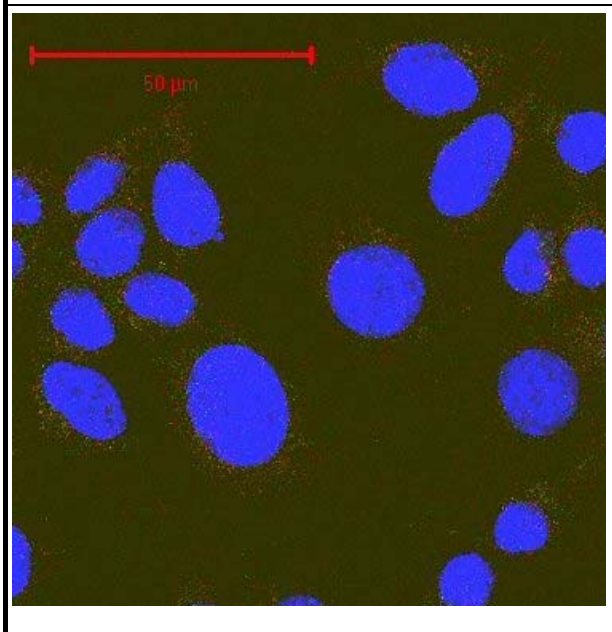
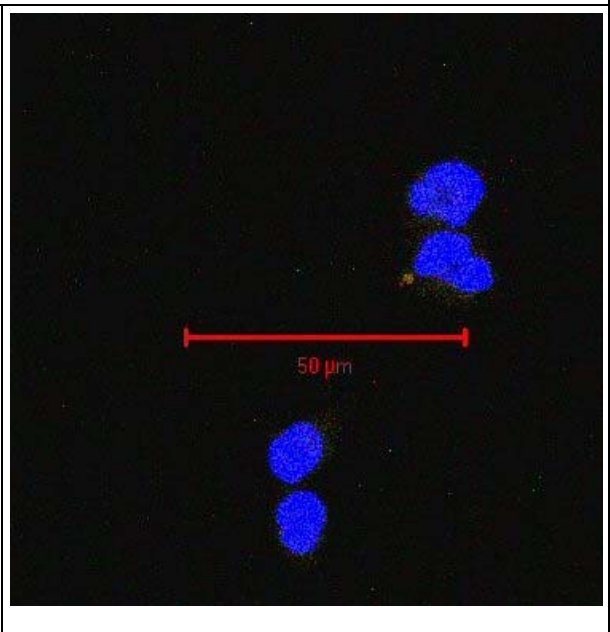
Das Ergebnis, in Abb. 3.49 wiedergegeben, zeigt, dass es bei Verwendung von Komplexen mit N/P 1,5 und 3 um einen signifikanten Knock-Down für $***P < 0,001$ handelt. Bei N/P 2 und 6 konnte auch ein signifikanter Knock-Down mit $**P < 0,01$ erzielt werden.

Weshalb der Knock-Down mit den Komplexen mit N/P 2 kleiner ausfiel als bei N/P 1,5 und 3, hat vermutlich eher statistische als mechanistische Gründe.

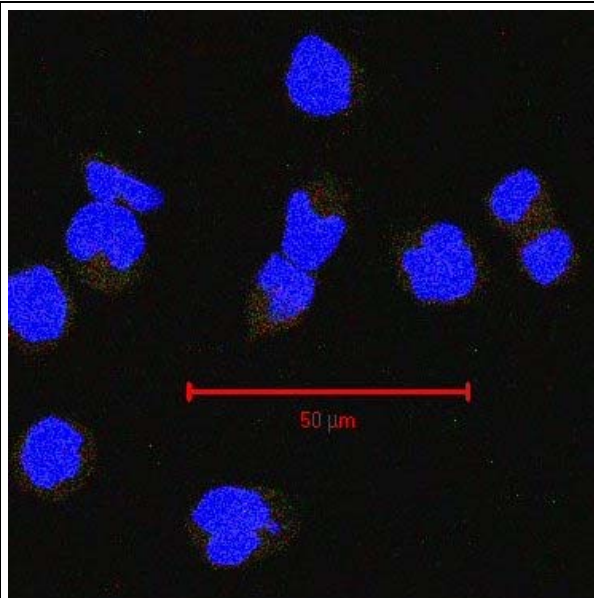
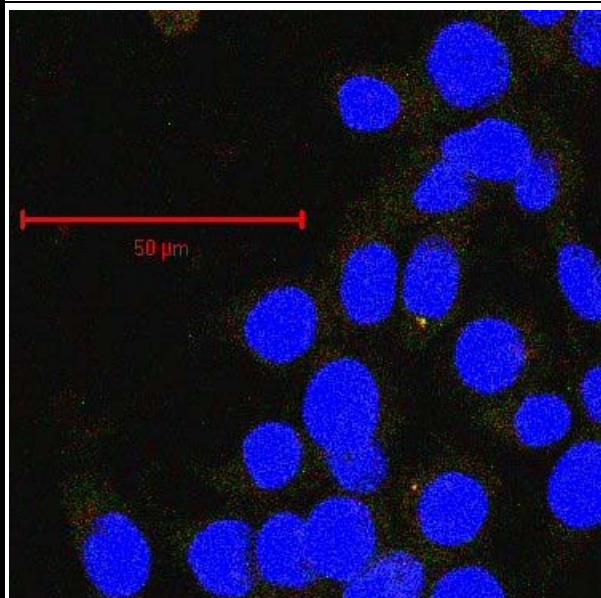
Die Ursache für das Ausbleiben des Knock-Downs bei Verwendung von Komplexen der gleichen N/P-Verhältnissen im SKOV-3/Luc-System kann darin liegen, dass, wie bereits mehrfach beschrieben wurde, dass nicht alle Zellen gleichartig zugänglich sind für die gleichen Komplexe [91]. Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass im SKOV-3/Luc-System aufgrund der Ergebnisse der Versuche mit LF, mit Komplexen aus 20 pmol siRNA gearbeitet wurde, während im NIH-3T3-System 50 pmol siRNA für die Komplexbildung verwendet wurden. Bei Verwendung von Polymeren als Vektoren könnten durchaus andere Mengen siRNA von Nöten gewesen sein.

3.9 Aufnahmeuntersuchungen

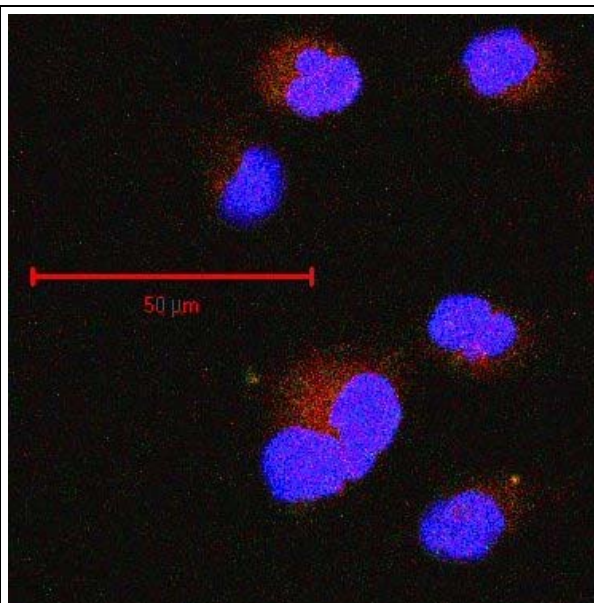
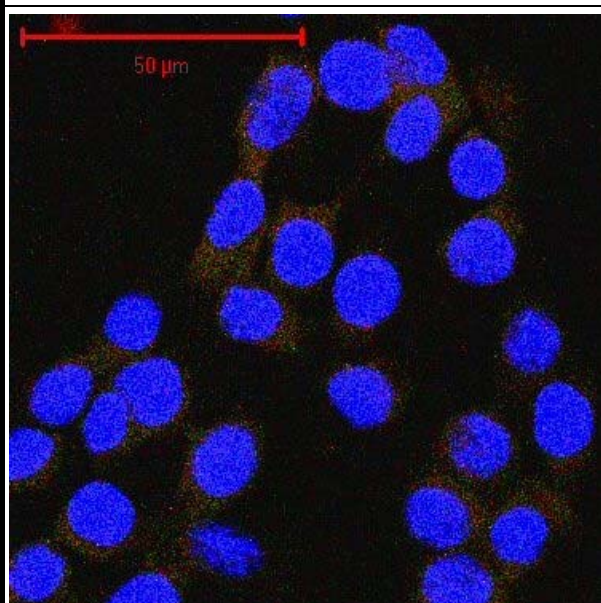
Nachdem die Transfektionen mit verschiedenen Polymeren verschiedener N/P-Verhältnisse und in zwei verschiedenen Systemen wenig Knock-Down-Effekte gezeigt hatten, sollte mit den Aufnahmeuntersuchungen die Frage beantwortet werden, ob die Komplexe von den Zellen aufgenommen wurden und ob die Komplexe zerfielen und die siRNA freiließen. Hierfür sollten die verwendeten Komplexe mittels Fluoreszenz-Labelings und Konfokal-Mikroskopie nach Transfektion lokalisiert und ihr Zerfall verfolgt werden. Um doppelmarkierte Komplexe herzustellen, wurden die Polymere PEI 25, LMWPEI und ePEI mit FITC gelabelt und mit käuflich erworbener Cy3-gelabelten siRNA (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) gemischt und zur Komplexbildung 20 min lang inkubiert. Das Labeling wurde durchgeführt, wie unter 2.2.11 beschrieben. Der Aufnahmeversuch selber wurde, wie unter 2.2.12 beschrieben, an SKOV-3/Luc- und an NIH-3T3-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden bis zur Fixierung im CO₂-Inkubator bei 37 °C kultiviert. Zu den gewählten Zeitpunkten (15 min, 30 min, 60 min und 120 min nach der Transfektion) wurden die Zellen in je einer Kammer pro verwendetem Polymer und Zelllinie auf dem Objektträger fixiert. Nachdem alle Zellen fixiert waren (150 min nach der Transfektion), wurden die Kammern abgenommen, die Zellen in FluorSaveTM Reagent eingebettet und mit Deckgläschen bedeckt und versiegelt. Am CLSM wurden Aufnahmen von den fixierten Zellen gemacht.

NIH-3T3	SKOV-3/Luc
PEI 25	
PEI 25 / 15 min	
	
PEI 25 / 30 min	
	

PEI 25 / 60 min

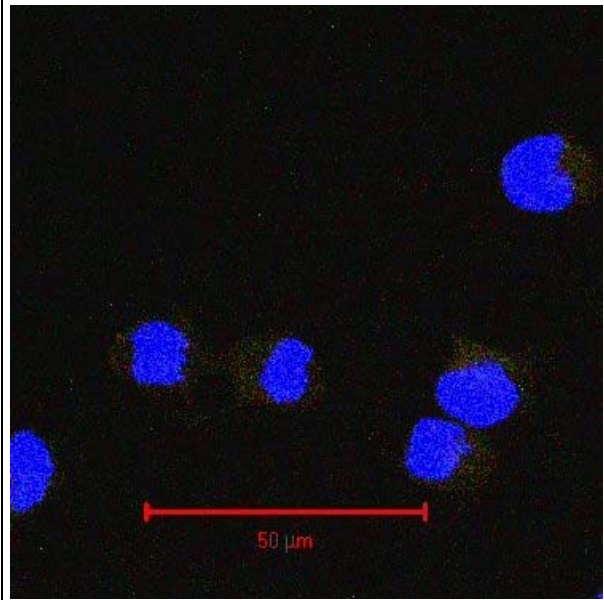
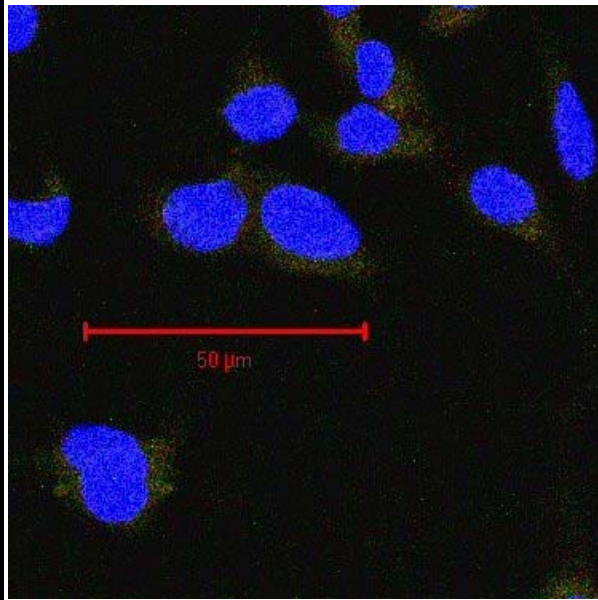


PEI 25 / 150 min

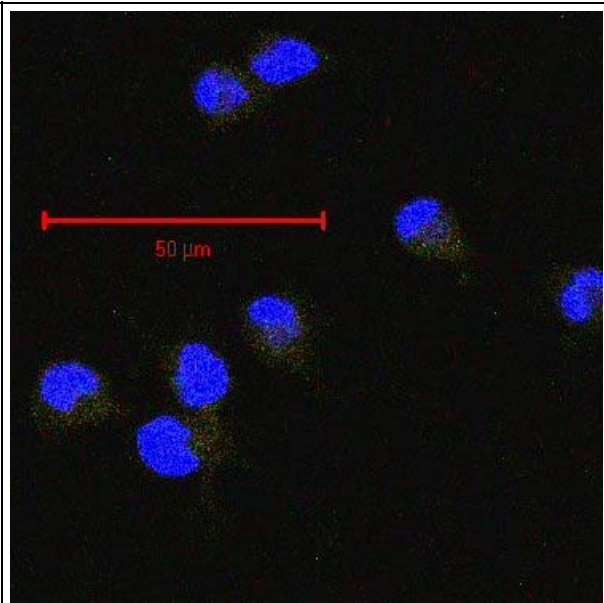
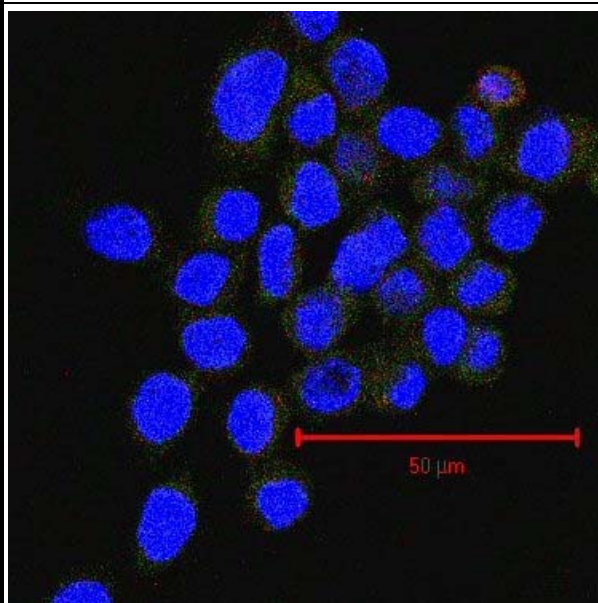


LMWPEI

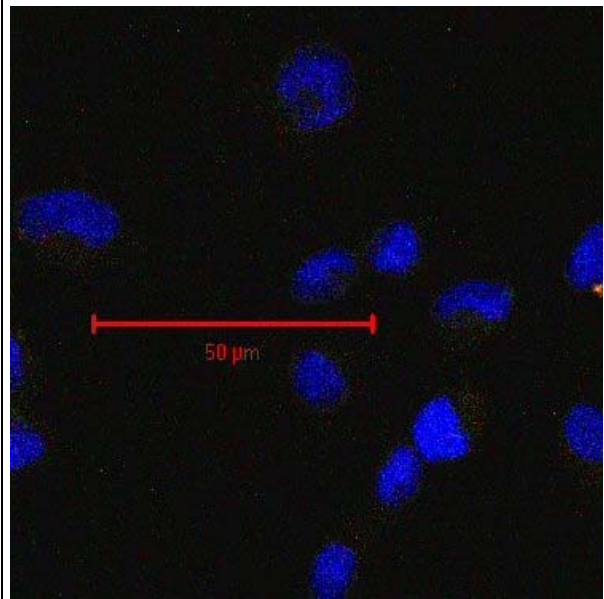
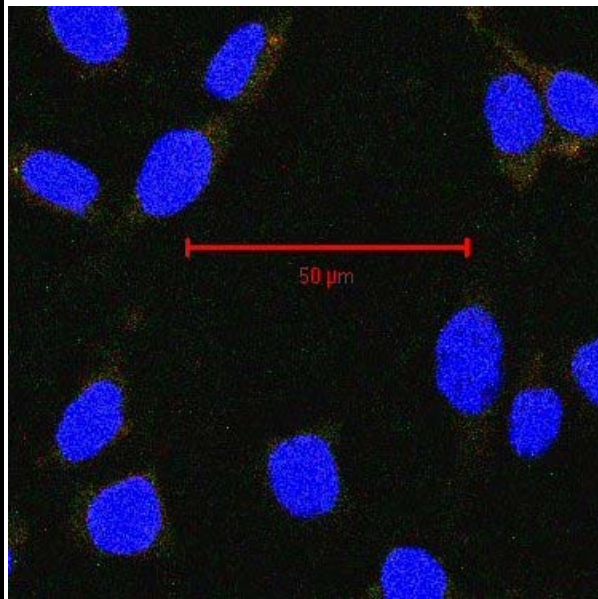
LMWPEI / 15 min



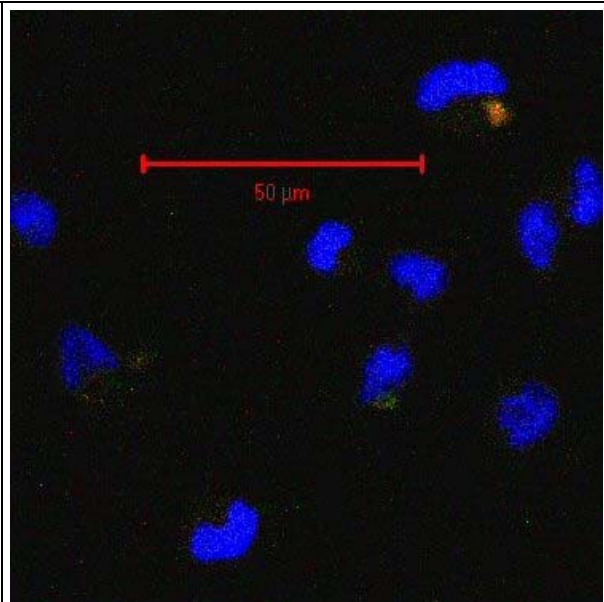
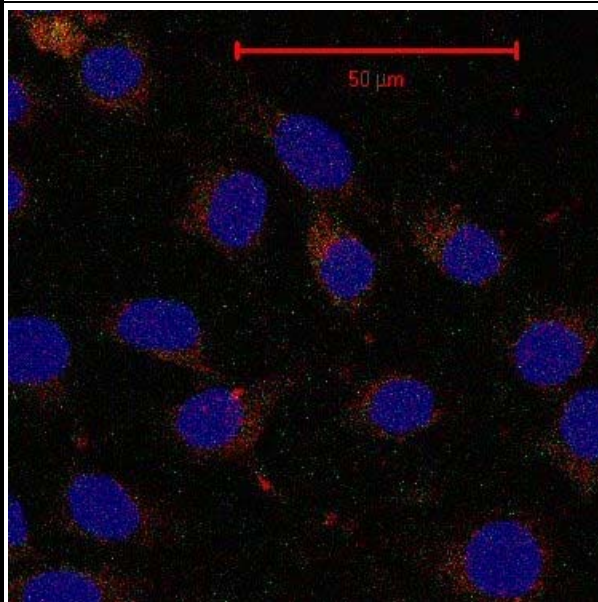
LMWPEI / 30 min



LMWPEI / 60 min

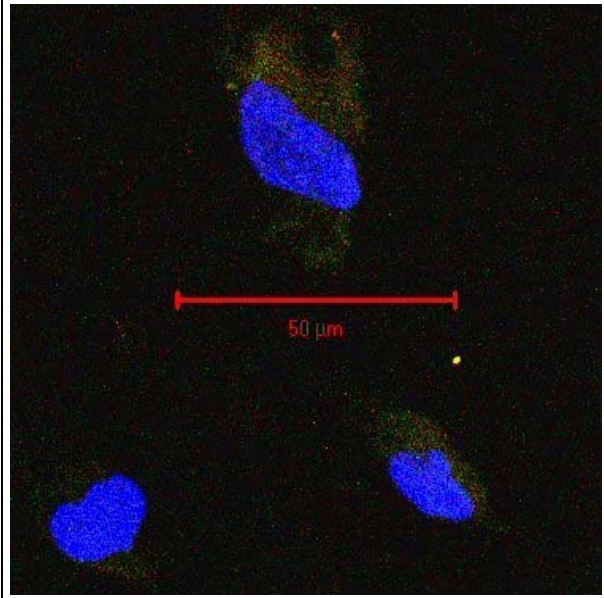
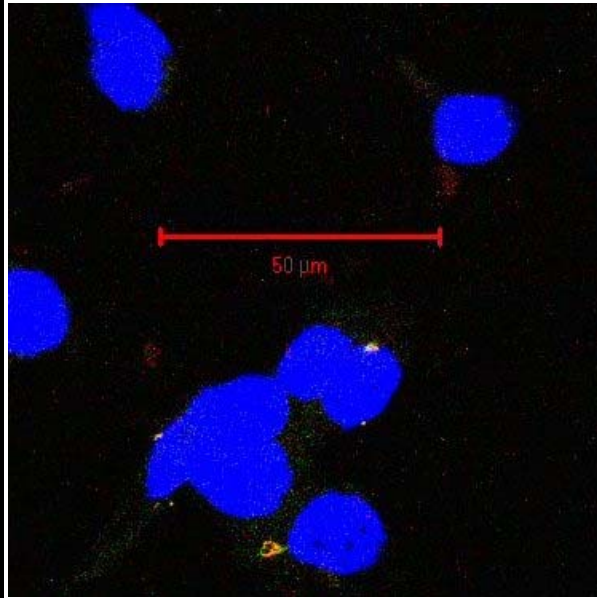


LMWPEI / 150 min

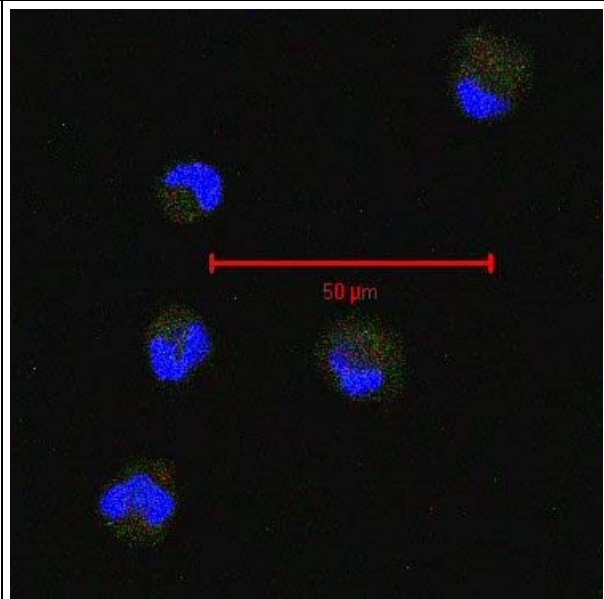
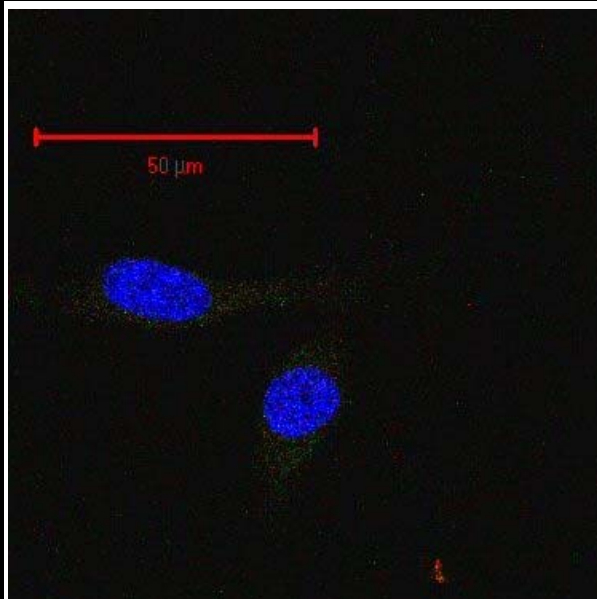


ePEI

ePEI / 15 min



ePEI / 30 min



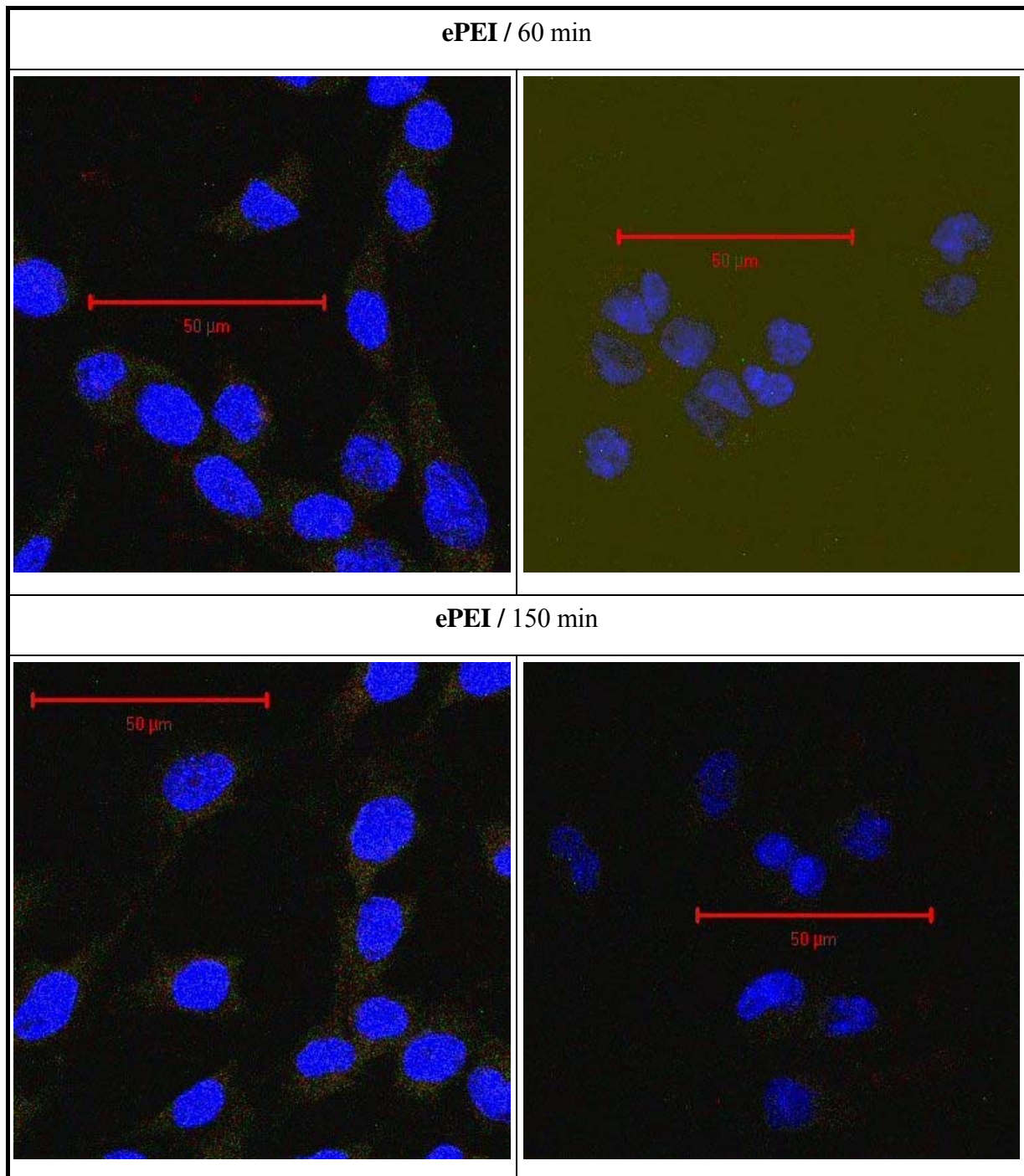


Tabelle 3.1: Zeitserie

Was durch die Aufnahmen mit dem CLSM deutlich wurde, ist, dass bei Verwendung von PEI 25 als Vektor nahezu alle Zellen erreicht wurden. Selbst nach 15 min konnte bei beiden Zelllinien grüne und rote Fluoreszenz beobachtet werden. Außerdem wurde deutlich, dass sich die Komplexe in den gesamten Zellen verteilt befanden, in welches Kompartiment sie aufgenommen worden waren, ist allerdings nicht eindeutig zu erkennen.

Es muss jedoch klar gesagt werden, dass bei Komplexierung der siRNA mit den anderen Polymeren nicht beide Zelllinien die Komplexe gleich gut internalisiert hatten. Sowohl bei Verwendung von LMWPEI als auch bei ePEI war die Fluoreszenz in den SKOV-3/Luc-Zellen weitaus geringer.

Leider konnte weder gezeigt werden, ob und wann die Komplexe zerfallen, noch konnte eine zeitabhängig unterschiedliche Anordnung der Komplexe in bestimmten Regionen beobachtet werden.

Aufgrund der sichtbaren aber sehr geringen Fluoreszenz kann nach diesem Versuch davon ausgegangen werden, dass bei Verwendung des NIH-3T3-Systems ausreichend Komplexe aus PEI 25, LMWPEI und auch ePEI aufgenommen wurden. Für das SKOV-System ist zumindest zu sagen, dass Komplexe aus PEI 25 gut aufgenommen werden konnten.

Das Ausbleiben der Knock-Down-Effekte kann deshalb nicht ausschließlich durch nicht ausreichende Aufnahme der Komplexe in die Zellen begründet werden.

Was jedoch berücksichtigt werden muss, ist, dass bereits berichtet wurde, dass bei zeitlich getrennter Transfektion (sequentieller Transfektion) von pDNA und siRNA die jeweiligen Komplexe nicht von denselben Zellen aufgenommen wurden [67]. Dies könnte untersucht werden, wenn auch für den Aufnahmeuntersuchungsversuch die vorherige Transfektion der Zellen mit pDNA durchgeführt würde. Diese müsste dann mit einem Fluoreszenzmarker markiert sein, dessen Absorptions- und Emissionsspektren sich von denen der anderen Fluoreszenzmarkern unterscheiden.

3.10 Vergleich beider Systeme: Stabil transfizierte Zelllinie vs. Koftransfektion

Nachdem die durchgeführten Transfektionsexperimente vergleichsweise bei beiden Systemen durchgeführt wurden, können nun einige generelle Aussagen gemacht werden.

3.10.1 RNAi in einer stabil transfizierten Zelllinie SKOV-3/Luc

Bei Verwendung einer stabil transfizierten Zelllinie wird das Zielgen endogen exprimiert, was eher dem physiologischen Zustand nahekommt. Die Transfektionsexperimente gestalten sich weniger zeitaufwendig, da das Zielgen nicht erst in die Zelle eingebracht werden muss. Allerdings kann in den Zellen bereits ein gewisses Level des Proteins, welches später mitgemessen wird, vorhanden sein. Daher sollten mindestens 5 Halbwertszeiten abgewartet werden, bevor die Proteinmenge bestimmt wird. Ein Nachteil gentechnisch veränderter Zellen ist aber, dass sie fremde Proteine exprimieren, die für die

Zelle toxisch sein können. Aufgrund der Veränderung des Genoms können weitere Faktoren verändert sein, so dass zum Beispiel, wie unter 3.2.2 gezeigt wurde, doppelte Menge Serum zur Kultivierung der Zellen notwendig wird. Hier kann es auch zu ungleichmäßiger Basis-Expression des Proteins kommen, welches zur Quantifizierung dienen soll. Die Kontrollwerte, die als 100%ige Expression angesehen wurden, zeigen dann große Schwankungen.

Für die hier verwendeten Zellen konnte durch die Aufnahmeversuche, siehe unter 3.9, gezeigt werden, dass sie für die verwendeten Komplexe wenig zugänglich waren. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass verschiedene Zelllinien für die Aufnahme von Komplexen unter Verwendung der gleichen Polymere, unterschiedlich geeignet sind [91]. Durch zielgerichtete Aufnahme, zum Beispiel über Rezeptoren oder Integrine, könnte dieses Problem jedoch angegangen werden.

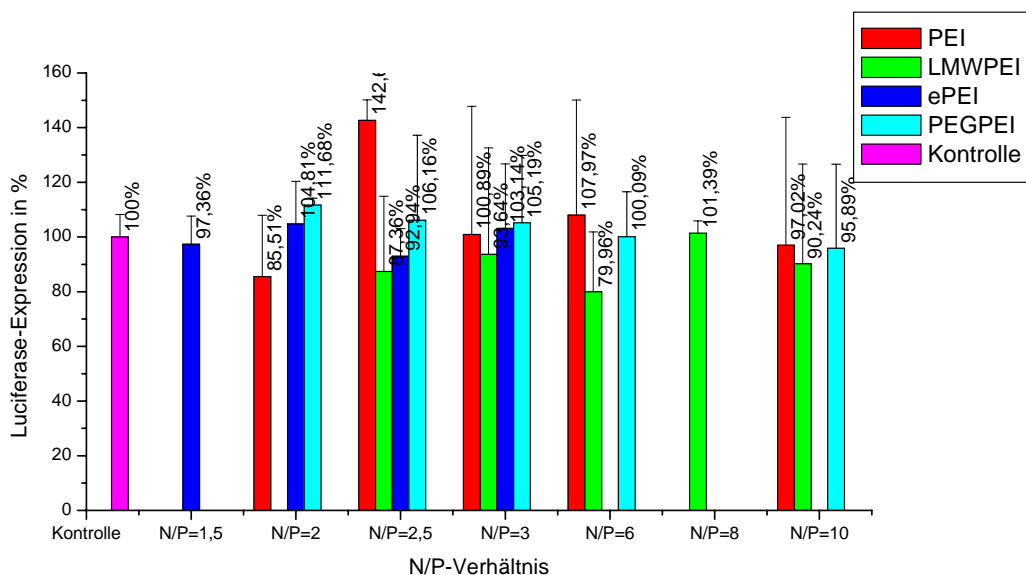


Abbildung 3.50: Transfektion von SKOV-3/Luc mit Komplexen aus siGL3 und 4 verschiedenen Polymeren der angegebenen N/P-Verhältnisse

3.10.2 RNAi nach zeitlich versetzter Kotransfektion von NIH-3T3 –Zellen

Bei Ko-, Prae- oder Post-Transfektion von Zellen exprimieren diese das Zielgen exogen. Die Verhältnisse entsprechen also weniger den physiologischen. Allerdings kann es so nicht zur Akkumulation des Proteins kommen, dessen Konzentration später gemessen wird. Matsui et. al. [91] konnten zeigen, dass die Aufnahme von pDNA-Komplexen und siRNA-

Komplexen prinzipiell nicht in Konkurrenz steht und unabhängig voneinander stattfindet. Daher sollte es möglich sein, auch die Zellen, die mit dem Zielgen transfiziert worden sind, in einem nächsten Schritt mit siRNA-Komplexen zu erreichen. Bei Ko-, Prae- oder Post-Transfektion sind jedoch auch durch die Transfektion mit pDNA bereits Variablen im Spiel, und die Versuche gestalten sich etwas zeitaufwändiger. Auch wenn es beim hier verwendeten sequentiellen System teilweise zu sogar gesteigerten Luciferase-Expressionen kam, waren die Zellen zugänglicher für die Aufnahme von siRNA-Komplexen und ein Knockdown konnte zumindest teilweise beobachtet werden.

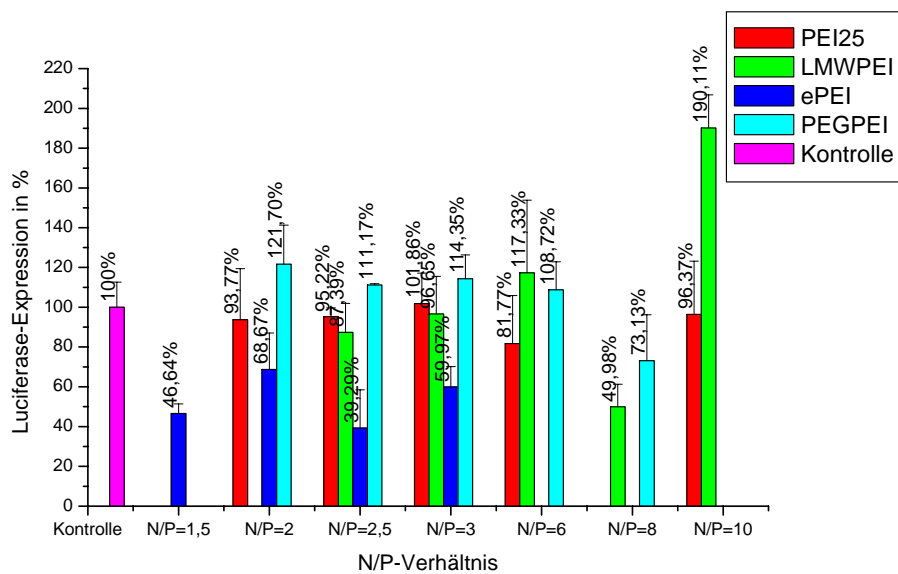


Abbildung 3.51: Transfektion von NIH-3T3 mit Komplexen aus siGL3 und 4 verschiedenen Polymeren der angegebenen N/P-Verhältnisse

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Systeme zur Untersuchung von RNAi-Effekten durch nicht-virale Einschleusung von siRNA entwickelt. Als Reporter gen wurde eine für Firefly-Luciferase codierende Sequenz ausgewählt. Die Systeme wurden optimiert und wichtige Parameter festgelegt. So wurden SKOV-3/Luc-Zellen in Medium mit einem Serum-Anteil von 20 % kultiviert und für die Versuche mit 70.000 Zellen pro well ausgesät, während NIH-3T3-Zellen mit 150.000 Zellen pro well im 24-well-Format ausgesät und 24 Stunden später mit 1,6 µg pGL3 pro well transfiziert wurden.

Es wurde bestimmt, dass für einen Knock-Down-Effekt des Zielproteins Luciferase im SKOV-3/Luc-System 20 pmol siGL3, im NIH-3T3-Modell 50 pmol siGL3 notwendig waren. Es wurde die Spezifität des Knock-Downs durch Überprüfung der Effekte einer siRNA veränderter Sequenz bestätigt und beobachtet, dass ab einer Menge von 40 pmol siRNA bei SKOV-3/Luc und 75 pmol siRNA bei NIH-3T3 unspezifische Effekte auf Luciferase- und Gesamtproteinexpression messbar waren.

Experimente zur Komplexierung der siRNA mittels Gel Retardation Assay halfen dabei, geeignete N/P-Verhältnisse zur Herstellung der Komplexe mit den vier verschiedenen verwendeten Polymeren zu ermitteln. Stabile Komplexe entstanden bei Komplexierung mit PEI 25 ab einem N/P-Verhältnis von 2, bei LMWPEI ab $N/P > 4$, bei PEGPEI ab $N/P 3$ und bei ePEI ab einem N/P-Verhältnis von 2.

Mittels dynamischer Lichtstreuung wurden die Größen der Komplexe aus PEI 25, LMWPEI, PEGPEI und ePEI bestimmt. Es ergaben sich Komplexgrößen von 287 ± 144 nm ($N/P 1$) bis $123 \pm 6,11$ nm ($N/P 8$) für PEI 25, $865 \pm 60,1$ nm ($N/P 1$) bis $101 \pm 23,7$ nm ($N/P 8$) für LMWPEI, 207 ± 17 nm ($N/P 1$) bis $87,2 \pm 11,8$ nm ($N/P 10$) für PEGPEI und 308 ± 181 nm ($N/P 1$) bis $97,3 \pm 3,55$ nm ($N/P 10$) für ePEI. Allerdings wurden diese Größen für eine Konzentration von 25 pmol siGL3 in 5 %iger Glucose ermittelt. Da es in 1x siRNA-Puffer zu starker Aggregation kam, muss davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der auf die Zellen gegebenen Komplexe vermutlich aggregiert hatte und daher für eine Aufnahme per Endozytose nicht mehr zur Verfügung stand.

Eingehende Untersuchungen der verwendeten Zelllinien hinsichtlich der Luciferase-Expression sowie der Aufnahme der hergestellten Komplexe wurden mit Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) durchgeführt. SKOV-3/Luc-Zellen zeigten zwar

permanente Luciferase-Expression, konnten aber im Vergleich zu den NIH-3T3-Zellen kaum Komplexe aus siRNA und den verschiedenen Polymeren aufnehmen. Auch im Zytosol der NIH-3T3-Zellen konnte nach 15 bis 150-minütiger Einwirkung von Komplexen aus siRNA und PEI 25, LMWPEI oder ePEI nur geringe Fluoreszenz der doppelmarkierten Komplexe beobachtet werden.

Diese durch CLSM erhaltenen qualitativen Ergebnisse konnten die quantitativen Aussagen der wenig erfolgreichen Transfektionsversuche bestätigen. Hier wurden Komplexe aus der notwendigen Menge siRNA und PEI 25, LMWPEI, PEGPEI oder ePEI hergestellt. Begonnen wurde mit N/P-Verhältnissen, die sich an den Ergebnissen des Agarose-Gel-Elektrophorese-Versuchs orientierten. Es wurden jeweils für ein Polymer die gleichen N/P-Verhältnisse bei beiden Systemen angewendet, welche, abhängig vom Polymer, zwischen 0,75 und 20 lagen. Lediglich beim NIH-3T3-System konnte ein signifikanter Knock-Down bei Verwendung von ePEI mit N/P 1,5; 2; 3 und 6 beobachtet werden. Diese Tatsache regte dazu an, bestimmte Parameter, vor allem die Kultivierungszeit zwischen Transfektion und Lyse, zu überdenken und zu überprüfen, bevor mit weiteren Transfektionsversuchen fortgefahren werden sollte.

4.2 Ausblick

Zukünftig soll die Knock-Down-Effizienz von siRNA-Polymer-Komplexen gesteigert werden. Hierfür muss erstens die Kinetik des Knock-Downs überprüft werden. Obwohl von einigen Gruppen berichtet wird, dass ein Effekt schon nach 6 [67] bis 24 Stunden sichtbar wird [72, 92-94], empfehlen andere, erst nach 48-72 [95] oder sogar 72 [96], 96 und mehr [97] Stunden auf Protein-Level zu messen, um die biologische Abnahme des Proteins aufgrund der Halbwertszeit abzuwarten, sowie die Dauer der Translation und Proteinbiosynthese zu berücksichtigen. Zur einfachen Klärung der Frage, ab welchem Zeitpunkt in welchem System eine signifikant geringere Menge des Zielproteins vorhanden ist, könnte die Kinetik des Knock-Downs ähnlich wie im unter 3.5 beschriebenen Versuch verfolgt werden. Eine andere und genauere Möglichkeit wäre die Quantifizierung der mRNA-Level durch RT-PCR. Eine Erklärung dafür, weshalb ein Knock-Down bei den durchgeführten Versuchen bei Anwendung von LF-siRNA-Komplexen bereits nach 24 Stunden erfolgt hatte, nicht jedoch bei Anwendung von Polymer-siRNA-Komplexen, könnte die Beobachtungen von McLaggan et. al. [98] bringen. Hier konnte ein Knock-Down nach 24 Stunden festgestellt werden, wenn in serumfreiem Medium gearbeitet

wurde. Bei Anwesenheit von Serum, konnte ein Knockdown erst nach 48 Stunden beobachtet werden. Urban-Klein et. al. [72] beschrieben ähnliche Ergebnisse: Während hier bei Verwendung des Transfektionsreagenzes TransIT-TKO in Anwesenheit von Serum kein merklicher Knock-Down stattgefunden hatte, die Luciferase-Expression jedoch in Abwesenheit von Serum mit dieser Methode auf etwa 10 % nach 72 Stunden herunterregulieren ließ, zeigt der Knock-Down bei Verwendung von Jet-PEI als Transfektionsreagenz in Gegenwart von Serum eine deutliche Zeitabhängigkeit. Bei transient Luciferase-exprimierenden Zellen ist nach 24 Stunden auch hier kein signifikanter Knock-Down erkennbar. Erstaunlicherweise werden die Verhältnisse bei den stabil Luciferase-exprimierenden Zellen SKOV-3/Luc anders beschrieben. Hier ist auch nach 24 Stunden schon ein 50 %iger Knock-Down beobachtbar, was bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen gerade einmal mit LipofectamineTM2000 erreicht worden war.

Aufgrund der kleineren Standardabweichungen der Luciferase-Expression und Gesamtproteinmenge der Zelllysate, siehe unter 3.2.3, könnte sich jedoch eine Kultivierung der Zellen von mindestens 48 Stunden nach der siFektion in jedem Fall günstig auf die Ergebnisse auswirken. Des Weiteren würden sich aus statistischen Gründen Messungen im Quintuplett anbieten.

Nach Optimierung der Kultivierungsdauer nach siFektion wäre ein erneutes Austitrieren der benötigten Menge siRNA für jedes System notwendig. Die unter 3.4 durchgeführten Versuche mit LF sollten nur einen Anhaltspunkt geben. Da jedoch Aufnahme- und Freigabe-Mechanismen bei Verwendung von LF beziehungsweise Polymeren als Vektor nicht zwingend übereinstimmen müssen, könnte zum Beispiel durch unterschiedlichen Abbau durch RNAsen bei Verwendung verschiedener Vektoren auch eine unterschiedliche Menge siRNA für einen Knock-Down notwendig sein.

Da hier nur qualitativ die Stabilität der Komplexe in Gegenwart von Serum untersucht wurde, sollte in jedem Fall noch die RNase-Stabilität der für die Transfektion zu verwendenden Komplexe nach verschiedenen Inkubationszeiten mit verschiedenen Mengen von Serum durch Vergleich mit rekombinanter RNase quantifiziert werden. Dieser Versuch sowie die Wiederholung der unter 3.7. beschriebenen Versuche sollte dann jedoch in einem PAA-Gel durchgeführt werden. Agarose-Gele weisen zu große Poren für die Trennung von Oligonukleotiden auf. Laut Amersham Biosciences [99] eignen sich Agarose-Gele erst für Sequenzen mit einer Länge von > 5.000.000 Basenpaaren.

Die Größenmessung der Komplexe hatte ans Licht gebracht, dass der 1x siRNA-Puffer kein geeignetes Lösungsmittel für die Komplexbildung darstellt. Zur Herstellung kleiner Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser von < 200 nm sollte ein isotonisches Lösungsmittel wie zum Beispiel HEPES-gepufferte Glucoselösung verwendet werden. Eine Pufferung sollte in jedem Fall vorgenommen werden, da ansonsten der pH-Wert der Lösung nach Zugabe der Polymerlösung zu stark schwanken könnte.

Ein weiterer Parameter, der zur physikochemischen Charakterisierung der Komplexe beitragen würde, ist das ζ -Potential, das bisher nicht bestimmt werden konnte. Dieses spielt eine große Rolle beim Vorkommen zytotoxischer Effekte durch Anlagerung und Zerstörung von Zellmembranen [29], ist aber auch zur Beantwortung von Fragen bei Problemen mit der Aufnahme der Komplexe in die Zellen wichtig. Kommt es aufgrund hoher ζ -Potentiale zu Agglomerationen der Komplexe, so muss von anderen Gegebenheiten ausgegangen werden als beim Vorliegen einzelner Komplexe.

Die physikochemische Charakterisierung der Komplexe sowie die Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittels für die Herstellung der Komplexe sollten vor weiteren Transfektionsversuchen in jedem Fall abgeschlossen sein.

Die Zytotoxizität und unspezifische Effekte der Komplexe wurden auch noch nicht ausreichend untersucht. Zur Bestimmung der Zytotoxizität bieten sich eine Reihe von Standard-Assays wie MTT- oder LDH-Assay an. Um unspezifische Effekte näher bestimmen zu können, muss von verschiedenen Seiten herangegangen werden. Zum einen muss der Effekt des reinen Vektors in einer „mock-Transfektion“ untersucht werden. Zum anderen müssen die Auswirkungen der unkomplexierten siRNA auf Targetsequenzen sowie auf Non-Targetsequenzen verglichen werden. Und letztlich wäre auch die Effizienz verschiedener siRNAs mit demselben Target zu vergleichen [87].

Zur Verbesserung der Knock-Down-Effizienz sind allerdings vor allem die beiden unter 1.2 genannten Probleme des Transfers in die Zelle sowie die Befreiung der Komplexe aus den Vesikeln in das Zielkompartiment und der notwendige Zerfall der Komplexe zur richtigen Zeit am richtigen Ort zu überwinden.

Um eine bessere Aufnahme der Komplexe zu erreichen, bieten sich die für pDNA bewährten Techniken des Targetings durch Kopplung an Antikörper [100, 101], an Folat [93, 102], an ein RGD-Peptid [92] oder andere Strukturen an, die spezifische Aufnahme in die Zelle bewirken. Weitere Möglichkeiten stellen die Kopplung an lipophile Reste an das 3'-Ende und die Synthese von Phosphorothioat-RNA-Strukturen [103, 104] dar.

Eine weitere Frage, die beantwortet werden muss, ist der Aufnahmemechanismus der siRNA-Polymer-Komplexe. Aufgrund ihrer geringen Größe wäre neben Clathrin-vermittelte Endocytose auch die Aufnahme über Caveolae möglich [105, 106], wobei ersteres zur Aufnahme in das Endosom, letzteres jedoch in das Endoplasmatische Retikulum führen würde. Selbst bei einer Aufnahme in das Endosom könnte ein Knock-Down ausbleiben, betrachtet man die Beobachtungen von Ogris et. al. [107]. Demnach ist für das Platzen des Endosoms eine gewisse Komplexgröße notwendig. Ob allein die Komplexgröße im Fall der siRNA-Komplexe nicht ausgereicht hatte, könnte durch Zusatz von Chloroquin ermittelt werden. Eine Aufnahme per Potozytose über Caveolae könnte dadurch untersucht werden, dass Zellen mit unterschiedlicher Caveolin-1-Expression mit fluoreszenzmarkierter siRNA transfiziert werden und die Transfektionseffizienz mittels Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) quantifiziert wird.

Nach weiterer Optimierung von *in vitro*-Modellen soll langfristig nicht mehr mit Reportergenen gearbeitet werden. Eine Reihe pathologisch überexprimierter Gene würde sich als Target in einem Tumormodell zum Knock-Down mittels RNAi anbieten. Ein gezieltes Tumortargeting kombiniert mit spezifischem Silencing würde den Weg für weitere *in vivo*-Versuche ebnen.

5 Literaturverzeichnis

1. Schmid, R.D., *Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering*. 2003, Weinheim: WILEY-VCH. WILEY-VCH.
2. Mulligan, R.C., *The basic science of gene therapy*. Science, 1993. **260**(5110): p. 926-32.
3. Verma, I.M., *Gene therapy*. Sci Am, 1990. **263**(5): p. 68-72, 81-4.
4. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
5. Van Tendeloo, V.F., C. Van Broeckhoven, and Z.N. Berneman, *Gene-based cancer vaccines: an ex vivo approach*. Leukemia, 2001. **15**(4): p. 545-58.
6. Fischer, D., *Nichtvirale Vektoren zur Gentherapie: Kationische Polymere als Vektorsysteme für den Transport von DNA*, in *Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie*. 1997, Philipps-Universität Marburg: Marburg.
7. Rolland, A.P. and R.J. Mumper, *Plasmid delivery to muscle: Recent advances in polymer delivery systems*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **30**(1-3): p. 151-172.
8. Hallek, M., et al., *[Basis of gene therapy: principles and state of development]*. Internist (Berl), 2001. **42**(10): p. 1306-8, 1311-3.
9. Miller, A.D., *Human gene therapy comes of age*. Nature, 1992. **357**(6378): p. 455-60.
10. Williams, D.A. and C. Baum, *Medicine. Gene therapy--new challenges ahead*. Science, 2003. **302**(5644): p. 400-1.
11. Wilson, J.M., *Gendicine: the first commercial gene therapy product*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(9): p. 1014-5.
12. Li, Z., et al., *Murine leukemia induced by retroviral gene marking*. Science, 2002. **296**(5567): p. 497.
13. Stolberg, S.G., *The biotech death of Jesse Gelsinger*. N Y Times Mag, 1999: p. 136-140, 149-150.
14. Check, E., *A tragic setback*. Nature, 2002. **420**(6912): p. 116-8.
15. Baum, C., et al., *Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2099-114.

16. Tang, X., et al., *Noncovalent protein--oligonucleotide interactions monitored by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Anal Chem*, 1995. **67**(24): p. 4542-8.
17. Banerjee, P., et al., *Novel hyperbranched dendron for gene transfer in vitro and in vivo*. *Bioconjug Chem*, 2004. **15**(5): p. 960-8.
18. Eliyahu, H., et al., *Novel dextran-spermine conjugates as transfecting agents: comparing water-soluble and micellar polymers*. *Gene Ther*, 2005. **12**(6): p. 494-503.
19. Kramer, M., et al., *Dendritic polyamines: simple access to new materials with defined treelike structures for application in nonviral gene delivery*. *Chembiochem*, 2004. **5**(8): p. 1081-7.
20. Zhao, Z., et al., *Polyphosphoesters in drug and gene delivery*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(4): p. 483-99.
21. Mansouri, S., et al., *Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004. **57**(1): p. 1-8.
22. Kumar, V.V., R.S. Singh, and A. Chaudhuri, *Cationic transfection lipids in gene therapy: successes, set-backs, challenges and promises*. *Curr Med Chem*, 2003. **10**(14): p. 1297-306.
23. Blessing, T., et al., *Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery*. *Bioconjug Chem*, 2001. **12**(4): p. 529-37.
24. Merdan, T., et al., *Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments*. *Pharm Res*, 2002. **19**(2): p. 140-6.
25. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
26. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, *Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(9): p. 5177-81.
27. Kircheis, R., L. Wightman, and E. Wagner, *Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **53**(3): p. 341-58.

28. Fischer, D., et al., *In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. *Biomaterials*, 2003. **24**(7): p. 1121-31.
29. Fischer, D., et al., *A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity*. *Pharm Res*, 1999. **16**(8): p. 1273-9.
30. Kunath, K., et al., *The structure of PEG-modified poly(ethylene imines) influences biodistribution and pharmacokinetics of their complexes with NF-kappaB decoy in mice*. *Pharm Res*, 2002. **19**(6): p. 810-7.
31. Gebhart, C.L. and A.V. Kabanov, *Evaluation of polyplexes as gene transfer agents*. *J Control Release*, 2001. **73**(2-3): p. 401-16.
32. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
33. Ratcliff, F.G., S.A. MacFarlane, and D.C. Baulcombe, *Gene silencing without DNA. rna-mediated cross-protection between viruses*. *Plant Cell*, 1999. **11**(7): p. 1207-16.
34. Ketting, R.F. and R.H. Plasterk, *A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans**. *Nature*, 2000. **404**(6775): p. 296-8.
35. Hannon, G.J., *RNA interference*. *Nature*, 2002. **418**(6894): p. 244-51.
36. Zamore, P.D., et al., *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. *Cell*, 2000. **101**(1): p. 25-33.
37. Hammond, S.M., et al., *Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1146-50.
38. Carmell, M.A., et al., *The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis*. *Genes Dev*, 2002. **16**(21): p. 2733-42.
39. Caplen, N.J., *Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference*. *Gene Ther*, 2004. **11**(16): p. 1241-8.
40. Tang, G., *siRNA and miRNA: an insight into RISCs*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(2): p. 106-14.
41. Nelson, P., et al., *The microRNA world: small is mighty*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(10): p. 534-40.
42. Agrawal, S. and E.R. Kandimalla, *Antisense and siRNA as agonists of Toll-like receptors*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(12): p. 1533-7.
43. Wang, Q. and G.G. Carmichael, *Effects of length and location on the cellular response to double-stranded RNA*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. **68**(3): p. 432-52.

44. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
45. Ui-Tei, K., et al., *Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. 936-48.
46. Dorsett, Y. and T. Tuschl, *siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(4): p. 318-29.
47. Tuschl, T. and A. Borkhardt, *Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy*. Mol Interv, 2002. **2**(3): p. 158-67.
48. Zhang, Z.Y., et al., *A novel cationic cardiolipin analogue for gene delivery*. Pharmazie, 2006. **61**(1): p. 10-4.
49. Brazas, R.M. and J.E. Hagstrom, *Delivery of small interfering RNA to mammalian cells in culture by using cationic lipid/polymer-based transfection reagents*. Methods Enzymol, 2005. **392**: p. 112-24.
50. Lewis, D.L., et al., *Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice*. Nat Genet, 2002. **32**(1): p. 107-8.
51. Javorovic, M., et al., *RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis*. Mol Ther, 2005. **12**(4): p. 734-43.
52. Chang, F.H., et al., *Surfection: a new platform for transfected cell arrays*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. e33.
53. Aoki, M., et al., *RNA interference in immune cells by use of osmotic delivery of siRNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(2): p. 326-33.
54. Behlke, M.A., *Progress towards in Vivo Use of siRNAs*. Mol Ther, 2006.
55. Bhoumik, A., et al., *An ATF2-derived peptide sensitizes melanomas to apoptosis and inhibits their growth and metastasis*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 643-50.
56. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference*. Cancer Cell, 2002. **2**(3): p. 243-7.
57. Cioca, D.P., Y. Aoki, and K. Kiyosawa, *RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines*. Cancer Gene Ther, 2003. **10**(2): p. 125-33.
58. Czauderna, F., et al., *Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(21): p. e127.

59. Denkert, C., et al., *Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference.* *Oncogene*, 2003. **22**(54): p. 8653-61.
60. Jiang, M. and J. Milner, *Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference.* *Oncogene*, 2002. **21**(39): p. 6041-8.
61. Wilda, M., et al., *Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi).* *Oncogene*, 2002. **21**(37): p. 5716-24.
62. Zhou, N., et al., *Inhibition of HIV-1 fusion with small interfering RNAs targeting the chemokine coreceptor CXCR4.* *Gene Ther*, 2004. **11**(23): p. 1703-12.
63. Zhang, W., et al., *Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene.* *Nat Med*, 2005. **11**(1): p. 56-62.
64. Ryther, R.C., et al., *siRNA therapeutics: big potential from small RNAs.* *Gene Ther*, 2005. **12**(1): p. 5-11.
65. Haupenthal, J., et al., *Inhibition of RNase A family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNAs in serum.* *Biochem Pharmacol*, 2006. **71**(5): p. 702-10.
66. Sano, M., et al., *Novel methods for expressing RNA interference in human cells.* *Methods Enzymol*, 2005. **392**: p. 97-112.
67. Kobayashi, N., et al., *Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression.* *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. **308**(2): p. 688-93.
68. Dheda, K., et al., *Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR.* *Biotechniques*, 2004. **37**(1): p. 112-4, 116, 118-9.
69. Kirsch, P., et al., *Time course of fluorescence intensity and protein expression in HeLa cells stably transfected with hrGFP.* *Mol Cells*, 2003. **15**(3): p. 341-8.
70. Spagnou, S., A.D. Miller, and M. Keller, *Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA.* *Biochemistry*, 2004. **43**(42): p. 13348-56.
71. Brus, C., et al., *Physicochemical and biological characterization of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers as a delivery system for oligonucleotides and ribozymes.* *Bioconjug Chem*, 2004. **15**(4): p. 677-84.
72. Urban-Klein, B., et al., *RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo.* *Gene Ther*, 2004.

73. Leclerc, G.M., et al., *Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression*. Biotechniques, 2000. **29**(3): p. 590-1, 594-6, 598 passim.
74. Thompson, J.F., L.S. Hayes, and D.B. Lloyd, *Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation*. Gene, 1991. **103**(2): p. 171-7.
75. Lemkine, G.F. and B.A. Demeneix, *Polyethylenimines for in vivo gene delivery*. Curr Opin Mol Ther, 2001. **3**(2): p. 178-82.
76. Petersen, H., et al., *Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system*. Bioconjug Chem, 2002. **13**(4): p. 845-54.
77. Lewis, D.L., *Compositions and processes using siRNA, amphipathic compounds and polycations*. 2004: USA.
78. Morcos, P.A., *Achieving efficient delivery of morpholino oligos in cultured cells*. Genesis, 2001. **30**(3): p. 94-102.
79. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
80. Hill, H.D. and J.G. Straka, *Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents*. Anal Biochem, 1988. **170**(1): p. 203-8.
81. von Harpe, A., et al., *Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery*. J Control Release, 2000. **69**(2): p. 309-22.
82. Muller, B.W. and R.H. Muller, *Particle size analysis of latex suspensions and microemulsions by photon correlation spectroscopy*. J Pharm Sci, 1984. **73**(7): p. 915-8.
83. Netzer, C., et al., *SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, encodes a transcriptional repressor which interacts with TRF1/PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(26): p. 3017-24.
84. van Beusechem, V.W., et al., *Efficient and selective gene transfer into primary human brain tumors by using single-chain antibody-targeted adenoviral vectors with native tropism abolished*. J Virol, 2002. **76**(6): p. 2753-62.
85. Zhao, J., et al., *Secreted antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing of HER2-overexpressing tumor cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21343-8.
86. Heidel, J.D., et al., *Lack of interferon response in animals to naked siRNAs*. Nat Biotechnol, 2004.

87. Semizarov, D., et al., *Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6347-52.
88. Corporation, I., *Transfecting Stealth. RNA or siRNA into Mammalian Cells Using Lipofectamine*. 2000. 2004.
89. Erbacher, P., et al., *Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI)*. J Gene Med, 1999. **1**(3): p. 210-22.
90. Mellman, I., *Endocytosis and molecular sorting*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 575-625.
91. Matsui, K., et al., *RNAi silencing of exogenous and endogenous reporter genes using a macrocyclic octaamine as a "compact" siRNA carrier. Studies on the nonsilenced residual activity*. Bioconjug Chem, 2006. **17**(1): p. 132-8.
92. Schiffelers, R.M., et al., *Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(19): p. e149.
93. Kim, S.H., et al., *Comparative Evaluation of Target-Specific GFP Gene Silencing Efficiencies for Antisense ODN, Synthetic siRNA, and siRNA Plasmid Complexed with PEI-PEG-FOL Conjugate*. Bioconjug Chem, 2006. **17**(1): p. 241-244.
94. Hassani, Z., et al., *Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels*. J Gene Med, 2004.
95. Hagstrom, J.E., *Short interfering RNA (siRNA) Transfection Reagent allows for efficient target gene knock out. (Tools & Techniques)*, in *Bioscience Technology*. 2002.
96. Paddison, P.J., A.A. Caudy, and G.J. Hannon, *Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1443-8.
97. Mollinari, C., et al., *PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone* [10.1083/jcb.200111052](https://doi.org/10.1083/jcb.200111052). J. Cell Biol., 2002. **157**(7): p. 1175-1186.
98. McLaggan, D., et al., *Pore forming polyalkylpyridinium salts from marine sponges versus synthetic lipofection systems: distinct tools for intracellular delivery of cDNA and siRNA*. BMC Biotechnol, 2006. **6**(1): p. 6.
99. Biosciences, A., *Protein Electrophoresis*, in *Handbook*. 1999. p. 5.

100. Vornlocher, H.P., *Antibody-directed cell-type-specific delivery of siRNA*. Trends Mol Med, 2006. **12**(1): p. 1-3.
101. Song, E., et al., *Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(6): p. 709-17.
102. Hwa Kim, S., et al., *Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with folate-modified poly(ethylenimine)*. J Control Release, 2005. **104**(1): p. 223-32.
103. de Fougères, A., et al., *RNA interference in vivo: toward synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics*. Methods Enzymol, 2005. **392**: p. 278-96.
104. Ravikumar, V.T., et al., *Development of siRNA for therapeutics: Efficient synthesis of phosphorothioate RNA utilizing phenylacetyl disulfide (PADS)*. Bioorg Med Chem Lett, 2006.
105. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 1): p. 159-69.
106. Le Roy, C. and J.L. Wrana, *Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(2): p. 112-26.
107. Ogris, M., et al., *The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells*. Gene Ther, 1998. **5**(10): p. 1425-33.

6 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr. Kissel für die interessante Aufgabenstellung und die stets kreativen und anregenden Diskussionen herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Mäder danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein außerordentlicher Dank gilt Oliver Germershaus für die hervorragende Einarbeitung in viele Methoden, die Unterstützung bei allen Problemen und Schwierigkeiten und für die vielen interessanten und fruchtbaren Diskussionen.

Ganz besonders möchte ich auch Eva Mohr und Nicole Bamberger für die Einarbeitung in die Zellkultur und die wertvolle Unterstützung bei den Zellkulturexperimenten danken.

Hilfreich zur Seite standen mir ebenfalls Elke Kleemann, Jutta Fuchs, Juliane Nguyen, Claudia Packhäuser, euch allen herzlichen Dank!

Allen Kollegen im Arbeitskreis Kissel möchte ich für die freundliche Aufnahme und die schöne Zeit danken.

7 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Olivia Monika Merkel, Gutenbergstraße 5, 35037 Marburg, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Wörtliche und sinngemäße Zitate wurden durch entsprechende Quellenangaben kenntlich gemacht.

Marburg, im Juni 2006