

**Generierung und funktionelle Anwendung einer
randomisierten *sh*- und *si-RNA* Bibliothek**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Daniel Schäfer
geb. am 04.04.1979, in Montevideo (Uruguay)

2009

Referent: Prof. Dr. Walter Müller
Korreferent: Prof. Dr. Hans Jörg Jacobsen
Tag der Promotion: 02. März 2009

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Methoden zur Generierung lentiviraler si/shRNA Bibliotheken beschrieben. Durch die Inhibition der Expression jedes beliebigen Gens durch den RNA-Interferenz-Mechanismus kann die Bibliothek vielseitige Anwendung finden.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Bibliothek zu generieren, die in der Lage ist, die Funktionen von Genen für biologische Phänotypen zu identifizieren.

Es wurde von einer Methode ausgegangen, die anhand von enzymatischen Verdauen zellulärer cDNA lentivirale si/shRNA exprimierende Konstrukte generiert. Dieses Verfahren wurde durch randomisierte, synthetische DNA optimiert, mit dem Ziel einer vereinfachten und kostengünstigeren Herstellung.

Der funktionelle Nachweis der verschiedenen hergestellten Bibliotheken, erfolgte anhand einer bekannten si/shRNA Sequenz, die gegen die mRNA des Grün-Fluoreszierenden-Proteins (GFP) gerichtet ist. Nach der Klonierung in lentivirale Expressionsplasmide wurden virale Überstände zur stabilen Transduktion von Zielzellen hergestellt. Mittels durchflusszytometrischer Methoden (FACS-Analysen) und Western-Blot Analyse konnte die effektive Reduktion des Zielgens GFP nachgewiesen werden.

Um eine bibliotheksbedingte Interferonantwort auszuschließen, wurden transduzierte Zellen auf die verstärkte Expression von 2'-5' Oligo-Adenylat-Synthetase (OAS) hin untersucht. Dieses Protein spielt in der Signalkaskade der Interferonantwort eine Schlüsselrolle und kann somit als Marker verwendet werden.

Da es zu keiner Aktivierung der 2'-5' OAS kommt, sind bei funktionellen Analysen keine störenden Effekte durch eine bibliotheksbedingte Interferonantwort zu erwarten.

Die Komplexität der generierten si/shRNA Bibliothek muss noch erhöht werden, um sie zu einem relevanten Werkzeug für funktionelle Genanalysen werden zu lassen.

Schlagworte:

small interfering RNAs, randomisierte si/shRNA-Bibliotheken, Genexpressionshemmung

Abstract

This work describes different ways to generate lentiviral si/shRNA libraries. These libraries should be able to silence every gene in eukaryotic organisms through RNA interference. The aim was to identify genes that produce a particular biological phenotype.

Initially a library of lentiviral si/shRNA constructs was produced by enzymatic digestion of cDNA.

The library production was improved by using randomized synthetic DNA, which is less time and cost intensive. These methods were optimized step by step.

The randomized sequence was replaced by a specific si/shRNA against the mRNA of the green fluorescent protein (GFP) to test functionality of the library construct. This construct was cloned into a lentiviral expression plasmid, viral supernatant was generated and used to stably transduce cells. FACS and Western-Blot analyses were used to quantify the reduction of target gene (GFP) expression.

The library was also screened for enhanced expression of the 2'-5' oligo-adenylate-synthetase (OAS). Since no enhanced expression of OAS was observed, the library is not expected to induce undesired effects such as interferon response.

The complexity of the generated library must be further increased in order to make the library a more useful tool for functional gene analysis.

Keywords:

small interfering RNAs, randomized si/shRNA-library, gene silencing

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 EINLEITUNG 13

1.1 RNA Interferenz 13

1.1.1 Entdeckung der RNA-Interferenz..... 14

1.1.2 Auslöser der RNAi 15

1.1.2.1 Lange dsRNA 15

1.1.2.2 siRNAs 16

1.1.2.3 miRNAs 16

1.1.3 Zusammensetzung des *silencing* Komplexes und Mechanismus der RNAi 18

1.1.3.1 bei siRNAs..... 18

1.1.3.2 bei miRNAs..... 20

1.2 si / sh RNA Bibliotheken 20

1.2.1 Chemisch und enzymatisch hergestellte siRNAs 22

1.2.2 RNAi expressions Systeme..... 23

1.3 Lentivirale Vektoren 27

1.3.1 Charakterisierung 27

1.3.2 Gentransfer durch lentivirale Vektoren 27

1.4 IL-3 abhängige Signalkaskaden 29

2 MATERIAL UND METHODEN..... 30

2.1 Verwendete Materialien 30

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien 30

2.1.2 Molekulargewichtsstandards 31

2.1.3 Kits 31

2.1.4 Verwendete Enzyme 32

2.1.5 Sonstige Materialien und Geräte 34

2.1.6 Nährmedien für Bakterien 35

2.1.7 Oligonukleotide 36

2.1.8 TaqMan-Sonden (Applied Biosystems) 37

2.1.9 Primer für TaqMan-Sonden 37

2.1.10 Sequenzierprimer 37

2.1.11 Plasmid-Vektoren 38

2.1.12	Antikörper	38
2.1.13	Bakterienstämme	38
2.1.14	Zelllinien	39
2.1.15	Software	40
2.2	Angewandte Methoden.....	45
2.2.1	Erste Methode.....	45
2.2.1.1	Synthese des komplementären DNA-Stranges mittels 1 Schritt „PCR“.....	45
2.2.1.2	Aufreinigung der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA.....	45
2.2.1.3	Verdau mit dem Restriktionsenzym <i>BamHI</i>	45
2.2.1.4	Isolierung des 49 bp großen Produkts durch ein PAA-Gel.....	45
2.2.1.5	Ligation der randomisierten Sequenz mit dem 3' Loop.....	46
2.2.1.6	Verdau mit <i>MmeI</i> und anschließender PAA-Gelaufreinigung.....	46
2.2.1.7	Ligation des 41 bp großen Produktes mit dem 5' Loop.....	46
2.2.1.8	RCA.....	46
2.2.1.9	Verdau des Konatamers mit den Restriktionsenzymen <i>PacI</i> und <i>DraI</i>	46
2.2.1.10	Ligation in den Vektor und Transformation.....	46
2.2.1.11	Modifikation des Inserts und umklonierung in lentiviralen Vektor.....	47
2.2.2	Zweite Methode.....	47
2.2.2.1	Synthese des komplementären DNA-Stranges.....	47
2.2.2.2	Aufreinigung der doppelsträngigen DNA.....	47
2.2.2.3	Verdau mit 2 Restriktionsenzymen.....	47
2.2.2.4	Isolierung des 35 bp großen Produkts durch ein PAA-Gel.....	48
2.2.2.5	Klonierung in den lentiviralen Vektor.....	48
2.2.3	Dritte Methode.....	48
2.2.3.1	Hybridisierung und Klenow mit anschließender Hitzeinaktivierung	48
2.2.3.2	Verdau mit zwei Restriktionsenzymen und anschließender Gelelektrophorese.....	48
2.2.3.3	Ligation an den Loop und isolierung des Ligationsproduktes.....	49
2.2.3.4	RCA.....	49
2.2.3.5	Verdau des DNA-Konkatemers mit <i>PacI</i> und Aufreinigung des Produkts.....	49
2.2.3.6	Ligation in Vektor und Transformation in Bakterien.....	49
2.2.3.7	Modifikation des Inserts und Umklonierung in lentiviralen Vektor.....	49

2.2.4	Vierte Methode.....	50
2.2.4.1	Hybridisierung.....	50
2.2.4.2	Klenow und Hitzeinaktivierung.....	50
2.2.4.3	Verdau und anschließender Dephosphorylierung.....	50
2.2.4.4	Aufreinigung und Ligation mit dem H1 Promotor.....	50
2.2.4.5	Ein Schritt PCR mit anschließender Isolierung des Produkts.....	50
2.2.4.6	Restriktionsverdau und Kinasierung.....	51
2.2.4.7	Ligation in Vektor und Transformation in Bakterien.....	51
2.2.4.8	Modifikation des Inserts und Umklonierung in lentiviralen Vektor.....	52
2.3	Allgemeine Methoden.....	52
2.3.1	Klonierung.....	52
2.3.2	Agarosegelelektrophorese.....	53
2.3.3	Gelextraktion mit anschließender Ethanol-fällung.....	54
2.3.4	Ligationen.....	54
2.3.5	Transformation (chemisch).....	55
2.3.6	Transformation (elektrisch).....	55
2.3.7	Minipräparation von DNA.....	55
2.3.8	Sequenzier-PCR.....	56
2.3.9	Maxipräparation von DNA.....	57
2.3.10	Photometrische Messung der DNA-Konzentration.....	57
2.3.11	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	58
2.3.12	Transfektion mit Lipofectamine 2000.....	59
2.3.13	Kryokonservierung von Zellen.....	60
2.3.14	Calcium-Phosphat-Transfektion.....	60
2.3.15	Konzentrierung des Virusüberstandes.....	61
2.3.16	Titerbestimmung.....	62
2.3.17	Transduktion.....	62
2.3.18	RNA-Isolierung.....	62
2.3.19	DNaseI Verdau.....	63
2.3.20	cDNA Synthese.....	64
2.3.21	Realtime Quantitative PCR.....	64
2.3.22	Proteinisolierung von Ganzzelllysaten.....	66

2.3.23	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	66
2.3.24	Auftrennung der Proteine durch SDS PAGE.....	67
2.3.25	Western Blot.....	68
3	Ergebnisse.....	70
3.1	Generierung einer antiEGFP Bibliothek nach der <i>restriction enzyme generated siRNA</i> (REGS) Methode.....	70
3.1.1	Isolierung und Verdau der DNA die für das EGFP Gen codiert.....	70
3.1.2	<i>Restriction enzyme generated siRNA</i> (REGS) Methode.....	71
3.1.3	Empfängervektoren für das hergestellte Konstrukt.....	75
3.1.3.1	Überprüfung der Funktionalität des Promotors.....	77
3.1.3.2	Vergleich des BamHI Loops mit dem wt-Loop.....	77
3.1.4	Letzte Schritte zum funktionellen lentiviralen shRNA Expressionsplasmid...	79
3.1.5	Sequenzierung und Evaluation der erhaltenen shRNAs.....	81
3.1.6	Verwendung einer randomisierten Sequenz.....	82
3.1.6.1	Sequenzüberprüfung und Verteilung der randomisierten Bibliothek.....	83
3.1.6.2	Funktionelle Evaluation auf Proteinebene.....	86
3.1.6.3	Komplexität und Ausbeute.....	87
3.2	Generierung einer Bibliothek durch die Gegenüberstellung zweier Pol III Promotoren	
3.2.1	Adaptation der Promotoren.....	88
3.2.1.1	Überprüfung der Funktionalität der mutierten Promotoren.....	90
3.2.1.2	Vergleich von H1 und U6.....	89
3.2.2	Synthese der Bibliothek.....	91
3.2.3	Sequenzierungsergebnisse der randomisierten Bibliothek.....	93
3.2.4	Funktionelle Evaluation anhand einer siRNA gegen EGFP.....	93
3.2.4.1	Sequenzierung.....	94
3.2.4.2	Lipofektion.....	94
3.2.4.3	Virusgenerierung und Transfektion von BaF 4h gfp.....	95
3.2.4.4	Überprüfung unseres Vektors anhand des veröffentlichten Vektors pDUAL.....	96
3.3	Generierung einer Bibliothek mittels RollingCircleAmplification (RCA).....	97
3.3.1	Methode mit randomisierten Sequenzen.....	97

3.3.2	Evaluierung der Methode mit einer antiGFP-shRNA Sequenz.....	100
3.3.2.1	Sequenzierung.....	102
3.3.2.2	Funktionalitätsüberprüfung mittels transienter Transfektion.....	103
3.3.2.3	Generierung von Virusüberständen und Transduktion von BaF 4h gfp Zielzellen.....	103
3.3.2.4	Western Blot.....	107
3.3.3	Sequenzierung und Verteilung der Nukleotide bei der randomisierten Bibliothek.....	107
3.3.4	Ausbeute: Klone / μg DNA.....	109
3.3.5	Generierung von Virusüberständen. Bilden Rekombinierer Virusüberst.?.....	109
3.3.6	Interferon Antwort.....	111
3.4	Generierung einer randomisierten Bibliothek ohne Verwendung von RCA.....	112
3.4.1	Vorversuch.....	112
3.4.2	Linkeradaptation.....	114
3.4.3	Testung der Methode anhand einer bekannten Sequenz.....	115
3.4.3.1	Vergleich verschiedener Polymerasen bei verschiedener Synthesetemperaturen.....	120
3.4.3.2	Funktionalitätsüberprüfung von EGFP.....	121
3.4.3.3	Sequenzüberprüfung.....	121
3.4.3.4	Transiente Transfektion.....	122
3.4.3.5	Stabile Transduktion.....	122
3.4.3.6	Nachweis der Reduktion auf Proteinebene.....	124
3.4.4	Generierung der Bibliothek.....	125
3.4.4.1	Sequenzierung /Verteilung.....	127
3.4.4.2	Klone / μg DNA (Ausbeute).....	128
3.5	Anwendung der Bibliothek.....	129
3.5.1	Voruntersuchungen der Zelllinie 32D.....	129
3.5.1.1	Faktorabhängigkeit der 32D-Zelllinie.....	129
3.5.1.2	Beeinflussung der Faktorabhängigkeit durch 2 lentiviralen Kontrollkonstrukte.....	130
3.5.2	Funktioneller Assay der Bibliothek.....	131

4	Diskussion.....	132
4.1	Statistische Einwände.....	132
4.2	Synthetische Bibliotheken vs. cDNA- Bibliotheken.....	135
4.3	Nachteile einer siRNA-Bibliothek.....	135
4.4	Vorteile und Nachteile der vier dargestellten Methoden.....	136
4.4.1	Die erste Methode.....	136
4.4.2	Die zweite Methode.....	137
4.4.3	Die dritte Methode.....	137
4.4.4	Die vierte Methode.....	138
4.5	Vergleich mit si/shRNA-Bibliotheken aus der Literatur.....	140
4.6	Anwendung der Bibliothek.....	140
5	Ausblick.....	141
6	Literatur.....	144
7	Anhang.....	153

Abkürzungsverzeichnis

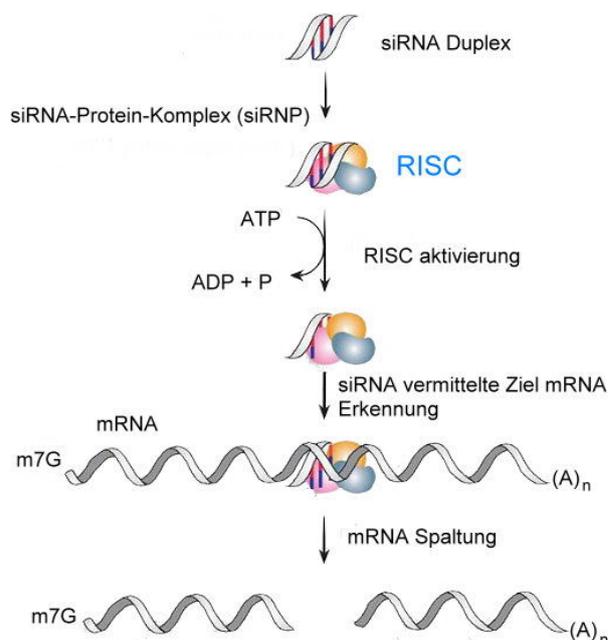
Ago2	Argonaute 2
Amp	Ampicillin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Bovine alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	(bovine serum albumine) Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
<i>C.elegans</i>	Chaenorapditis elegans
cDNA	komplementäre DNA
cfu	Kolonie bildende Einheit
CHS	Chalcon Synthetase
CO₂	Kohlendioxid
Ctrl	Kontrolle
Der	Dicer
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleotidsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen diamine tetrasodium acetat
EGFP	Enhanced green fluorescence protein
esiRNA	endoribonuclease-prepared siRNA
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales bovine serum
FCS	Fetal calf serum
G-CSF	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3 phosphat-Dehydrogenas
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HTS	high-throughput screens
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IRES	Internal ribosome entry side
ISG	Interferon stimulierten Gene
ITD	Internal tandem duplication
JAK	Januskinase
kb	Kilobase
LB	Lysogeny Broth
LTR	Long terminal repeat
Min	Minute
miRNA	Micro-RNA
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Messenger-RNA
nt	Nukleotid
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte

P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PKR	Proteinkinase R
PNK	Polynukleotidkinase
Pol	Polymerase
Pre-miRNA	Prekursoren miRNA
Pri-miRNA	Primäre miRNA
PTGS	Post transkriptional gene silencing
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
RIGS	Repeat induced gene silencing
RISC	RNA induced silencing complex
RLC	RISC loading complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interference
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonucleoprotein particles
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRE	Rev-response element
RT	Raumtemperatur
SCF	Stem cell factor
Sec	Sekunde
SFFV	Spleen focus-forming virus
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
S.O.C	Super optimal broth with glucose
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tat	Transkriptionstransaktivator
Tm	Schmelztemperatur
TRBP	transactivating response RNA-binding protein
U	Unit
UpM	Umdrehung pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VSV-G	Vesikuläre-Stomatitis-Virus-Glykoprotein
WEHI	WEHI conditioned medium
WPRE	Wood chuck hepatitis post-transcriptional response eleme

1. Einleitung

1.1 RNA *interference*

RNA Interferenz (RNAi) beschreibt ein in Eukaryoten hochkonservierten Mechanismus der sequenzspezifischen posttranskriptionellen Inhibition der Genexpression. Durch RNAi wird nicht nur die zelleigene Genexpression reguliert, sondern der Mechanismus schützt die Zelle auch vor Viren und Transposons und hilft bei der Beseitigung nicht funktioneller mRNA (Tijsterman et al. 2002). Aktiviert wird der Mechanismus durch unterschiedlich lange doppelsträngige RNA-Moleküle, Einzelstrang-RNAs, die intramolekular Haarnadelstrukturen ausbilden oder endogen exprimierte „micro“ RNAs (miRNAs). DsRNAs oder shRNAs werden intrazellulär durch Dicer, eine dsRNA spezifische Ribonuclease Typ III in sogenannte „small interfering“ (siRNAs) prozessiert, die in der Regel zwei Nukleotid lange 3' Hydroxyl-Überhänge besitzen, ca. 21-23 Nukleotide lang und 5' phosphoryliert sind. Die Prozessierung durch Dicer findet ausschließlich im Cytoplasma statt (Zeng und Cullen 2002). Die dsRNAs,



die von Dicer zu siRNAs gespalten wurden, werden von einem aus mehreren Proteinen zusammengesetzten RNA-*induced silencing complex* (RISC) eingebunden. Es ist notwendig, dass die siRNA phosphorylierte 5' Enden besitzt, um in den RISC Komplex aufgenommen zu werden. Die siRNAs, denen das Phosphat fehlt, werden rasch durch eine endogene Kinase phosphoryliert (Schwarz et al. 2002). Die doppelsträngige siRNA wird durch einen ATP verbrauchenden Mechanismus zu einzelsträngiger RNA

entwunden, wobei der Strang der am 5'-Ende die geringere thermodynamische Affinität zum Gegenstrang hat am Komplex gebunden bleibt, und den gesamten RISC-Komplex zur homologen Ziel-mRNA führt (Khvorova et al. 2003 und Schwarz et al. 2003). Diese wird an einer Stelle, in der Mitte des Duplexbereichs, 10 Nukleotide vom 5' Ende der siRNA entfernt, gespalten (Elbashir et al. 2001). Gespaltene mRNA werden rasch von Nukleasen abgebaut. Die Proteinsynthese kann dadurch nicht mehr stattfinden, was zu einer verminderten bis hin zur nahezu totalen Abwesenheit des betreffenden Proteins in den Zielzellen führen kann.

1.1.1 Entdeckung der RNA-Interferenz

Um 1990 wollte man in Petunien eine Überexpression der Chalcon Synthetase (CHS) erzielen, um die Farbintensität der Blütenblätter zu erhöhen.

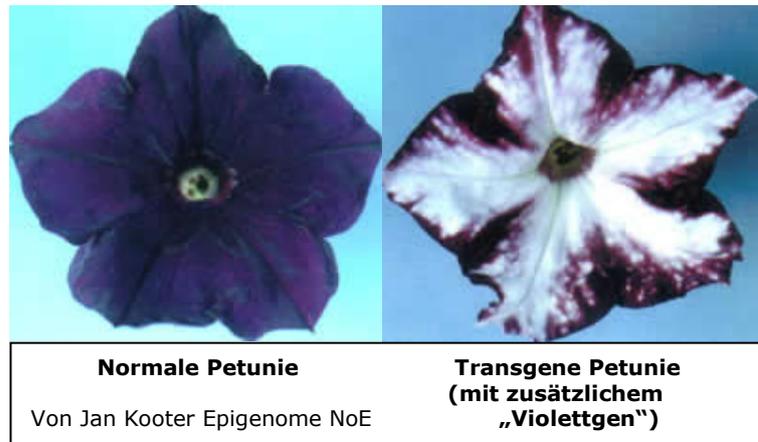
Dazu wurde das chimere CHS-Gen zusätzlich in die Blütenblätter eingefügt. Das Gegenteil wurde erreicht. Es

kam zu einer so genannten „*coordinate suppression*“, die

nicht nur die Expression des eingefügten Gens, sondern auch die des endogenen Gens herabsetzte. Das hatte zur Folge, dass viele der normalerweise dunkelvioletten Blüten auf einmal verstärkt entfärbte Regionen bis hin zu komplett weißen Blütenblättern zeigten (Napoli et al. 1990). Diese sogenannte Co-Suppression wurde anhand eines anderen Gens, der Dihydroflavonol-4-reductase (DFR), von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt. Sie kamen zu dem Schluss, dass es sich hierbei um ein bislang unbekanntes Phänomen handelt, in dem die Interferenz von RNA Strängen eine Rolle spielen kann (van der Krol et al. 1990). In späteren Arbeiten wurde vermehrt das „repeat induced gene silencing“ (RIGS) der Methylierung der DNA zugeschrieben oder aber der Konfigurationsänderung des Chromatins (Assaad et al. 1993 ; Ye and Signer 1996).

In der Pflanzenwelt konnte man bei der *Neurospora crassa* eine ähnliche Entdeckung verzeichnen (Pandit and Russo 1992), wobei dieses Phänomen als „quelling“ bezeichnet wurde (Romano and Macino 1992). In einer späteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das „transgene silencing“ in *Neurospora crassa* weder von einer DNA-DNA Interaktion noch von einer DNA-Methylierung verursacht wird. Vielmehr wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem RNA mit DNA oder RNA mit RNA interagiert (Cogni et al. 1996).

Schon 1988 wurde, um eine gezielte Reduktion der Genexpression zu erreichen, antisense RNA in die Zelle injiziert (Bevilacqua et al. 1988). Jedoch erst zehn Jahre später gelang der Durchbruch durch die Arbeit von Andrew Fire und Craig Mello. Sie konnten an Nematoden *Caenorabditis elegans* zeigen, dass die Einführung von doppelsträngiger RNA in die Zielzelle sehr viel effizienter zu einer Inhibition der Genexpression führt als der anti-sense Strang alleine (Fire et al. 1998). Für diese Entdeckung und anschließenden Untersuchungen wurde ihnen 2006 der Nobelpreis in Medizin zuerkannt.



1.1.2 Auslöser der RNAi

1.1.2.1 Lange dsRNA

In den ersten Experimenten wurden mittels PCR aus cDNA lange RNA-Stränge hergestellt (ca. 200 – 1000 bp). Anschließend wurde die cDNA durch DNase-Verdau entfernt und die aufgereinigten und neu zu Doppelsträngen hybridisierten RNAs mittels Mikroinjektion in die Zielzelle injiziert. Auf diese Weise wurde eine Reduktion der entsprechenden mRNA erreicht, was zur Folge hatte, dass auch das von dieser mRNA kodierte Protein weniger exprimiert wurde, was zu charakteristischen Phänotypen führte (Montgomery et al. 1998). Man generierte auch dsRNA gegen die Sequenzen von Promotoren und Introns. Da dies jedoch keinen Effekt zeigte, wurde RNAi als ein posttranskriptioneller und im Cytoplasma stattfindender Prozess erkannt (Montgomery et al. 1998). Noch im selben Jahr konnte durch die Transfektion eines Plasmidvektors in Trypanosomazellen auch die effektive Reduktion eines Genes durch die Expression von dsRNA *in vivo* gezeigt werden (Ngo et al. 1998). Der mRNA Abbau durch lange dsRNA Fragmente wurde in einem zellfreien System wiederholt, wobei das Lysate von Fruchtfliegenembryos verwendet wurde (Tuschl et al. 1999). Neben den schon genannten Organismen wie Nematoden (Fire et al. 1998 ; Montgomery et al. 1998), und Trypanosomas (Ngo et al. 1998) wurden nun in vielen anderen Organismen das Phänomen der RNAi entdeckt: z.B. in Fruchtfliegen (Kennerdell and Carthew 1998; Misquitta and Paterson 1999), Planarien (Sánchez-Alvarado and Newmark 1999), Hydren (Lohmann et al. 1999), Zebrafischen (Wargelius et al. 1999), Mäusen (Bahramian and Zarbl 1999) und in Pflanzen (Waterhouse et al. 1998). (Patkaniowska 2005)

Eine weitere interessante Entdeckung war, dass selbst kleinste Mengen an dsRNA effektiv die Expression von Genen hemmen kann. Die Arbeitsgruppe von Fire konnte 1998 zeigen, dass etwa zwei dsRNA-Moleküle pro Zelle ausreichend sind, um sehr viele *unc-22RNAs* zu zerstören, woraus sie den Schluss gezogen haben, dass eine Amplifikation möglich wäre. Im Jahr 2001 konnten sie dieses Phänomen in *Caenorhabditis elegans* nachweisen (Sijen et al. 2001). Der Mechanismus der Bildung dieser sekundären siRNAs wird als „Transitive RNAi“ bezeichnet. Dies kommt zustande, wenn denaturierte siRNAs an komplementäre Sequenzen binden und eine *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRP) eine neue doppelsträngige RNA herstellt, die wiederum den RNAi-Mechanismus aktiviert. Die transitive RNAi kann sogar zwischen den Zellen übertragen werden (Alder et al. 2003). Allerdings konnte sie bislang nur in wenigen Organismen nachgewiesen werden.

Ein großer Nachteil der Anwendung der RNAi in Säugerzellen durch lange dsRNAs ist die Aktivierung der Proteinkinase PKR und der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (2',5'-OAS). Beide Proteine triggern die Interferonantwort der Zelle (Stark et al. 1998). Die Expression des Interferons (INF) aktiviert die Transkription von hunderten von IFN-stimulierten Genen (ISGs) durch die JAK-STAT Signalkaskade (Sledz et al. 2003). Viele der ISGs kodieren für Proteine mit antiviralen Eigenschaften, wie zum Beispiel dem Resistenzprotein gegen das Myxovirus (Influenza Virus) (Goodbourn et al. 2000; Haller et al. 2006). Die Interferonantwort spielt eine wichtige Rolle bei der antiviralen Abwehr bei Vertebraten.

1.1.2.2 siRNAs

Hamilton konnte 1999 eine Akkumulierung von RNA-Moleküle mit einer Länge von etwa 25 nt feststellen. Diese waren ausreichend lang um den „posttranscriptional gene silencing“ (PTGS) Mechanismus zu aktivieren (Hamilton and Boulcombe 1999). Interessanterweise aktivierten sie nicht die unspezifische Interferonantwort, weil sie zu kurz für die Bindung und anschließenden Aktivierung der PKR waren (Elbashir et al. 2002). Ein Jahr später konnte gezeigt werden, dass transfizierte Zellextrakte von *Drosophila* spezifische Nucleaseaktivität besitzen und exogene RNA-Moleküle, die homolog zu der transduzierten Sequenz sind, spalten (Hammond et al. 2000). Die kurzen RNA-Fragmente mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden sind Spaltprodukte von langen dsRNA (Zamore et al. 2000). Diese ATP verbrauchende Spaltung der doppelsträngigen RNA benötigt nicht die Ziel mRNA und wird durch eine RNase III durchgeführt (Bass 2000). Diese hinterlässt siRNAs mit einem 2 Nukleotid 3' Überhang mit einem 5' Phosphat- und 3' Hydroxyl- Ende (Elbashir et al. 2001). Die siRNA wurde sehr schnell zu einer wichtigen Methode wegen der von ihr ausgelösten signifikanten Reduktion der Proteinexpression (Dorsett and Tuschl 2004). Schon kurz nach ihrer Entdeckung wurde sie in Zellkulturen verschiedenster Herkunft angewendet (Caplen et al. 2001; Elbashir et al. 2001) und seit dem ist sie nicht mehr aus der modernen Forschung wegzudenken. (Patkaniowska 2005)

1.1.2.3 miRNAs

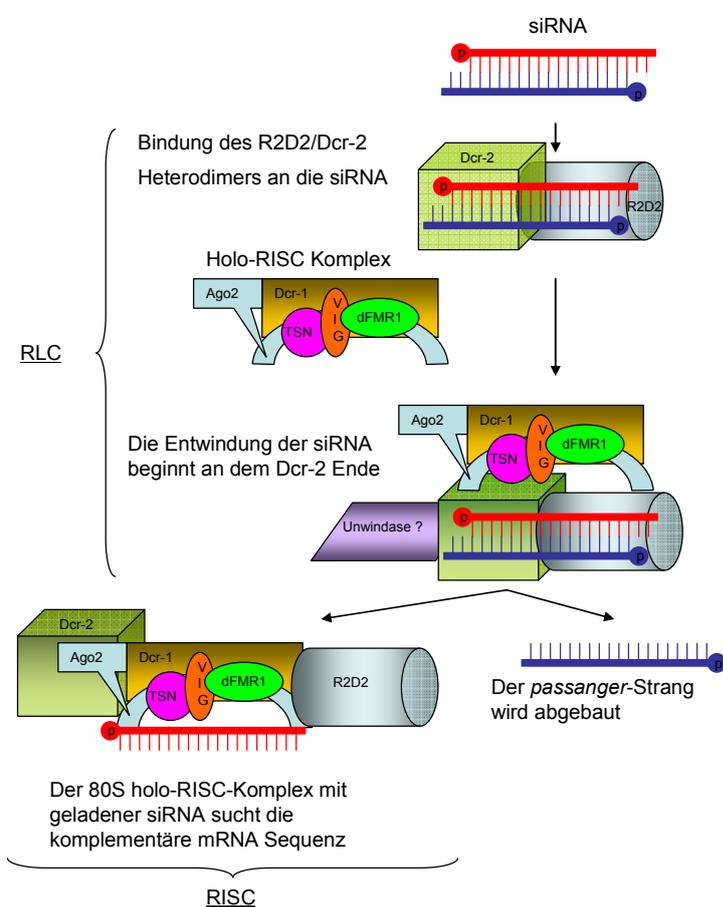
Eine weitere Gruppe regulatorischer RNAs sind die microRNAs (miRNAs), die als endogen exprimierte Auslöser von RNAi agieren. Schon 1993 wurde eine der ersten miRNAs, *lin-4*, in *C. elegans* von der Arbeitsgruppe von Ambros beschrieben. *Lin-4* kodiert nicht für ein Protein, sondern besitzt regulatorische Funktionen. Es wurde angenommen, dass diese Regulation durch eine antisense RNA-RNA Interaktion vonstatten geht (Lee et al. 1993).

Diese findet auch tatsächlich statt, wie später herausgefunden wurde. Lin4 bindet zum Beispiel unvollständig an sieben Regionen der 3' *untranslated regions* (UTRs) der lin-14 mRNA, wodurch es zu einer Expressionshemmung des lin-14 kommt. Etwa ein Drittel der miRNAs in *C.elegans* werden während der Entwicklungsphase exprimiert. miRNAs sind aber nicht nur bei der Entwicklung wichtig, sondern sie spielen auch für Stoffwechsel, Proliferation und Zelltod eine wichtige Rolle (Vella and Slack 2005). Nachdem die Methode der Isolation und Charakterisierung der miRNAs verbessert wurde, fand man kleine endogen regulierende RNAs auch noch in vielen anderen Organismen, was eine regelrechte Lawine an neu entdeckten miRNAs auslöste. (Lau et al. 2001; Lagos-Quintana et al. 2001; Lee and Ambros 2001). Heute kann man hunderte von miRNAs von den unterschiedlichsten Organismen in recht großen und ständig ergänzten Datenbanken im Internet finden, wie zum Beispiel: miRBase <http://microrna.sanger.ac.uk/>

1.1.3 Zusammensetzung des *silencing* Komplexes und Mechanismus der RNAi

1.1.3.1 siRNAs

siRNAs gelangen in den RISC-Komplex durch den so genannten *RISC loading complex* (RLC). Dieser RLC enthält im Lysat von Drosophilafliegen ein Heterodimer bestehend aus



R2D2/Dcr-2 (Pham et al. 2004; Tomari et al. 2004a; Tomari and Zamore 2005). In humanen Zellextrakten besteht der Heterodimer aus den Untereinheiten TRBP/Dicer (Chendrimada et al. 2005; Gregory et al. 2005; Haase et al. 2005). R2D2 bindet an dem Ende der doppelsträngigen siRNA, das thermodynamisch stabilere Basenpaarbindungen aufweist.

Durch die Erkennung der thermodynamischen Assymetrie bekommt die siRNA eine Orientierung, bei der festgelegt wird, welcher Strang später abgebaut wird und welcher Strang in den RISC-Komplex gelangt (Tomari et al. 2004b). In Säugerzellen spielt der TRBP/Dicer Komplex

Die Zusammensetzung des RISC-Komplexes in Drosophila Fliegen (nach Review: Perspective: machines for RNAi (Y. Tomari and P.D. Zamore, 2005))

auch eine Rolle bei der Assoziation der *ribonucleoprotein particles* (RNPs). Generell wird ein siRNA-enthaltender Effektor-Komplex als RISC und ein miRNA-enthaltender Effektor-Komplex von einigen Autoren als miRNP bezeichnet (Mourelatos et al. 2002).

An die RNase III Domäne von Dicer kann nun das Ago2 Protein mit seiner Piwi Domäne binden (Doi et al. 2003; Tahbaz et al. 2004). Ago2 gehört zur Argonautenfamilie, die Sequenz- und Strukturähnlichkeiten bei vielen Organismen aufweist. Ursprünglich wurden die Argonauten als Proteine definiert, die jeweils zwei PAZ (Piwi Argonaute Zwille) und Piwi Domänen enthalten (Cerutti et al. 2000). Deshalb findet man in der Literatur auch die Bezeichnung *PAZ and Piwi domain* (PPD) *proteins*. Kristallstrukturanalysen haben gezeigt,

dass die Piwi-Domäne eine RNase H ähnliche Struktur enthält, die bei der später erläuterten Spaltung der einzelsträngiger mRNA mitwirkt (Parker et al. 2004; Song et al. 2004).

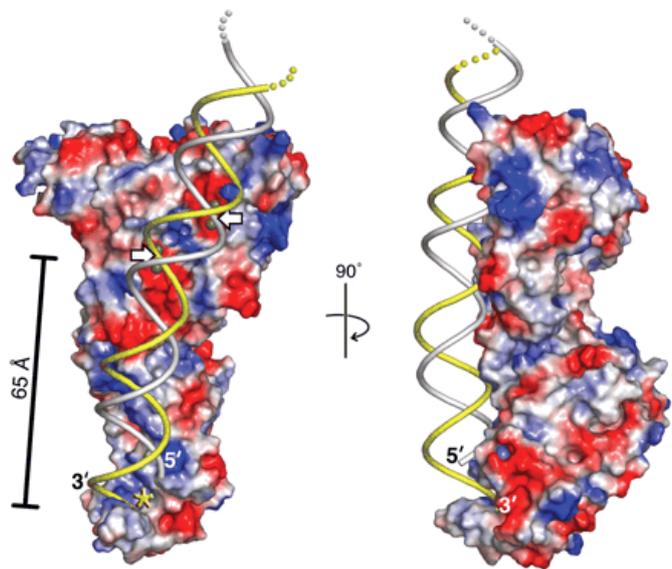
Die Elimination des *passanger*-Stranges und Aktivierung des RISC-Komplexes kann auf zwei Weisen erfolgen. Der *passanger*-Strang kann durch das Ago2 Protein gespalten werden (Matranga et al. 2005; Rand et al. 2005) oder aber der siRNA duplex wird unter ATP-Verbrauch durch eine Helikase entwunden z.B. *Armitage* (Tomari et al. 2004a). Der aktive RISC-Komplex, auch „Holo-RISC“ genannt (Pham et al. 2004) benötigt Mg^{2+} -Ionen, um als Endonuklease katalytisch aktiv zu sein (Martinez and Tuschl 2004; Schwarz et al. 2004).

Wenn der aktive RISC-Komplex anhand des geladenen guide RNA-Stranges die dazu komplementäre mRNA Sequenz

gefunden hat, schneidet sie diese (Elbashir et al. 2001), wobei sie für diese von ihr katalysierte Reaktion kein zusätzliches ATP benötigt (Nykänen et al. 2001; Haley and Zamore 2004; Martinez and Tuschl 2004; Rivas et al. 2005). Durch chemische Veränderungen wurde die Funktionsweise der Spaltung analysiert (Chiu and Rana 2003; Haley

and Zamore 2004). Nach einer Schlaufenbildung der siRNA mit der Ziel-mRNA, kommt die mRNA an das dem zehnten Phosphodiesterbindung des *guide*-Stranges der siRNA gegenüberliegende aktive Zentrum (Elbashir et al. 2001b).

Dieses aktive Zentrum enthält zwei als „*scissile phosphates*“ bezeichnete aktive Phosphatgruppen, die aber nur eine Phosphodiesterbrücke spalten können (MacRae et al. 2006). Die Spaltung mit RISC hinterlässt ein 5'Phosphat- und ein 3'Hydroxyl- Ende (Martinez and Tuschl 2004). Die derart gesplante mRNA wird anschließend vollständig abgebaut. Das 5' mRNA-Fragment wird rasch von ihrem 3' Ende her durch das Exosom und das 3' mRNA-Fragment von ihrem 5' Ende durch XRN1 abgedaut (Orban and Izaurralde 2005). RISC ist ein „*multiple-turnover RNAi enzyme complex*“ (Hutvagner and Zamore 2002). Das bedeutet, dass die geladene siRNA im RISC-Komplex nach dem Schneiden einer



Dicer Prozessierung einer dsRNA. Die blaue und rote Farbe zeigt die alkalische bzw. saure Ladungen des Giardia Dicer Proteins an. Die weißen Pfeile deuten auf die *scissile* Phosphate hin, die in unmittelbarer Nähe der katalytisch wichtigen Metallionen sind, die hier grün dargestellt sind. Der Stern zeigt die Bindungsstelle des 3'Überhangs in der PAZ Domäne. (Aus: Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. (MacRae et al. (2006).)

mRNA intakt bleibt und der Komplex weiterhin aktiv ist, um die nächste komplementäre Ziel-mRNA zu suchen und zu prozessieren.

1.1.3.2 miRNAs

Die meisten Eukaryoten verfügen in ihrem Genom Sequenzen, die miRNAs codieren. Diese werden von der RNA-Polymerase II in die sogenannten primären miRNAs (pri-miRNAs) transkribiert. Diese Transkripte werden durch die im Zellkern vorkommende RNase III *Drosha* und dem *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8) Protein innerhalb eines als „Microprozessor“ bezeichneten Komplex in Haarnadeln von 60 bis 70 nt Länge, den *precursor* oder Vorläufer-miRNAs (pre-miRNA), gespalten.

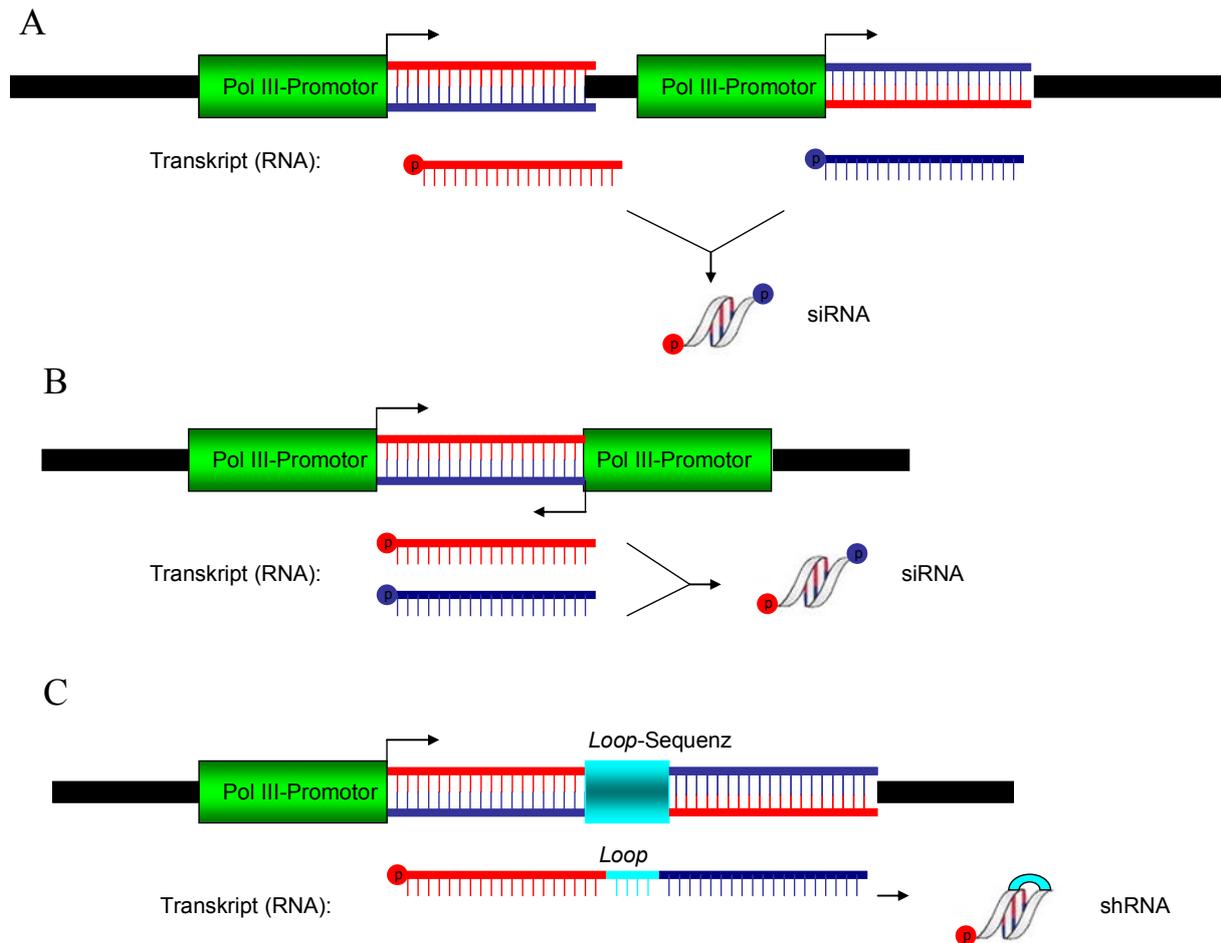
Nach dem Export der pre-miRNA aus dem Zellkern in das Cytoplasma durch den Ran-GTP abhängigen Exportin-5 Transporter, wird sie durch die RNase III Dicer in einen nicht perfekt komplementären Duplex von 21-24 nt gespalten. Das Dicerenzym braucht das „*transactivating response RNA-binding protein*“ (TRBP) im sogenannten pre-miRNA prozessierenden Komplex. Nach Strangselektion und Separation werden die etwa 22 nt langen reifen miRNAs durch den Ribonucleoprotein (miRNP)-Komplex, das auch *Argonaute 2* (Ago2) enthält, zur spezifischen mRNA dirigiert. Je nachdem, ob die miRNA-mRNA Basenpaarung nur teilweise oder vollständig passt, wird die Translation der mRNA unterdrückt oder die mRNA gespalten und gleich darauf abgebaut.

1.2 si / sh RNA Bibliotheken

Die Entwicklung von Methoden zur Induktion von RNAi ermöglicht funktionelle Genanalysen in einer Vielzahl von Organismen.

RNAi wird zur systematischen Analyse in Form von *high-throughput screens* (HTS) verwendet. Hierzu gebraucht man RNAi-Bibliotheken, die in der Lage sind, effizient Gene auszuschalten, um biologische Abläufe zu untersuchen und besser zu verstehen (Miyagishi and Taira 2003). Die erste große systematische Untersuchung an *C. elegans* mittels einer RNAi Bibliothek erfolgte im Jahr 2000. Dabei wurden Nematoden mit Bakterien gefüttert, die zuvor mit einem Vektor transformiert wurden, in denen Fragmente des Nematodengenoms kloniert sind. Durch zwei entgegengesetzte Promotoren wurde intrazellulär doppelsträngige RNA erzeugt, die bei der Aufnahme durch *C. elegans* RNAi induzierten. Dadurch konnte man funktionelle Analysen durchführen und viele Genfunktionen identifizieren und zuordnen (Fraser et al. 2000, Kamath et al. 2001/2003).

„Gene silencing“-Studien in Säugerzellen benötigen die dauernde Anwesenheit des RNAi-*Triggers* in der Zelle, was durch eine Pol III-Promotor-vermittelte Transkription von si/shRNAs erreicht werden kann. Die meisten Expressionssysteme lassen sich in zwei Gruppen einteilen: eine, in der der Sense und Antisense-Strang getrennt transkribiert wird (Tandem-Struktur) und eine in dem der Sense mit dem Antisense-Strang durch eine Loopsequenz verbunden ist (Hairpin oder Haarnadel-Struktur).



Expression des RNAi *Triggers*: A. + B. Sense und Antisense werden getrennt transkribiert
 C. Sense und Antisense sind mit einer Loopstruktur verbunden

Vergleiche der Effektivität beider Formen werden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.2.1 Chemisch und enzymatisch hergestellte siRNAs

Die ersten Bibliotheken waren lange dsRNAs mit einer Größe von etwa 1-2 kb. Diese konnten allerdings nur sehr begrenzt eingesetzt werden, da in höheren Organismen die langen dsRNAs einen unspezifischen Abbau der RNAs einleiten (Interferonantwort) (Elbashir et al. 2001). Nachdem aber gezeigt wurde, dass 21nt lange doppelsträngige RNAs die einen 2nt langen 3' Überhang haben (siRNA), diesen Mechanismus zum Schutz gegen virale Infektionen nicht auslösen, jedoch noch aktiv die Genexpression hemmen können, begannen viele Arbeitsgruppen mit der Verwendung chemisch synthetisierter siRNAs (Caplen et al. 2001).

Der *Sense* und *Antisense*-Strang wird dabei getrennt synthetisiert, hybridisiert und mittels chemischen oder physikalischen Methoden wie Transfektionsreagenzien, Elektroporation oder Microinjektion, in die Zielzellen gebracht.

Man konnte dadurch „hohe Durchsatz Untersuchungen“ durchführen und die funktionellen siRNAs charakterisieren. Da die chemische Synthese von siRNAs sehr kostenintensiv ist, versuchte man mittels Algorithmen die Wahrscheinlichkeit, wirksame siRNAs herzustellen, zu erhöhen (Scherer and Rossi 2003, Khvorova et al. 2003, Reynolds et al. 2004, Schwarz et al. 2003). Durch Computeranalysen werden Gen-codierende Sequenzen im Genom gesucht, gegen die man siRNAs generieren kann, aber trotz der gewaltigen Fortschritte, die man auf diesem Gebiet aufweisen kann, werden immer noch nicht alle gefunden oder es treten unerwartete und nicht vorhersehbare Splicemöglichkeiten auf (Rinn et al. 2003). Bei der Isolierung von cDNAs konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass etwa neun Prozent der identifizierten Gene nicht durch Computeranalysen des bekannten Genoms von *C. elegans* vorausgesagt wurden (Reboul et al. 2003).

Viele Bibliotheken verwenden mehrere siRNAs gegen ein Gen, um gleiche Phänotypen durch verschiedene siRNAs zu erhalten und um die Effizienz zu erhöhen. Obwohl das mit Mehrkosten und mit mehr Arbeitsaufwand verbunden ist, hat es doch den Vorteil, dass durch mehrere gleiche Effekte die von der Expressionshemmung eines Gens hervorgehen, ein „off-target“-Effekt nahezu ausgeschlossen werden kann. Solche Effekte treten dann auf, wenn eine siRNA auf mehrere mRNAs passt (Downward et al. 2004/5).

Synthetische siRNA Bibliotheken sind teuer, nicht amplifizierbar und wenig robust.

Eine Alternative hierzu bilden siRNA Bibliotheken, die durch die Spaltung der mRNA durch Dicer oder RNase III aus *E. coli* hergestellt werden (Calegari et al. 2002). Obwohl Dicer im endogenen RNAi System die langen doppelsträngigen RNAs in 21-23 bp lange siRNAs

schneidet (Hannon 2002), hat sich die Verwendung von RNase III aus *E coli* in im *vitro*-System als effizienter zur Generierung von siRNAs erwiesen (Yang and Erickson 2000). Die als esiRNA (endoribonuclease-prepared siRNA) bekannt gewordene Methode wurde erfolgreich in Säugerzellen getestet und angewandt (Yuang et al. 2002; Kittler et al. 2004).

1.2.2 RNAi-Expressionssysteme

2001 wurde in *C. elegans* ein Mechanismus beschrieben, mit dessen Hilfe die sogenannten sekundären siRNAs entstehen. Diese sind siRNAs, die durch einen Amplifikationsschritt mittels der RNA-directed RNA Polymerase (RdRP) entstehen. Die primären siRNAs fungieren dabei als Primer der RdRP so dass die Ziel m-RNA gleichzeitig als Matrize zur Bildung von langen doppelsträngigen RNAs dient, die wiederum in den RNAi Mechanismus eintreten können (Sijen et al. 2001). Ein weiteres interessantes Phänomen ist die systemische RNAi, wobei dsRNA interzellulär durch das Transmembranprotein SID-1 weitergegeben werden können, so dass man RNAi in Zellen beobachten kann, die ursprünglich nicht durch siRNAs transfiziert wurden (Winston et al. 2002).

Da Säugerzellen weder die endogene Amplifikation von siRNAs noch die systemische Weiterreichung der RNAi Auslöser besitzen, sind die durch siRNAs erzielten Effekte zeitlich begrenzt. Diese transitive Eigenschaft wird durch Zellteilung und zusätzlichen Abbau der RNAi Induktoren noch verstärkt. Für viele Experimente reicht eine kurzzeitige Inhibierung der Genexpression nicht aus. Eine intrazelluläre stabile Expression von siRNAs, shRNAs sowie miRNAs wurde durch das Einbringen von Expressionsplasmiden in Zielzellen erreicht. Für die Generierung von siRNAs und shRNAs werden meist die RNA Polymerasen III (Pol III) U6 und H1 verwendet. (Paule et al. 2000; Myslinski et al. 2001)

Man kann die RNA die von Pol III –Promotoren im Vektorsystem für die RNAi synthetisiert werden in zwei große Gruppen einteilen (Review J. Clark and S. Ding 2006):

Zum einen die Tandem-Expression und zum anderen die Haarnadel (oder Hairpin)-Expression.

Im Jahr 2002 veröffentlichte die Arbeitsgruppe von John Rossi eine Methode zur Herstellung von Tandemtranskripten, wobei auf einem Plasmid zwei U6 Promotoren *Sense* und *Antisense*-Strang der siRNA transkribierten. Sie konnten zeigen, dass mit dieser Methode der RNAi die Expression des EGFP-Reportergens von transfizierten 293 Zellen um etwa 90 % gehemmt werden kann (Lee et al. 2002).

Eine Optimierung dieser Transkription erfolgte durch die Gegenüberstellung zweier Pol III-Promotoren, die dann dieselbe Sequenz einmal von der *Sense*-Seite und einmal von der *Antisense*-Seite transkribierten. Dieser duale siRNA Expressionsvektor (pDual) der von Zheng et al. entwickelt wurde, verwendet zur Vermeidung von ungewollten Wechselwirkungen zwischen den Promotoren zwei unterschiedliche Pol III Promotoren (H1 und U6). Dieser Vektor wurde auch in dieser hier vorliegenden Arbeit verwendet, getestet und mit anderen Methoden verglichen. Zheng zeigte mit diesem Vektorsystem pDual eine Reduktion von Luciferase um 70-90 % (Zheng et al. 2004). Hiermit schien nun der Weg zur einfachen Generierung einer beliebigen Bibliothek geebnet, die noch von etlichen Arbeitsgruppen aufgegriffen und verbessert wurde (Rui et al. 2005), pHippy (Kaykas et al. 2004). Ein Jahr später wurde von Chen et al. eine auf dasselbe Prinzip beruhende, völlig randomisierte Bibliothek veröffentlicht. Die erreichte Komplexität wurde auf etwa 5×10^8 geschätzt, wobei sie 50 µg Ausgangsplasmid verwendeten (Chen et al. 2005).

Bei der Haarnadel oder *Hairpin* Expression wird der *Sense* und der *Antisense*-Strang, die durch eine Loopsequenz voneinander getrennt sind, von einem Promotor transkribiert. Das hat den großen Vorteil, dass sich die Stränge nicht erst in der Zelle finden müssen, bevor sie hybridisieren können.

Einen wichtigen Beitrag zur Etablierung dieser Art von RNAi Auslöser ist von der Arbeitsgruppe von David Engelke geleistet worden, in dem sie zeigen, dass eine als siRNA funktionelle Sequenz gegen Lamin A/C auch als ein einziges Transkript eines Pol III Promotors bei dem der *Sense* und *Antisense*-Strang durch vier Basen voneinander getrennt sind, eine vergleichbare Funktionalität aufweist (Paul et al. 2002). Diese Loopstruktur der transkribierten so genannten *short hairpin* RNA (shRNA) wird von Dicer gespalten. Die so gebildete funktionelle siRNA ist dann für die Beladung des RISC-Komplexes verfügbar.

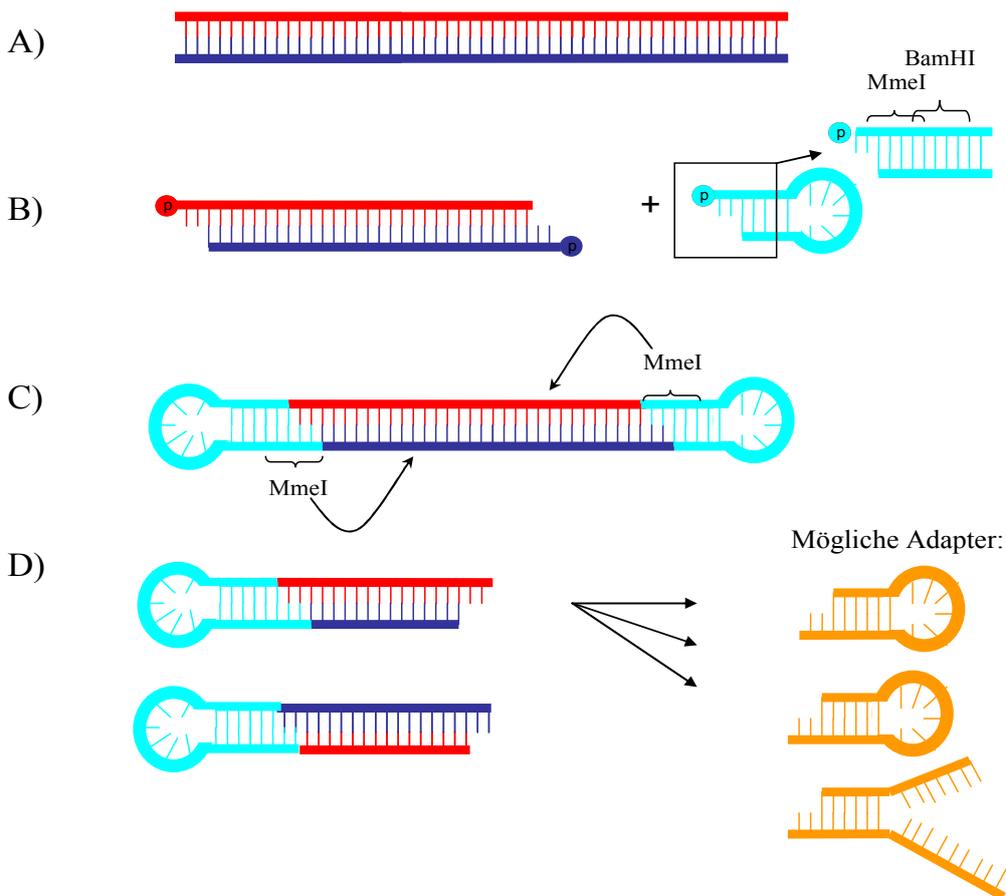
Viele Arbeitsgruppen haben sich seitdem mit der Generierung von shRNA Bibliotheken befasst. Die meisten gehen von cDNA aus, um diese in mehreren Schritten in die gewünschte Form von *Sense- Loop- Antisense* zu bringen, damit bei der Transkription dieser Vektoren, funktionelle shRNAs gebildet werden können.

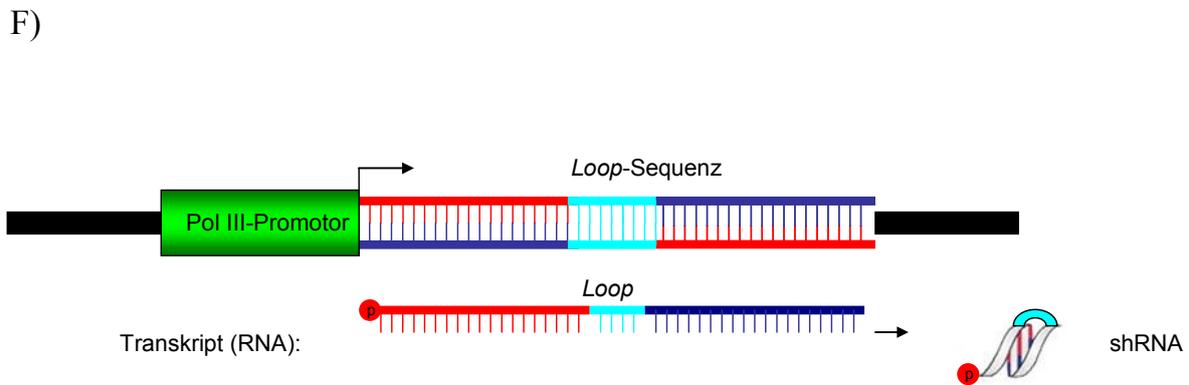
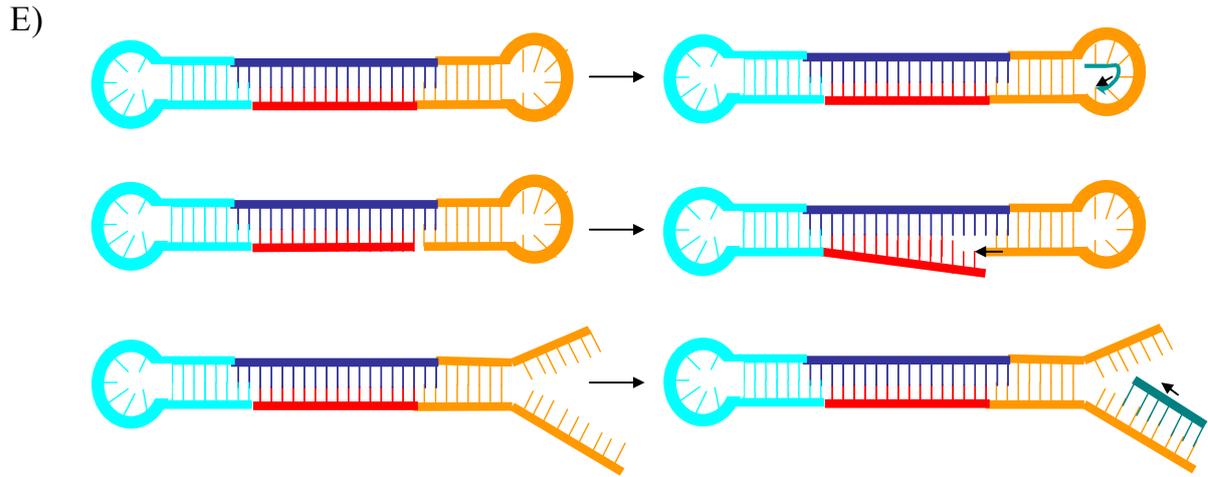
Einige dieser Techniken sind: REGS (Sen et al. 2004), EPRIL (Shirane et al. 2004), SPEED (Luo et al. 2004). Das Herstellungsprinzip ist aber bei allen stets ähnlich:

- A) Zunächst wird die cDNA mittels Restriktionsenzyme oder DNase I in Fragmente geschnitten, die einen Überhang haben, an die man einen *Loop* ligieren kann.

- B) Der *Loop*, der an die cDNA ligiert wird, ist so aufgebaut, dass er durch einen Verdau verkürzt werden kann, so dass die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym später den *Loop* bildet. Zusätzlich enthält der *Loop* auch die Erkennungssequenz für das Enzym Mme I.
- C) Mittels dem Restriktionsenzym Mme I wird die cDNA geschnitten. Dieses Enzym schneidet die an den *Loop* ligierte cDNA in die gewünschte Länge von 21 Nukleotiden und hinterlässt einen zwei Nukleotid langen Überhang.
- D) An dem vom Mme I produzierten Überhang wird ein Adapter ligiert.
- E) Ausgehend von diesem „Adapter“ wird der komplementäre Strang mittels einer DNA Polymerase synthetisiert.
- F) Das erhaltene Produkt wird geschnitten und in einen Expressionsvektor hinter einem Pol III Promotor kloniert.

(Review J. Clark and S. Ding 2006)





Die neuste Entwicklung der RNAi-Bibliotheken bilden die „*second generation shRNA libraries*“ (Chang et al. 2006). Hier werden microRNA ähnliche Strukturen verwendet, indem die shRNA Sequenz sowohl am 5'- als auch am 3' Ende von einer miR30 Sequenz eingerahmt wird. Auch die Loopstruktur entspricht der natürlich vorkommenden miR30 Sequenz. Als Ergebnis wurde eine Erhöhung der Expression von reifen synthetischen miRNAs um das 12-fache nachgewiesen (Silva et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wird im Ausblick noch auf die mögliche vereinfachte Herstellung dieser Methode eingegangen.

1.3.1 Lentivirale Vektoren

1.3.1 Charakterisierung

Lentiviren [lentus (lat.) = langsam] gehören zur Familie der Retroviridae. Charakteristisch für Retroviridae ist die Fähigkeit, ihr RNA-Genom in DNA umzuschreiben und es dann in das Wirtsgenom als Provirus zu integrieren. Die Besonderheit der Lentiviren besteht in ihrer Fähigkeit, mit ihrem Preintegrationskomplex die intakte Kernmembran von sich nicht teilenden Zellen zu passieren. Diese Eigenschaft ermöglicht es Lentiviren, ein weites Spektrum an Zellen zu infizieren, die in der G0 oder G1 Phase sind. Wichtige Zielzellen können dabei Nervenzellen, Muskelzellen, Makrophagen sowie hämatopoetische Stammzellen bilden.

Lentiviren besitzen eine Größe von 80-100 nm. Ihr diploides Genom, das zwischen 7 und 10 kb lang ist, besteht aus zwei Kopien einzelsträngiger RNA. Wichtig für die Vermehrung des Virus sind die Strukturenzyme Gag (*group-specific antigen*) sowie die Replikationsenzyme: Protease (pro) RNase H, reverse Transkriptase und Integrase (pol). Das Virion wird durch die Wirtszellcytoplasmamembran, die aus zwei Untereinheiten bestehende virale Proteine Env enthält, verpackt. Im Wirtsgenom wird das Provirus durch die sogenannten *long terminal repeats* (LTR) flankiert. Diese sind notwendig für die Regulation der viralen Genexpression. Die 5'LTR reguliert die Transkription durch die zelluläre Polymerase II, während die 3'LTR für die Polyadenylierung verantwortlich ist. Ungespleißte, einfach und vielfach gespleißte virale RNAs gelangen ins Cytoplasma der Wirtszelle und werden dort in virale Proteine translatiert. Wichtige Proteine sind dabei die Transaktivatoren Tat und Rev. Der virale Transkriptionstransaktivator (Tat) aktiviert den 5'LTR Promotor, während Rev mit einer Region die als *Rev responsive element* (RRE) bezeichnet wird, interagiert. Rev ist verantwortlich für die Menge der für das Spleißen sowie für den Export ins Cytoplasma (gag, pol, env) zur Verfügung stehenden RNA.

1.3.2 Gentransfer durch lentivirale Vektoren

Die Entwicklung von lentiviralen-Vektor-Systemen basiert hauptsächlich auf der Modifikation des HIV-Genoms. Dabei ist man darauf bedacht, die biologische Sicherheit zu gewährleisten.

Aus diesem Grund wird die Expressionskassette, die für cis-aktive Sequenzen, die für die Verkapselung der reversen Transkription, die Integration in das Wirtsgenom und die RNA

Prozessierung (z.B. RRE), auf ein sogenanntes Transgenplasmid kodiert. Die transaktiven Sequenzen für pro, pol, tat und rev sowie env werden auf ein zweites bzw. drittes Plasmid gebracht (Miller et al. 1993).

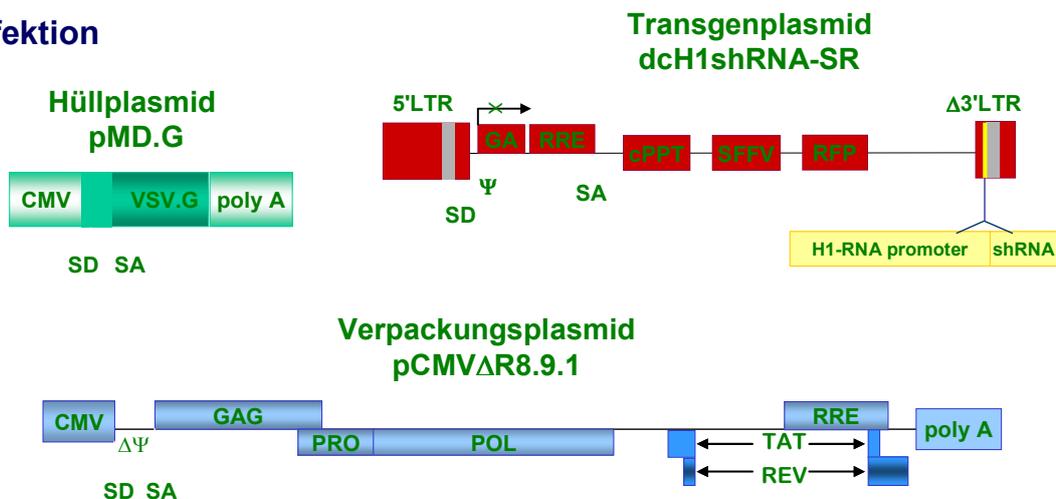
Um virale Vektorpartikel zu generieren, werden alle drei Konstrukte in dieselbe Zelle transduziert (Naldini et al. 1996). Da nur das RNA-Transkript des Transgenplasmids in die entstehenden Viruspartikel verpackt wird, kann das entstehende Virus nur ein einziges Infektionsereignis tätigen.

Das verwendete Transgen-Plasmid dcH1-SR besitzt ein 5' LTR, gefolgt von einer unvollständigen gag-Sequenz, die das Verpacken verstärken soll. Ein anschließender SFFV-Promotor (*spleen focus forming virus immediate early promoter*) verstärkt die Expression eines *red fluorescence protein* (RFPs). Die Deletion sowie eine Klonierungsposition in der U3-Region der 3'LTR bewirkt die Inaktivierung des 5'LTRs sowie die Verdopplung der klonierten Sequenz (hier eine RNA-Pol III-shRNA-Kassette) nach Integration des Transgen-Plasmids in das Wirtsgenom. Ein Verpackungssignal (Ψ) ermöglicht die Enkapsidation des Transgen-Plasmids (Scherr et al. 2003).

Das Verpackungs-Plasmid pCMV Δ 8.9.1 kodiert virale Strukturelemente sowie die pro- und pol-Gene. Das Verpackungssignal ist deletiert, und die LTRs wurden 5' durch einen starken humanen CMV-Promotor und 3' durch einen Polyadenylierungssignal ersetzt (Naldini et al. 1996).

Durch eine transiente Transfektion der drei Plasmide in 293T-Zellen können virale Zellkulturüberstände produziert werden. Die viralen Partikel beinhalten das Transgen-Plasmid.

Kotransfektion



Die Spezifität des Virus für bestimmte Zelltypen ist durch die Interaktion seiner Hüllproteine mit Rezeptoren der Zellmembran festgelegt. Die Modifikation der Hülle viraler Partikel durch Einbau verschiedener Glycoproteine wird auch Pseudotypisierung genannt. Ein drittes Plasmid, das für das Vesikuläre-Stomatitis-Virus-Glykoprotein (VSV-G) kodiert, erhöht die Infektiosität der viralen Partikel für eine breite Palette von Zelltypen. Das VSV-G bindet an ein Phospholipid der Zellmembran und initiiert die Fusion mit der Virushülle (Burns et al. 1993). Durch VSV.G pseudotypisierte virale Partikel können durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert werden. Die Hüllproteine verleihen dem Virion somit nicht nur mechanische Stabilität, sondern erweitern auch das Infektionsspektrum.

Durch eine transiente Transfektion dreier Plasmide in 293T-Zellen, können virale Zellkulturüberstände produziert werden. Die viralen Partikel beinhalten das Transgen-Plasmid.

1.4 Interleukin 3 (IL-3) abhängige Signalkaskaden in 32D Zellen

32D Zellen sind IL-3 abhängig und stammen ursprünglich aus dem Knochenmark von C3He/J Mäusen die intravenös mit dem *Friend murine leukemia* Virus infiziert wurden (Greenberger et al 1980; Greenberger et al. 1983). Sie werden als immortalisierte „normale“ hämatopoetische Progenitorzellen für viele Versuche verwendet. 32D Zellen können durch das Absetzen von IL-3 und Zugabe von physiologischen Faktoren wie Erythropoietin (Epo), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) und granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), zu reifen Zellen ausdifferenzieren. (Migliaccio et al. 1989)

Zur Positivselektion der si/shRNA Bibliothek wurden 32D Zellen verwendet, denen man den Faktor entzogen hat. Dabei war es von Interesse, Gene zu finden, die ein faktorunabhängiges Wachstum ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	BioRAD
Agarose	Gel Seakem ME
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Sigma
ATP	Invitrogen
BES(N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2 aminoethansulfonsäure)	Sigma
BigDye	Applied Biosystems
Bio Rad Protein Assay	Bio Rad
Bromphenolblau	Serva
BSA (Bovines Serumalbumin)	NEB / Bio Labs
Calciumchlorid	Merck
Chloroquine C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMEM with Glutamax-1	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
EDTA (N,N,N,N-Ethylendiamintetraacetat)	Sigma
Essigsäure	Sigma
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
FCS (fötales Kalbsserum)	Gibco
Ficoll 400	Fluka
Glycerol	Serva
Glycin	AppliChem
Isopropanol	J.T.Baker
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	ICN
Lipofectamine 2000 Reagent (1mg/ml)	Invitrogen
Luciferin-Natriumsalz	AppliChem
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Magermilchpulver	Serva
Methanol	J.T.Baker
Natriumacetat	
Natrium Butyrate	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nonidet-P-40	Sigma
ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid)	Sigma
PBS (phosphate buffered saline)	Gibco
Pefabloc	Boehringer
Phenol	Merck
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Invitrogen

Poly-L-Lysin (0,01 %)	Sigma
Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche
Rnasin Rnase-Inhibitor (40 U/ μ l)	Promega
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco
Saccharose	Merck
Salzsäure	Riedel-de-Haen
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Merck
STI 571	Novartis
Stoppuffer (5x) DNA für EV 10 ml, 11g Sucrose, 0,1 M EDTA	
25 mg Bromphenolblau	
TBE (10x) 0,089 M Tris, 0,089 M Borsäure, 0,002 M EDTA pH 8,3	
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Triton-X-100	Sigma
Trizol UltraPure 100 ml	Invitrogen
Trypanblau (Stammlsg. 0,5g/100ml NaCl 0,9%)	Sigma
Gebrauchslösung: 1:10 verdünnt mit 0,9% NaCl, + 3% Essigsäure	
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Serva
Western Lightning Chemilumineszenz Reagent Plus	PerkinElmer
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Galactosid)	Sigma
Xylencyanol	Merck

2.1.2 Molekulargewichtsstandards

10 bp DNA-Leiter	Invitrogen
DNA Molecular Weight Marker I-VIII	Roche
<i>Prestained SDS-PAGE low range protein marker</i>	Biorad
Stoppuffer (5x) DNA für EV 10 ml, 11g Sucrose, 0,1M EDTA, 25mg Bromphenolblau	

2.1.3 Kits

Brilliant QPCR Master Mix	Stratagene
ECL (enhanced chemiluminescence kit)	Amersham
QIAamp DNA Blood Minikit	Qiagen
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini und Maxi Kit	Qiagen
Qiagen-spin PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
SequenzierPCRAufreinigungs Kit	Qiagen
Rapid Ligation Kit, T4 DNA Ligase	Roche
Quick Ligation Kit	BioLabs

2.1.4 Verwendete Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen.

<u>Name:</u> <i>AccI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GT-MKAC
Puffer: NEB 4	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>AcI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): C-CGC
Puffer: NEB 3	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>BamHI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): G-GATCC
Puffer: <i>BamHI</i> -Puffer	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>BglII</i>	Schnittmuster (5' → 3'): AGATCT
Puffer: NEB 3	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>BsaHI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GR-CGYC
Puffer: NEB 1	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>BsmBI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): CGTCTC(N) ₁ -
Puffer: NEB 3	Temperaturoptimum: 55 °C
<u>Name:</u> <i>BstXI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): CCANNNNN-NTGG
Puffer: NEB 3	Temperaturoptimum: 55 °C
<u>Name:</u> <i>ClaI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): AT-CGAT
Puffer: NEB 4 + BSA	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>EcoRI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): G-AATTC
Puffer: NEB 3 + BSA	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>Eco0109I</i>	Schnittmuster (5' → 3'): RG-GNCCY
Puffer: NEB 4 + BSA	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>HindIII</i>	Schnittmuster (5' → 3'): A-AGCTT
Puffer: NEB 2	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>HincII</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GTY-RAC
Puffer: NEB 3 + BSA	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>HinPII</i>	Schnittmuster (5' → 3'): G-CGC
Puffer: NEB 2	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>HpaII</i>	Schnittmuster (5' → 3'): C-CGG
Puffer: NEB 1	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>HpyCH4IV</i>	Schnittmuster (5' → 3'): A-CGT
Puffer: NEB 1	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>KpnI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GGTACC
Puffer: NEB 1	Temperaturoptimum: 37 °C

<u>Name:</u> <i>MlyI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GAGTC(N) ₅ -
Puffer: NEB 4 + BSA	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>MmeI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): TCCRAC(N) ₂₀ -
Puffer: NEB 4 + SAM	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>NarI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GG-CGCC
Puffer: NEB 1	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>NcoI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): C-CATGG
Puffer: NEB 3	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>NheI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GCTAGC
Puffer: NEB 4 + BSA	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>NotI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GC-GGCC-GC
Puffer: NEB 3 + BSA	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>PmeI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GTTT-AAAC
Puffer: NEB 4	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>PstI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): CTGCA-G
Puffer: NEB 3	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>SacI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GAGCT-C
Puffer: NEB 1	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>SacII</i>	Schnittmuster (5' → 3'): CCGC-GG
Puffer: NEB 4	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>SalI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): G-TCGAC
Puffer: eig. Puffer	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>SfoI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): GGC-GCC
Puffer: NEB 2	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>SmaI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): CCC-GGG
Puffer: NEB 4	Temperaturoptimum: 25 °C
<u>Name:</u> <i>SnaBI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): TAC-GTA
Puffer: NEB 4 + BSA	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>SpeI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): A-CTAGT
Puffer: NEB 2 + BSA	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>StuI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): AGG-CCT
Puffer: NEB	Temperaturoptimum: 37 °C
<u>Name:</u> <i>TaqαI</i>	Schnittmuster (5' → 3'): T-CGA
Puffer: NEB 3 +BSA	Temperaturoptimum: 65 °C

Name: *Xba*I Schnittmuster (5' → 3'): T-CTAGA
Puffer: NEB 2 + BSA Temperaturoptimum: 37 °C

Name: *Xho*I Schnittmuster (5' → 3'): C-TCGAG
Puffer: NEB 2 + BSA Temperaturoptimum: 37 °C

SAP (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)	Amersham
T4-DNA-Ligase	NEB
Mung Bean Nuclease,	NEB
Klenow,	Roche
dNTPs (Desoxy-Nukleotid-Triphosphate)	Invitrogen/AB
DNase I (10 U/μl)	Roche
T4-Polynukleotid-Kinase (PNK)	BioLabs

2.1.5 Sonstige Materialien und Geräte

ABI PRISM 310 System	Applied Biosystems
Autoklav	Getinge
Bacillol	Bode
Bakterienschüttler	Gerhardt
Biofuge 13	Heraeus Sepatech
BioRad Protein Assay	Biorad
Blockthermostate	Kleinfeld Lab. Technik
Blotkammer	Multiphor II
Brutschrank für die Zellkultur	Heraeus
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (steril)	Sarstedt
Elektrophorese-Apparaturen	Biorad
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf
FACS	Becton Dickinson
Falcon Tubes (50/15ml)	Greiner
Filmentwickler	Protec
Fluoreszenzmikroskop TE300	Nikon Eclipse
Gelkamera MP4 Land Camera	Polaroid
Heizblock	Eppendorf
Immobilon-P-Membran	Millipore
Kleenex/Kimtech	Kimberly-Clark
Kryoröhrchen	Nunc
Kühlzentrifuge	Beckman J2-MC
Lichtmikroskope: Axiovert 25	Carl Zeiss Jena
Olympus CK2	Optical
Lumat	Berthold
Megafuge 1. OR	Heraeus
Mikrotiterplatten-Spektralphotometer	MWG
Nitrocellulose Membran	Amersham Biosciences
PAA-Gele	Biorad
PCR Geräte	Biometra
Penicillin/Steptomycin	Seromed

pH-Meter Basic Meter PB-20	Sartorius
Realtime Quantitative PCR ABI Prism 7700	Applied Biosystems
Roti-Blue	Roth
Rotoren (JA 10, JA 20)	Beckman
Röntgenfilme	Amersham
<i>Semi-Dry-Blot</i> -Kammer	BioMetra
Sequenziergeräte ABIPrism	Applied Biosystems
S.O.C.	Invitrogen
Spektralphotometer	MWG
Spritzen (50ml)	Fresenius
Sterilbänke	BDK
Sterilfilter Millex-HV 0,45 µm	Millipore
Thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge	Eppendorf
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman
UV Transilluminator	UVP inc.
Vortexer: Vortex-genie 2	Scientific Industries
Heidolph	REAX top
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf AG
Wasserbad	BLB
Whatman Papier	
96-well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems
Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen	Greiner
Zellzählgerät Beckman Coulter AC.T8	Beckman
Zellzählkammer 0,1mm Tiefe 0,0025 mm ² Neubauer	
Zentrifugen: 5417R	Eppendorf
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf
Biofuge 13	Heraeus
Megafuge 1.0R	Heraeus
BeckmanUltrazentrifuge	
Optima LE-80K Ultrazentrifuge,	Beckman, USA
Kühlzentrifuge	Beckman J2-MC

2.1.6 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium:

10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden auf 1000 ml mit dest. Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika zur plasmidspezifischen Selektion erfolgte unmittelbar vor Inkulturnahme.

LB-Agarplatten:

1 l LB-Medium wurde mit 15 g Agar versetzt und autoklaviert. Zur Selektion plasmidpositiver Klone wurde das erforderliche Antibiotikum nach Abkühlung auf unter 60 °C zugefügt und der Ansatz in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Ampicillin	D[-]α-Aminobenzylpenicillin (MW: 371,4g/mol)	Sigma
LB Broth	<i>LENNOX L Broth Base</i> Bio Science Rockland Inc., Rockland, Me USA	Invitrogen/Cambrex
S.O.C		Invitrogen

2.1.7 Oligonukleotide:

Mut.H1-1FP:

5'-GGG AAT CTT ATA AGT TCT GTA TGA GAC TTA AGA TCT AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC CTC-3'

Mut.H1-1RP:

5'-CGA GGT CGA CGG TAT CGA TAA GCT TAG ATC TTA AGT CTC ATA CAG AAC TTA TAA GAT TCC C-3'

Mut.H1-2FP:

5'-GGG AAT CTT ATA AGT TCT GTA TGA GAC TTA ATT AAT AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC CTC G-3'

Mut.H1-2RP:

5'-CGA GGT CGA CGG TAT CGA TAA GCT TAT TAA TTA AGT CTC ATA CAG AAC TTA TAA GAT TCC C-3'

Mut.U6-1FP:

5'-CGA TTT CTT GGC TTT ATA TAT CTT GTG GAA GTT TCG AAA CAC CGT CGA CGG GTC TAG AGC GG-3'

Mut.U6-1RP:

5'-CCG CTC TAG ACC CGT CGA CGG TGT TTC GAA ACT TCC ACA AGA TAT ATA AAG CCA AGA AAT CG-3'

Mut.U6-2FP:

5'-CGA TTT CTT GGC TTT ATA TAT CTT GTG GAA GTT TAA ACA CAC CGT CGA CGG GTC TAG AGC GG-3'

Mut.U6-2RP:

5'-CCG CTC TAG ACC CGT CGA CGG TGT GTT TAA ACT TCC ACA AGA TAT ATA AAG CCA AGA AAT CG-3'

H1-GFP-Bam-FP:

5'-TAA AAA GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTT GGA TCC AAA CTT CAG GGT CAG CTT GCC TTT TT-3'

H1-GFP-Bam-RP:

5'-AAA AAG GCA TGA CCC TGA AGT TTG GAT CCA AAC TTC AGG GTC AGC TTG CCT TTT TAA T-3'

H1-GFP-WT-FP:

5'-TAA AAA GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTT CAA GAG AAC TTC AGG GTC AGC TTG CCT TTT T-3'

H1-GFP-WT-RP:

5'-AAA AAG GCA AGC TGA CCC TGA AGT TCT CTT GAA ACT TCA GGG TCA GCT TGC CTT TTT AAT-3'

U6-GFP-FP:

5'-AAA CAA AAA GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTT GGA TCC AAA CTT CAG GGT CAG CTT GCC TTT TTA
ATT AA-3'

H1-GFP-Bam-FP:

5'-TTA ATT AAA AAG GCA AGC TGA CCC TGA AGT TTG GAT CCA AAC TTC AGG GTC AGC TTG CCT TTT
TGT TT-3'

Linker(F):

5'-TAA GTA TAC CCG GGC AGT ACG TAG TTT AAA CGT T-3'

Linker(R):

5'-AAC GTT TAA ACT ACG TAC TGC CCG GGT ATA CTT AAT-3'

shRNA:

5'-CCC CAG GAG GCC TTA ATT AAA AAN NNN NNN NNN NNN NNN NGT TGG ATC CTG CTG GGC GCA TGG-3'

PCRshRNAFP:

5'-CCC CAG GAG GCC TTA ATT AA-3'

PCRshRNARP:

5'-CCA TGC GCC GAG CAG GAT CCA-3'

siRNA:

5'-CCC CAG GAG GCC TTA ATT AAA AAN NNN NNN NNN NNN NNN NNC TTT TTG TTT AAA CCG GCC GCC G-3'

PCRsiRNARP:

5'-CGG CGG CCG GTT TAA ACA AAA AG-3'

3'-Loop:

5'-GAT CCT GGG ACT GTT CAA AGA GAC AGT CCC AG-3'

5'-Loop:

5'-TTT TTA AAT AAT CAC TGG CCG TCG TAT TAC CAG TGA TTA ATT AAA AAN N-3'

2.1.8 TaqMan-Sonden (Applied Biosystems):

muGAPDH: 6FAM-TGGCCTACATGGCCTCCAAGGA-TAMRA

muOAS1: 6FAM-CAAGGGCAAAGGCACCGCG-TAMRA

2.1.9 Primer für TaqMan-Sonden

FP-GAPDH: 5'-CAACAGGGTGGTGGACCTC-3'

RP-GAPDH: 5'-GGGTGGTCCAGGGTTTCTTA-3'

FP-muOAS1: 5'-GCCGAATGAGGGCCTCTAA-3'

RP-muOAS1: 5'-AGCGTCTGACCTGCCCTTG-3'

2.1.10 Sequenzierprimer

T3-Primer für den pSuper-Vektor

T3-Primer-Bindungsstelle (CTTTAGTGAGGGTTAAT): 989-1005

H1-Primer: GCATGTCGCTATGTGTTCTGGGA

Rev Seq SR/SEW-H1: AGCTCATTGAGGGTTGCTTCTG

H1 Seq 154bp: AAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTG

Seq H1 pos:	GCCCTGCAATATTTGCATGT
Seq SR/SEW-H1:	GTCTTCGTTGGGAGTTACTCG
Seq SR Rev Kor:	CAGATCTGGTCTAACCAGAGAGACCC
Seq Oligo SR-Rev:	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGG
Seq SR-Rev libr:	GAATACACGGAATTAATTCTAGATGC
Seq H1 dan:	CCCTGGCAGGAAGATGGCTCTGA

2.1.11 Plasmid-Vektoren

pSuper	Brummelkamp et al.
MSCV-huPU.1-IRES-EGFP	M. Scherr
pHR ⁺ SINcPPT-SEW/SR	M. Scherr
dcH1-SR	M. Scherr
PMD.G	Daniel Ory, 1994
PCMV Δ8.9.1	Zufferey, 1997

(Plasmidkarten siehe Anhang)

2.1.12 Antikörper

GFP (FL): sc-8334 rabbit polyclonal IgG, 200 µg/ml	Santa Cruz
--	------------

2.1.13 Bakterienstämme

One Shot Top10®	DH10β™	Invitrogen
Stbl2®	JM109	Invitrogen
Stbl3®	für chem. Transf.	Invitrogen
Stbl4®	ElectroMAX	Invitrogen
HB101	Library Efficiency Comp. Cells	
XL1-Blue		

2.1.14 Zelllinien

BHK-21

Zelltyp:	Niere von Syrischen Hamstern
Ursprung:	Subklon (cl 13) von Nierenzellen von fünf 1 Tag alte Hamster (1961).
Morphologie:	adhärente fibroblastoide Zellen wachsen als <i>monolayer</i>
Medium:	90% Dulbecco's MEM + 10% FBS
Subkultur:	Zellen werden durch Trypsin/EDTA von der Flasche abgelöst. Konfluente Kultur 1:2 bis 1:3 alle 2-4 Tage gesplittet; aussäen mit ca. $0,2 \times 10^5$ Zellen/ cm^2
Verdopplungszeit:	32-50 Stunden

293T

Zelltyp:	humane embryonale Nierenzellen
Ursprung:	von einer humanen embryonalen Niere, transformiert mit Adenovirus Typ 5; klassifiziert als Risikogruppe 1 von der Deutschen Zentralen Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS); Zelllinie auch als HEK-293 bekannt
Morphologie:	adhärente fibroblastoide Zellen wachsen als <i>monolayer</i>
Medium:	90% Dulbecco's MEM + 10% FBS
Subkultur:	Zellen werden durch Schlagen gegen die Flasche abgelöst und die konfluente Kultur 1:5 bis 1:6 alle 2-3 Tage gesplittet; aussäen mit ca. $2.5-3.0 \times 10^5$ Zellen/25 cm^2
Verdopplungszeit:	20-24 Stunden

HeLa

Zelltyp:	humanes Cervixkarzinom
Ursprung:	von einem epitheloiden Cervixkarzinom einer 31 Jahre alten Frau, kontinuierlich kultivierte Zelllinie
Morphologie:	Epithelium-ähnliche Zellen wachsen in Monolayer-Form
Medium:	DMEM + 10% FCS
Subkultur:	konfluente Kultur alle 3-5 Tage. Ablösung der adherent wachsenden Zellen mit Trypsin
Verdopplungszeit:	ca. 48 Stunden
Bezug:	Göttingen

K562

Zelltyp:	Humane chronisch myeloische Leukämie (im Blastenschub)
Original:	Aus der Pleurapunktion einer 53 Jahre alten Frau mit „ <i>chronic myeloid leukemia</i> “ (CML)

Morphologie:	länglich-runde Zellen. Einzellig in Suspension
Medium:	90% RPMI 1640 + 10% FBS
Subkultur:	bei 0,1 – 0,5 Mio Zellen pro ml halten. Jeden 3. Tag 1:3 bis 1:5 „splitten“
Verdopplungszeit:	etwa jede 30 bis 40 Stunden

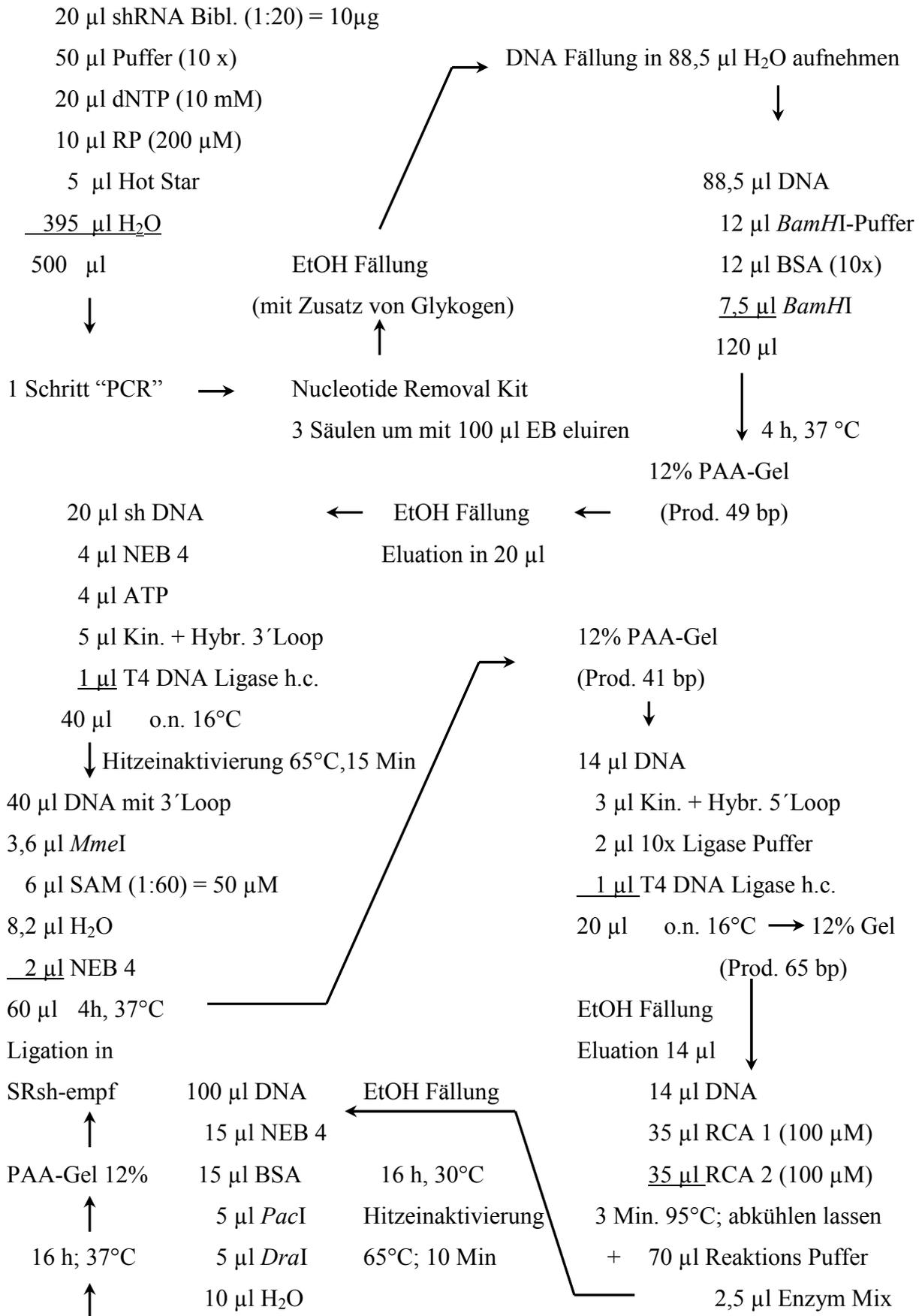
32D

Zelltyp:	Mausknochenmark
Herkunft:	Aus einer Mausknochenmarkkultur einer C3H/HeJ Maus.
Morphologie:	runde Zellen. Einzellig oder in Clustern. Suspensionszellen.
Medium:	90% RPMI 1640 + 10% FBS + 10-20% vol WEHI-Medium der Zelllinie WEHI-3B
Subkultur:	bei 0,02 – 1,5 Mio Zellen pro ml halten. Jeden 2-3. Tag 1:10 bis 1:50 „splitten“
Verdopplungszeit:	etwa jede 15 Stunden

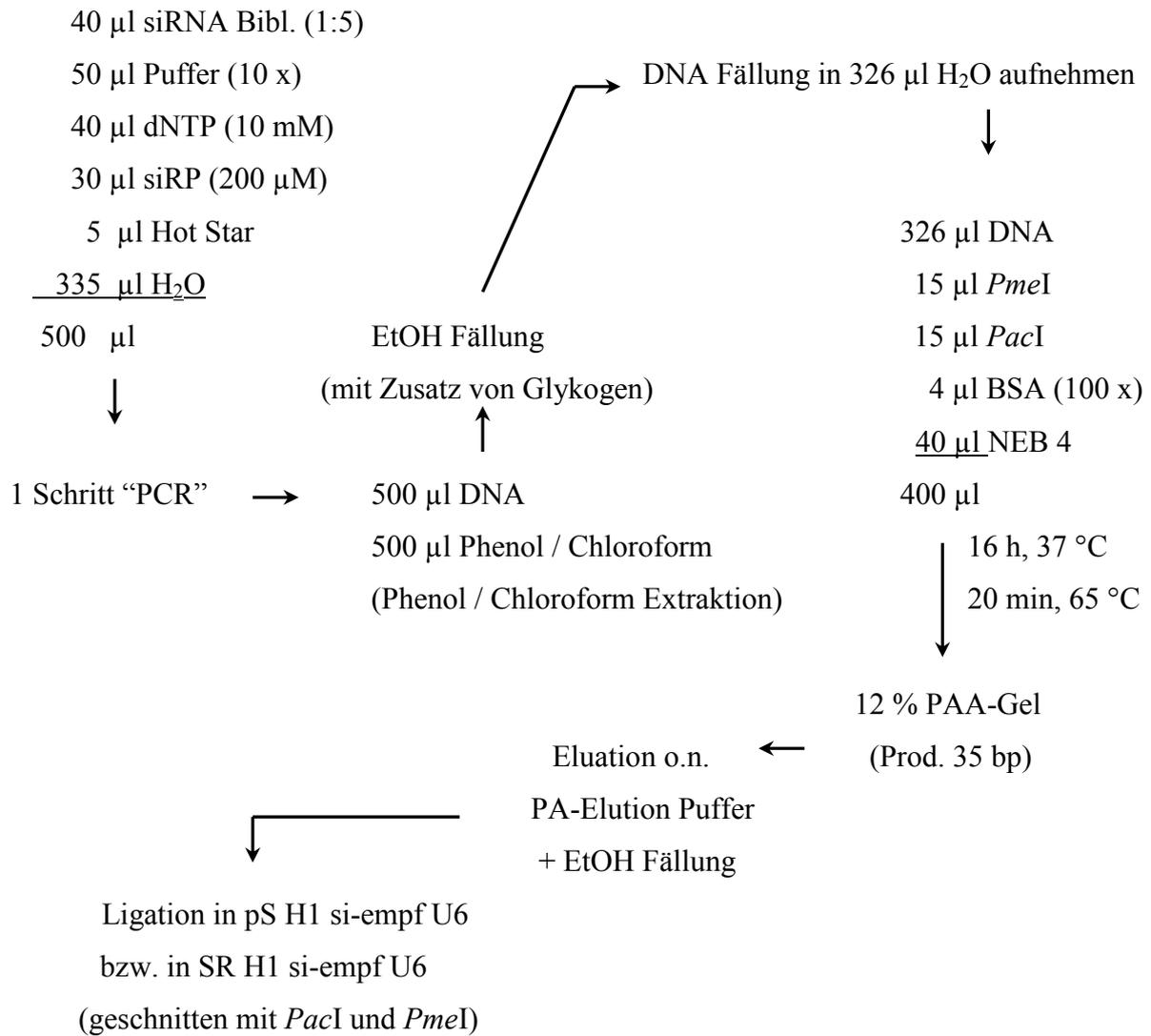
2.1.15 Software

FACS	CellQuest 3.1f
ABIPRISM	<i>Sequence Detection Systems (SDS) Vers. 1.9.1</i> <i>Primer Express Software Vers. 1.5</i>
EXCEL2007	Tabellenkalkulationsprogramm
Sonstige	GeneRunner http://www.generunner.com (Freeware) Vector NTI (Freeware bei Invitrogen) Chromas http://www.technelysium.com.au (Shareware) pDraw32 http://www.aacal.com (Freeware)

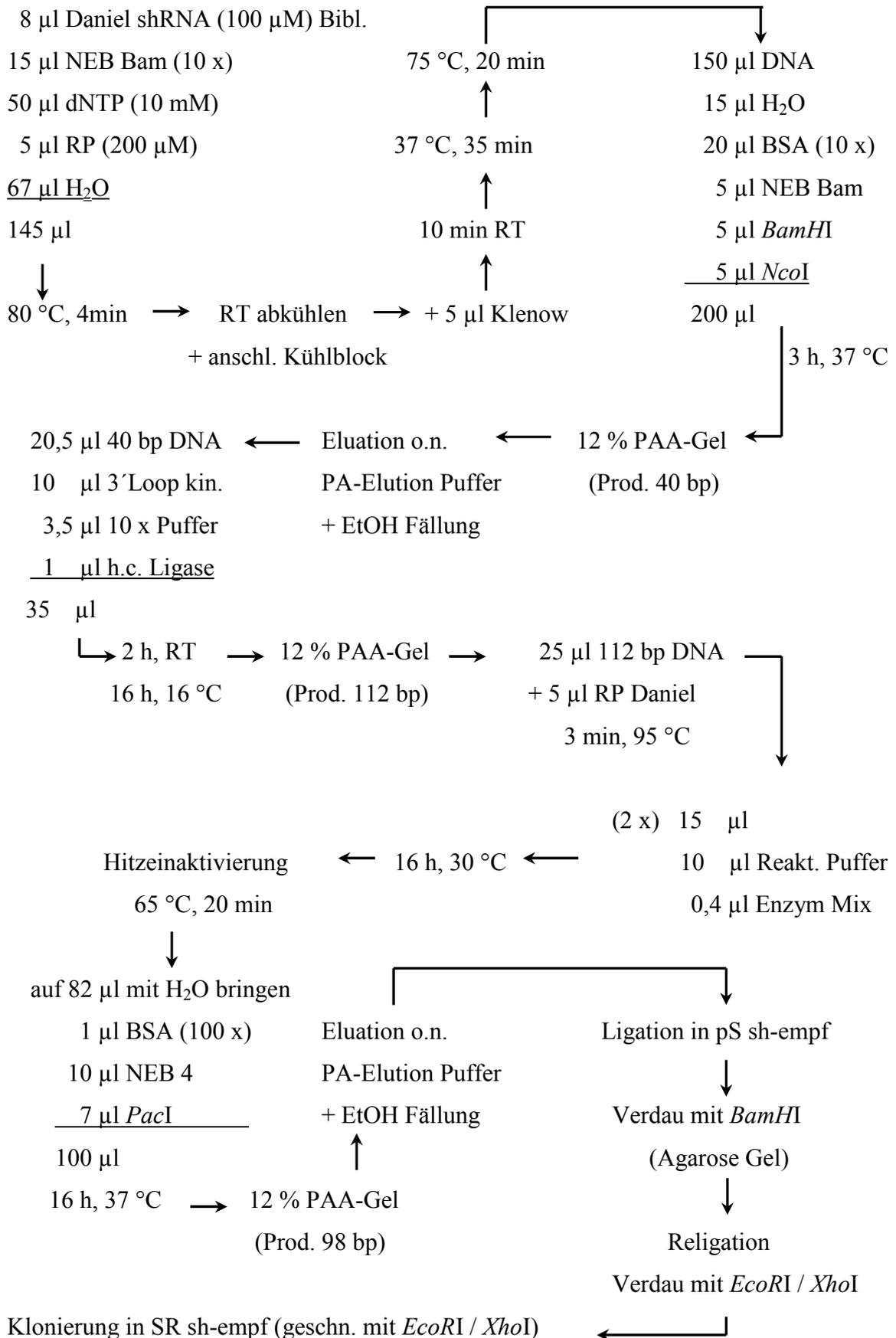
2.2.1 Erste Methode:



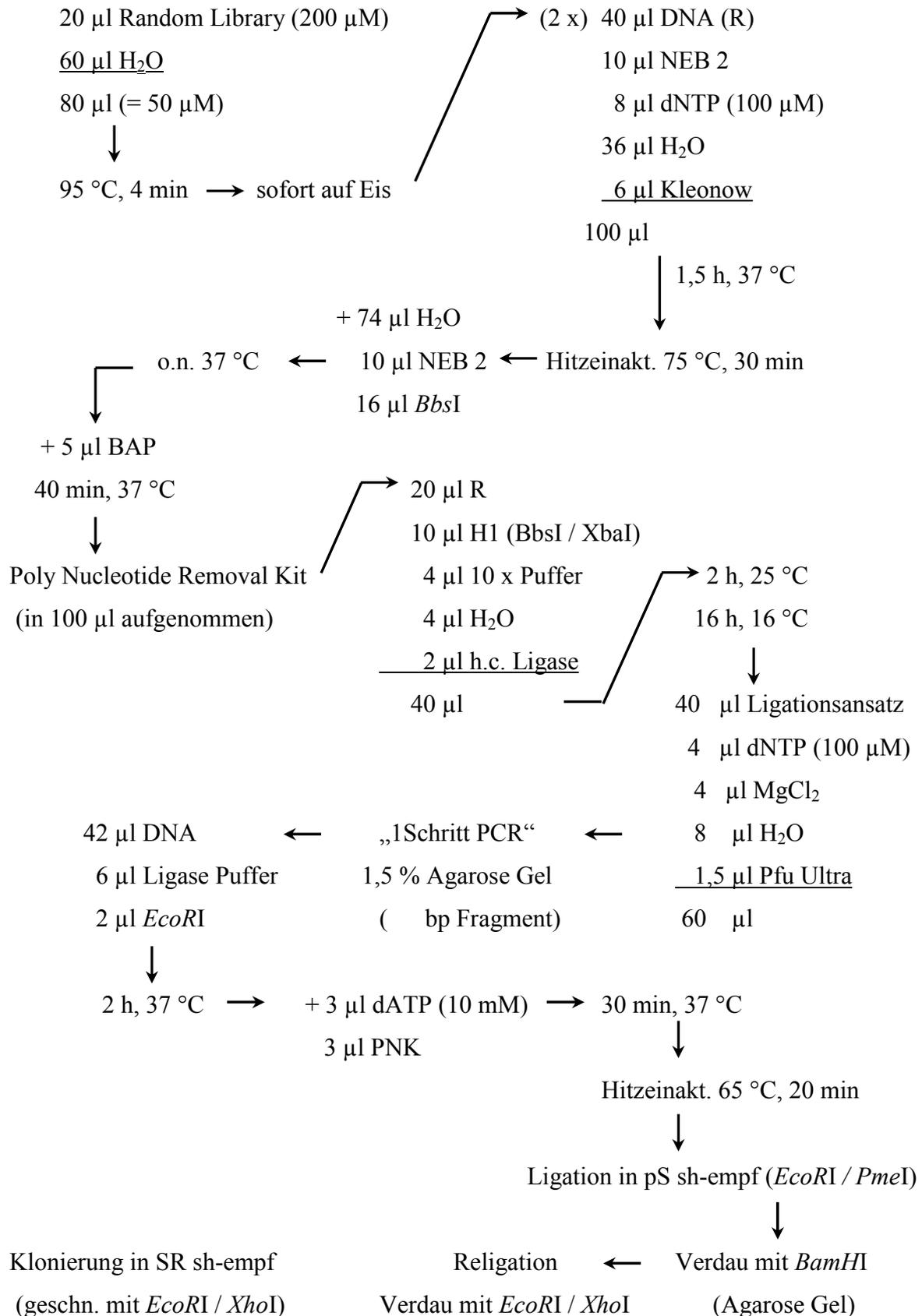
2.2.2 Zweite Methode:



2.2.3 Dritte Methode:



2.2.4 Vierte Methode:



2.2 Angewandte Methoden

2.2.1 Erste Methode:

2.2.1.1 Synthese des komplementären DNA-Stranges mittels 1 Schritt „PCR“

10 µg der shRNA Bibliothek (Ausgangsoligonukleotid) wurden mit 10 µl des 200 µM RP-Primers, Polymerasepuffer sowie 20 µl der 10mM dNTP-Lösung versehen. Da eine Hot-Star Polymerase zur Synthese des Gegenstranges verwendet wurde, wurde folgendes Programm gewählt:

PCR-Programm (1 Schritt)

95 °C	15 min
94 °C	1 min
50 °C	1 min
72 °C	10 min
10 °C	Pause

2.2.1.2 Aufreinigung der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA

Die 66 bp große doppelsträngige DNA wurde mittels dem Nukleotide Removal Kit von Qiagen von den überschüssigen Salzen wie auch der nicht durch Hitze inaktivierbaren Polymerase befreit. Um die Effektivität der Enzyme bei dem nun folgenden Verdau zu erhöhen, wurde eine Ethanolfällung angeschlossen, indem das 100 µl Eluat mit 1 µl Glykogen, 10 µM NaOAc pH 5,5 und 340 µl EtOH 100% versehen wurde. Nach 30 Minuten bei -78 °C wurde die DNA durch eine 20 Min. Zentrifugation bei 13.000 rpm präzipitiert und noch einmal mit 70% EtOH gewaschen. Die Fällung wurde in 88,5 µl Wasser aufgenommen.

2.2.1.3 Verdau mit dem Restriktionsenzym *BamHI*

Die aufgereinigte DNA wurde mit NEB-*BamHI*-Puffer, BSA sowie 7,5 µl *BamHI* (10 U/µl) versehen. Der Verdau wurde bei 37 °C 4 Stunden lang inkubiert. Der Verdau wurde anschließend zur Auftrennung der Fragmente auf ein PAA-Gel geladen.

2.2.1.4 Isolierung des 49 bp großen Produkts durch ein PAA-Gel

Das von der randomisierten Sequenz abgeschnittene 17 bp lange Fragment wurde durch eine Gelelektrophorese mit einem 12 % Polyakrylamidgel von dem 49 bp langen erwünschten

Produkt getrennt, isoliert und eluiert. Durch eine Ethanol-Fällung wurden die überschüssigen Salze entfernt und die DNA in 20 µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.5 Ligation der randomisierten Sequenz mit dem kinasierten und hybridisierten 3'Loop

Der kinasierte und hybridisierte 3'Loop, der die passende Sequenz für die Ligation mit der durch *Bam*HI geschnittenen randomisierten Sequenz hat, wird wie in der Schemazeichnung beschrieben ligiert. Die Ligation wurde bei 16°C, 16 Stunden lang inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 65°C Hitzeinaktiviert.

2.2.1.6 Verdau mit *Mme*I und anschließender PAA-Gelaufreinigung

Das hitzeinaktivierte Ligationsprodukt wurde mit 3,6 µl *Mme*I in Puffer 4 und dem Zusatz von SAM (50 µM) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch die anschließende PAA-Gelaufreinigung wurde das 41 bp große Produkt isoliert.

2.2.1.7 Ligation des 41 bp großen Produktes mit dem kinasierten und hybridisierten 5'Loop

Das aus dem PAA-Gel isolierte Produkt wurde in 14 µl H₂O aufgenommen und mit 3 µl kinasierter und hybridisierter 5'Loop (100 µM) ligiert. Nach der PAA-Gelaufreinigung und anschließender EtOH-Fällung, wurde das 65 bp große Produkt in 14 µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.8 RCA

Der 65 bp große Dumbbell wurde mit 35 µl RCA-Primer 1 und 35 µl RCA-Primer 2 versehen und für 3 min bei 95 °C erhitzt. Nach der anschließenden Abkühlung auf RT wurde Reaktionspuffer und Enzym Mix dazugegeben und die Reaktionsgefäß bei 30 °C, 16 h lang inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Phi 29 Polymerase durch Erhitzung (10 min bei 65 °C) inaktiviert.

2.2.1.9 Verdau des Konatamers mit den Restriktionsenzymen *Pac*I und *Dra*I

Das RCA-Produkt wurde mit 5 µl *Pac*I und 5 µl *Dra*I 16 Stunden lang bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte eine 12% PAA-Gelaufreinigung wobei das 118 bp große Produkt isoliert und aufgereinigt wurde.

2.2.1.10 Ligation in den Vektor und Transformation

Das mit *Pac*I und *Dra*I geschnittene Konstrukt wurde mit dem Vektor pS sh-empf (geschnitten mit *Pac*I/*Dra*I) ligiert (2 h, 25 °C danach 16 h 16 °C). Stbl 4 Bakterien wurden

nach Herstellerangaben mit dem Ligationsprodukt Elektroporiert (1 µl Ligationsprodukt in 20 µl Bakterien). Eine definierte Menge wurde für die Abschätzung der Klonzahl auf eine LB-Amp Platte ausplattiert. Mit dem restlichen Ansatz wurde ein Midi/Maxi Plasmidpräparation durchgeführt.

2.2.1.11 Modifikation des Inserts und umklonierung in lentiviralen Vektor

Die erhaltene DNA der Midi Plasmidpräparation wurde mit *Bam*HI (10 U/µl) verdaut um die überschüssige Loopsequenz herauszuschneiden. Anschließend wurde der Vektor wieder intramolekular ligiert und dann mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Xho*I verdaut. Das 320 bp große Fragment wurde in den Lentiviralen Vektor SRsh-empf das mit denselben Enzymen geschnitten wurde kloniert. Mit dem so erhaltenen lentiviralen Plasmid wurden Virusüberstände hergestellt.

2.2.2 Zweite Methode:

2.2.2.1 Synthese des komplementären DNA-Stranges

4 µg des 64 Nukleotid lange Oligos (200 µM) wurden mit 30 µl Primer (RP-si, 200 µM), Polymerasepuffer sowie mit 10 mM dNTP versehen. Da eine Hot-Star Polymerase zur Synthese des Gegenstranges verwendet wurde, wurde folgendes Programm gewählt (wegen der vorhandenen DNA Menge wurde auf eine Vervielfältigung durch die PCR verzichtet):

PCR-Programm (1Schritt)

95 °C	15 min
53 °C	1 min
72 °C	10 min
10 °C	Pause

2.2.2.2 Aufreinigung der doppelsträngigen DNA

Die 64 bp große nun doppelsträngige DNA wurde mittels dem Nukleotide Removal Kit von Qiagen von den überschüssigen Salzen wie auch der nicht durch Hitze inaktivierbaren Polymerase befreit. Um die Effektivität der Enzyme bei dem nun folgenden Verdau zu erhöhen, wurde eine Ethanol-fällung angeschlossen.

2.2.2.3 Verdau mit 2 Restriktionsenzymen

Die aufgereinigte DNA wurde mit NEB-Puffer 4, BSA sowie 15 μ l DNA *PacI* und *PmeI* (10 U/ μ l) versehen. Der Verdau wurde bei 37 °C 16 h lang inkubiert, bevor die Enzyme bei 65 °C während 20 min inaktiviert wurden.

2.2.2.4 Isolierung des 35 bp großen Produkts durch ein PAA-Gel

Das rechts und links von der randomisierten Sequenz geschnittene 35 bp lange Fragment wurde durch eine Gelelektrophorese mit einem 12 % Polyakrylamidgel von den 16 und 13 bp langen Überhängen getrennt, isoliert und eluiert. Durch eine Ethanol-Fällung wurden die überschüssigen Salze entfernt.

2.2.2.5 Klonierung in den lentiviralen Vektor

Anders als bei der ersten Methode wurde hier das Fragment direkt in den lentiviralen Vektor SR siRNA empf kloniert. Mit dem so fertig gestellten Vektor wurden Viruspartikel hergestellt.

2.2.3 Dritte Methode:

2.2.3.1 Hybridisierung und Klenow mit anschließender Hitzeinaktivierung

μ M des 45 Nukleotid langen Oligonukleotids wurden mit 6,6 μ M Primer (Daniel RP), 3,3 mM dNTP und 10 x NEB Bam Puffer versehen. Eine Erhitzung auf 80 °C für 4 min folgt eine langsame Abkühlung auf RT. Nach einer kurzen Kühlung des Reaktionsgefäßes im Eisbad wurde 5 μ l Klenow hinzugefügt (1 U/ μ l), 10 min bei RT stehen gelassen, und dann bei 37°C für 35 min inkubiert. Um Klenow wieder zu inaktivieren, wurde der Reaktionsansatz anschließend bei 75 °C, 20 min lang erhitzt.

2.2.3.2 Verdau mit zwei Restriktionsenzymen und anschließender Gelelektrophorese

Die doppelsträngige 56 bp lange DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NcoI* für 3 h bei 37 °C verdaut. Das 40 bp lange Fragment wurde anschließend durch eine Gelelektrophorese mit einem 12 % Polyakrylamidgel von den 5 und 11 bp langen Überhängen getrennt, isoliert und eluiert. Durch eine Ethanol-Fällung wurden die überschüssigen Salze entfernt.

2.2.3.3 Ligation an den Loop und Isolierung des Ligationproduktes.

Das aufgereinigte DNA Fragment wurde mit 14,3 μM Loop (Bam 3' Loop) sowie 1 μl (2000 U/ μl) high concentration Ligase versehen und für 3 h bei RT inkubiert. Durch ein 12 % PAA-Gel wird das 112 bp große Dumbbell-Produkt isoliert und aus dem Gel eluiert. Wie im Schritt 2.2.3.2 wurde auch jetzt eine Ethanol-Fällung durchgeführt.

2.2.3.4 RCA

Der 112 bp große Dumbbell wird mit 22,3 μM Primer (RCA-T) versehen und für 3 min bei 95 °C erhitzt. Nach der anschließenden Abkühlung auf RT wurde Reaktionspuffer und Enzym Mix dazugegeben und bei 30 °C, 16 h lang inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Phi 29 Polymerase durch Erhitzung (20 min bei 65 °C) inaktiviert.

2.2.3.5 Verdau des DNA-Konkatemers mit *PacI* und Aufreinigung des Produkts

Das mit der RCA erhaltene hochmolekulare DNA-Konkatemer wurde mit 7 μl (10 U/ μl) *PacI* verdaut. Der Restriktionsverdau wurde bei 37 °C über 16 h durchgeführt. Danach wurde durch ein 12 % PAA Gel das erwünschte Produkt isoliert und eluiert. Nach einer Ethanolfällung wurde das Fragment in den pS Vektor kloniert.

2.2.3.6 Ligation in Vektor und Transformation in Bakterien

Das mit *PacI* geschnittene Konstrukt wurde mit dem Vektor pS sh-empf (geschnitten mit *PacI*) ligiert (2 h, 25 °C danach 16 h 16 °C). Stbl 4 Bakterien wurden nach Herstellerangaben mit dem Ligationprodukt elektroporiert (1 μl Ligationprodukt in 20 μl Bakterien). Eine definierte Menge wurde für die Abschätzung der Klonzahl auf eine LB-Amp Platte ausplattiert. Mit dem restlichen Ansatz wurde eine Midi/Maxi Plasmidpräparation durchgeführt.

2.2.3.7 Modifikation des Inserts und umklonierung in lentiviralen Vektor

Die erhaltene DNA der Midi Plasmidpräparation wurde mit 8 μl (10 U/ μl) *BamHI* verdaut um die überschüssige Loopsequenz herauszuschneiden. Anschließend wurde der Vektor wieder intramolekular ligiert und dann mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* verdaut. Das ca. 320 bp große Fragment wurde in den lentiviralen Vektor SRsh-empf das mit denselben Enzymen geschnitten wurde kloniert. Mit dem so erhaltenen lentiviralen Plasmid wurden Virusüberstände hergestellt.

2.2.4 Vierte Methode:

2.2.4.1 Hybridisierung

Die von der Fa. Biospring bezogenen Oligonukleotide wurden in Wasser aufgenommen, so dass die Endkonzentration 50 μM betrug. Durch eine Erhitzung von 4 min bei 95 °C und dem anschließenden sofortigen Abkühlen des Reaktionsgefäßes mittels eines Eisbades wurde das Oligonukleotid intramolekular hybridisiert.

2.2.4.2 Klenow und Hitzeinaktivierung

Der Hybridisierungsansatz (40 μl) wurde mit Wasser (36 μl), NEB Puffer 2 (10 μl), 80 μM dNTP (8 μl von 100 μM dNTP Mischung) sowie 0,25 U / μg DNA Klenow (6 μl) versehen. Nach 1,5 h Inkubationszeit wurde die Klenowpolymerase durch 30 min bei 75 °C inaktiviert.

2.2.4.3 Verdau und anschließender Dephosphorylierung

Zu der hitzeinaktivierten Klenowreaktion wurde Wasser (74 μl), NEB Puffer 2 (10 μl) und 1,66 U / μg DNA Restriktionsenzym *BbsI* (16 μl) hinzugefügt. Der Verdau verlief über 16 h bei 37 °C. Danach wurden 0,1 U / μg DNA (5 μl) alkaline Phosphatase hinzugefügt und bei 37 °C für 45 min inkubiert.

2.2.4.4 Aufreinigung und Ligation mit dem H1 Promotor

Um die Salze, die alkaline Phosphatase sowie das Restriktionsenzym von der DNA zu trennen wurde die DNA mittels des Nucleotide Removal Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die von der Säule eluierte, aufgereinigte DNA wurde mit dem H1 Promotor (geschnitten mit *BbsI* und *XbaI*) 2 h bei 25 °C und danach über Nacht (16 h) bei 16 °C durch Verwendung der high concentration Ligase ligiert (2 x 40 μl Ligationsansatz).

2.2.4.5 Ein Schritt PCR mit anschließender Isolierung des Produkts

Der Ligationsansatz (40 μl) wurde mit 6,6 μM dNTP (4 μl von 100 μM dNTP Mischung), 1,6 mM MgCl_2 (4 μl einer 25 mM Lösung), für 4/6 des Reaktionsansatzes Pfu Ultra 10 x Puffer sowie die Polymerase Pfu Ultra (1,5 μl) versehen. Die ein Schritt PCR (ohne Zyklen) erfolgte nach der in der Tabelle angegebenen Temperaturen und Zeiten.

PCR-Programm	(1Schritt)	
	95 °C	1 min 30 s
	85 °C	1 min
	82 °C	1 min
	80 °C	1 min
	77 °C	1 min
	75 °C	4 min
	72 °C	4 min
	70 °C	4 min
	68 °C	4 min
	65 °C	4 min
	60 °C	1 min
	55 °C	1 min
	50 °C	1 min
	45 °C	1 min
	10 °C	Pause

Durch eine Elektrophorese mit einem 1,5 % Agarosegel wurde das Produkt (345 bp) isoliert. Die DNA Extraktion aus dem Gel erfolgte nach dem Protokoll des Gel Extraktions Kits von Qiagen.

2.2.4.6 Restriktionsverdau und Kinasierung

Das Eluat der Gelextraktion wurde mit 2 µl *EcoRI* (10 U/µl) für 3 h bei 37 °C verdaut, bevor man dATP (3 µl) und 3 µl (1 U/µl) DNA Polynukleotidkinase dazugab und weitere 30 min bei 37 °C inkubierte. Durch die darauf folgende Hitzeinktivierung (20 min, 65 °C) verhinderte man die Kinasierung des Vektors bei der anschließenden Ligation.

2.2.4.7 Ligation in Vektor und Transformation in Bakterien

Das an einem Ende mit *EcoRI* geschnittene und am anderen Ende mit PNK Kinasierte 345 bp große Konstrukt wurde mit dem Vektor pS sh-empf (geschnitten mit *EcoRI* und *PmeI*) ligiert (2 h 25 °C danach 16 h 16 °C). Stbl 4 Bakterien wurden nach Herstellerangaben mit dem Ligationsprodukt Elektroporiert (1 µl Ligationsprodukt in 20 µl Bakterien). Eine definierte Menge wurde für die Abschätzung der Klonzahl auf eine LB-Amp Platte ausplattiert. Mit dem restlichen Ansatz wurde ein Midi/Maxi Plasmidpräparation durchgeführt.

2.2.4.8 Modifikation des Inserts und Umklonierung in lentiviralen Vektor

Die erhaltene DNA der Midi/Maxi Plasmidpräparation wurde mit U / μg DNA *Bam*HI verdaut um die überschüssige Loopsequenz herauszuschneiden. Anschließend wurde der Vektor wieder intramolekular ligiert und dann mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Xho*I verdaut. Das ca. 320 bp große Fragment wurde in den lentiviralen Vektor, das mit den selben Enzymen geschnitten wurde, kloniert. Mit dem so erhaltenen lentiviralen Plasmid konnte nun Virusüberstände hergestellt werden.

2.3 Allgemeine Methoden

2.3.1 Klonierung (Verdau, Klenow und BAP)

Der Verdau wurde je nach Zielsetzung anders gewählt. Allgemeine Kontrollverdaue aus Minipreparationen wurden wie folgt angesetzt:

8	μl	DNA (von 50 μl Mini-Säulen Eluat entspr. ca. 0,9 μg)
3	μl	NEB Puffer (je nach verwendeten Enzyme)
0,8	μl	<i>Enzym I</i>
0,8	μl	<i>Enzym II</i>
3	μl	BSA 10x
<u>Restliches Volumen</u>		Wasser
30	μl	Gesamtvolumen

Für Präparative Gele mit nachfolgender DNA Extraktion wurde nachfolgendes Protokoll verwendet:

X	μl	DNA (ca. 10 μg)
4	μl	NEB Puffer (je nach verwendeten Enzyme)
1,5	μl	<i>Enzym I</i>
1,5	μl	<i>Enzym II</i>
4	μl	BSA 10x
<u>Restliches Volumen</u>		Wasser
40	μl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde für 2 bis 3 h bei 37 °C inkubiert.

Bei Präparationen, bei denen für die anschließende Ligation die entstandenen Überhänge

nicht aufeinander passten, wurden die sticky ends mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt:

X	µl	Restriktionsansatz
5	µl	MgCl ₂
4	µl	dNTPs (10 mM)
1	µl	<i>Klenow</i>
<u>Restliches Volumen</u>		Wasser
50	µl	Gesamtvolumen

Die Klenow-Polymerase wurde durch eine Inkubation bei 75 °C für 25 min hitzeinaktiviert. Plasmidvektoren (nicht aber die Inserts) wurden durch Zugabe von BAP (1 U/µl) dephosphoryliert (30 min bei 37 °C). Dadurch wurden Religierer (Vektoren ohne Insert) vermieden.

Der Reaktionsansatz wurde mit 5 x Stopppuffer versehen und auf ein Agarose- oder ein Polyakrylamid-Gel aufgetragen.

2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Reinigung, Auftrennung und Identifikation von DNA-Fragmenten ist die Agarosegelelektrophorese eine nicht wegzudenkende Methode geworden.

Da sich die Nukleinsäurefragmente aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld gerichtet bewegen, lassen sie sich mit Hilfe einer Agarose-Gelmatrix ihrer Größe entsprechend auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearen doppelsträngigen DNA-Fragmenten ist umgekehrt proportional der Agarosekonzentration des Gels wie auch ihres Molekulargewichtes.

Durch Ethidiumbromidfärbung können Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht werden, da Ethidiumbromid in doppelsträngige DNA interkaliert und mit den planaren Heterocyclen der Basen wechselwirkt. Bei Betrachtung unter UV-Licht (254 nm oder 366 nm) fluoresziert das Ethidiumbromid intensiv orange.

Sowohl für analytische als auch für präparative Agarosegelelektrophoresen wurden 0,8 %-ige bis 2 %-ige Gele in TBE Puffer mit Ethidiumbromidlösung (1 ng/ml) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor der Auftragung mit 5 x Lade- bzw. Stopppuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von ca. 8 V/cm (bei unseren Gelformaten 130 V) mit TBE als Laufpuffer.

2.3.3 Gelextraktion mit anschließender Ethanol-fällung

Die mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemachten, auf der richtigen Höhe laufenden Banden wurden herausgeschnitten und mit dem Gelextraktions-Kit von Qiagen nach Anleitung aufgereinigt:

1. DNA Fragment aus dem Agarosegel mit einem sauberen Skalpell ausschneiden.
2. Gelstückchen im Eppi wiegen. Das 3 x Volumen vom QG Buffer zu 1 Volumen Gel geben (100 µg = 100 µl)
3. Bei 50 °C für 10 min unter Schütteln inkubieren.
4. Bei DNA Fragmente die < 500 bp und > 4 kb sind, ist es sinnvoll, 1 Gelvolumen Isopropanol zuzusetzen (ca.300 µl).
5. Um die DNA an die Säule zu binden, die Lösung auf die Säule geben und für 30 – 60 s bei 13.000 rpm zentrifugieren.
6. Unteren Auffangbehälter leeren und die Säule wieder darauf stecken.
7. Um restliche evtl. vorhandene Gelrückstände zu entfernen, wird 0,5 ml QG Buffer dazugegeben und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.
8. Zum Waschen 0,75 ml PE Buffer auf die Säule geben und 30 – 60 s zentrifugieren.
9. Inhalt des Auffangtubes verwerfen und eine weitere Minute bei derselben Geschwindigkeit zentrifugieren (zum Trocknen).
10. Auffangtube verwerfen und die Säule in ein frisches 1,5 ml Eppi geben.
11. Um die DNA zu eluieren gibt man 100 µl Wasser direkt auf die Membran, lässt für 1 min stehen und zentrifugiert die im Wasser gelöste DNA in das neue Eppi.

Die in 100 µl eluierte DNA wurde mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 µl Ethanol gemischt und zur besseren Fällung der DNA 15 bis 30 Min bei - 80°C aufbewahrt. Nach der Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, bei 10 °C) wurde der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen und das Pellet zum Waschen in 500 µl 70 %igem Ethanol aufgenommen und für 15 weitere min wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 µl Wasser gelöst. Zur Abschätzung der DNA-Konzentration wurden 2 µl der DNA auf ein 1 bzw 1,5 prozentiges Agarosegel aufgetragen.

2.3.4 Ligationen

Die Ligation von DNA wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1,2	µl	geschnittener Vektor [ca.400 ng] +BAP (+ evtl. Klenow)
6	µl	Insert (+ evtl. Klenow) [4-6 x so viel wie eingesetzter Vektor]
2	µl	10 x T4 DNA Ligase-Puffer
1	µl	T4-DNA-Ligase (je nachdem: high conc. oder norm conc.)
<u>Restliches Volumen</u>		H ₂ O
→	20	µl Gesamtvolumen

Reaktionsansatz entweder für 2 h bei RT oder für 16 h bei 16°C inkubieren.

2.3.5 Transformation (chemisch)

Der Ligationsansatz wurde in TOP-10 (Invitrogen), Stbl 3 (Invitrogen) oder XL1 Blue transformiert. Die nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Ein aliquot Bakterien (100 µl) wurde auf Eis aufgetaut (5-10 min) und mit 10 µL des Ligationsansatzes gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Röhrchen für 45 s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend wieder für 2 min auf Eis gestellt. Alternativ wurde statt des Hitzeschocks die zu transformierenden Bakterien bei 37 °C für 5 min inkubiert, bevor der Ansatz wie davor für 2 min auf Eis kam. Der Bakteriensuspension wurden 300 µL S.O.C.-Medium hinzu pipettiert und für eine Stunde unter schütteln bei 37° inkubiert. Dieser Schritt führt zu einer Regeneration der Bakterien und zur Expression des Resistenzgens. Die transformierten Bakterien wurden nach einer Zentrifugation (3 min, 8000 rpm) auf eine LB-Agarplatte mit 0,1 mg/ml Ampicillin ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.3.6 Transformation (elektrisch)

Für die elektrische Transformation wurden Stbl4 Zellen verwendet, die sich durch eine hohen Klonzahl pro µg eingesetzter DNA ($\times 10^9$ Klone / µg pUC19 Plasmid) und wegen ihrer geringen Rekombinationsrate auszeichnen.

Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 20 µl Aliquots aufgeteilt. Zu diesen Aliquots wurde je 1 µl des Ligationsansatzes pipettiert und der Ansatz nach einer Inkubation von 5 Minuten auf Eis in eine im Eisbad vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Einstellungen für den Biorad Pulser II waren: 1,2 kV, 25 µF, 200 Ω. Der elektrische Puls verlief je nach Salzgehalt und Volumen der Bakteriensuspension normalerweise mit einer Zeitkonstante von etwas unter 5 ms. Gleich nach dem Puls wurde 1 ml SOC-Medium hinzugefügt und die Zellen für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Bakterien bei 6000 x g für 3 Minuten zentrifugiert, 900 µl Überstand abgenommen und das Bakterienpellet in dem verbliebenen Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf einer LB-Agarplatte mit 0,1 mg/ml Ampicillin ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.3.7 Minipräparation

In einer entsprechenden Anzahl von (17 ml) Plastikröhrchen wurden 2 ml LB-Ampicillin (0,1mg/ml) vorgelegt und jedes Röhrchen mit einer von der LB-Agarplatte „gepickten“ Kolonie angeimpft (ca. 6 – 8 Klone pro Konstrukt). Die Röhrchen wurden bei 37 °C im Schüttler für 12 bis 16 Stunden inkubiert. Die Bakterien-Suspension wurde in ein 1,5 ml

Eppendorfgefäß überführt und bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Es wurden sowohl Miniprep Säulen von der Fa. Qiagen wie auch von der Fa. PeqLab verwendet. Im Allgemeinen aber sind die Protokolle gleich: Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 250 µl Resuspendierlösung (Puffer 1 mit zugesetzter RNase) homogenisiert. Gleich im Anschluss wurden mit 250 µl Lysispuffer die Zellen aufgeschlossen. Danach wurden 350 µl Neutralisationspuffer dazugemischt und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die nachfolgenden Zentrifugationen wurden bei 8000 rpm für je 30 s durchgeführt. Der Überstand wurde in eine Qiagensäule überführt und zentrifugiert. Die Säule wurde mit 500 µl PB (Binding Buffer) versehen und zentrifugiert. Nach dem Waschschrift mit PE-Puffer (750 µl) wurde die Säule trocken-zentrifugiert. Um die DNA von der Säule zu lösen, wird diese in ein neues Mikroreaktionsgefäß gestellt, mit 50 µl Wasser versehen, ein paar Minuten stehen gelassen und zentrifugiert. Die DNA wurde für kürzere Zeit im Kühlschrank (5 °C), ansonsten bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.8 Sequenzier-PCR

Zur Überprüfung der Klonierergebnisse und zur Ausschließung von Mutationen wurden die im Restriktionsverdau als positiv erachteten Klone meistens noch sequenziert.

2 µl	Minipräp.- DNA
1 µl	H1-FPrimer (50 pmol/µl)
4 µl	<i>Big Dye</i>
3 µl	Wasser

PCR-Programm (2 Step)

96 °C	1	min	Denaturierung	} 25 Zyklen
96 °C	30	s	Denaturierung	
60 °C	4	min	Elongation	
10 °C			Pause	

Die PCR-Produkte wurden auf einer Sepharose-Säule (Dye-Ex, Qiagen) gereinigt, um die restlichen fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotid-triphosphate (ddNTPs) sowie Polymerase und Salze zu entfernen, die ein Hintergrundrauschen bei der Sequenzierung erzeugen würden.

2.3.9 Maxipräparation

Eine mit dem entsprechenden Plasmid transformierte Bakterien-Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und eine 2-ml-LB-Amp.-Vorkultur angeimpft. Nach 6 h Inkubation wurden die 2 ml in 250 ml LB-Amp. überführt. Nach einer Inkubation bis zu maximal 16 Stunden im Schüttler bei 37 °C wurde aus der Bakteriensuspension die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben der Aufreinigungssäulen (Qiagen) isoliert und aufgereinigt.

1. Die Bakterien der Übernachtskultur werden bei 6.000 x g für 15 Minuten bei 10 °C abzentrifugiert
2. Durch 10 ml P1 Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) wird das Bakterienpellet resuspendiert
3. Vom Buffer P2 (1% SDS, 0,2 M NaOH) werden 10 ml dazugegeben und durch 6 maliges Umschwenken vorsichtig gemischt. → 5 min Inkubationszeit bei RT
4. Vom Buffer P3 (3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5) werden 10 ml dazugegeben und schnell durch 4-6 maliges Umschwenken vermischt. → 20 min Inkubationszeit auf Eis.
5. Bei 16.000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugieren. Überstand auf eine equilibrierte Säule geben.
6. Die QIAGEN tip 500 wird mit 7 ml QBT Buffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol, 0,15% (v/v) Triton X-100) equilibriert.
7. Die DNA Lösung aus Schritt 5 auf die Säule geben und durchlaufen lassen.
8. Die QIAGEN Säule wird 2 x mit je 30 ml QC Buffer (1,0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol) gewaschen.
9. Durch die Zugabe von 15 ml QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 15% Ethanol) Buffer wird die DNA in ein 50 ml Falkontube eluiert.
10. Durch Zugabe von 12 ml Isopropanol wird die DNA gefällt. Mischen und bei > 15.000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugieren. Anschließend vorsichtig dekantieren.
11. Das DNA-Pellet wird mit 2 ml 70 % EtOH gewaschen und erneut bei > 15.000 g für 10 min zentrifugiert und anschließend erneut dekantiert.
12. Das gewaschene Pellet wird für etwa 10 min bei RT getrocknet und dann mit 300 µl Wasser versehen.
13. Die Bestimmung der Plasmidkonzentration erfolgte im Spektralphotometer .
Die Ausbeute an Plasmid-DNA liegt bei dieser Aufarbeitungsmethode im Allgemeinen zwischen 300-600 µg.

2.3.10 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Zur photochemischen Konzentrationsbestimmung von DNA wurde die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm gemessen. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Hierbei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Nicht basengepaarte Nukleinsäuren besitzen eine höhere Absorption, ein Effekt, der als Hyperchromie bezeichnet wird. Es gelten daher für RNA sowie einzelsträngige DNA andere Werte. 1 OD₂₆₀ entspricht 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder 33 µg/ml RNA. Aussagen über die Reinheit der DNA-Lösung konnte bei zusätzlicher Messung der Extinktion bei 280 nm getroffen werden. Der Quotient E₂₆₀/E₂₈₀ liegt bei geringen Proteinverunreinigungen der DNA bei 1,7 – 1,9 und für RNA zwischen 1,9 – 2,1. Sehr geringe DNA-Konzentrationen wurden im Agarosegel durch Vergleich mit der bekannten Menge der Markerbande abgeschätzt.

Die Messung der DNA Konzentration erfolgte mit einem Spektrometer. Für die Messung wurde 1 µl DNA in 99 µl aqua dest. aufgenommen und in eine Quarzküvette überführt. Vor der Messung wurden folgende Einstellungen gewählt: Verdünnungsfaktor 100; OD = 50 für dsDNA.

2.3.11 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Eine Vorkultur mit 20 ml SOB (komplett) (ohne Antibiotika) wurde mit einer Kolonie (HB101, XL1-Blue) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1-2 ml der Vorkultur wurde für das Animpfen von 250 ml SOB mit 1,25 ml MgCl₂ und 1,25 ml MgSO₄ verwendet. Diese Hauptkultur wurde bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (bei 600 nm Wellenlänge) von 0,5 (gegen SOB) geschüttelt. Die Fähigkeit der Bakterien DNA aufzunehmen (Kompetenz) ist in diesem OD-Bereich optimal, da sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Diese Kultur wurde auf 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt, 10 Min auf Eis gestellt und 10 Min bei 2500 x g (4°C) abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis ausgeführt und Zentrifugationen bei 2500 x g bei 4 °C getätigt. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterienpellets vereinigt und in TP resuspendiert (steril). Nach einer 10-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit TP-DMSO resuspendiert. Es wurden 100-µl-Aliquots in Eppendorfgefäße angelegt und diese gleich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

TP mit 7 % DMSO (17,4 ml + 2,8 ml) Erst warm anmischen, dann auf Eis stellen.

<u>SOB (1000 ml)</u> (Kühlraum)	<u>Transformationspuffer (TP) (1000 ml)</u> (Kühlraum)	
20,0 g Trypton	2,4 g Hepes	10 mM
5,0 g Hefe Extrakt	2,2 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O	15 mM
0,5 g NaCl	18,6 g KCl	250 mM
2,5 ml 1M KCl	mit 1 N KOH auf pH 6,7 einstellen	
Mit 200 µl 5N NaOH auf pH 7 einstellen	10,9 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O	55 mM
Autoklavieren	ad 1000 ml, sterilfiltrieren	
Vor Gebrauch 5 ml 2 M MgCl ₂ und 5 ml 2M MgSO ₄ zufügen	<u>2 M MgCl₂</u> 102 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O (nicht das Wasserfreie!) Ad 250 ml mit H ₂ O → autoklavieren	
	<u>2 M MgSO₄</u> 123,24 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O Ad 250 ml mit H ₂ O → autoklavieren	

2.3.12 Transfektion mit Lipofectamine 2000 Invitrogen (bzw. Fugene von Roche)

In einer 24-*well*-Platte werden pro *well*, einen Tag oder 16 Stunden vor der Transfektion, 2×10^5 HeLa-Zellen pro *well* in DMEM + 10% FCS ausgesät.

Pipettierschema:

	Mock	LNSN	MSCV	LNSN + MSCV	pSuper- shRNA Konstrukte
MSCVhuPU.1- IRES-EGFP	/	/	1µl	1µl	1µl
LNSN	/	1µl	/	1µl	1µl
pSupershRNA	/	/	/	/	1µl
Lipofectamine		3µl	3µl	3µl	6µl

Die DNA-Konzentration der MSCV und pSuper-shRNA-Vektoren betrug jeweils 1µg/µl.

Die DNA Konzentration von LNSN betrug 0,1µg/µl

Die jeweilige DNA-Kombination wurde in 50 µl DMEM ohne FCS in einem Eppendorfreaktionsgefäß zusammenpipettiert. Die benötigte Menge Lipofectamine wurde mit DMEM ohne FCS auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht und 5 Min bei RT stengelassen. Für 1 µg DNA wurden 3 µl Lipofectamine benötigt. Beide Ansätze wurden zusammenpipettiert und zur Bildung der DNA-Lipidkomplexe für 20 Min. bei RT stengelassen. Das alte Medium wurde von den Zellen abgenommen, 400 µl neues Medium (DMEM mit FCS) wurden je *well* vorgelegt und 100 µl des DNAmix in das richtige *well* vorsichtig verteilt. In die Kontrolle (*mock*) kamen nur 500 µl Medium hinein. Die Platte wurde 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zwei Stunden vor der FACS-Messung wurden die Zellen, die mit dem LNSN-Plasmid transfiziert wurden, mit dem humanem *anti-nerve-growth-factor-receptor*-Antikörper markiert. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen, 150 µl *cell dissociation buffer* in jedes *well* pipettiert und für 5 bis 10 Min. bei RT inkubiert, um die Zellen abzulösen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und für 5 Min. bei 1500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die richtigen Röhrchen wurden mit dem LNGFR-Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde 1:20 verdünnt (5 µl AK + 45µl PBS pro Röhrchen), dabei wurde der ungefähr 50 µl zurückfließende Überstand bei der Verdünnung mit berücksichtigt. Nach einer Inkubation von 20 Min. wurde zum Auswaschen des nicht gebundenen Antikörpers die

Röhrchen mit PBS aufgefüllt und 5 Min bei 1000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet für die FACS-Messung in 300 µl PBS aufgenommen.

2.3.13 Kryokonservierung von Zellen

Für Langzeitkonservierung von Zellen :

5-10 x 10 ⁶	Zellen in Medium
800µl	z.B. DMEM
800µl	FCS oder FBS (100%)
150µl	DMSO (99,7%)

Die Zellsuspension mischen und einen Tag unter Verwendung der Einfrierboxen bei -70 bis -80°C stellen, erst danach in flüssigem Stickstoff lagern.

2.3.16 Calcium-Phosphat-Transfektion

Für die Virusproduktion wurden sechs 175cm²-Zellkulturflaschen mit 0,01% Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet und 5 Min stehengelassen, das PLL wurde abgenommen und die Kulturflasche mit ca. 10 ml PBS gewaschen. Die Flaschen wurden zwei Stunden unter der Sterilwerkbank zum Trocknen stehengelassen. In jede Flasche wurden 5 x 10⁶ 293T-Zellen in 25 ml DMEM + 10% FCS ausgesät.*

*293T-Zellen wurden durch ständiges Schwenken von der Kulturflasche gelöst und bei 900 UpM für 3 Min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zuerst in 1 ml Medium aufgenommen und mit einer 1ml Pipette resuspendiert. Anschließend wurden 24 ml Medium hinzugefügt und nochmals mit einer 10 ml Pipette resuspendieren.

Nach drei Tagen erfolgte die Transfektion, wenn die Konfluenz ca. 80-90 % betrug.

SR-SnaBI-SUPER-Konstrukt zur Bildung der shRNA z.B. gl4 (2x)

a)	160	µg	oben genannte DNA
	120	µg	pCMV 8.9.1
	80	µg	pMD.G
	488	µl	2M CaCl ₂
	x	µl	Wasser
	4000 µl Gesamtvolumen		

b) 6 x 2000 µl 2x HBS wurden auf 14-ml-Röhrchen verteilt und 2 ml der obigen DNA/CaCl₂-Mischung tropfenweise unter ständiger Luftzufuhr mit einer zweiten Pipette dazugeben und anschließend zum Präzipitieren für 20 Min stengelassen.

c) 100 ml DMEM mit 10% FCS wurden mit 28,6 µl 0,1 M Chloroquine versehen und in einer kleineren Kulturflasche zusammengemischt.

Das alte Medium wurde von den Zellen abgenommen und 12 ml von c) und 4ml von b) hinzu pipettiert und die Flasche leicht geschwenkt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, und 5% CO₂ für ca. 16 h über Nacht. Am nächsten Tag wurde das alte Medium von den Zellen entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen (nicht direkt auf die Zellen pipettieren, da sich die Zellen leicht ablösen) und 16 ml DMEM + 10% FCS mit 0,01 M Natriumbutyrat auf die Zellen gegeben (160 ml + 1600 µl 1M Butyrate). Nach 8 Stunden wurde der Überstand entfernt und pro Flasche 16 ml RPMI ohne FCS auf die Zellen gegeben und über Nacht weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und bei 4°C aufbewahrt und wieder 16 ml RPMI ohne FCS dazu gegeben. Nach 8 Stunden Inkubation wurde der zweite Zellkulturüberstand entnommen und mit neuem Medium ersetzt. Die gesammelten Überstände (64ml) wurden in 50-ml-Falconröhrchen bei 1000 UpM für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,45-µm-Filter (Millipore) mit einer 50-ml-Injektionsspritze in eine Zellkulturflasche gedrückt, um restliche Zellen und größere Partikel zu entfernen.

2.3.15 Konzentrierung des Virus

64 ml Virusüberstand wurden auf 2 Beckman-Plastikzentrifugenröhrchen verteilt und diese in Ultrazentrifugen-Röhrchen gesteckt. Die Zentrifugation lief bei 10.000 UpM, bei 10°C über Nacht (16h). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zentrifugenröhrchen über Kopf auf ein steriles Tuch gestellt, um das restliche Medium zu entfernen. Das Viruspellet, das mit bloßem Auge nicht zu sehen ist, wurde in 150 µl PBS pro Röhrchen aufgenommen und einige Minuten geschwenkt. In 50-µl-Aliquots wurde das Virus bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.16 Titerbestimmung

Zur Feststellung der Transduktionseffizienz des Viruskonzentrats wurden 1 x 10⁵ K562- oder U937-Zellen in einem Volumen von 200 µl RPMI + 10% FCS pro Well einer 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät. Pro well wurden 2 µl Protaminsulfat (100x) hinzupipettiert und mit je 1 µl bzw. 10 µl des Virus transduziert. Einen Tag später wurden die

Zellen in eine 24-*well*-Platte mit 1 ml Medium überführt und für weitere drei Tage bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Am vierten Tag wurde der prozentuale Anteil der transduzierten Zellen durch eine FACS-Messung ermittelt und der Titer als die Anzahl der transduzierten Zellen pro ml Viruskonzentrat angegeben.

Berechnung:

$$(A - 0) \times 10^5 \text{ Zellen} \times 1000 \mu\text{l} / (B) = \text{Transfizierte Zellen pro ml Virus}$$

A = Relativer Anteil transduzierter rot-fluoreszierender Zellen

B = 1 (1µl Virus) oder 10 (10µl Virus).

Der Titer wurde als Mittelwert der Transduktion mit 1 µl und 10 µl Virus angegeben.

2.3.17 Transduktion der BaF 4h gfp-Zellen mit anti-EGFP -shRNA-Virus bzw. 32D Zellen mit der Bibliotheks-shRNA-Virus

Durch die stabile Transduktion von BaF 4h gfp-Zellen, mit den anti-EGFP-shRNA-kodierendem Virus wurde die Effizienz der Bibliothek nachgewiesen. Für die Transduktion wurden 1×10^5 Zellen (in RPMI ohne FCS) pro *well* in einer 96-*well*-Platte ausgesät und mit 3 µl Protaminsulfat (100x) gemischt. 50 µl Virus wurden hinzugefügt und der Ansatz mit RPMI ohne FCS auf 250 µl gebracht. Für bessere Transduktionsergebnisse wurde die 48-*well*-Platte nun 90 Minuten bei 32 °C und 2500 U/min zentrifugiert. Anschließend wird die Platte 4 Stunden im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Die zweite Transduktion erfolgte am Abend mit weiteren 50 µl Virus je Ansatz. Wieder wurde bei 37 °C und 2500 U/min für 90 Minuten zentrifugiert. Vor der Inkubation über Nacht im 37 °C Brutschrank (mit 5% CO₂) wurden noch 300 µl RPMI (mit FCS) zu den Zellen gegeben.

Am nächsten Tag (Tag 1) werden die Zellen in eine kleine Zellkulturflasche überführt und mit RPMI (mit FCS) auf insgesamt 11 ml gebracht. 1 ml der gut resuspendierten Zellschlammung wurde wieder entnommen und in eine 48-*well*-Platte gegeben, um davon die Zellzahl an den Tagen 4, 6, 8, 11 und 13 zu ermitteln.

Vier Tage nach der Transduktion wurde die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Am Tag 5 und 6 wurden die Proteine aus $0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen isoliert, um die Reduktion der Proteinexpression auf einem *Western Blot* nachzuweisen. Ab Tag 12 wurden die Zellen noch einmal mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.3.18 RNA-Isolierung aus transduzierten 32D-Zellen

Die Total-RNA wurde am vierten Tag nach Transduktion der 32D-Zellen isoliert. Dafür wurden $0,1 - 1 \times 10^7$ Zellen pelettiert, mit PBS gewaschen und in 1ml Trizol resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform wurde kurz gevortext und 10 Min. bei RT stehengelassen. Anschließend wurde bei 14000 UpM bei 10°C 15 Minuten lang zentrifugiert. In der oberen Phase befand sich die RNA, die in ein neues Eppi überführt wurde und mit 500 μ l Isopropanol vermischt und für 10 Min bei RT präzipitiert wurde. Danach folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 14000 UpM bei 10°C. Das DNA/RNA-Pellet wurde mit 200 μ l 70%igem Alkohol gewaschen und der Überstand nach der Zentrifugation (5 Min.; 14.000 U/min) verworfen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 11 μ l Wasser gelöst und bei -70°C gelagert oder gleich mit *DNaseI* verdaut.

2.3.19 *DNaseI*-Verdau

Zum entfernen der restlichen genomischen DNA musste die RNA mit *DNaseI* behandelt werden.

11,0 μ l	Total RNA
4,3 μ l	<i>First strand buffer</i> (5x)
0,9 μ l	0,1M Dithiothreitol (DTT)
3,2 μ l	<i>DNaseI</i>
0,6 μ l	RNasin (RNase-Inhibitor)

Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde die RNA gereinigt. Dazu wurden 30 μ l Wasser und 50 μ l Phenol/Chloroform beigemischt und 5 Min. bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppi überführt, mit 150 μ l Ethanol und 1 μ l Glykogen gemischt und für eine Stunde oder über Nacht bei -70°C aufbewahrt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 13000 UpM und 10°C wurde das RNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, d.h. bei 7500 UpM, bei 10°C zentrifugiert. Das Pellet wurde nach kurzem trocken in 12 μ l Wasser resuspendiert und die RNA-Konzentration bestimmt.

2.3.20 cDNA Synthese

RNA 10 Minuten bei 70 °C inkubieren und danach schnell auf Eis abkühlen.

4 µl	<i>First strand buffer</i> (5x)
2 µl	0,1M DTT
2 µl	dNTP(10mM)
1 µl	Primer pd(N) ₆ (<i>random primer</i> 100pmol/µl)
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200U)
11 µl	RNA (1 µg)

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf 100 µl mit reinem (Rnase-freiem) Wasser aufgefüllt. (Zur Inaktivierung der M-MLV-RT wurde der Reaktionsansatz bei 70°C für 10 min. inkubiert.) Die cDNA wurde entweder bei -20°C gelagert oder gleich für die RTQ verwendet.

2.3.21 Realtime Quantitative PCR

Die *Realtime PCR* (RTQ-PCR) ermöglicht mit spezifischen fluoreszierenden Sonden sowie mit 5'- sowie 3'-flankierenden Primern die Quantifizierung von cDNA und DNA. Das Prinzip der RTQ-PCR baut auf den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen zwei Fluorochromen auf (Cardullo et al. 1988). Ein Fluoreszenzfarbstoff (F1), angeregt mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1), strahlt die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge (E1) ab. Ein in ausreichender Nähe platziertes Fluorochrom (F2), dessen Absorptionsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum (E1) entspricht, nimmt das Licht im E1 auf und gibt sie als Licht im E2 ab. F1 ist als Reporter und F2 als *quencher* (Auslöscher) bekannt. Ein spezifisches komplementäres Oligonukleotid (Sonde), das auf Sequenzdaten, der zu quantifizierenden DNA, basiert, ist 5' mit einem Reporter und 3' mit einem *quencher* ausgestattet. Da beide Farbstoffe nahe beieinander liegen, findet FRET statt. Zur Amplifizierung der DNA wurde AmpliTaq Gold® DNA Polymerase verwendet, die eine 5'-Nuklease-Aktivität besitzt. Bei der Elongation trifft die Polymerase auf die 5'-Seite der Sonde, dabei wird der Reporterfarbstoff von der Sonde exonukleolytisch entfernt und emittiert nach Anregung Licht im E1. Nach jedem Amplifikationszyklus wird der Reaktionsansatz durch einen Laser induziert und die Fluoreszenz des freigelassenen Reporterfarbstoffes erfasst. Die Fluoreszenzzunahme während der PCR-Zyklen ist proportional zum Zuwachs der amplifizierten DNA. Das 3'-Ende der Sonde ist blockiert, so dass es nicht zur Verlängerung der Sonde kommt.

In den frühen PCR-Runden kommt eine weitgehend exponentielle Amplifikation der *Template-DNA* zustande. Da Primer und Nukleotide im Laufe der Zyklen verbraucht werden und die Polymerase sowie Nukleotide wegen der hohen Temperaturen inaktiv werden, kommt es zur Sättigung und schließlich zum Abbruch der Vermehrung. Als Richtwert wird die Zellzykluszahl erfasst, bei der sich das Fluoreszenzsignal exponentiell vom Hintergrund abhebt, auch *cycle threshold* (*ct*, Zyklenschwelle) genannt. Die Quantifizierung erfolgt mit Standardkurven. Dafür werden parallel die *ct*-Werte für bekannte DNA-Konzentrationen ermittelt. Die *ct*-Werte der Proben werden auf der Standardkurve der entsprechenden DNA-Konzentration zugeordnet und die ursprüngliche DNA-Menge bestimmt.

Zur Normalisierung der eingesetzten DNA-Menge wird das GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), ein Haushalts-Gen, das in allen Zellen eines Zelltyps in gleicher Weise transkribiert wird, in den Proben bestimmt. Durch den GAPDH-Wert kann die Zellzahl bestimmt werden.

Der Quotient zwischen dem OAS-Wert und dem GAPDH-Wert einer Probe ergibt den relativen Wert der cDNA bzw. mRNA im Vergleich zu einer Kontrolle. Als Kontrollen wurden RNA aus untransduzierten sowie mit dem SR gl4-Virus transduzierten 32D-Zellen mitgeführt und als Referenz gleich eingesetzt.

Die Konzentrationen der *Reverse-* und *Forward-Primer* wurden auf 300 pM eingestellt. Von diesen Stammlösungen wurde ein verdünntes Primergemisch hergestellt. Dazu wurden je 50 µl vom FP und RP in 900 µl bidest. Wasser gemischt (1:10-Verdünnung). Die Sonde wurde ebenfalls von der Stammlösung ausgehend 1:10 verdünnt.

Von den 1:10-Verdünnungen wurde eine Mixtur hergestellt.

5 µl Primer
8 µl Sonde
40 µl 2x Mastermix (beinhaltet AmpliTaq Gold®)
53 µl Gesamt

Die gesamte cDNA wurde auf die benötigte Menge an Proben mit bidest. Wasser verdünnt (4 Proben = 108 µl Gesamtvolumen). Für einen Ansatz wurden 27 µl cDNA mit 53 µl der Mixtur gut gemischt und auf drei *wells* einer speziellen 96-*well*-Platte verteilt (25µl/*well*). Verdünnungsreihen für die GAPDH- Standardreihen wurden mit der cDNA, die separat von Total-RNA aus nicht transduzierten U937-Zellen isoliert und synthetisiert wurde, hergestellt. Die jeweilige Verdünnung wurde mit 53 µl der Mixtur gut gemischt und je 25 µl auf drei

wells verteilt.

Verdünnungsreihe für GAPDH-Standardreihe in (μ l):

cDNA	Wasser	Zellzahl
27	0	3500
22,5	4,5	3000
18,75	8,25	2500
11,25	15,75	1500
3,75	23,25	500
0	27	0

2.3.22 Proteinisolierung von Ganzzelllysaten

Für die Kernlysate wurden zwischen 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Pellet in 4 ml Puffer A resuspendiert. Es erfolgte eine 15 Minütige Inkubation auf Eis. Nach dieser Zeit wurden 250 μ l NP-40 hinzugefügt und 10 Sekunden gevortext. Nun wurde bei 3500 UpM 3 Min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in 100 μ l Puffer C resuspendiert und ein Eppi überführt. Es erfolgte eine weitere 15 Minütige Inkubation auf Eis, wobei alle 5 Minuten der Ansatz gevortext wurde. Nun wurden die Eppis 5 Min bei 4 °C und 14000 UpM zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet bei – 80 °C eingefroren. 5 μ l wurde vorher für die Proteinmessung (Bradford) gesondert aufbewahrt.

Puffer A

10 mM HEPES
10 mM KCl
0,1 mM EDTA
0,1 mM EGTA
1 mM DTT

Puffer C

20 mM HEPES
0,4 M NaCl
1 mM EDTA
1mM EGTA
1mM DTT

Jeweils Proteinase-Inhibitoren hinzugeben. Gebrauchslösung 1 Tablette in 10 ml.

2.3.23 Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteinassay basiert auf der Veränderung der Farbabsorption des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, die nach Bindung an Proteine im sauren Milieu erfolgt (Bradford et al.,1976). Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei von 465 zu 595 nm, wahrscheinlich weil der Farbstoff in seiner unprotonierten anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung stabilisiert wird. Coomassie-Brilliant-Blue ist ein Triphenylmethanfarbstoff,

der unspezifisch an kationische und nicht polare, hydrophobe Seitenketten der Proteine bindet. Am wichtigsten sind die Wechselwirkungen mit Arginin, weniger die mit Lysin, Histidin, Tyrosin und Phenylalanin.

Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurden durch dieses Verfahren ermittelt. 5 µl der Extrakte wurden unverdünnt mit 795 µl Wasser und 200 µl Biorad-Dye-Reagent-Concentrate (Fa. Biorad) versetzt. Die Proben wurden mit dem Vortexer gut durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Blaufärbung der Probe wurde bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Formel berechnet:

$$\text{Proteinextinktionskoeffizienten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{OD} = \mu\text{g} / \text{ml Protein}$$

5 µl	Proteinextrakt
795 µl	Dest. Wasser
200 µl	<i>Bio RAD protein dye</i>

Das Spektrometer wurde vor der Messung mit 800 µl und 200 µl *protein dye* auf Null gestellt.

Berechnung der Konzentration:	$\text{OD} \times \epsilon \times 200$	=	µg/ml
Extinktionskoeffizient von Proteinen:	ϵ	=	35.7
Verdünnungsfaktor		=	200

2.3.24 Auftrennung der Proteine durch SDS PAGE

Die Polyacrylamidgelelektrophorese macht man sich zunutze, um Proteingemische aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit in einem angelegten elektrischen Feld zu trennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von Größe, Form und Solvatisierungsgrad des Moleküls ab. Bei der PAGE benutzt man Acrylamid als festes Medium für die Auftrennung der Proteine, welche sowohl auf der Molekülgröße als auch auf der elektrophoretischen Beweglichkeit beruht.

Das Gel besteht aus auspolymerisiertem Acrylamid, das durch N,N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt ist. Die hier verwendeten Gele haben einen Polymerisationsgrad von 10%. Die Polymerisation erfolgt durch Zugabe von Ammoniumperoxidisulfat, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) dient als Radikalstabilisator. Durch einen netzartigen Siebeffekt wandern dann größere Moleküle langsamer als kleine.

Bei der SDS-PAGE wird die Elektrophorese in Gegenwart von denaturierenden Reagentien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) durchgeführt. Die reduzierende Eigenschaft von DTT hat ein Aufbrechen von Disulfidbrücken zur Folge. SDS hingegen

lagert sich so an Proteine an, dass diese in ihre Untereinheiten dissoziieren und denaturiert werden.

Die so entstandenen Aminosäurenketten sind gestreckt und bilden Ellipsoide. Da SDS in einem konstanten Verhältnis (Moleküle SDS/g Protein) an das Protein bindet und seine Ladung die des Proteins überdeckt, haben alle Proteine nahezu das gleiche Ladungs-Masse-Verhältnis. Die Trennung der Proteine bei der Elektrophorese erfolgt demnach nur nach ihrer molaren Masse. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zu dem Logarithmus ihrer molaren Massen. Anhand eines definierten Molekulargewichtstandards, der mit auf das Gel aufgetragen wird, kann so die molekulare Masse abgeschätzt werden. Die aufgetrennten Proteine werden anschließend durch Western Blot als Proteinbanden auf einem Röntgenfilm dargestellt.

10 %-iges Trenngel (1 gr. Gel)

10 ml 40 % Acrylamid
 10 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
 0 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
 19,4 ml H₂O
 200 µl 10 %-ige APS-Lsg.
 400 µl 10 %-ige SDS-Lsg.
 20 µl TEMED
 40 ml

4 %-iges Sammelgel (1 gr. Gel)

2 ml 40 % Acrylamid
 0 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
 5 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
 12,5 ml H₂O
 250 µl 10 %-ige APS-Lsg.
 200 µl 10 %-ige SDS-Lsg.
 25 µl TEMED
 20 ml

7,5 %-iges Trenngel (1 gr. Gele)

7,5 ml 40 % Acrylamid
 10 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
 21,8 ml H₂O
 250 µl 10 %-ige APS-Lsg.
 500 µl 10 %-ige SDS-Lsg.
 25 µl TEMED
 40 ml

3x Probenauftragspuffer

2 % SDS
 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8
 15 mM DTT
 20 % Glycerol
 0,25 % Bromphenolblau
 5 % β-Mercaptoethanol

5 x SDS- Laufpuffer (hier 1x)

25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,1% SDS

Das Gel wurde bei 60V über Nacht laufen gelassen. Der Gellauf wurde gestoppt, als die Bromphenolbande den unteren Rand erreichte. Das Gel wurde vorsichtig zwischen den Glasplatten entnommen und das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt.

2.3.25 Western Blot

Der Western Blot dient als Nachweis spezifischer Proteine. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden nach Anlegen einer elektrischen Spannung im nassen Milieu auf eine Membran transferiert. Der verwendete Transferpuffer enthält Methanol, um die Bindungsaffinität der Membran zu erhöhen, und SDS, das eine negative Ladung auf die Proteine überträgt. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgt mit Hilfe von spezifischen

Antikörpern. Da die Nitrocellulosemembran allerdings alle Proteine bindet, muss verhindert werden, dass die Antikörper unspezifisch an die Membran binden. Dazu werden die unspezifischen Bindungsstellen mit Magermilchpulver geblockt. Anschließend werden die Proteinbanden mit Hilfe spezifischer Antikörper markiert, die wiederum von sekundären Peroxidasegekoppelten Antikörper erkannt werden. Mit Hilfe der gekoppelten Peroxidaseaktivität und einem Chemilumineszenzreagenz lässt sich das gesuchte Protein durch Belichtung eines Röntgenfilms detektieren.

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Biosciences) transferiert. Die Proteine wandern von „Minus“ zu „Plus“. Daher wurde der Aufbau im Transferpuffer folgendermaßen (von + zu -) getätigt: Schwamm, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Gel, Filterpapier und Schwamm. Der Proteintransfer wurde im Transferpuffer mit Wasserkühlung (im Kühlraum) bei 0,8 A 120 Minuten lang durchgeführt. Anschließend wurde die Membran durch eine einstündige Inkubation in 3 %-iger Magermilchlösung (PBS-Milch) bei RT abgesättigt. Es folgte die o.n. Inkubation mit dem spezifischen Antikörper bei 4°C auf dem Rad. Der primäre Antikörper wurde 1: 1000 mit PBS Magermilch verdünnt. (1. AK: polyklonal anti EGFP)

Nach dreimaligem Waschen mit dest. Wasser wurde die Membran über einen Zeitraum von zwei Stunden mit einer 1:5000 verdünnten 2. AK-Lsg (in PBS-Milch) bei RT inkubiert. Als sek. AK wurde *horseradish peroxidase (HRP) conjugated donkey-anti-rabbit IgG* 200µg/ml (Santa Cruz Biotechnology) verwendet. Nach mehrmaligem Waschen wurde der Blot abschließend in 10 ml Detektionslösung (5 ml Lsg.1 + 5 ml Lsg.2) von der Fa Amersham für 3 Min im Dunkeln inkubiert, bevor die Membran in durchsichtige Folie gewickelt und in die Röntgenfilmbelichtungskassette gelegt wurde. Die durch die Peroxidasereaktion emittierte Chemilumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm detektiert.

Transferpuffer pH 8,3

39 mM Glycin
48 mM Tris-HCl
0,037 % SDS 20 % Methanol

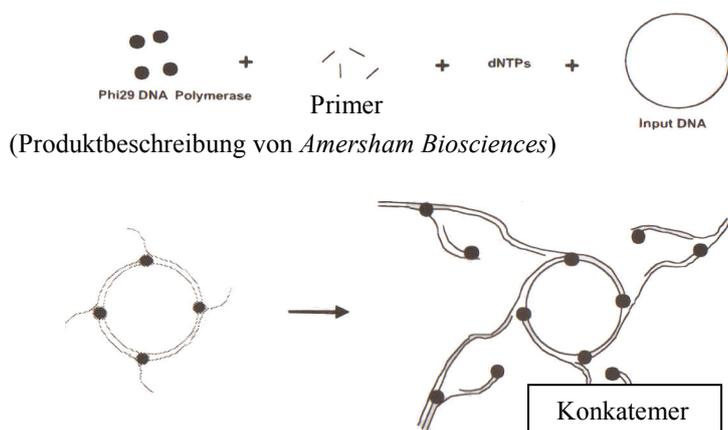
Waschpuffer (TBS-Tween) pH 7,6

20 mM Tris-HCl
137 mM NaCl
0,3 % Tween 20

3.1.2 “Restriction enzyme generated siRNA” (REGS) Methode

Jedes der in 3.1.1 generierten Fragmente des EGFP-Gens, hat einen Überhang, der für die Ligation mit einem 3' Loop verwendet wurde (Abb. 2a). Dieses synthetische Oligonukleotid mit einer Länge von 44 Nukleotiden wurde zuvor phosphoryliert und anschließend für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert, um danach sofort in einem Eisbad schnellst möglich abgekühlt zu werden. Dies hat sich als effektiv für die Bildung der intramolekularen Loopstrukturbildung erwiesen, die sonst verstärkt mit der intermolekularen Hybridisierung konkurriert. Der 3' Loop verbindet den *Sense* mit dem *Antisense* Strang der einzelnen EGFP-Fragmente. Aus jeweils zwei Strängen wird ein Strang. Da die EGFP-Fragmente aber noch zu lang sind, müssen diese in die für die Prozessierung von shRNAs nötige Größe gebracht werden. Dazu wird das Enzym *MmeI*, dessen Erkennungssequenz erst durch die Ligation des GC-Fragments mit dem 3' Loop vervollständigt wird, verwendet (Abb. 2b). *MmeI* ist ein nicht palindromisches Enzym, das 18 bzw. 20 Nukleotide von der Erkennungssequenz entfernt die DNA schneidet (Abb. 2c). Da das C am 5' Ende der Erkennungssequenz von *MmeI* noch zu dem ligierten Fragment gehört, hinterlässt das Enzym Fragmente mit einer Länge von 21 Nukleotiden. Dabei schneidet *MmeI* die DNA so, dass ein 2 Nukleotid langer 3' Überhang entsteht. Dieser Überhang wurde dazu verwendet, um einen weiteren Loop, den 5' Loop, zu ligieren (Abb. 2d). Da diese zwei Nukleotide je nach ligiertem Fragment differieren, hat der 5' Loop an dessen 3' Ende 2 randomisierte Nukleotide (für vier Möglichkeiten pro Position wären das insgesamt 16 verschiedene Loops). Dieser 5' Loop ermöglicht an der einzelsträngigen Haarnadelschleife (Abb. 2e) die Bindung von Primern, die die Synthese des komplementären Strangs ermöglicht (Abb. 2f). Der 5' Loop wurde so entworfen, dass seine Sequenz nicht 100% komplementär ist, mit dem Ziel, später gerichtet klonieren zu können.

Um den komplementären Strang dieses in sich geschlossenen Rings zu synthetisieren, wurde

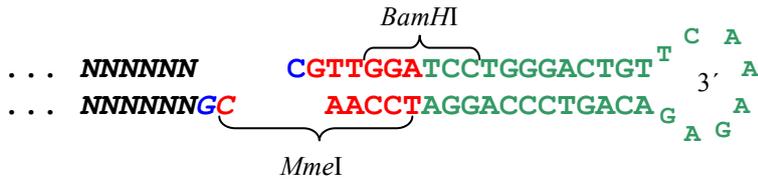


die $\Phi 29$ DNA Polymerase verwendet. Diese zeichnet sich durch ihre besonders ausgeprägte Fähigkeit aus, Doppelstränge vor sich her zu öffnen. Dies ist wichtig um zum einen durch die in sich geschlossene Haarnadelstruktur (*dumbbell*) zu kommen und zum anderen eine

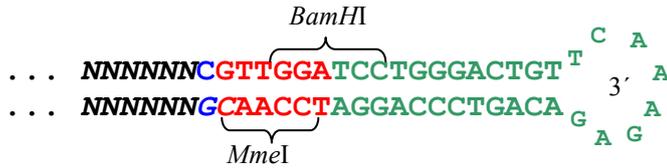
Amplifikation durch mehrmaliges Durchlaufen dieses in sich geschlossenen Ringes zu erhalten. Von Bedeutung ist auch, dass sie den synthetisierten Doppelstrang nicht vor sich her wieder durch eine 5' → 3' Exonukleaseaktivität abgedaut. Nach mehrmaligem Durchlaufen dieser Ringstruktur und ständiger Verdrängung des schon synthetisierten Doppelstranges, entsteht ein langer, einzelsträngiger DNA-Strang. Um den komplementären Strang zu bilden, wurde der sog. RCA-2 Primer dazugegeben. Da dieser Primer beim langen einzelsträngigen Konkatermer mehrmals passt und die Polymerase weiterhin jeden schon synthetisierten Doppelstrang verdrängt, kommt es zu einer starken Verästelung und einer Amplifikation des Konkatermers (Abb. 2g).

Um klonierbare doppelsträngige DNA Fragmente in der richtigen Größe mit den 21 Nukleotiden *sense*- und *antisense* DNA zu erhalten, wurde das Konkatermer der Polymerase Reaktion mit den Enzymen *PacI* und *DraI* geschnitten. Man erhält die erwünschte Bande mit einer Länge von 98 Nukleotiden (Abb. 2h). Diese wurde in den pSuper-sh empf. Vektor (siehe Abb. 3) kloniert, so dass am Ende des Pol III Promotors eine Ligation an dem mit *PacI* geschnittenen Ende stattfinden konnte und am anderen Ende die Ligation vor dem Stopp Signal der RNA Polymerase (5 x T) möglich wurde (Abb. 2i). Da die komplementären 21-Nukleotid langen Sequenzen des am Anfang eingesetzten Fragments durch den in Abb. 2a ligierten 3' Loop zu weit voneinander getrennt sind um nach Transkription funktionelle sh/siRNAs zu ergeben, wird der nun als vollständig vorliegende (aufgeklappte) doppelsträngige 3' Loop durch den Verdau mit *BamHI* herausgeschnitten (Abb. 2j). Der Vektor wird an der *BamHI*-Schnittstelle religiert, so dass nun die 21 Nukleotide des Fragments nur noch durch die als *Hairpin* fungierende Sequenz TTGGATCCAA voneinander getrennt werden (Abb. 2k). Das Produkt der Transkription durch die RNA-Polymerase ist in Abb. 2l dargestellt.

a)

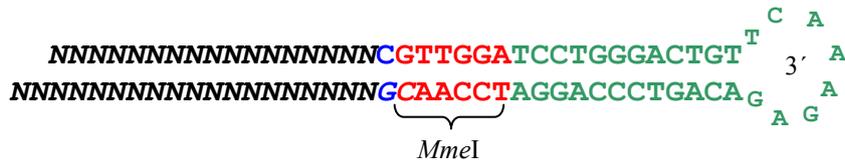


b)



Schnittmuster MmeI:
 5' (N)₁₈GTYGG A
 3' (N)₂₀CARCCT

c)

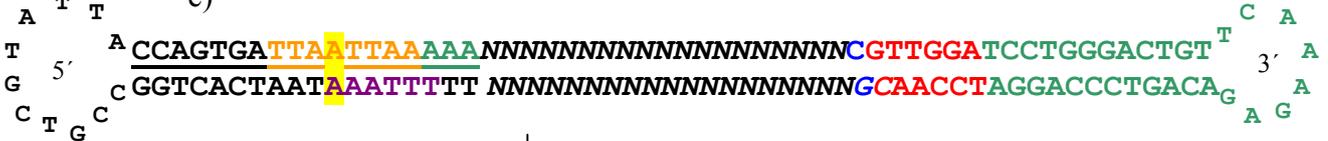


d)

Ligation mit 5' Loop

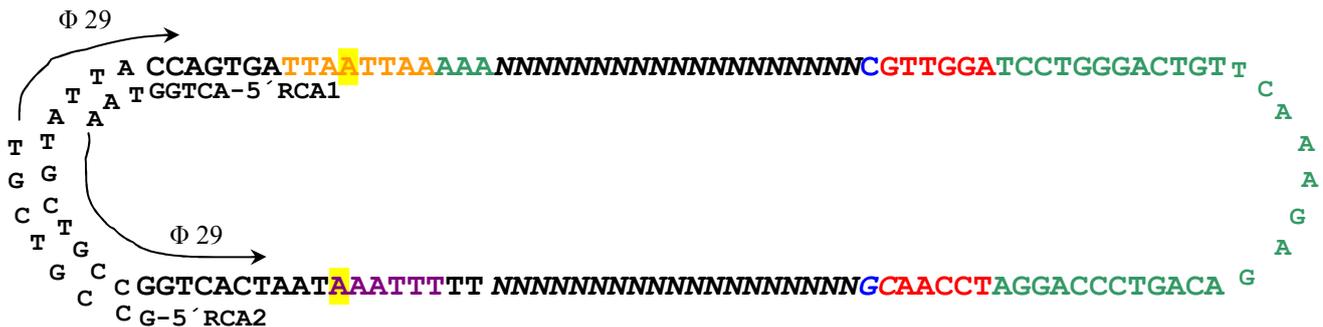


e)



RCA (Φ 29 DNA Polymerase)
 Primer RCA1: 5'-ACTGGTAA-3'
 RCA2: 5'-GCCGTCGT-3'

f)



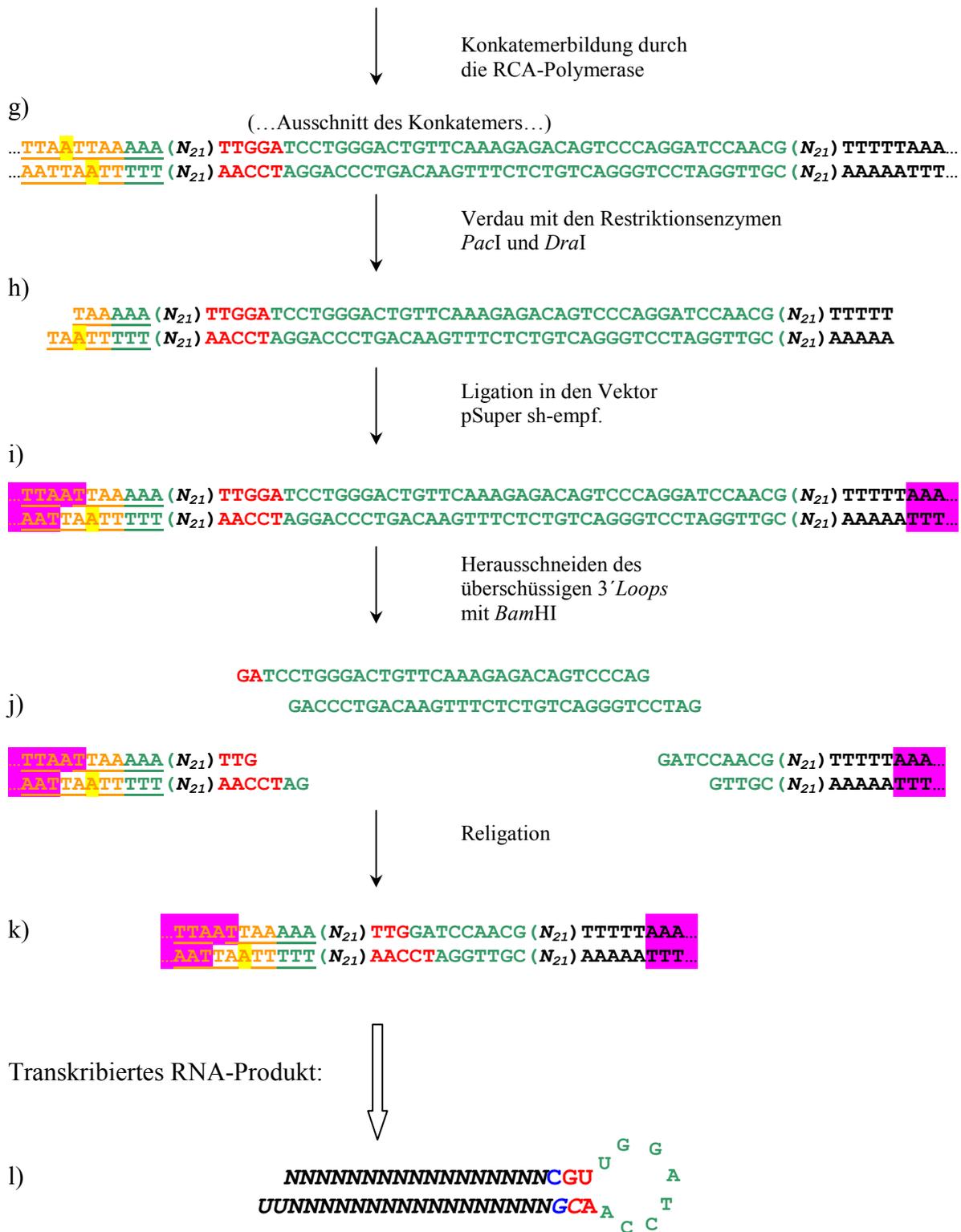


Abb. 2 Skizze der einzelnen Schritte der Generierung einer shRNA Bibliothek nach der „restriction enzyme generated siRNA“ (REGS). Vergl. Gel Abb. 5

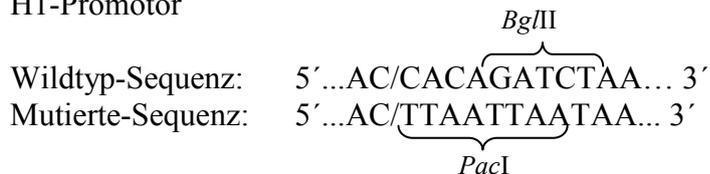
- | | | |
|-------------------------|---|---------------------------|
| a) Ligation mit 3' Loop | b/c) Verdau mit <i>MmeI</i> | d/e) Ligation mit 5' Loop |
| f/g) Konkatemerbildung | h) Verdau mit <i>PacI</i> und <i>DraI</i> | |
| i) Ligation mit Vektor | j) Entfernen des überschüssigen 3' Loops | |
| k) Religation | l) Transkriptionsprodukt | |

3.1.3 Empfängervektoren für das durch die REGS Methode hergestellte Konstrukt

Modifikation des pSuper-Plasmids und Generierung des lentiviralen sh-Empfänger-Plasmids: Durch mehrere aufeinanderfolgende Mutagenesen wurde der H1 Promotor vom pSuper-Plasmid (11 Basen vor dem Transkriptionsstart) modifiziert. (Abb. 3A)

Mutagenese: pSuper in pSuper-PacI

H1-Promotor



Die durch die Mutagenesen eingeführte Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *PacI* wurde verwendet, um zwischen *PacI* und *HincII* (einem *blunt-end cutter*) einen Adapter (*Linker*) einzufügen (Abb. 3B). Dieser *Linker* enthält mehrere Erkennungssequenzen von *blunt-end cutter*, die bei späteren Anwendungen gebraucht werden.

Um den lentiviralen Vektor SR-SnaB mit der H1-Expressionskassette zu versehen, wurde dieser mit dem Restriktionsenzym *SnaBI* geschnitten. Der H1-Promotor mit dem Linker wurde durch den Verdau mit *BamHI* / *XhoI* vom pSuper sh empf herausgeschnitten, mittels Klenow Polymerase in die *blunt end* Konformation gebracht und so in die *SnaBI* Schnittstelle vom SR-Vektor kloniert (Abb. 3C). Bei der richtigen Orientierung des Fragmentes wird die *BamHI* Erkennungssequenz zerstört, die *XhoI* Sequenz jedoch wieder hergestellt. Abbildung 3D zeigt den fertigen SR sh-empf. Vektor.

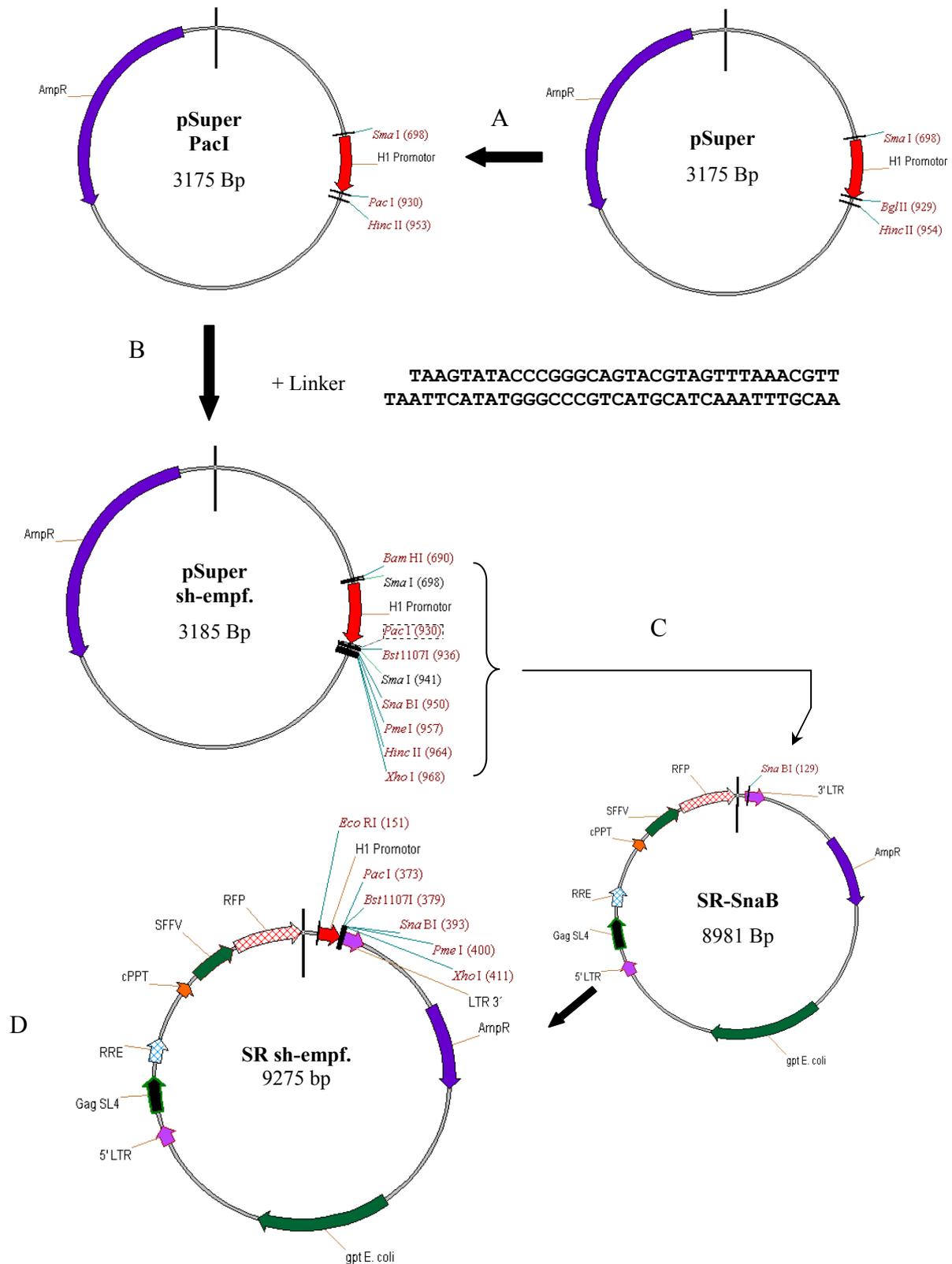


Abb. 3 Vektormodifikationen für die anschließende Klonierung der Bibliothek.
 A: Einführung der *PacI* Erkennungssequenz am 3' Ende des H1 Promotors.
 B: Klonierung eines Linkers in dem mit *PacI* und *HincII* geschnittenen Vektor.
 C: Überführung der H1-Linker Kasette in das lentivirale Konstrukt SR-SnaB.
 D: Fertiger lentiviraler Vektor mit dem H1-Linker in der 3' LTR Region.

3.1.3.1 Überprüfungen der Funktionalität des Promotors

Da die Sequenz des H1 Promotors vor dem Transkriptionsstart modifiziert wurde, musste überprüft werden, ob die Modifikationen möglicherweise einen Einfluss auf die Transkriptionseffizienz haben.

Um dies zu überprüfen wurde mittels der *PacI* Schnittstelle eine gegen EGFP gerichtete shRNA Sequenz eingeführt. Bei der shRNA handelt es sich um eine Sequenz, die die Expression des EGFP Proteins mittels RNAi an der Position 121 der codierenden Sequenz inhibiert (Scherr et al. 2003).

Mittels Lipofektion der Konstrukte in BHK 21 Zellen wurden die verschiedenen Modifikationen mehrmals auf Funktionalität überprüft. Zur Normalisierung der Werte wurde zusätzlich zu den Vektoren die EGFP und die shRNA 121gfp kodieren ein Vektor transfiziert, der den *low-affinity-nerve-growth-factor-receptor* LNGFR exprimiert. Durch eine Antikörperfärbung kann man die leicht unterschiedlichen Aufnahmen der mit Lipofektamin transfizierten DNA in den einzelnen *wells* berücksichtigen. Tabelle und Graphen in Abb. 4 zeigen das kein Unterschied durch das Einführen der *PacI* Erkennungssequenz im Vergleich zu der nicht modifizierten Promotorregion zu erkennen ist.

3.1.3.2 Vergleich des BamHI Loops mit dem wt-Loop

Die durch diese Methode generierte Bibliothek verwendet nicht die von Brummelkamp publizierte Loopsequenz (TTCAAGAGA; Brummelkamp et al. 2002), sondern die *BamHI*-Erkennungssequenz bildet das Bindeglied zwischen dem *Sense*- und *Antisense*-Strang. Es wurde dieselbe Sequenz einer gegen die EGFP-mRNA kodierenden shRNA, die sich nur in ihrer Loopsequenz voneinander unterscheiden, mittels Lipofektion miteinander verglichen. Die eine 121shRNA enthält den von Brummelkamp et al. publizierten Loop (wt Loop) während bei der anderen 121shRNA der sense vom antisense Strang durch den *Bam-Loop* getrennt wird (*Bam* Loop). Es ist kein Unterschied zwischen diesen beiden Loopvarianten zu erkennen (Abb. 4).

a)

	% GFP Expression	% GFP Reduktion
pS gl4	100,00	0,00
pS 121gfp	14,17	85,83
pS H1 Pac 121gfp wt Loop	13,82	86,18
pS H1 Pac 121gfp Bam Loop	12,29	87,71

b)

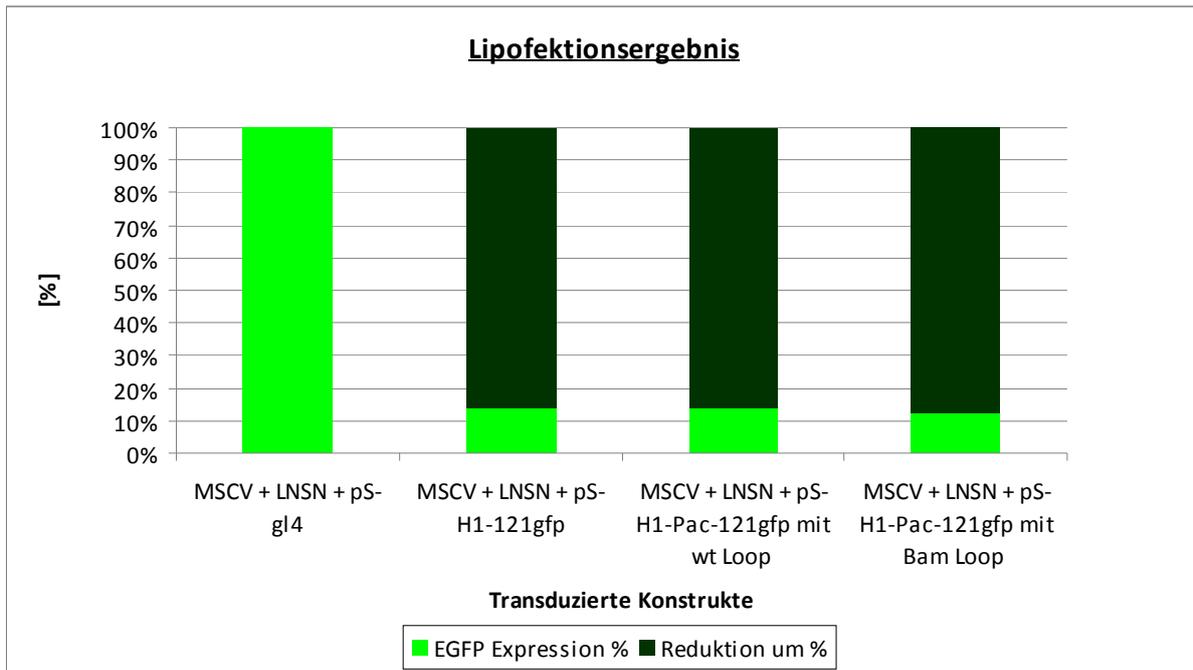


Abb. 4 Effekte der Mutagenese in der H1- Promotorregion und der unterschiedlichen Loops auf die GFP-shRNA Expression. Die Normalisierung erfolgte mit dem zusätzlich transduzierten Oberflächenmarker LNGFR.

a) Exemplarische Auflistung eines Lipofektionsergebnis.

b) Aus der Tabelle erstelltes Diagramm. In grün ist die restliche noch vorhandene EGFP Expression im Vergleich zu der Kontrolle pS gl4 in Prozent aufgetragen. Die dunkelgrünen Balken stellen die entsprechenden prozentualen Reduktionen dar im Vergleich zur Kontrolle pS gl4 dar.

3.1.4 Letzte Schritte zum funktionellen lentiviralen shRNA Expressionsplasmid

Bei der in Punkt 3.1.2 beschriebenen Methode geht man vom EGFP-Gen aus, das man anhand von verschiedenen Enzymen in Fragmente schneidet, die ein CG-Überhang aufweisen. Man erhält bei der Verwendung von *Acil*, *BsaHI*, *HinPI*, *HpaII*, *HpyCH4IV* und *TaqI* beim Schneiden vom EGFP Gen (750 bp) insgesamt 24 Fragmente, wobei das größte Fragment 102 bp lang ist. Dies entspricht dem Ergebnis des Gelbildes in Abbildung 5 a, Spalte 5. In der ersten Spalte ist der 10 bp Marker aufgetragen. In der zweiten Spalte der „schockhybridisierte“ und kinasierte 3'Loop. Wie man sieht, ist die intramolekulare Faltung gegenüber der intermolekularen Hybridisierung nahezu 100 %. Fügt man dem kinasierten 3'Loop Ligase hinzu, ligieren zwei Loops miteinander zu einer doppelten Haarnadelschleife von einer Länge von ca. 44 bp (Spalte 3). Daher sind Konkatemerbildungen ausgeschlossen. Das Hinzufügen des Restriktionsenzym *MmeI* ändert nichts an dieser Struktur, da die Schnittstelle des Enzyms in der Schlaufe liegt, so dass das Enzym nicht schneiden kann (Spalte 4). Wäre ein Verdau möglich, müsste durch die Ligation mit noch einem geschnittenen Konstrukt eine Bande bei etwa 88 bp auftauchen. Dies ist aber nicht der Fall. Spalte 6 zeigt das Ligationsprodukt der in Spalte 5 gezeigten Fragmente. Noch deutlicher sind diese unterschiedlich langen ligierten Fragmente als „Schmier“ in Spalte 7 zu sehen, wo die EGFP Fragmente untereinander aber auch mit dem 3'Loop ligiert wurden, der im Überschuss hinzugefügt wurde. Das *MmeI*-Enzym schneidet das Ligationsprodukt der EGFP-Fragmente mit dem 3'Loop in 45 bp lange Stücke. Diese Bande sieht man in Spalte 7 und wird präparativ zur Ligation mit dem 5'Loop aufgereinigt.

In Abbildung 5b ist in der ersten Spalte der 10 bp Marker aufgetragen. In der zweiten Spalte ist der kinasierte und hybridisierte 5'Loop zu sehen. In der dritten Spalte wurde Ligase zu dem in Spalte 2b dargestellten Loop gegeben. Wie man an der noch sichtbaren Bande bei ca. 24 bp sehen kann, ist nicht ligierter 49 Nukleotid langer 5'Loop im Überschuss eingesetzt worden (Durch intramolekulare Faltung entspricht die Laufhöhe in etwa der Hälfte der Nukleotidanzahl). Durch ein denaturierendes Harnstoff-PAA Gel konnte das mit Hilfe einer Silberfärbung nachgewiesen werden. Mit dem roten Pfeil wird in Spalte 4 und 5 das erwünschte Produkt gezeigt: Das Ergebnis der Ligation des 3'Loops mit dem 21 Nukleotid langen Fragment der cDNA plus dem 5'Loop gezeigt. Desweiteren erkennt man ein Nebenprodukt bei einer Höhe von etwa 78 bp, welches durch die Ligation zweier 3'Loops mit den entsprechenden 21 Nukleotiden zu erklären ist. Bei der Höhe von 46 bp sieht man die Selbstligation des 5'Loops. Etwas Edukt (3'Loop + 21 nt) kann man bei der Höhe von 39 bp

sehen. Um dies zu verdeutlichen, ist in Spalte 6 noch einmal der 3'Loop mit den 21 Nukleotiden aufgetragen.

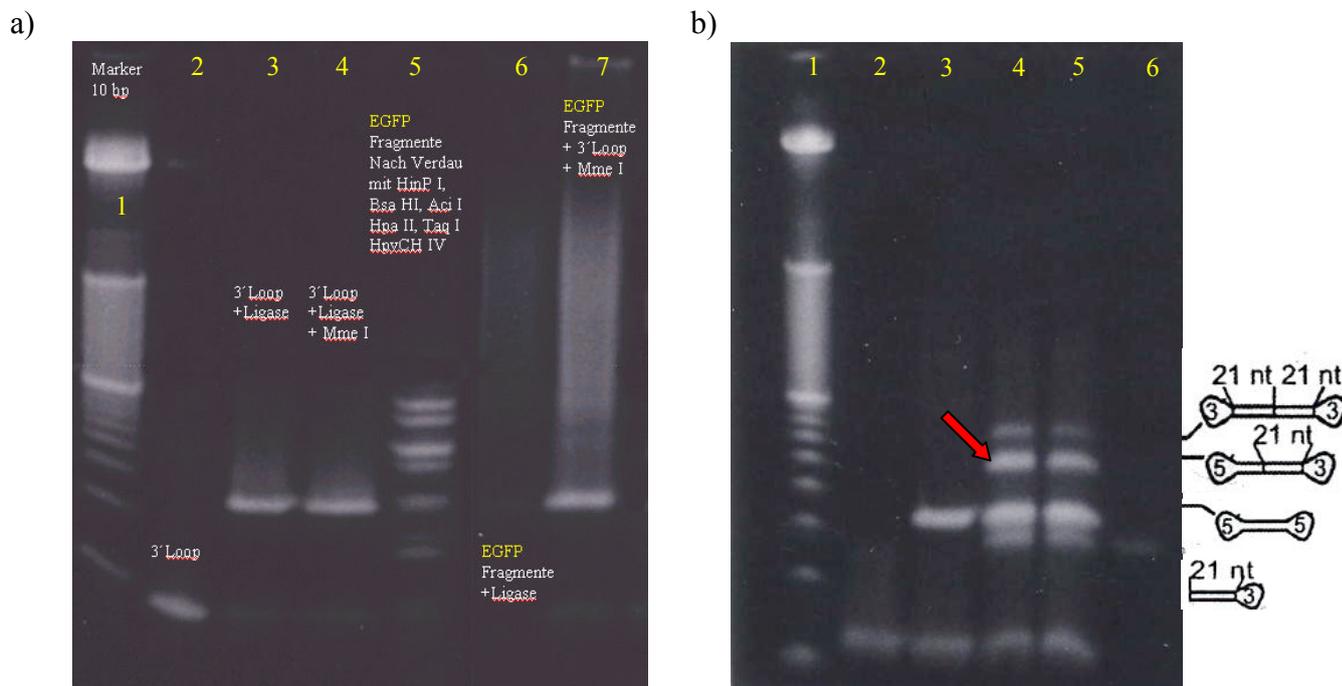


Abb. 5 PAA-Gelbilder der einzelnen in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Klonierungsschritten.

a) Auftragung der ersten Klonierungsschritte: 1. 10 bp Marker; 2. 3'Loop kinasiert und hybridisiert; 3. Der in 2 aufgetragene Loop mit Ligase; 4. In sich geschlossene Haarnadelschleife durch die Ligation zweier 3'Loops nach Zusatz des Enzyms *MmeI*; 5. Fragmente des EGFP Verdau mit den fünf im Text genannten Restriktionsenzymen; 6. Ligierte EGFP Fragmente mit dem 3'Loop und mit sich selbst; 7. Verdau der in Spalte sechs aufgetragenen ligierten Fragmente mit dem Restriktionsenzym *MmeI*.

b) Auftragung anschließender Klonierungsschritte bis zur RCA: 1. 10 bp Marker; 2. Kinasierter und hybridisierter 5'Loop; 3. Der in 2 aufgetragene Loop mit Ligase; 4. + 5. Ligation des 5'Loops an den 3'Loop mit den durch *MmeI* Verdau zugeschnittenen 21 bp der cDNA. Mit dem roten Pfeil ist das erwünschte Produkt markiert, der aus dem 5'Loop, den 21 bp des Gens und dem 3'Loop besteht; 6. 3'Loop mit zurechtgeschnittenen 21 nt. (Edukt aus 7a.)

Die mit dem roten Pfeil markierte Bande wurde ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert und in die RCA-Reaktion eingesetzt. Nach Verdau des gebildeten Konkatemers mit den Enzymen *PacI* und *DraI* wurde das Fragment wie in 3.1.2 beschrieben, in den pS-sh empf. Vektor kloniert. Anschließend erfolgt die Transformation in Bakterien. Durch die Bakterien werden die einzelnen Konstrukte amplifiziert. Somit kann man das Schneiden dieses Vektors mit *BamHI* (um die von *BamHI* flankierte irrelevante Sequenz loszuwerden) in einem größeren Maßstab durchführen, ohne Diversität zu verlieren. Desweiteren kann der Verdau einzelner Klone mit *BamHI* für Sequenzierzwecken verwendet werden.

3.1.5 Sequenzierung und Evaluation der erhaltenen shRNAs

Es wurden 15 Klone sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ergab, dass man wie erwartet, abhängig ob der 3'Loop an dem 5'- oder am 3'-Ende der cDNA ligiert wurde, sowohl die *Sense*- als auch die *Antisense*- Orientierung erhält. In der Tabelle sind die möglichen Varianten sowie die durch die zufällige Selektion von 15 Klonen erhaltenen und durch Sequenzierung festgestellten Treffer aufgelistet.

Nr.	Schnittstellenposition	siRNA Sequenz (sense)	siRNA Sequenz (antisense)	Häufigkeit der Isolation
1	29 <i>HpaII</i>	10-31	30-51	0
2	50 <i>TaqI</i>	32-52	51-71	0
3	65 <i>HpyCH4IV</i>	47-67	66-86	0
4	92 <i>HpaII</i>	74-94	93-113	2 (sense)
5	152 <i>HpaII</i>	134-154	153-173	1 (anti)
6	219 <i>AcI</i>	201-221	220-240	0
7	260 <i>AcI</i>	242-262	261-281	0
8	278 <i>HpyCH4IV</i>	260-280	279-299	0
9	288 <i>HinPI</i>	269-289	288-308	2 (anti)
10	327 <i>AcI</i>	309-329	328-348	0
11	329 <i>HinPI</i>	311-331	330-350	2 (sense)
12	344 <i>TaqI</i>	326-346	345-365	1 (anti)
13	366 <i>AcI</i>	348-368	367-387	1 (sense)
14	371 <i>TaqI</i>	353-373	372-392	0
15	386 <i>TaqI</i>	368-388	387-407	0
16	449 <i>HpyCH4IV</i>	431-451	450-470	2 (sense)
17	504 <i>AcI</i>	486-506	505-525	1 (sense)
18	515 <i>TaqI</i>	497-517	516-536	0
19	617 <i>AcI</i>	599-619	618-638	2 (sense)
20	645 <i>HinPI</i>	626-646	645-665	1 (anti)
21	677 <i>AcI</i>	659-679	678-698	0
22	680 <i>AcI</i>	662-682	681-701	0
23	683 <i>HpaII</i>	665-685	684-704	0

Abb. 6 Die Tabelle zeigt die möglichen Sequenzen, die man durch die REGS Methode bei dem Verdau des EGFP-Gens erhalten kann. Die in gelb unterlegten, zeigen die erhaltenen Sequenzen an, wobei die zusätzlich grau Unterlegten auch signifikant die EGFP Expression hemmen.

Funktionelle Evaluation dieser unterschiedlichen Fragmente mittels Lipofektion in BHK 21 Zellen ergaben, dass die in der Tabelle von Abb. 6 grau unterlegten Konstrukte am effizientesten die Translation des EGFP-Proteins hemmten und somit die EGFP-Fluoreszenz reduzierten.

Ein weiteres Ergebnis der Sequenzierung ergab (Abb.7), dass es zu einer Zusammensetzung von kleinen Fragmenten kommt, wenn die cDNA durch die Verwendung der sechs in Abbildung 1 aufgelisteten Restriktionsenzymen in zu kleinen Fragmenten geschnitten wurde (d.h. < 21 bp). →DanL6 (08.02.08)

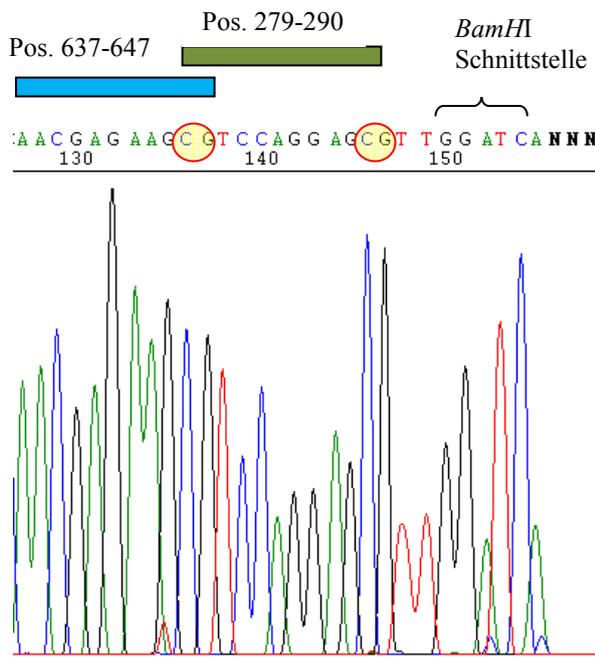


Abb. 7 Sequenzierung einer unerwünschten Ligation mehrerer (zu kleinen) Fragmenten. Der blaue und der grüne Balken zeigen die unterschiedlichen Fragmente an, die zusammenligiert wurden. Die CGs die die *sticky ends* für die Ligation mit dem 3' Loop sowie mit dem anderen Fragment lieferten, sind mit einem rot umrandeten gelben Kreis versehen. Die unvollständige *BamHI* Schnittstelle entsteht durch den vor der Sequenzierung durchgeführten Verdau mit *BamHI* (um Sekundärstrukturen bei der Sequenzierungsreaktion zu verhindern).

3.1.6 Verwendung einer randomisierten Sequenz

Durch mehrfache Ligation von Fragmenten die kleiner als 21 nt waren, wurden Sequenzen gebildet, die nicht funktionell sind. Anstelle der Gewebe- und Zell-spezifischen cDNA Vorgabe wurde als neues Ziel die Generierung einer Bibliothek gesetzt, die universal in Eukaryoten anwendbar ist und die nach Möglichkeit das ganze Spektrum an möglichen siRNAs abdeckt: eine randomisierte Bibliothek.

Prinzipiell ähnelt sie der eben beschriebenen Methode. Statt der in Abbildung 2a beschriebenen Ligation der cDNA Fragmente mit dem 3' Loop muss vorher noch mittels einer Klenow-Polymerase-Reaktion der komplementäre Strang eines Oligonukleotids mit einer randomisierten Sequenz *N* synthetisiert und mit *BamHI* verdaut werden. An den einsträngigen Überhang des *BamHI* Verdau kann ein *Loop* ligiert werden, welcher komplementär zur

einsträngigen *Bam*HI Sequenz ist. Die restlichen Schritte sind mit denen aus Abbildung 2 b) bis 2 l) identisch.

a)

CCCCAGGAGGCCTTAATTAAAAAN₂₀GTTGGATCCTGCTGGGCGCATGG
ACCTAGGACGACCCGCGTACC

b)

Hybridisierung
+ Klenow-Polymerase-
Reaktion

CCCCAGGAGGCCTTAATTAAAAAN₂₀GTTGGATCCTGCTGGGCGCATGG
GGGTCCTCCGGAATTAATTTT₂₀CAACCTAGGACGACCCGCGTACC

*Bam*HI Verdau
und Aufreinigung des 49 Bp langen
Fragmentes

c)

Ligation mit dem 3' Loop

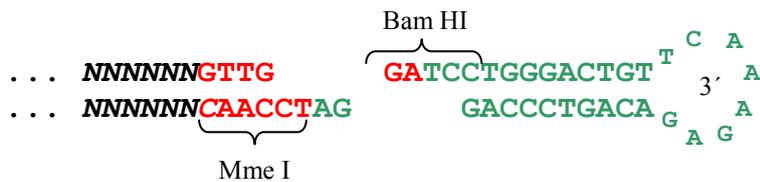


Abb. 8 Skizze der zusätzlichen Schritte bei der Generierung einer shRNA Bibliothek mit einer randomisierten Sequenz.

a) Generierung des komplementären Stranges durch die Hybridisierung eines Primers und anschließender Klenow-Polymerase-Reaktion

b) Verdau der doppelsträngigen DNA mit *Bam*HI und anschließender PAA-Gelaufreinigung

c) Ligation des mit *Bam*HI geschnittenen Fragmentes (das die randomisierte Sequenz enthält) mit dem 3' Loop.

3.1.6.1 Sequenzüberprüfung und Verteilung der randomisierten Bibliothek

Die generierte randomisierte shRNA-Bibliothek wurde mittels Sequenzierung überprüft. Zunächst wurden ca. 10.000 Bakterienklone vereinigt und die daraus gewonnene Plasmid-DNA als „pool“ sequenziert. Das Ergebnis ist in Abb. 9 dargestellt. Die Sequenz ist wie erwartet lesbar bis zum Beginn der randomisierten Sequenz. Man erkennt die *Pac*I

Erkennungssequenz (TTAATTAA) und die 5 As, die bei der komplementären Sequenz auf demselben Strang das Stoppsignal des Pol III-Promotors liefert. Der komplementäre Strang ist hier nicht dargestellt, da die DNA vor der Sequenzierung mit BamHI geschnitten wurde, um einen vorzeitigen Abbruch der Sequenzier-PCR durch Sekundärstrukturen zu verhindern.

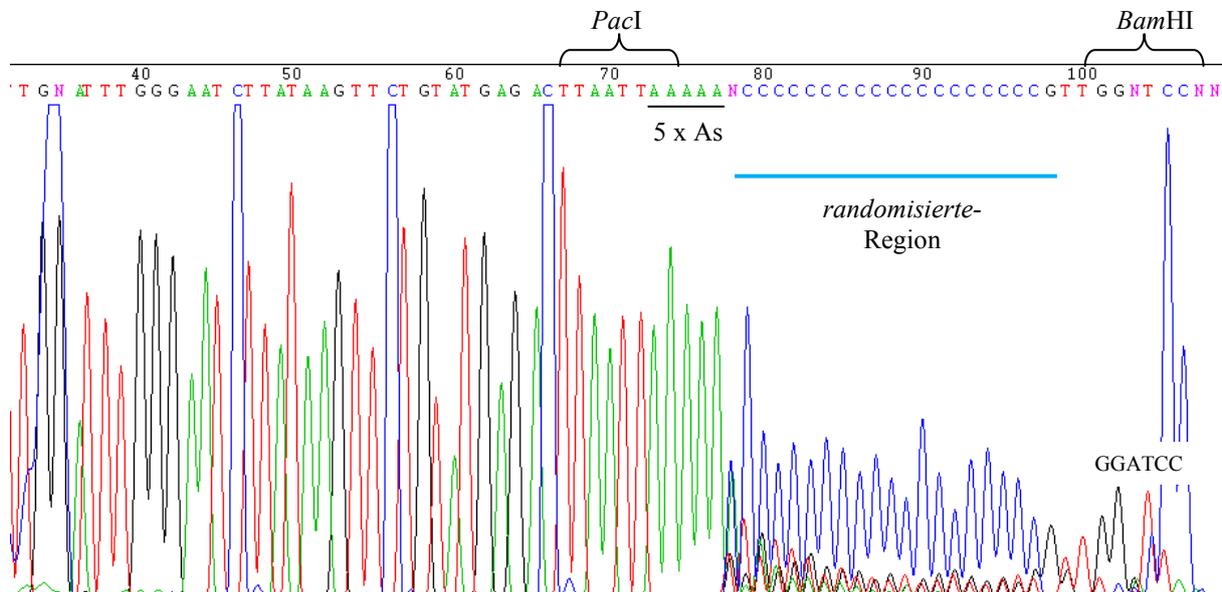


Abb. 9 Sequenzierung eines Pools von etwa 10.000 Konstrukten mit einem Primer der in der H1 Sequenz hybridisiert.

Bei einer Gleichverteilung jedes der vier Basen in der randomisierten Region, würde man erwarten, dass die Peaks aufeinander liegen und somit in der oberen Leiste als „N“ kenntlich gemacht werden. Da das Sequenzierergebnis in Abbildung 9 eine Überrepresentation des Cytosins im Bereich der randomisierten Sequenz aufweist, wurden einzelne Klone gepickt, DNA isoliert und sequenziert. Das Ergebnis, 50 dieser Sequenzierungen, ist in Abbildung 10a dargestellt. In 10b wurden die Anzahl der einzelnen Basen von der Tabelle 10a aufgetragen und in 10c als prozentualer Wert angegeben. Erwartet werden bei einer Gleichverteilung für jede Base jeweils 25 %. Wie man in Abbildung 10 c in der letzten Spalte sieht ist das Cytosin mit 29,6 % am stärksten vertreten, gefolgt vom Thymin mit 26,1 %. Guanin und Adenin sind hingegen etwas weniger enthalten (22,5% und 21,8 %). Dieses Ergebnis begründet aber noch nicht die so deutlichen Peakhöhenunterschiede in Abbildung 9. Das Ergebnis einer Rücksprache mit der Firma Applied Biosystems ist, dass die Peakhöhe kein Maß für die Quantität ist. Das erkennt man in der Abbildung auch an den unterschiedlichen Peakhöhen der unterschiedlichen Basen (C gibt bei weitem den höchsten Ausschlag). Die Peakhöhe einer selben Base ist auch recht unterschiedlich im Verlauf der Sequenzierung, wobei der Verbrauch der Basen in dem kurzen Abschnitt vernachlässigbar ist.

a)

Postion:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	...TTAATTA	A	C	A	T	T	A	A	G	C	C	C	A	G	C	T	A	A	G	C	GTTGGATC
2		A	T	C	C	G	A	C	G	G	C	T	C	A	C	C	T	A	A	C	G
3		A	C	G	T	C	A	T	C	G	C	C	G	C	T	C	C	G	C	A	T
4		A	T	A	A	T	G	C	C	A	C	A	C	G	A	C	T	G	T	G	C
5		A	T	C	T	T	A	C	G	T	A	C	A	T	A	A	C	G	G	C	T
6		G	G	G	G	C	T	A	C	C	C	G	G	T	T	G	G	G	C	G	T
7		T	T	C	T	C	C	G	C	C	A	C	A	C	A	C	T	C	C	A	A
8		A	T	T	A	C	G	T	T	A	T	T	G	C	T	G	C	C	G	C	A
9		A	C	G	T	T	T	A	C	A	C	T	A	T	A	G	T	C	A	G	C
10		C	T	A	G	T	T	A	A	T	G	A	C	G	T	T	C	T	A	T	A
11		A	T	A	C	G	C	T	C	G	T	C	G	C	C	C	T	G	C	C	C
12		A	T	C	A	T	A	C	A	A	C	T	A	C	T	A	T	T	A	C	A
13		A	T	A	T	C	A	C	C	G	G	T	C	G	A	T	C	T	A	C	T
14		C	C	A	A	A	C	C	A	A	C	G	G	T	G	C	C	T	G	T	T
15		A	C	T	C	T	G	G	G	G	T	G	G	A	T	T	T	T	T	G	C
16		T	C	C	C	T	T	G	T	A	T	C	C	G	C	A	G	T	C	T	A
17		T	T	C	A	C	T	T	T	C	C	C	A	C	C	G	C	G	C	A	C
18		G	T	C	T	G	T	G	A	C	G	G	C	C	C	G	C	C	T	C	G
19		G	C	T	C	T	T	A	T	T	G	G	T	G	C	A	C	C	C	G	C
20		T	C	A	C	A	A	G	A	C	T	G	C	G	G	C	A	G	G	C	T
21		A	C	G	T	G	T	T	G	G	C	C	G	G	C	T	T	G	C	A	G
22		G	C	A	G	T	A	C	T	T	T	T	A	T	C	C	T	G	A	G	
23		A	A	A	T	A	T	G	A	C	T	A	T	T	C	A	T	G	G	C	T
24		T	A	A	A	T	G	C	C	G	G	T	G	C	G	T	A	T	G	G	C
25		A	T	A	T	C	A	C	C	G	G	T	C	G	A	T	C	T	A	C	T
26		G	A	T	C	T	T	G	G	T	G	C	C	G	G	T	C	C	G	T	T
27		A	T	G	C	C	T	G	T	A	C	G	T	G	C	A	G	G	T	T	T
28		A	C	A	C	A	T	A	C	G	A	C	C	T	C	G	T	G	C	T	C
29		A	A	A	C	C	A	A	T	G	C	C	G	C	C	G	T	C	C	G	A
30		A	G	A	G	C	T	C	C	A	A	G	G	T	T	T	G	C	T	A	C
31		T	G	T	T	T	G	A	C	A	C	T	T	T	T	T	C	G	G	C	C
32		A	C	A	C	G	T	C	C	G	G	T	C	T	T	C	A	A	G	G	C
33		A	G	C	T	G	G	C	A	G	C	T	T	A	C	T	G	T	T	G	T
34		C	A	C	A	A	A	G	G	T	T	A	G	C	A	A	A	C	A	G	T
35		A	G	C	C	G	G	C	C	A	A	T	T	T	C	C	A	G	T	C	A
36		C	A	T	A	T	A	C	T	G	G	G	T	T	G	C	G	A	G	A	C
37		C	A	C	G	A	C	T	C	T	A	C	A	A	C	T	G	C	T	G	A
38		A	C	A	G	C	T	G	G	T	T	C	C	A	T	G	T	T	A	A	G
39		A	T	A	T	G	T	G	T	T	T	A	C	T	C	A	G	T	T	G	T
40		A	G	G	G	T	A	C	T	C	C	C	A	T	C	A	T	C	A	C	C
41		T	C	G	T	A	A	G	T	C	G	G	T	G	C	C	T	A	G	G	A
42		C	T	C	G	T	T	C	C	C	T	G	C	C	T	A	C	C	G	A	T
43		A	T	G	C	A	T	A	C	G	C	A	G	A	T	A	C	T	C	C	C
44		C	C	A	G	C	T	T	A	C	T	A	A	G	G	C	A	T	T	G	C
45		A	A	G	G	T	C	C	A	C	C	A	A	G	T	A	C	G	A	T	A
46		A	G	A	A	C	G	A	C	C	G	G	T	C	A	C	C	A	G	C	T
47		A	G	C	C	T	C	T	G	T	T	G	T	T	G	C	G	T	G	T	C
48		G	T	C	T	G	G	G	T	G	G	C	C	C	A	T	C	T	A	G	G
49		G	A	T	A	G	C	C	G	T	T	G	A	A	T	A	G	C	C	T	G
50		C	C	C	A	C	C	C	T	C	G	G	G	G	T	A	C	T	G	A	T

b)

Anzahl:																				Summe:	
"A"	28	9	19	11	8	14	10	9	10	6	8	10	9	9	14	6	6	12	10	10	222
"T"	7	17	7	15	18	19	8	13	11	14	12	11	14	16	12	15	17	10	9	16	268
"G"	7	8	9	10	10	9	13	10	15	13	15	13	14	8	8	10	14	16	16	7	229
"C"	8	16	15	14	14	8	19	18	14	17	15	16	13	17	16	19	13	12	15	17	300
	50								50									50			

c)

Prozentuale Anteil:																					
"A"	56	18	38	22	16	28	20	18	20	12	16	20	18	18	28	12	12	24	20	20	21,8 %
"T"	14	34	14	30	36	38	16	26	22	28	24	22	28	32	24	30	34	20	18	32	26,1 %
"G"	14	16	18	20	20	18	26	20	30	26	30	26	28	16	16	20	28	32	32	14	22,5 %
"C"	16	32	30	28	28	16	38	36	28	34	30	32	26	34	32	38	26	24	30	34	29,6 %

Abb. 10 Tabellen aus Sequenzierergebnissen von 50 Klonen.

a) Exemplarisches Sequenzierergebnis von 50 einzelnen Klonen

b) Anzahl der einzelnen Nukleotide in einer bestimmten Position.

c) Prozentualer Anteil der Nukleotide, wobei eine 25% Verteilung pro Position und Base erwartet wurde.

3.1.6.2 Funktionelle Evaluation auf Proteinebene

Um die Reduktion des EGFP-Proteins auch durch einen Western Blot zu zeigen, wurde EGFP stabil exprimierender BAF 4 h gfp Zellen mit unseren shRNA-Konstrukten mittels lentiviraler Transduktion stabil transduziert. Am 6 Tag nach Transduktion und FACS-Sortierung anhand des rot fluoreszierenden Proteins (RFP), wurden Gesamtzelllysate hergestellt und die EGFP-Reduktion durch den Western-Blot nachgewiesen. Der verwendete lentivirale Vektor exprimiert RFP. Die Expressionsstärke dieses Proteins ist ein Indiz für die Anzahl an Integrationen (MOI) bedingt durch die Virusinfektionen und somit repräsentativ für die Expressionshäufigkeit der shRNA. Durch das *sorten* der Zellen anhand der RFP Fluoreszenz, ist es möglich, Zellen die mit unterschiedlichen shRNA-Konstrukten transfiziert wurden, miteinander vergleichen zu können. In Abbildung 11 ist sowohl die Kontrolle SR gl2 sowie die im Labor etablierte SR121 sh anti-GFP dargestellt. Als Vergleich dazu, ist daneben das durch die oben erwähnte Methode hergestellte Konstrukt SR 121 Bam anti-GFP dargestellt. Man sieht bei beiden Konstrukten eine starke Reduktion des EGFP-Proteins, wobei die Intensität der Reduktion von SR121 sh Anti-GFP vergleichbar ist mit der vom Konstrukt SR 121 Bam Anti-GFP. Als Ladungskontrolle diente das ERK-2 Protein.

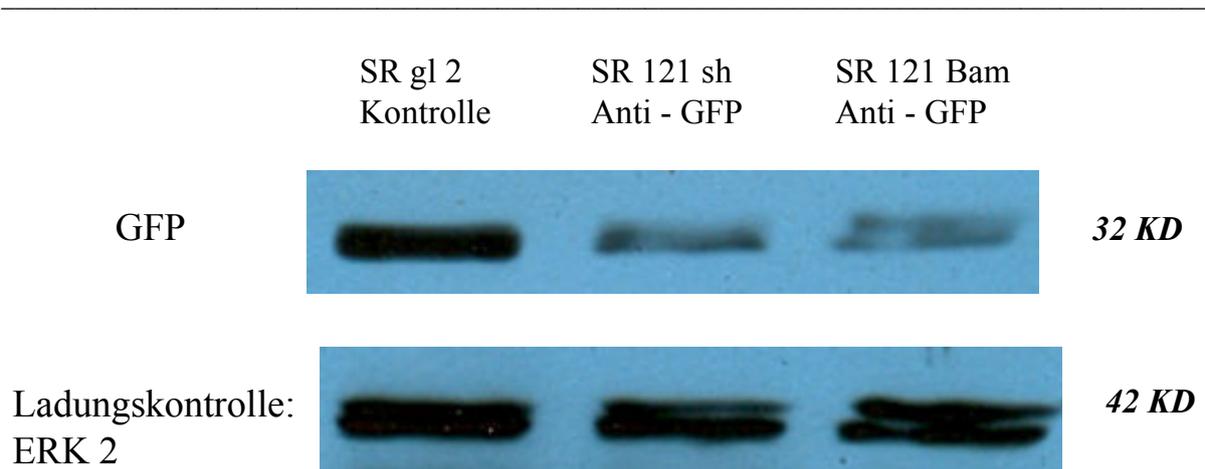


Abb. 11 Western Blot der GFP-Expression. Es wird die Inhibition durch die shRNA SR 121 sh Anti – GFP im Vergleich zu der . Dieses Konstrukt mit der definierten Sequenz wurde nach demselben Schema wie später auch die randomisierte Bibliothek generiert.

3.1.6.3 Komplexität und Ausbeute

Es ist schwierig anhand der Anzahl der erhaltenen Klone, Rückschlüsse auf die dazu benötigte DNA-Menge des Ausgangsoligonukleotids zu ziehen, da ein Amplifikationsschritt dazwischen liegt. Bei der RCA-Amplifikation könnte theoretisch sehr viel klonierbares Material hergestellt werden, welches jedoch von demselben Dumbbell stammt und so zwar zur Steigerung der Klonzahl beiträgt, nicht jedoch zur Diversität der shRNA Sequenzen.

Die theoretisch mögliche Komplexität lässt sich wie folgt berechnen:

Die Teilchenzahl, die ein Mol eines jeden Stoffes enthält, beträgt

$$N_A = 6,02217 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

Start mit 40 µl einer 100 µMolaren DNA-Bibliothek → 4 nM (oder $2,4 \times 10^{15}$ Moleküle) oder aber auch 81,56 µg.

Um alle Varianten eine 20 nt langen randomisierten shRNA Bibliothek abzudecken, wären $1,1 \times 10^{12}$ unterschiedliche Oligonukleotide nötig. Somit hätte man, statistisch gesehen, bei jedem Ansatz, von jeder Variante ca. 2.000 gleiche Oligonukleotide eingesetzt.

3.2 Generierung einer siRNA-Bibliothek durch die Gegenüberstellung zweier Pol III Promotoren

Eine Möglichkeit, direkt siRNAs zu generieren, ist die Transkription von *Sense*- und *Antisense*-RNA-Strang durch zwei Promotoren. Wenn die Promotoren hintereinander liegen, ist es nicht möglich von unbekanntem Sequenzen sowohl den *Sense*- als auch den *Antisense*-Strang zu generieren. Wenn man die Promotoren aber gegenüberstellt und dazwischen das erwünschte Transkript kloniert, dann führt das zur Transkription von beiden Strängen (*Sense*- und *Antisense*-Strang).

3.2.1 Adaptation der Promotoren

Wegen mehrfach beschriebener möglichen Vektorinstabilität durch die Gegenüberstellung von zwei gleichen Promotoren (komplementäre DNA Sequenz nur getrennt durch die siRNA-kodierende Sequenz) wurden zwei verschiedene Pol III Promotoren verwendet: H1 und U6.

Die Modifikation des H1-Promotors wurde in 3.1.3 beschrieben. Dessen Funktionalität wurde in 3.1.3.1 nachgewiesen. Dem H1-Promotor wurde der U6 Promotor aus dem Plasmid pTZ-U6 + 1 gegenübergestellt.

Zunächst wurde mittels Mutagenese-PCR die Restriktionsenzymstrecke *PmeI* eingeführt.

U6-Promotor

Wildtyp-Sequenz: 5'...GAAAGGACGAAACACC... 3'

Veränderte Sequenz: 5'...GAAGTTTAAACACACC... 3'

Durch ein Ligationsschritt konnte die U6-Promotor-Kassette in den pBlueskriptvektor „pS shLibrary empf.“ sowie in den lentiviralen Vektor „SR shLibrary empf.“ kloniert werden. Durch Kontrollverdauung sowie Sequenzierung wurde die richtige Orientierung des U6 Promotors festgestellt (nicht dargestellt).

Um die anfangs erwähnte Vektorinstabilität bei der Gegenüberstellung zweier gleicher Promotoren zu überprüfen, wurden zwei H1-Promotoren spiegelverkehrt zueinander in den pSuper Vektor kloniert (Klonierung nicht gezeigt).

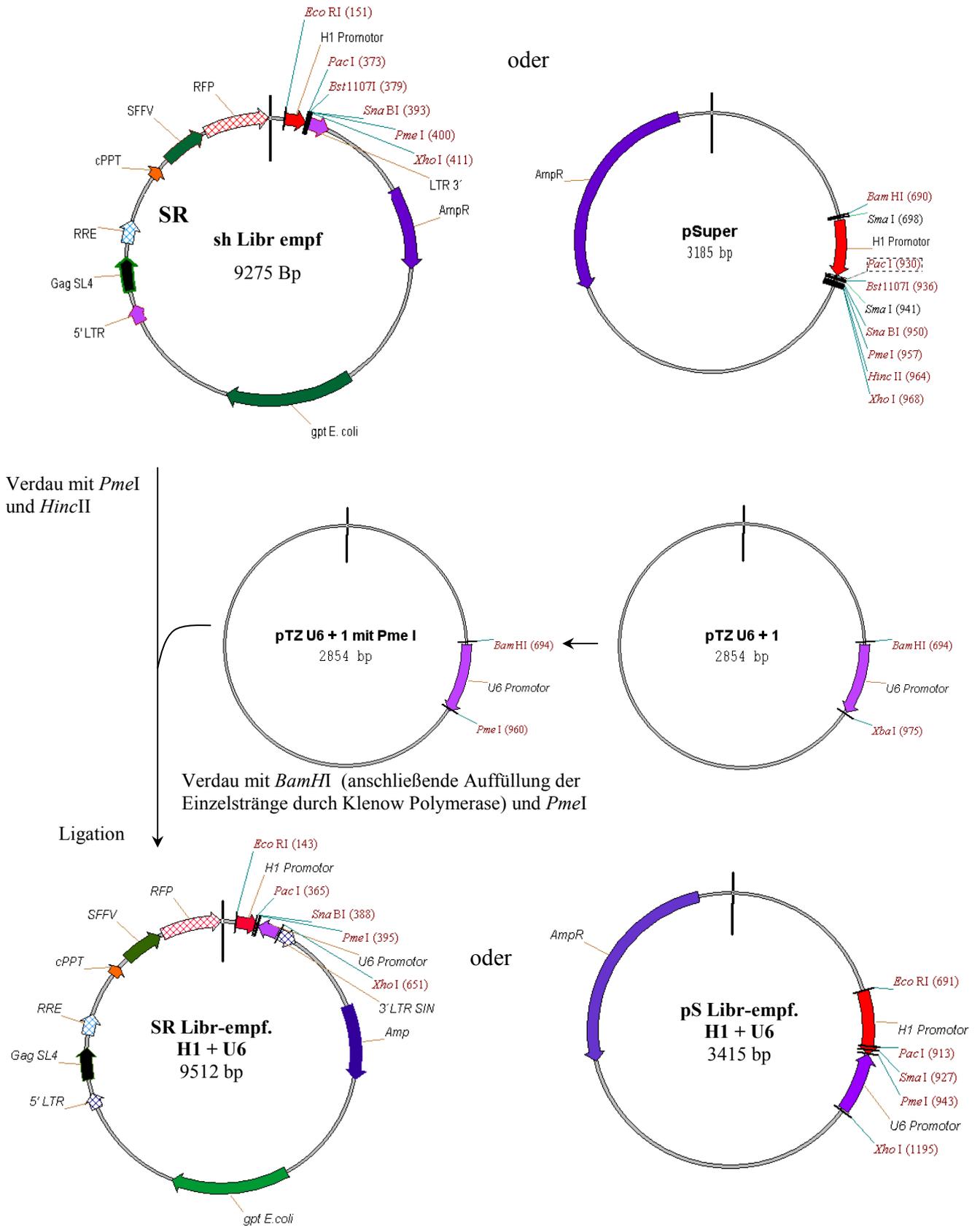


Abb. 12 Klonierung der Plasmide pSuper und SR mit entgegengesetzten Pol III Promotoren.

3.2.1.1 Überprüfung der Funktionalität der mutierten Promotoren und Vergleich von H1- und U6-Promotor

Um die Funktionalität der Promotoren nach Einführung der in 3.2.1 beschriebenen Mutationen zu überprüfen, wurde die DNA, die für die *anti* GFP-shRNA kodiert (121gfp mit *Bam*HI Loop), hinter den H1- und U6-Promotor kloniert. Auf diese Weise konnten verschiedene Kombinationen generiert werden (der rote Pfeil zeigt die Transkriptionsrichtung an):

pS H1 shRNA 121gfp; pS H1 shRNA 121gfp U6 und pS deletiertem H1 shRNA 121gfp U6.

Die Transkription erfolgt immer von 5' in 3' Richtung. Bei gegenübergestellten Promotoren wird sowohl der *sense* als auch der *antisense*-Strang transkribiert. Da auch die Loopsequenz ein Palindrom bildet (*Bam*HI Erkennungssequenz), ist das Transkriptionsprodukt (die shRNA 121gfp) in 5' → 3' Richtung in „Uhrzeigersinn“ und gegen den „Uhrzeigersinn“ abgelesen, gleich.

Getestet wurden die Konstrukte durch Lipofektion von BHK21 Zellen und anschließender Auswertung mittels FACS-Analyse. Die Reduktion, die durch die si/shRNA gegen EGFP verursacht wird, kann direkt gemessen werden. Exprimiert wird das EGFP durch das lipofizierte Plasmid MSCV. Der Abgleich der aufgenommenen DNA-Menge erfolgte über den zusätzlich durch die Lipofektion eingeführten Oberflächenmarker (LNGFR), dessen Expression durch Antikörperfärbung nachgewiesen werden konnte. Durch die transiente Transfektion konnte nicht nur die Funktionalität der si/shRNAs untersucht werden, sondern es ermöglicht auch den Vergleich der Expressionsrate der Pol III Promotoren H1 und U6 untereinander.

In Abbildung 13 ist zunächst das Lipofektionsergebnis der FACS-Messung der mit dem LNGFR abgeglichenen EGFP-Expression dargestellt.

Das Plasmid pSuper gl4 (pS-gl4) dient als Kontrolle. Es exprimiert eine irrelevante shRNA und hat somit keinen Einfluss auf die EGFP Expression. Hier geht man von einer 100 % EGFP-Expression aus. Deshalb stehen die anderen Werte alle im Vergleich zu diesem Wert. In der zweiten Säule ist die Reduktion durch *anti* GFP-shRNA dargestellt (pS-H1-121gfp mit *Loop*). In der darauf folgenden Säule ist der U6 Promotor dem H1 Promotor gegenübergestellt. Dazwischen liegt die shRNA gegen EGFP. Man sieht, dass es nicht zur stärkeren Reduktion kommt, obwohl zwei aktive Promotoren gegenüber liegen, und theoretisch doppelt so viel Transkription stattfinden sollte. Um zu beweisen, dass der U6

Promotor aktiv ist, wurde als letztes ein pS Konstrukt transfiziert, in dem der H1 Promotor nachträglich deletiert wurde. Man stellt fest, dass die Transkriptionseffizienz bzw. Transkriptionsrate bei dem U6 Promotor der des H1 Promotor sehr ähnlich ist.

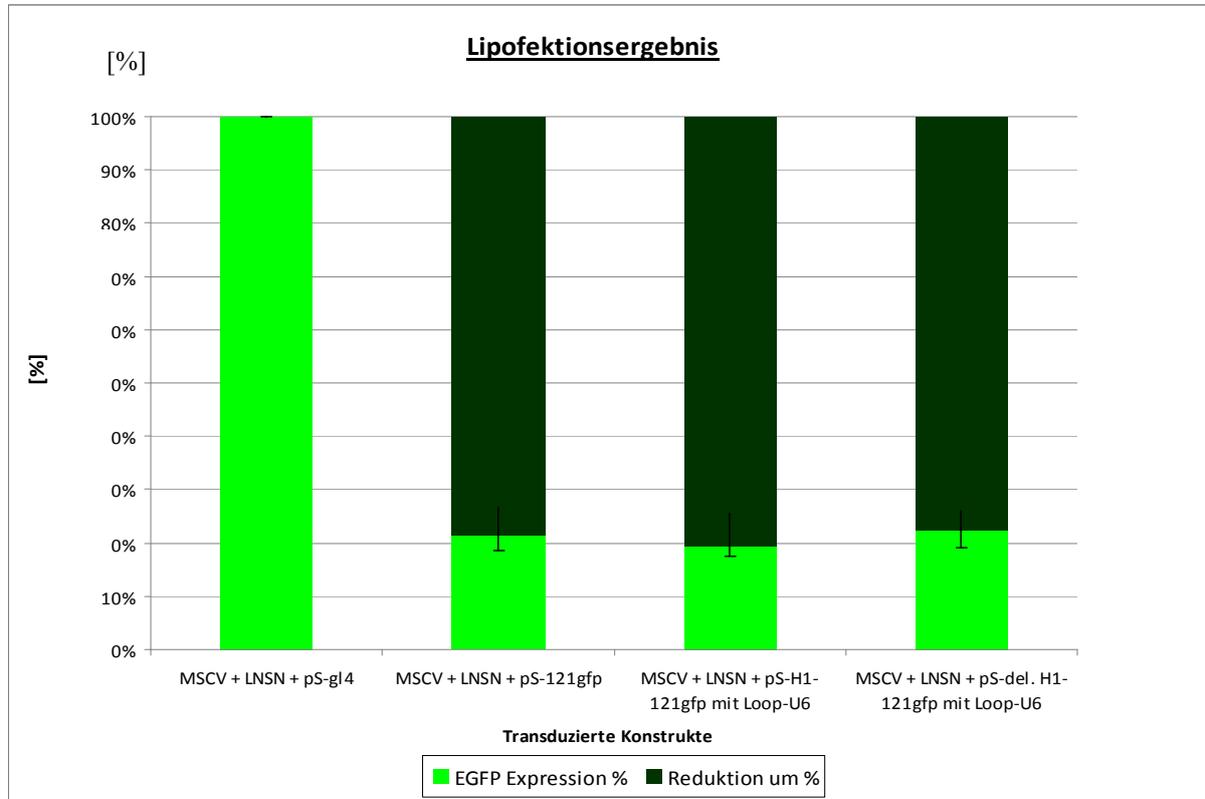


Abb. 13 Graphische Darstellung der prozentualen EGFP Expression (und Reduktion) in BHK 21 Zellen nach transienter Transduktion mit den auf der x-Achse beschriebenen Konstrukten.

3.2.2 Synthese der Bibliothek

Zur Synthese der Bibliothek wird zunächst der *Primer* an das randomisierte Oligonukleotid hybridisiert. Durch eine Klenow-Polymerase-Reaktion wird der komplementäre Strang gebildet. Theoretisch wäre eine PCR Amplifikation möglich. Wir haben uns jedoch auf die einfache Synthese des Gegenstranges beschränkt, da die in den Versuch eingesetzte Menge wie in 3.1.6.1 berechnet, schon ein vielfaches jedes möglichen Konstruktes enthält. Das generierte doppelsträngige DNA-Fragment wird anschließend mit den Restriktionsenzymen *PacI* und *PmeI* geschnitten. Eine Polyakrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die Isolierung des klonierbaren Fragments von 35 Nukleotiden Länge. Dies wird nach der Isolierung zwischen die Promotoren H1 und U6 des mit *PacI* und *PmeI* geschnittenen Vektors ligiert. Da der U6 Promotor ein G als Transkriptionsstart bevorzugt, wird dies durch eine gerichtete Klonierung ermöglicht, indem das eine Ende einen zwei Nukleotid langen Überhang hat und das andere ein glattes Ende besitzt.

Ergebnisse

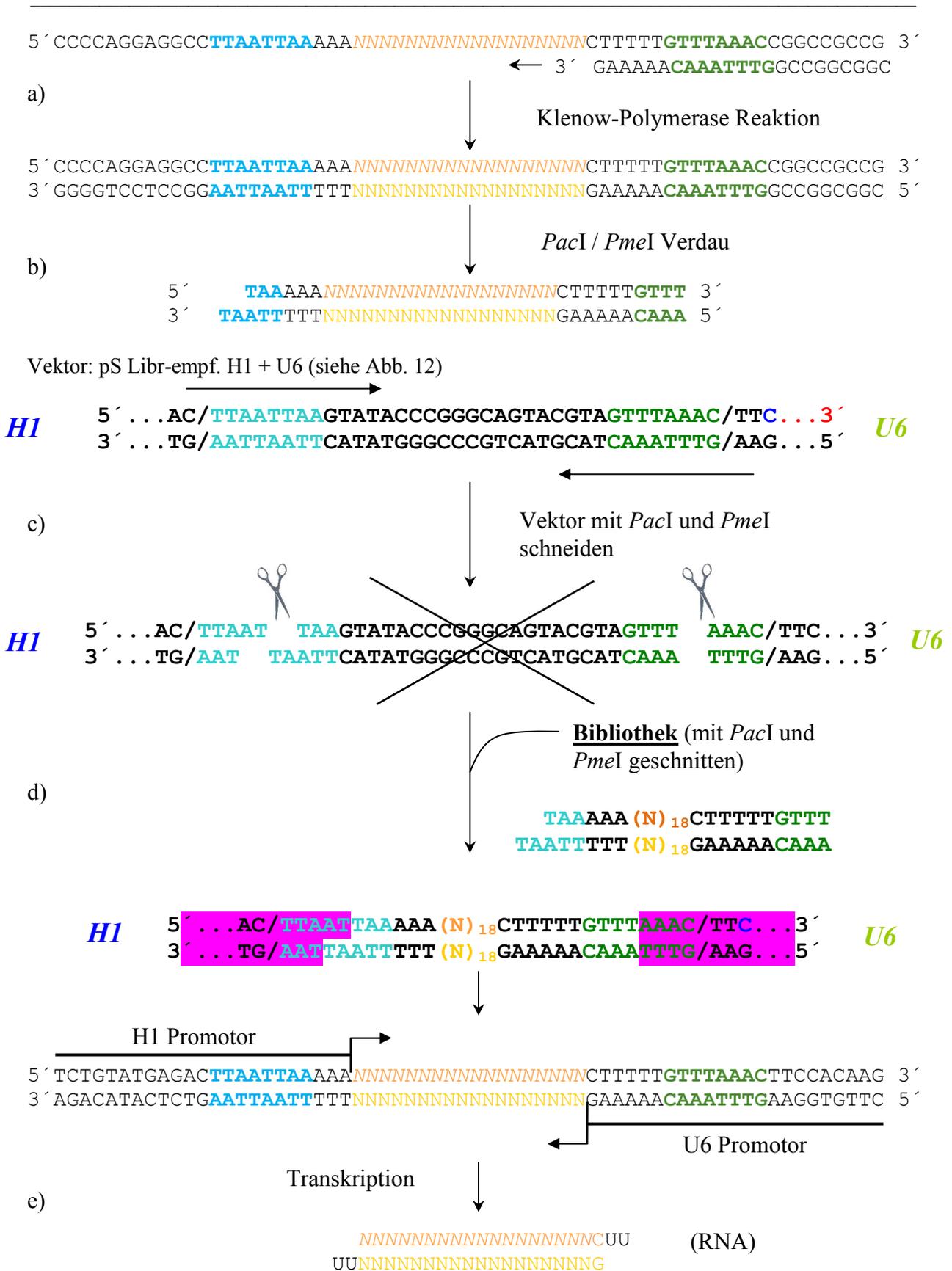


Abb. 14 Generierung der siRNA Bibliothek. a) Synthese des Doppelstranges b/c) Verdau von Bibliothek und Vektor mit *PacI* und *DraI* d) Ligation der Bibliothek in den Vektor e) Transkriptionsprodukt nach intermolekularer Hybridisierung in der Zelle.

3.2.3 Sequenzierergebnisse der randomisierten Bibliothek

Die Synthese der siRNA-Bibliothek kann innerhalb eines Tages erfolgen. Nach Transformation der Bibliothek in Bakterien, wurden die Klone einer Platte (etwa 2000 Stück) vereinigt und nach DNA-Isolation sequenziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Wie man an der Abbildung sehen kann, werden die 18 vollständig randomisierten Nukleotide (Ende der ersten Reihe und Anfang der Zweiten) als Guanin angezeigt. Dies kann eine Tendenz anzeigen, muss es aber nicht (siehe 3.1.6.1), da die Peaks alle ein wenig von der Höhe her unterschiedlich sind.

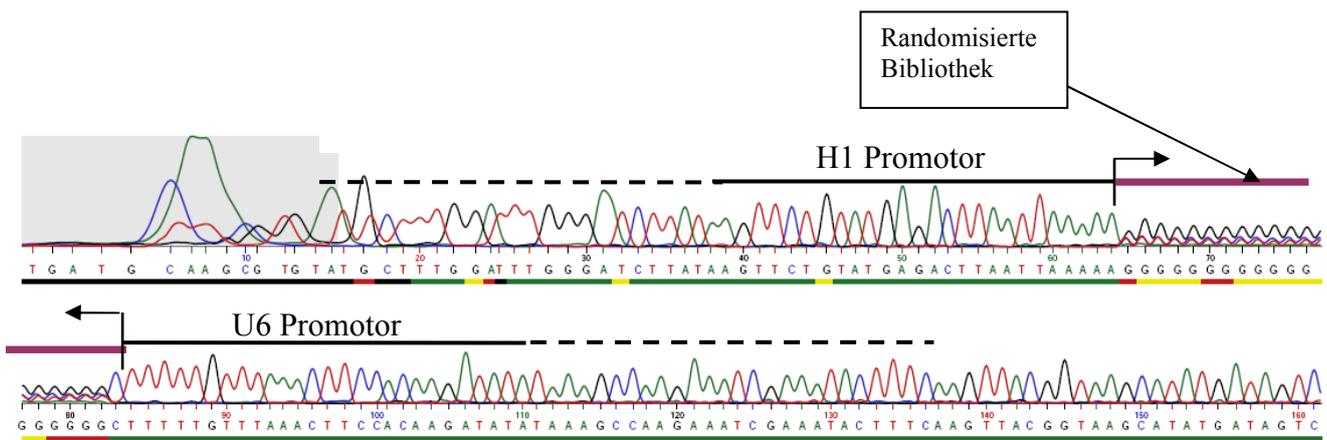
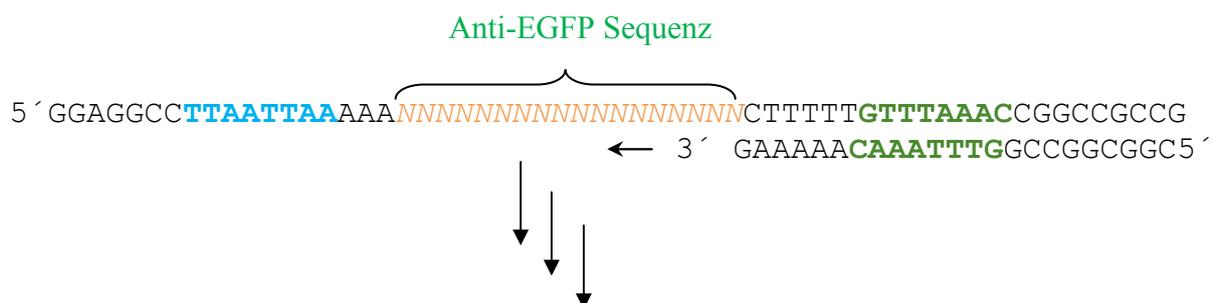


Abb. 15 Sequenzierung der randomisierten Bibliothek zur direkten Generierung von siRNAs.

Die Sequenzierung einzelner Klone ergab eine Gleichverteilung der vier Basen. Die Sequenzergebnisse wurden auch auf Homologien mit dem humanen Genom hin untersucht (BLAST). Dies wurde aber nicht ausgeweitet, da die funktionelle Evaluation anhand einer siRNA gegen EGFP keine zufriedenstellende Effektivität dieses Systems zeigte (3.2.4).

3.2.4 Funktionelle Evaluation anhand einer siRNA gegen EGFP

Um diese Methode der siRNA Bibliothek-Generierung auf ihre Effektivität hin zu überprüfen, wurde die Sequenz die für die siRNA gegen das EGFP Gen kodiert, zwischen die Promotoren H1 und U6 kloniert. Die *sense*-Sequenz ist dieselbe, die auch für die shRNA Methode verwendet wurde, und müsste die siRNA 121 anti GFP liefern.



3.2.4.1 Sequenzierung

Wie man anhand von Abbildung 16 sehen kann, stimmt die erhaltene Sequenz, die man nach dem Durchlaufen der Prozedur zur Generierung der siRNA-121 anti GFP erhält, mit der erwünschten Sequenz überein.

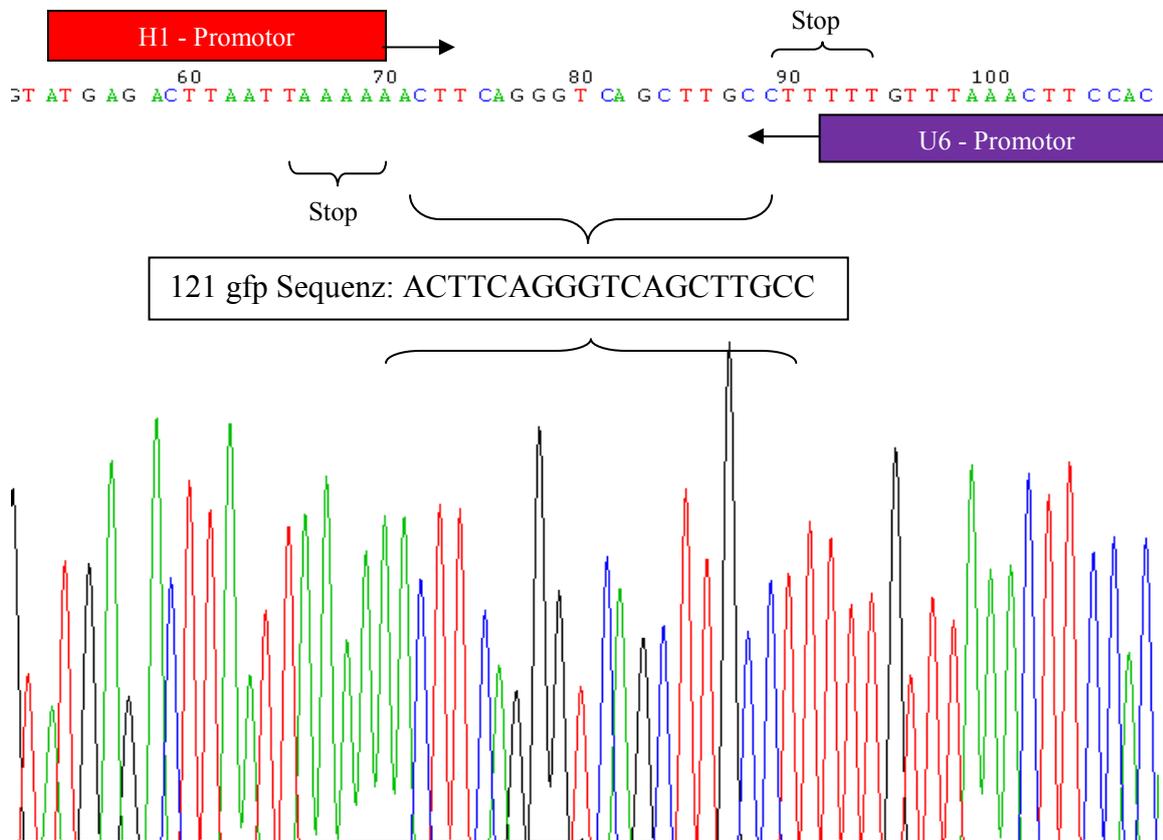


Abb. 16 Sequenzierungsergebnis der 121 gfp Sequenz die mit den zwei Promotoren H1 und U6 flankiert ist. Die 3' Enden der Promotoren H1 und U6 sind farblich markiert. Der Transkriptionsbeginn ist mit den Pfeilen gekennzeichnet.

3.2.4.2 Lipofektion

Da die mutierten Promotoren, wie in 3.2.1.1 gezeigt keine funktionelle Beeinträchtigung der Transkription zeigen, wurden die Konstrukte nun mittels Lipofektion transient in BHK 21 Zellen transfiziert. Trotz vielfacher Versuche und mehrfacher Wiederholung konnte man keine bemerkenswerte Reduktion der EGFP Expression im Vergleich zur Kontrolle erzielen. Die Reduktion belief sich in denn meisten Fällen auf lediglich ca. 5 %.

3.2.4.3 Virusgenerierung und Transfektion von BAF 4hGFP

Obwohl das anti-GFP-siRNA-Konstrukt in der transienten Transduktion keine Reduktion zeigte, wurde das Konstrukt in das lentivirale Plasmid kloniert und Virusüberstände generiert um grün leuchtende BAF4hGFP-Zellen zu transduzieren. FACS Messungen der transduzierten Zellen sind als Histogramme in Abbildung 17 dargestellt.

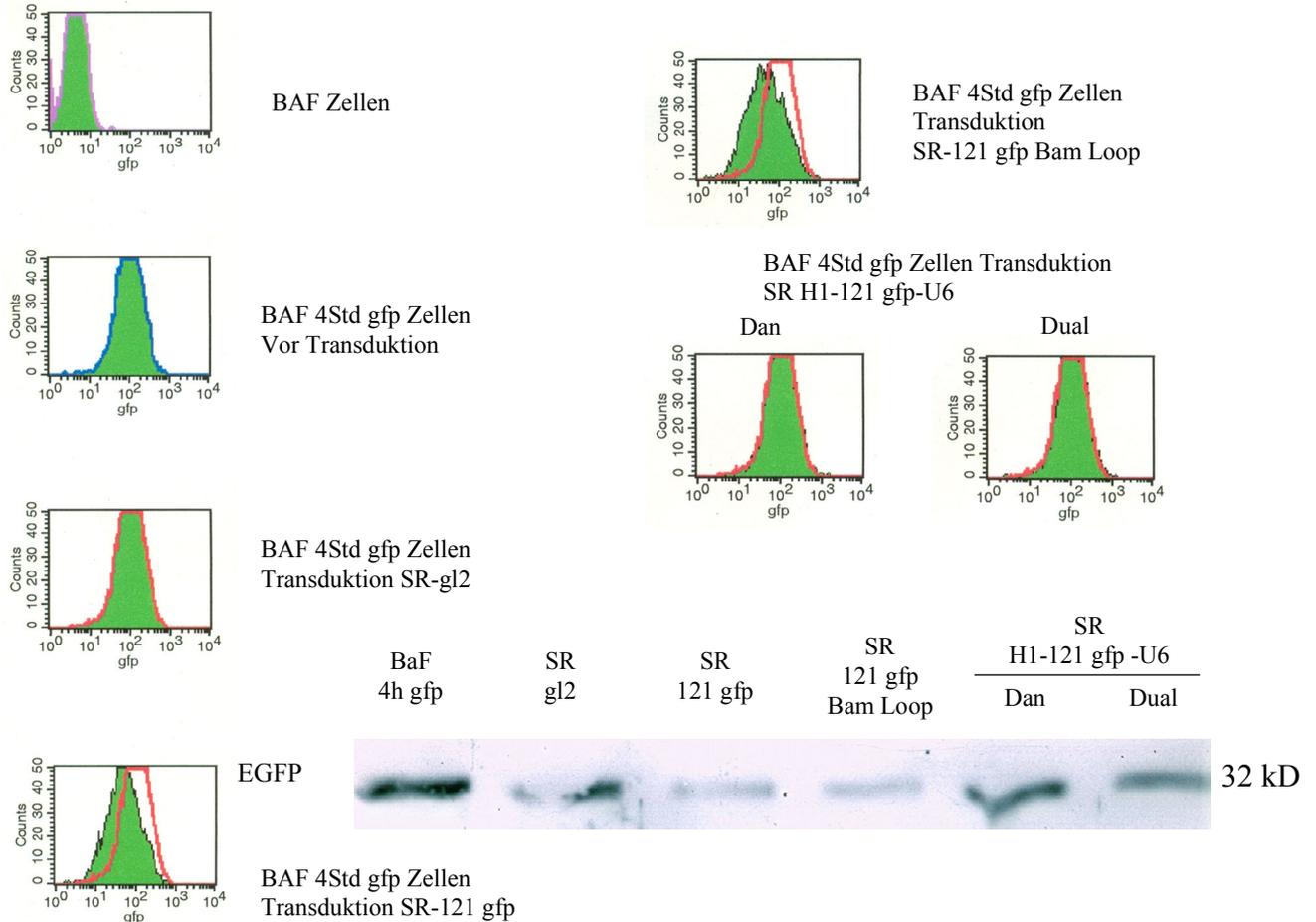


Abb. 17 Histogramm und Westernblot der transduzierten BaF 4h gfp Zellen.

In Abbildung 17 sind Histogramme der EGFP-Fluoreszenz aufgetragen.

Wie man sieht, verursacht die Transduktion mit den Konstrukten SR-121 gfp und SR-121 gfp Bam Loop eine Verschiebung der Grünfluoreszenz nach links im Vergleich zu den mit einer Kontroll shRNA transduzierten Zellen. Dies zeigt eine Reduktion der GFP Fluoreszenz an, was mit der Inhibition der GFP-Expression einhergeht. Mit einer roten Linie ist die Kontur der Kontrolle in den folgenden anderen Grafen eingefügt. Bei den Konstrukten SR H1-121 gfp- U6 sieht man keine Linksverschiebung in der FACS Analyse. Untersucht wurden zwei Varianten: „Dan“ und „Dual“. Die „Dan“ Variante ist die mit unseren mutierten Promotoren generiertes Konstrukt. Die „Dual“ Variante stellt die Klonierung unserer siRNA 121 gfp in

das H1 und U6 Promotorsystem von der Arbeitsgruppe von Peter G. Schultz dar (Zheng et al. 2004). Von all diesen Zellen wurde am Tag 6 nach Transduktion Zelllysate für die Westernblotanalyse hergestellt. Dies ist in der Abbildung 17 unten dargestellt. Es wurden jeweils 75 µg Protein geladen. Wie schon in der FACS Messung beobachtet, erkennt man eine deutliche Reduktion der Expression bei den Konstrukten SR- 121 gfp und SR-121 gfp Bam Loop. Bei der Kontrolle SR gl2 ist durch eine Luftblase beim Blotten der Transfer des EGFP Proteins nur unvollständig gewesen. Bei den Konstrukten SR H1-121 gfp- U6 kann man eine schwache Reduktion sehen. Bei der Verbesserung der Methode 1 wurden die Proteinextrakte noch einmal im WB aufgetragen (Abbildung 24).

3.2.4.4 Überprüfung unseres Vektors anhand des veröffentlichten Vektors pDual

Um zu überprüfen, ob es an unserem Vektor liegt, dass das Reduktionsergebnis der GFP-Expression so mangelhaft ausfällt, wurde der pDual Vektor von der Arbeitsgruppe von Peter G. Schultz (Zheng et al. 2004) mit der 121siRNA Sequenz versehen und mittels Lipofektion getestet. Doch auch hier schwankt die Reduktion lediglich um ca. 5%.

3.3 Generierung einer shRNA-Bibliothek mittels *Rolling Circle Amplification* (RCA)

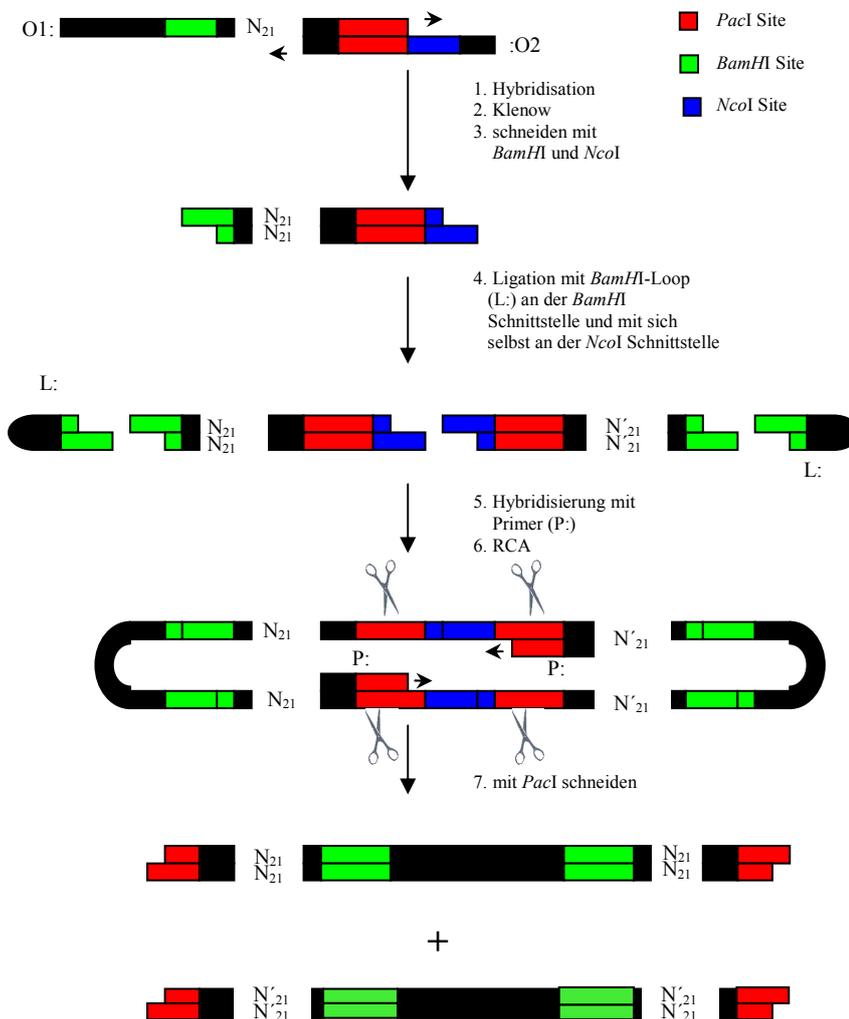
Die in 3.1 präsentierte REGS-Methode basiert auf dem Verdau von cDNA durch mehrere Enzyme, die denselben Überhang hinterlassen, und der Ligation einer Loopsequenz. Um die Methode zu vereinfachen und eine universell anwendbare Bibliothek zu generieren, die nicht nur auf den Organismus von der die cDNA stammt, beschränkt ist; wurde in 3.1.6 eine 21 Nukleotid lange randomisierte, synthetisch hergestellte Sequenz verwendet. Dies erspart den Restriktionsverdau einer cDNA Bibliothek nicht. Die nach der Ligation mit dem Loop nötige Verkürzung auf die für die Funktionalität richtige Länge bleibt jedoch erhalten. Hier wird nun die Möglichkeit beschrieben, mit einem einzigen Loop ohne mehrfache Ligations- und Aufreinigungsschritte die „*dumbbell*“-Struktur als Ausgang für die RCA zu erhalten. Dies senkt Herstellungskosten, spart Zeit und erhöht die Effizienz.

3.3.1 Methode mit randomisierten Sequenzen

Ein 45 Nukleotid langes Oligonukleotid, das eine 21 Nukleotid lange randomisierte Sequenz enthält, wurde mit einem Primer hybridisiert. Wie in Schemazeichnung 18 gezeigt, wurde der Primer so konzipiert, dass zum einen der Gegenstrang zum Ausgangsoligonukleotid durch die Polymerasereaktion synthetisiert und zum anderen das Ausgangsoligo um 11 Nukleotide verlängert wird. Das entstandene 56 bp lange doppelsträngige DNA-Fragment (Schema 18 A) wurde in einem Doppelverdau mit den Enzymen *NcoI* und *BamHI* geschnitten. Durch ein Polyakrylamidgel wurde das ca. 40 bp große Fragment aufgereinigt. Nach Eluation aus dem Gel folgte eine Ligation mit einem Überschuss an *loop*-Oligonukleotid. Dies bezweckt, dass an dem einen Ende das Fragment hauptsächlich mit dem im Überschuss vorliegende Loop ligiert wird. An dem anderen Ende (*NcoI*-Schnittstelle) kann es nur mit einem weiteren Konstrukt ligieren, das sich nur in der randomisierten Sequenz unterscheidet. Durch diese zwei in einem Ansatz gleichzeitig durchgeführten Ligationsschritte erhält man die doppelte Haarnadel-Struktur (*dumbbell*-Struktur), die nötig für die RCA ist. Anders als bei der Methode 3.1 wurde hier nur ein einziger Primer für die RCA verwendet, da die zu dem Primer komplementäre Sequenz auf beiden Strängen zu finden ist. Der Primer hybridisiert nun nicht an der Loopsequenz, sondern in der Mitte des *dumbbells*. Dies ist nötig um die Reihenfolge: *sense*-, Loop, *antisense*-Sequenz zu gewährleisten. Das hochmolekulare RCA Produkt wurde durch das Restriktionsenzym *PacI* in 98 bp lange Fragmente geschnitten (Schema 18 B). Durch Gelelektrophorese wurde diese Bande im Polyakrylamidgel aufgetrennt und anschließend isoliert. Nach der Isolation wurde das Fragment mit dem *PacI* geschnittenen Vektor pSuper sh-empf ligiert. Nachdem der überschüssigen Loopsequenz durch einen

*Bam*HI Verdau und anschließender Religation entfernt wurde, wurde das gesamte Konstrukt in das lentivirale Plasmid gerichtet kloniert. Die Orientierung des hinter dem H1 Promotor klonierten shRNA-Sequenz wurde bei definierten Oligos mittels Sequenzierung überprüft. Bei der randomisierten Bibliothek spielt das keine Rolle, da die Loopsequenz ein Palindrom ist. Im Gegenteil erhöht dies die Möglichkeit der Diversität pro Haarnadelstruktur auf das Doppelte.

A.



B.

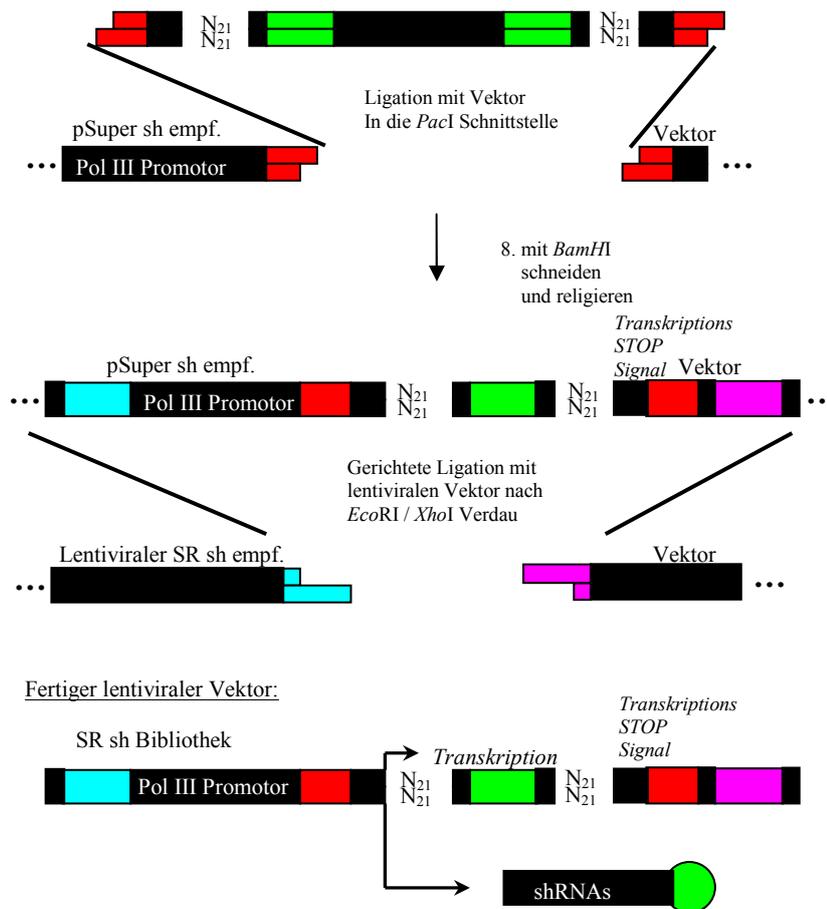


Abb. 18 Schematische Darstellung der Generierung der Bibliothek 4.3.

A. Die Oligonukleotide O1 und O2 wurden hybridisiert. Der komplementäre Strang wurde an beiden 3' Enden mit Klenow gebildet. Nach Hitzeinaktivierung der Polymerase wurde das Produkt im Doppelverdau mit *Bam*HI und *Nco*I geschnitten. Das 40 bp Fragment wurde aus dem PAA-Gel isoliert und mit dem *Bam*HI Loop (L) an dem einen Ende und am anderen Ende mit dem gleichen Konstrukt, das sich lediglich in der randomisierten Sequenz N unterscheidet, ligiert. Nach der *rolling circle amplification* (RCA) mit Primer P, wurde das Konkatermer mit *Pac*I geschnitten. Nach Aufreinigung und Abtrennung von Nebenprodukten, wurden die 98 bp langen Produkte in unser Vektorsystem pSuper kloniert.

B. Das mit *Pac*I geschnittene RCA-Produkt wurde hinter dem Pol III Promotor H1 des pSuper Vektors, das auch mit *Pac*I geschnitten wurde, kloniert. Die Verkürzung der Loopsequenz erfolgte durch ein zweimaliges Schneiden mit *Bam*HI und anschließender Religation. Mit *Eco*RI und *Xho*I wurde das Konstrukt später gerichtet in den lentiviralen Vektor kloniert.

3.3.2 Evaluierung der Methode mit einer antiGFP-shRNA Sequenz

Um zu zeigen, dass diese Methode in der Lage ist, funktionelle shRNAs zu generieren, wurde statt der randomisierten Sequenz, eine definierte Sequenz gegen das EGFP Gen verwendet. In Abbildung 19 a) sind die einzelnen Schritte auf einem PAA-Gel aufgetragen.

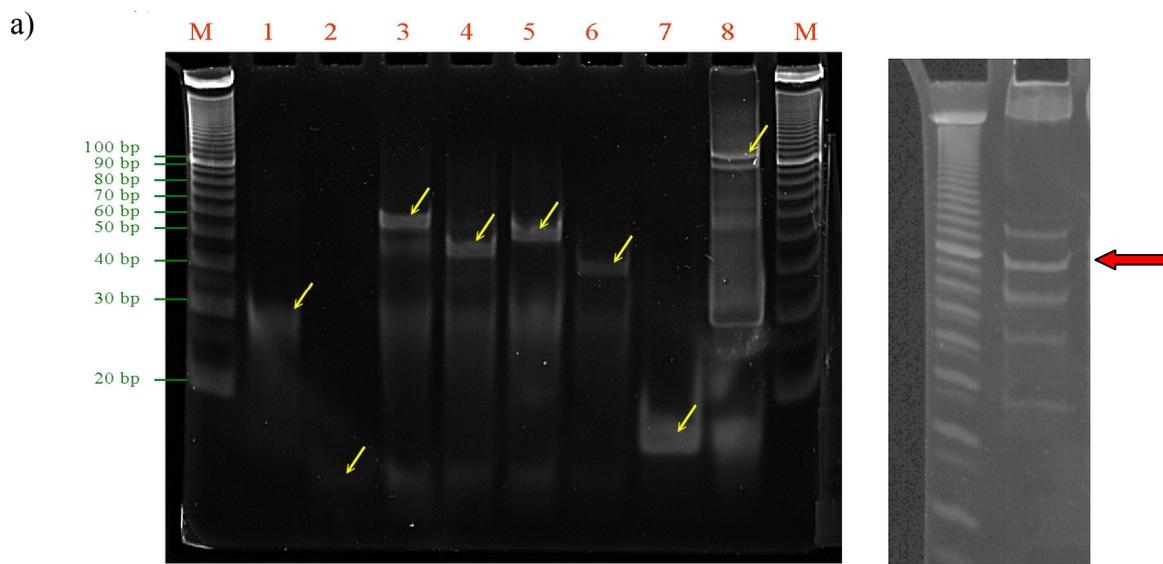


Abb. 19 PAA-Gel der verschiedenen Syntheseschritte der Bibliotheksgenerierung.

Das erwünschte Produkt ist mit einem gelben Pfeil markiert.

a) Spalte 1 und 2 zeigt die nicht hybridisierten Ausgangsoligonukleotide 1 (45nt) und 2 (19nt).

Die Hauptbande bei Lane 3 ist das 56 bp lange Produkt der Hybridisierung der beiden Oligonukleotide mit anschließender Klenow-Reaktion.

Spalte 4 und 5 zeigt den Verdau der dargestellten 56 bp Bande von Spalte 3 mit *Bam*HI (45 bp, Spalte 4) und *Nco*I (51 bp, Spalte 5).

Spalte 6 zeigt das Produkt des Doppelverdau (40 bp) mit den beiden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nco*I. Die schwächeren Banden in Spalte 3-6 gehören zu den Edukten.

Der kinasierte und schock-hybridisierte *Loop* L ist in Spalte 7 aufgetragen.

Spalte 8 zeigt das 112 bp lange Ligationsprodukt, bestehend aus zwei *Loops* (Spalte 7) und jeweils zwei Konstrukten (Spalte 6).

M. 10 bp DNA Leiter

1. Bibliothek Oligonukleotid (45 nt)



2. Primer (19 nt)



3. nach Klenow (56 bp)



4. nach *Bam* HI Verdau (45 bp)



5. nach *Nco* I Verdau (51 bp)



6. nach *Bam* HI + *Nco* I Verdau (40 bp)



7. Loop (32 nt)



8. nach Ligation von zwei Konstrukten 7, die mit dem Loop ligiert sind (112 bp)



Spalte 1 zeigt das einzelsträngige Ausgangsoligo (45 nt), das mit dem in Spalte 2 gezeigten Primer (19 nt) hybridisiert wird. Dadurch, dass diese einzelsträngig sind, ist ihr Laufverhalten

im Gel anders als das des doppelsträngigen Längenmarkers. Spalte 3 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung und der Polymerase Reaktion. Das 56 bp große Produkt ist mit dem gelben Pfeil markiert. Des Weiteren sieht man noch die Bande des Ausgangsoligos wie auch die des Primers. Spalte 4 und Spalte 5 zeigen das Ergebnis des Verdau sowohl mit *BamHI* wo ein 11 bp Fragment wegfällt (Spalte 4) als auch das Ergebnis des Verdau mit *NcoI* wo ein 5 bp Fragment abgetrennt wird (Spalte 5). Zur Demonstration wurden diese Verdau getrennt durchgeführt. Für präparative Gele wird der Verdau mit beiden Enzymen gleichzeitig durchgeführt, so dass gleich das 40 bp lange Fragment das in Spalte 6 gezeigt wird, gebildet wird. Spalte 7 zeigt die kinasierte und mit sich selbst hybridisierte Loopsequenz. Wird dies mit dem Produkt aus Spalte 6 ligiert, erhält man die Banden die in Spalte 8 gezeigt werden. Der gelbe Pfeil zeigt wieder auf das gewünschte Produkt von 112 bp. Obwohl der Loop in Überschuss dazugegeben wurde, sieht man doch in Spalte 8 eine Bande bei 96 bp. Dies müssen zwei mit sich selbst ligierte 40 bp Fragmente sein, die aber nur mit einem Loop ligiert sind. Das erklärt die um 16 bp kürzere Bande als die gewünschte von 112Bp. Dieses isolierte Produkt, das die Form einer doppelten Haarnadelschleife hat und in sich geschlossen ist, dient als Ausgangssubstrat der RCA. Abbildung 19 b) zeigt das hochmolekulare Ergebnis einer 16 h RCA-Reaktion bei 30 °C nach einem Verdau mit dem Restriktionsenzym Pac I. Dabei entsteht das gewünschte in pSuper klonierbare Fragment von 98 bp Länge.

Dadurch wird die Sequenz lesbar, wobei jedoch von beiden Seiten der Schnittstelle sequenziert werden muss (Abbildung 20 B+C). Die erwartete Sequenz ist unter dem Sequenziererergebnis dargestellt.

3.3.2.2 Funktionalitätsüberprüfung mittels transienter Transfektion

In einem vierfachen Ansatz wurde das im Punkt 3.3.2.1 sequenzierte Konstrukt gegen das EGFP-Gen durch Lipofektamin in BHK21 Zellen transfiziert. Die Reduktion der EGFP-Expression ist in Abbildung 21 dargestellt.

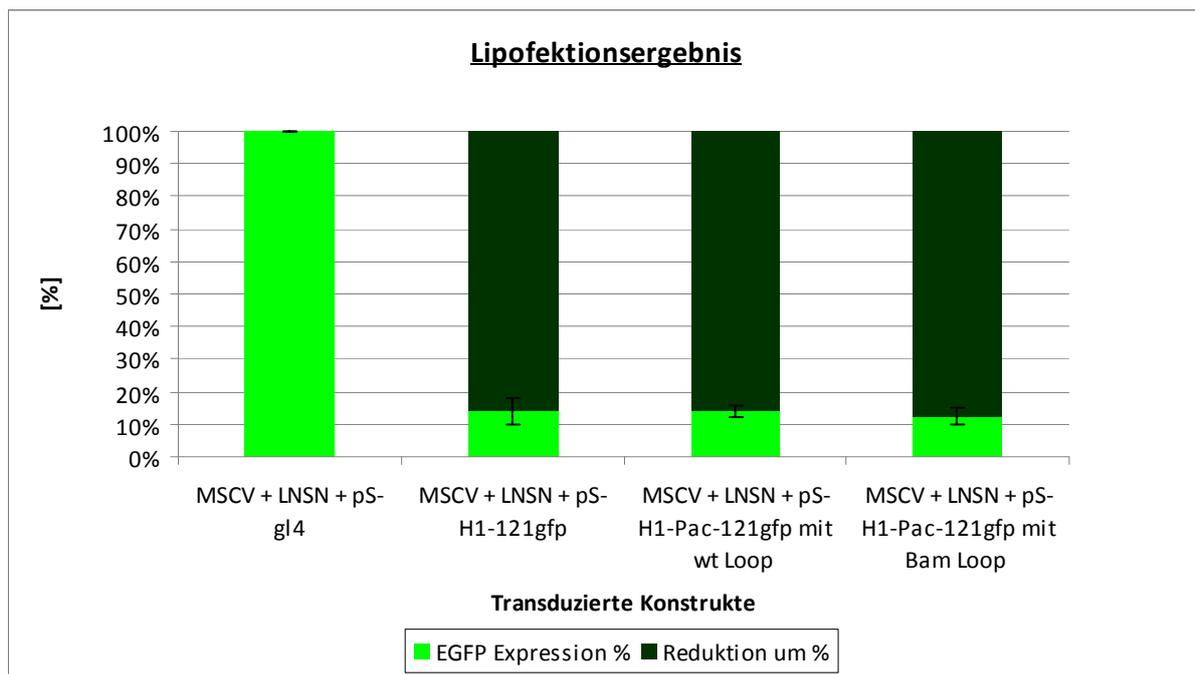


Abb. 21 Graphische Darstellung der prozentualen EGFP Expression (und Reduktion) in BHK 21 Zellen nach transienter Transduktion mit den auf der x-Achse beschriebenen Konstrukten.

3.3.2.3 Generierung von Virusüberständen und Transduktion von BaF 4h gfp Zielzellen

Von den Konstrukten, die mit Lipofektamin transient in die Zellen gebracht wurde, wurde nach der Klonierung in den lentiviralen Vektor, Virusüberstände generiert. Damit wurden grün leuchtende BaF 4h gfp Zellen transduziert. Das Ziel war eine stabile Expression der shRNA gegen EGFP zu erhalten, um einen lang andauernde Reduktion beobachten zu können. Da die Zellen der unterschiedlichen Konstrukte und auch die Zellen eines selben Konstrukts unterschiedlich stark mit Viruspartikel transduziert wurden (obwohl man bei allen Konstrukten mit etwa gleicher Virustärke transduziert hat), wurden diese nach der für den

Vektor spezifischen RFP Expression gesortet. Anhand der RFP-Signalintensität konnte man die Abtrennung der rot leuchtenden Zellen von den nicht transduzierten Zellen erreichen und durch ein beim Sort festgelegtes Fenster die Virusinfektionsrate bei allen Konstrukten vereinheitlichen.

A.

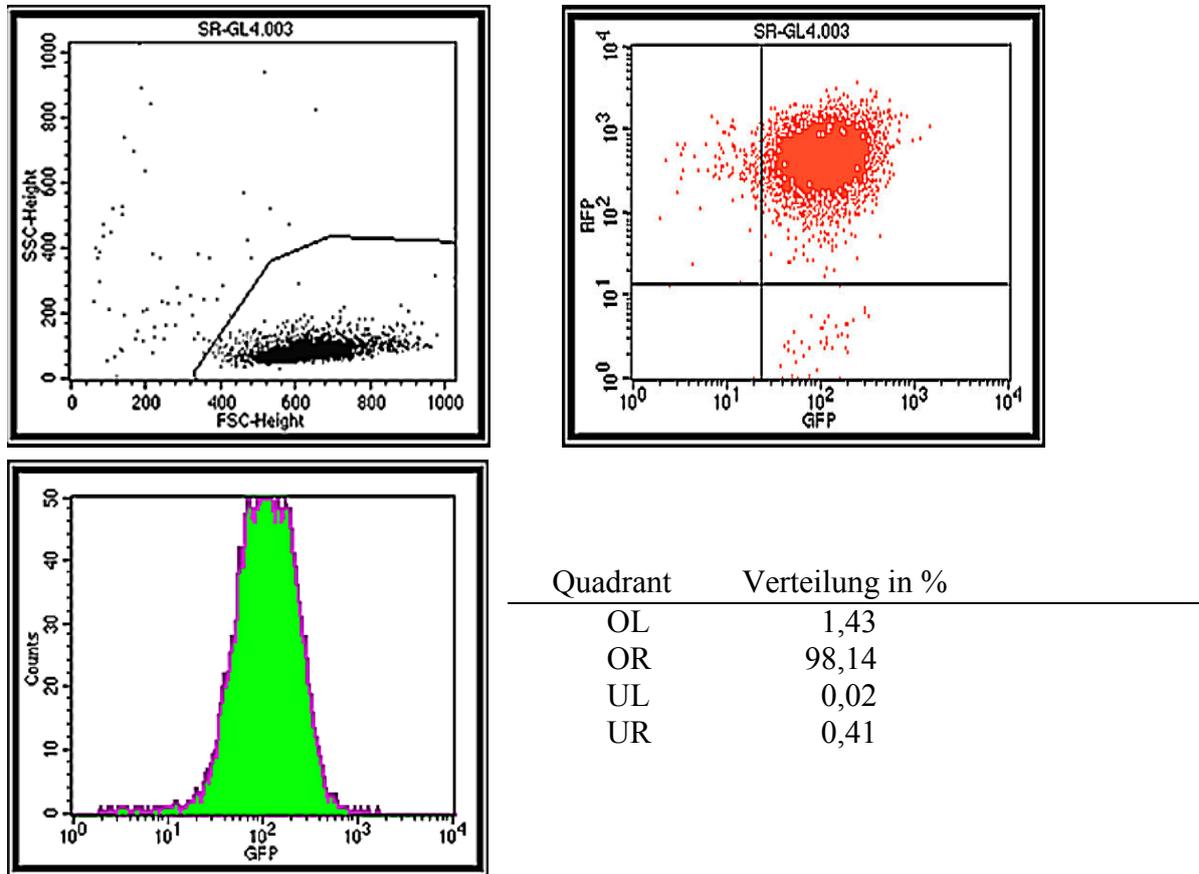


Abb. 23 *Dot blot*-Darstellung und Histogramm der BaF 4h gfp Zellen nach Transduktion und Sortierung.

Die erste *Dot blot*-Darstellung zeigt die Zellpopulation im Bezug auf Größe (FSC) und Granularität (SSC).

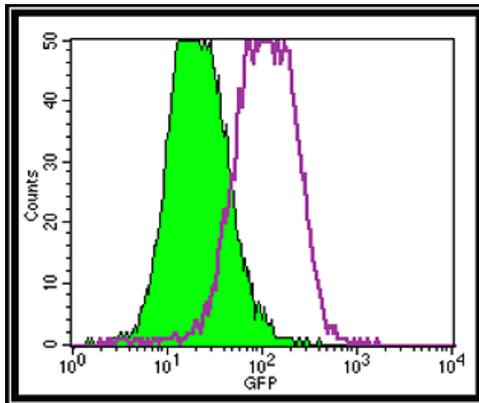
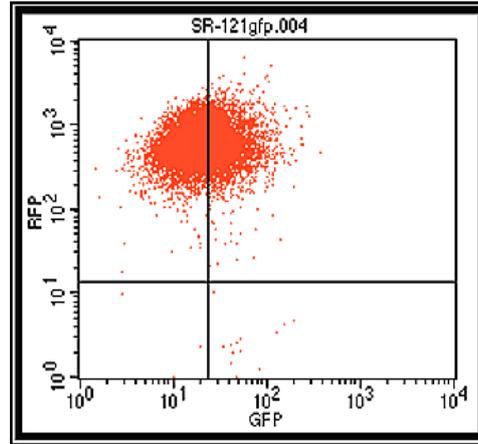
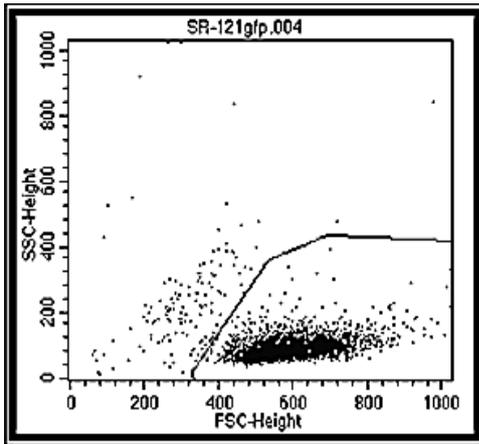
Im zweiten Dotplot sind die Zellen nach ihrer Rot- und Grünfluoreszenz aufgetragen. Dazu gehört die Tabelle, in der noch einmal die Verteilung der Zellen in Prozent in den jeweiligen Quadranten angezeigt wird (OL = oben links, OR = oben rechts, UL = unten links, UR = unten rechts). Im Histogramm sind die Häufigkeiten der GFP-Expressionsstärke grafisch dargestellt. In violett ist die Kontur der shRNA gezeigt, die keinen Einfluss auf die EGFP expression hat (SR gl4).

A. Konstrukt SR gl4 (Negativ Kontrolle).

B. Konstrukt SR 121 gfp (Positiv Kontrolle).

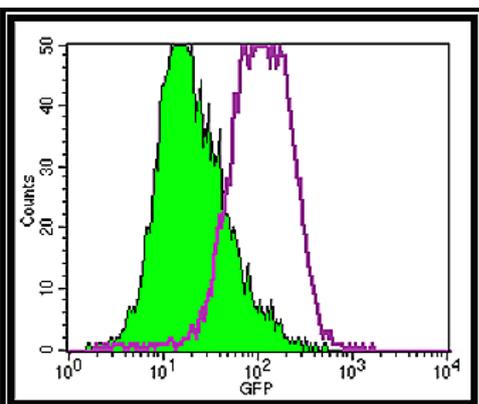
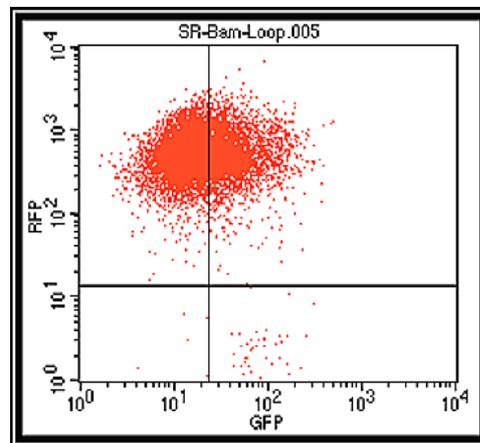
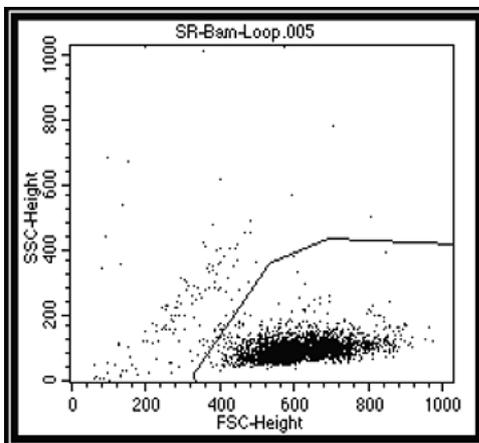
C. Konstrukt SR 121 gfp Bam Loop (Methode 3).

B.



Quadrant	Verteilung in %
OL	58,50
OR	41,33
UL	0,03
UR	0,14

C.



Quadrant	Verteilung in %
OL	62,36
OR	37,19
UL	0,05
UR	0,40

Im ersten Bild der Abbildung 23 ist die FACS-Darstellung der Zellpopulation entsprechend ihrer Größe und Granularität aufgetragen. Die dort mit einem Kreis eingeschlossenen Zellen sind dann in der zweiten *dot blot*-Darstellung nach ihrer Rot- (y-Achse) und ihrer Grün-Fluoreszenz (x-Achse) aufgetragen. Man sieht, dass die gesorteten Zellen alle eine ähnlich starke Rotfluoreszenzintensität aufweisen. Bei den Konstrukten SR 121 gfp (Positiv Kontrolle) und SR 121 gfp Bam Loop (Methode 3) sieht man, dass die Grünfluoreszenz abnimmt und somit die gesamte „Wolke“ nach links verschoben wird.

Die Verschiebung der „Wolke“ nach links ist auch in der Tabelle ersichtlich. Diese gibt den prozentualen Zellanteil der vier Quadranten in der zweiten *dot blot*-Darstellung an. Bei der Negativ-Kontrolle (Konstrukt SR gl4) befinden sich 98,14% der Zellen in dem Quadrant oben rechts (OR). Durch die Hemmung der Translation des EGFPs durch die shRNA verschiebt sich die dargestellten Zellen nach links. Dadurch sind bei der Positiv-Kontrolle nun 58,5 % der Zellen in dem Quadranten oben links. Bei dem Konstrukt, das nach der dargestellten Methode generiert wurde, sind es sogar 62,3%.

Eine andere Darstellung dieser Verschiebung zeigt das Histogramm. Mit einem violetten Umriss wurde in jeder Abbildung zum Vergleich die mit der Negativ-Kontrolle transduzierten BaF 4h gfp Zellen dargestellt.

3.3.2.4 Western Blot

Von den in Punkt 3.3.1.3 transduzierten BaF 4h gfp wurden Zelllysate generiert und durch einen Western Blot die vorhandene EGFP-Proteinmenge dargestellt. Abbildung 24 zeigt das Ergebnis des Western Blots, in dem pro Spalte 75 µg Protein eingesetzt wurden. Als Ladungskontrolle wurde der Antikörper gegen Erk2 verwendet.

In der ersten Spalte ist das Zelllysate der BaF 4h gfp Zellen, die mit der Negativ-Kontrolle SR gl4 transduziert wurden, aufgetragen. Die Bande des EGFP-Proteins erscheint gut sichtbar und in vergleichbarer Intensität wie die Zellen, die mit den Konstrukten SR H1 121 gfp U6 (Methode 2a) [Spalte 4] und SR H1 121 gfp U6 (aus dem Vektor „pDual“) [Spalte 5] transduziert wurden. Dies stellt noch einmal auf dem Western-Blot das dar, was in der FACS-Messung im Punkt 3.2.4.3 (Seite 79) ersichtlich war, nämlich dass die nach der zweiten Methode generierte siRNA gegen EGFP nicht die erwünschte Reduktion zeigt. In der zweiten Spalte ist das Zelllysate der mit der Positiv-Kontrolle transduzierten Zellen aufgetragen und in der dritten das Zelllysate, welches mit dem Konstrukt transduziert wurde, dass nach dieser dritten Methode generiert wurde. Beide zeigen eine ähnlich starke Reduktion der EGFP-Expression.

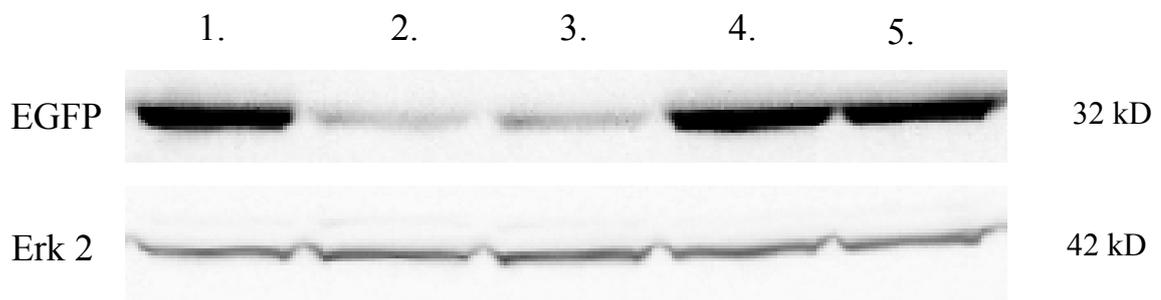


Abb. 24 Western Blot der transduzierten BaF 4h gfp-Zellen.

1. Transduktion mit SR gl4 (negativ Kontrolle)
2. Transduktion mit SR 121 gfp (positiv Kontrolle)
3. Transduktion mit SR 121 gfp Bam Loop (Methode 3)
4. Transduktion mit SR H1 121 gfp U6 (Methode 2a)
5. Transduktion mit SR H1 121 gfp U6 (aus dem Vektor „Dual“)

3.3.3 Sequenzierung und Verteilung der Nukleotide bei der randomisierten Bibliothek

Eine Ansammlung von etwa 12.000 vereinigten Klonen wurde sequenziert. Um einen vorzeitigen Abbruch der Sequenzierung zu umgehen, wurde wie schon in 3.1.6.1 erläutert, die vereinigten Konstrukte vorher mit dem *Bam*HI Restriktionsenzym verdaut, so dass die

Haarnadelstruktur kodierende Sequenz an der „Schleife“ aufgeschnitten wurde. In Abbildung 25 ist die Sequenzierung ausgehend vom H1-Promotor bis zur *Bam*HI Erkennungssequenz dargestellt.

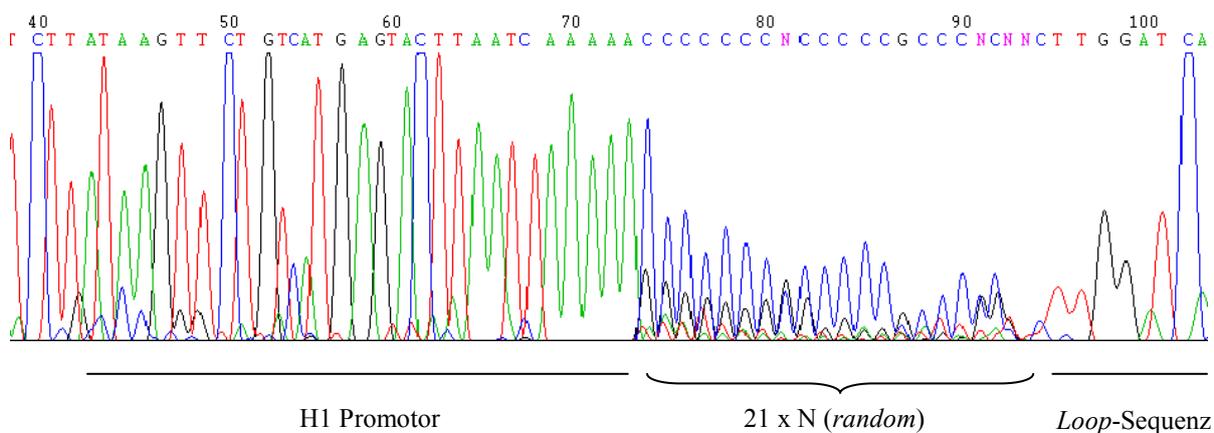


Abb. 25a Sequenzierung von ca. 12.000 vererinigten Klonen. Um den vorzeitigen Abbruch der Sequenzierung wegen der Ausbildung einer Haarnadelstruktur zu verhindern, wurde der Vektor vor der Sequenzierung mit *Bam*HI geschnitten. Abgebildet ist die Sequenz bis zur *Bam*HI Schnittstelle ausgehend vom H1 Promotor.

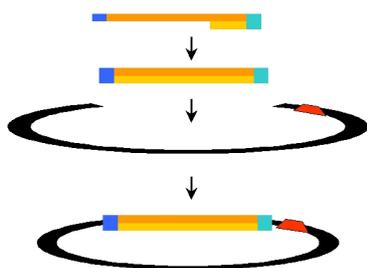
Sequenzierungen einzelner Klone ergaben die in der Tabelle in Abbildung 25b dargestellten Ergebnisse.

<i>Daniel</i>		Position:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Σ	Erhalten %
Bestellt:	Prozentualer Anteil:																								
25%	"A"		6	17	21	15	9	15	21	21	13	23	13	28	30	19	28	21	23	28	17	17	21	406	19,35
25%	"T"		11	13	17	17	9	9	4	9	26	6	15	11	11	6	13	11	6	13	2	9	4	219	10,44
25%	"G"		30	28	30	36	32	30	40	38	15	32	23	26	28	45	30	19	26	13	30	13	47	609	28,98
25%	"C"		53	43	32	32	51	47	34	32	47	38	49	36	32	30	30	49	45	47	51	62	28	866	41,24
																								100,00	

<i>Daniel + T</i>		Position:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Σ	Erhalten %
Bestellt:	Prozentualer Anteil:																								
30%	"A"		29	21	26	29	32	26	32	26	18	24	34	29	29	37	39	39	34	34	37	32	42	650	30,94
34%	"T"		18	18	26	26	29	13	11	21	29	16	18	18	21	18	18	13	16	18	21	26	19	417	19,84
24%	"G"		11	13	13	18	8	21	5	24	21	18	21	18	11	26	13	11	16	13	11	18	23	333	15,86
12%	"C"		42	47	34	26	32	39	53	29	32	42	26	34	39	18	29	37	34	34	32	24	16	700	33,35
																								100,00	

Abb. 25b Sequenzierung von jeweils ca. 40 einzelner Klone von zweier unterschiedlichen chemischen Synthesen. Aufgetragen ist jeweils der prozentuale Anteil der in der zweiten Spalte aufgeführten Basen. Unter „Bestellt:“ ist die gewünschte Verteilung der einzelnen Basen für jede Position angegeben. In der letzten Spalte ist der erhaltene Wert aufgetragen.

Wie man anhand der Tabelle sieht, ist die Verteilung nach der Prozedur der Generierung der randomisierten Bibliothek nicht mehr wie erwartet. Nachdem man statt einer Gleichverteilung der einzelnen Basen (25% je Base) einen Cytosin-Überschuss und eine Thymin Unterschuss erhalten hat, wurde anhand einer neuen Bestellung des Oligos versucht, dem entgegen zu wirken. Die bestellte Verteilung (Daniel + T) kann man in der ersten Spalte unten ablesen. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigt (Spalte ganz rechts), dass die Werte zwar in die gewünschte Richtung gebracht wurden, jedoch noch nicht eine Gleichverteilung entsprechen.



Um die Verteilung der Basen des Oligos zu überprüfen, wurde dieses durch die Klenow-Polymerase aufgefüllt und ungerichtet in den pSuper Vektor kloniert (siehe Abbildung links). Sequenzierungen von etwa 10 Klonen, zeigten die bestellte Verteilung.

3.3.4 Ausbeute: Klone / μg DNA

Die Ausbeute an Klonen pro μg Ausgangs DNA Oligonukleotid lässt sich bei dieser Methode (wie auch schon bei der ersten) schlecht abschätzen, da die RCA ein Amplifikationsschritt ist. Somit wäre es möglich, fast beliebig die Zahl der erhaltenen Klone / μg eingesetztes Ausgangs oligonukleotid zu erhöhen. Bei einer gering eingesetzten DNA Menge des *dumbbells* erhält man bei der RCA gleiche Sequenzen, was für eine nicht allzugroße Diversität spricht.

Berechnungen und Abschätzungen haben eine Ausbeute von ca. 6×10^5 Klone / μg Ausgangs-DNA ergeben.

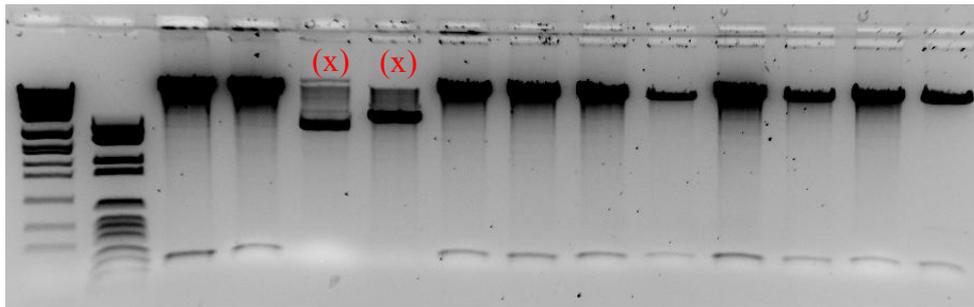
3.3.5 Generierung von Virusüberständen. Bilden Rekombinierter Virusüberstände?

Beim Arbeiten mit lentiviralen Transgenvektoren kann es vermehrt zu Rekombinationen mit dem Bakteriengenom kommen aufgrund der repetitiven Sequenzen der zwei für die Integration ins Genom von Eukaryoten wichtigen *long terminal repeats* (LTR). Die Rekombinationsrate liegt im ungünstigsten Fall bei ca. 30 - 40 %. Dieser unerwünschte Effekt konnte aber im Verlauf der Arbeit auf ein Minimum reduziert werden. Um die Rekombinationsrate zu minimieren, wurde ein spezieller Bakterienstamm verwendet (Stabl 4 Zellen von Invitrogen), der zur Stabilisierung besonders rekombinationsfreudiger Plasmide geeignet ist (Abbildung 26 A). Um zu sehen, ob ein rekombinierter Transgenvektor in der

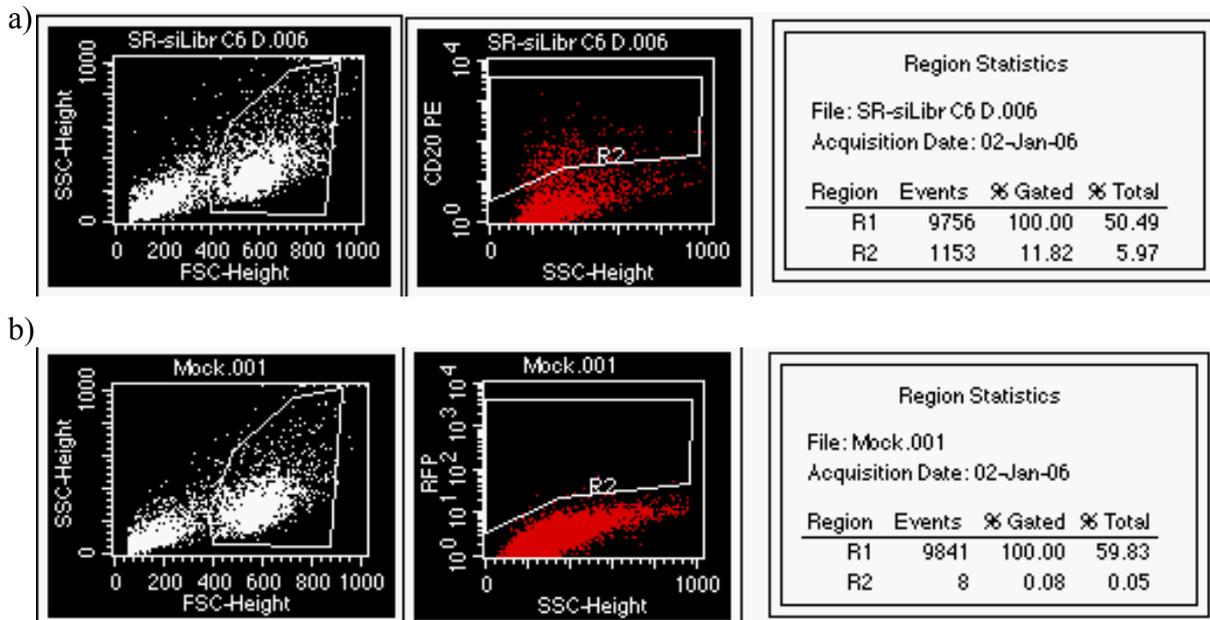
Lage ist funktionsfähige Viruspartikel zu generieren, wurden Virusüberstände von 3 rekombinierten Vektoren generiert. Als Kontrolle wurde ein nicht rekombinierter Transgenvektor verwendet.

Es war nicht möglich, funktionsfähige Viruspartikel der rekombinierten Transgenplasmide zu generieren, da schon die „producer-Zellen“ keine RFP-Expression zeigten. Der frisch hergestellte Überstand, der die Viruspartikel enthalten sollte, wurde zur Transduktion der Zielzellen verwendet. Wie man in der FACS-Messung in Abbildung 26 B sehen kann, riefen die mit rekombinierten Konstrukten generierten Virusüberstände bei den transduzierten Zielzellen keine RFP-Expression hervor. Das linke Bild zeigt in weiß die Zellpopulation, aufgetrennt nach Granularität und Größe. Das markierte Feld R1 zeigt die Zellen an, die im zweiten Bild nach ihrer Rotfluoreszenz und Größe dargestellt wurden. Das Feld R2, das bei der Positiv-Kontrolle rote Zellen enthält, bleibt bei den untransduzierten und mit dem rekombinanten Konstrukt transduzierten Zellen leer. Somit kommt man zu dem Ergebnis, dass rekombinierte Vektoren nicht in der Lage sind, funktionelle Virusüberstände zu generieren, und somit die Untersuchung von Zielzellen durch Anwendung der Bibliothek zu stören.

A.



B.



c)

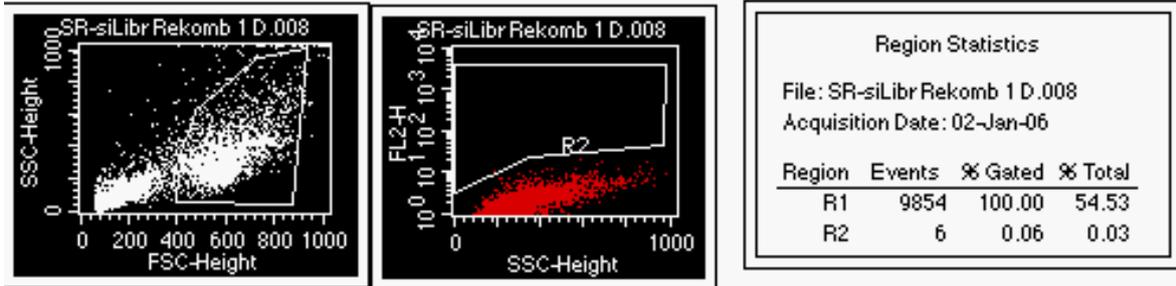


Abb. 26 Agarose Gel eines Verdau von einzelnen Klonen einer Bibliothek, bei der zwei Rekombinierer auftraten und FACS Daten von transfizierten Zellen mit einem nicht rekombinierten und einem rekombinierten Transgenplasmid.

A. Aus einzelnen Klonen der Bibliothek isolierte lentivirale Transgenvektoren verdaut mit *EcoRI* / *BamHI*. Die Rekombinierer sind mit (x) markiert.

B. FACS Daten der Transduktion von 32D Zellen.

a) Untransduzierte 32D Zellen.

b) Transduzierte Zellen mit einem nicht rekombinierten Klon aus der Bibliothek.

c) Transduzierte Zellen mit einem rekombinierten Klon aus der Bibliothek.

3.3.6 Interferon Antwort

Beim Arbeiten mit kurzen RNA Fragmenten ist es wichtig, dass diese nicht eine Interferonantwort der Zellen auslösen. Aus diesem Grund wurde sowohl eine Kontroll-shRNA (SR gl4) als auch die Library in 32D Zellen transduziert und die OAS mRNA Rate, welches ein Indikator für die Interferonantwort ist, mit der des in der Zelle stabil exprimierten GAPDH mRNA verglichen. Zu Vergleichszwecken wurden 32D Zellen 24 Stunden lang mit 10 bzw. 50 Units IFN- α behandelt.

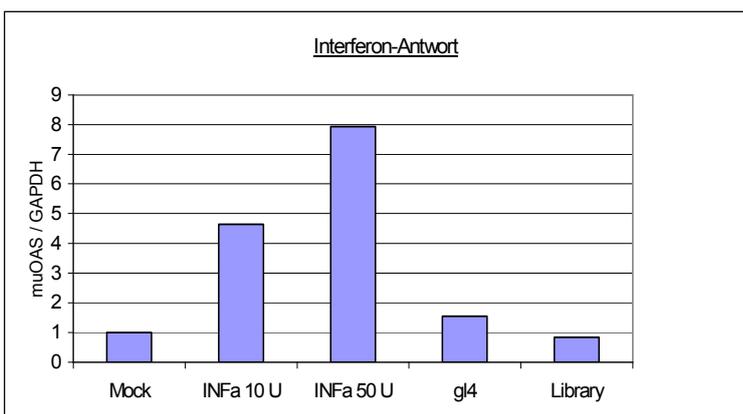


Abb. 27 Graphische Darstellung der TaqMan PCR Ergebnisse von 32D Zellen, die 24 Stunden mit 10 bzw. 50 U IFN- α behandelt wurden. Im Vergleich 32D Zellen die mit einer irrelevanten shRNA (gl4) und mit randomisierter shRNA Bibliothek-Konstrukten transduziert wurden.

Wie man anhand des Graphen in Abbildung 27 sehen kann, ruft der Einsatz der von uns generierten Bibliothek keine Interferonantwort hervor.

3.4 Generierung einer randomisierten Bibliothek ohne Verwendung der RCA

Die in 3.3 beschriebene Methode ist eine deutliche Verbesserung der Generierung einer randomisierten si/shRNA Bibliothek bezüglich der Methode von 3.1. Sie verwendet jedoch die Rolling Circle Amplifikation. Der Nachteil dieser Amplifikation ist, dass man am Ende anhand der Klonzahl nicht wirkliche Aussagen über die Diversität der Bibliothek machen kann. Es wäre möglich, dass viele Klone durch die Amplifikation eines einzigen Dumbbells entstehen. Gleiche Sequenzierergebnisse von unterschiedlichen Klonen haben diese Annahme bestätigt. Hier wird nun eine Methode zur Erstellung einer randomisierten si/shRNA Bibliothek vorgestellt, die die RCA nicht mehr benötigt.

3.4.1 Vorversuch

Bei der Untersuchung der Basenverteilung der synthetischen Oligonukleotide bei der vorherigen Methode (3.3.3) entstand die Idee, das erhaltene Konstrukt mit *Bam*HI und *Pme*I zu schneiden und an der *Bam*HI Schnittstelle den Loop (nicht kinasiert) der Methode 3.3 zu ligieren (Abbildung 28). Da der Loop nicht kinasiert ist, bildet die fehlende Phosphatgruppe ein „gap“ in der Sequenz. Mit der Phi 29 Polymerase und der Pfu Ultra Polymerase wurde nun untersucht, ob es möglich ist, den Strang am 5'Ende „abzuheben“ und den Gegenstrang zu synthetisieren. Die Phi 29 Polymerase, die bekannt ist durch ihre „strand displacement“ Eigenschaften, arbeitet bei 30 °C während die Pfu Ultra Polymerase bei 68-72 °C bzw. 75°C ihr Temperaturoptimum für die Synthese zeigt. Die Fragestellung ist nicht nur, ob die Synthese überhaupt stattfindet, sondern auch ob die 3'→ 5'Exonukleaseaktivität der Polymerase nicht zu einem Abbau des Stranges jenseits des „gap“ führt. Nach dem Auffüllen muss der Vektor noch durch eine Ligation mit dem mit *Pme* I geschnittenen Vektor als „blunt-end“-Ligation in die geschlossene zirkuläre Form gebracht werden.

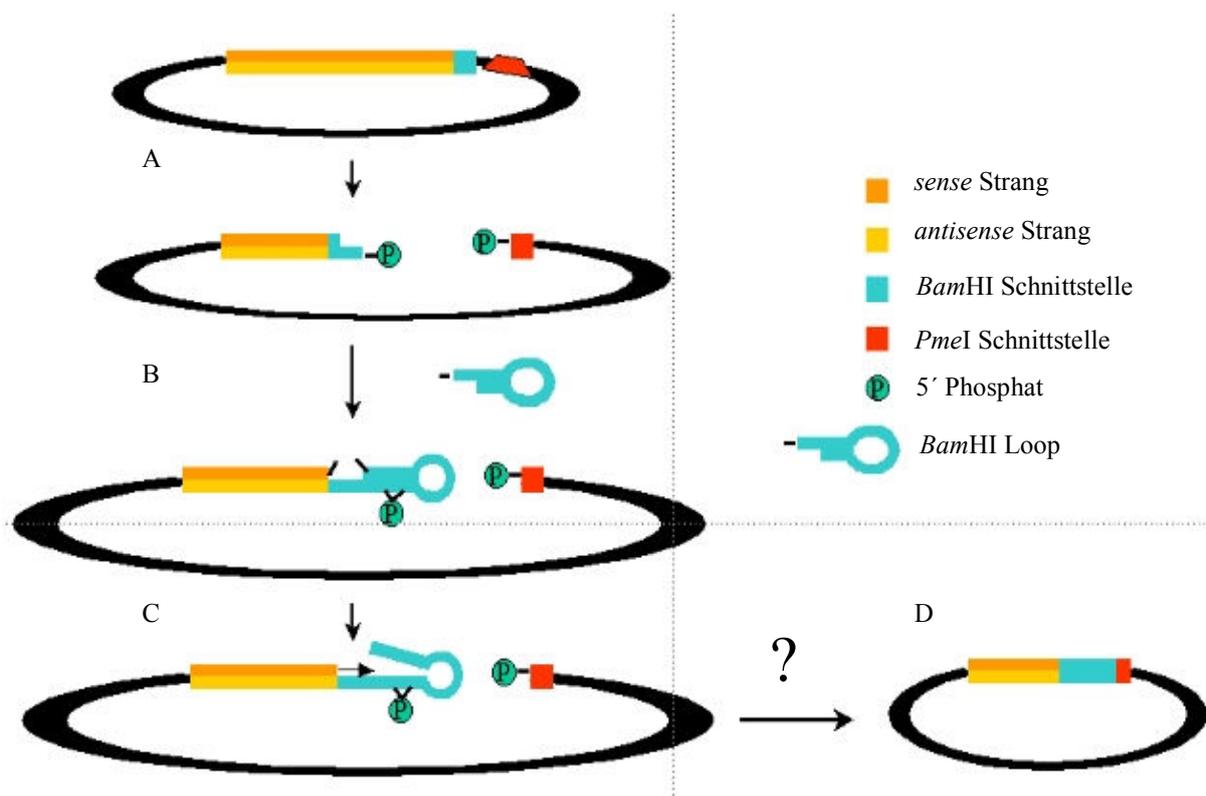


Abb. 28 Schematische Darstellung des Vorversuchs.

A: Ein in 3.3.3 hergestelltes Konstrukt wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pme*I geschnitten.

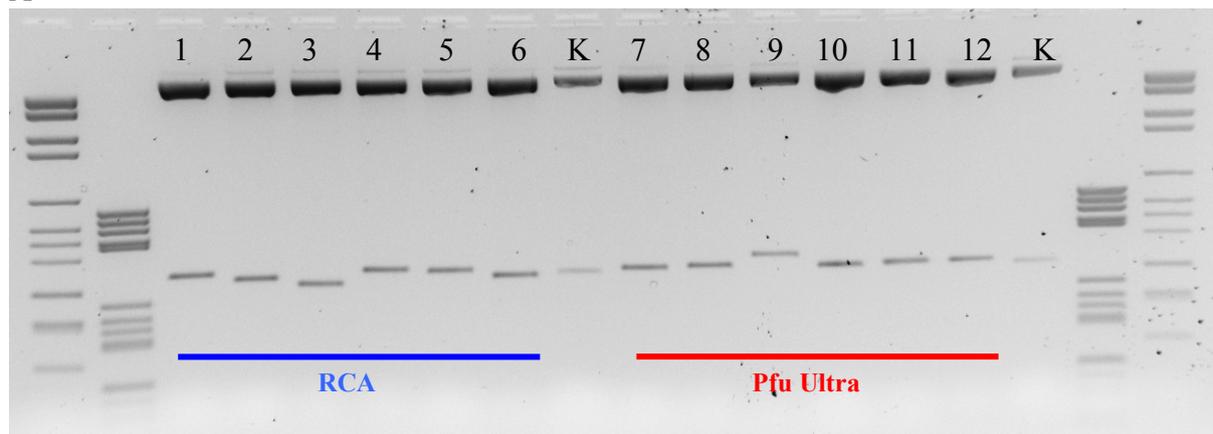
B: An die *Bam*HI Restriktionsschnittstelle wurde ein nicht kinasierter Loop ligiert, der auf die *Bam*HI Schnittstelle passt.

C: Mittels einer Polymerase wurde versucht, den komplementären Strang zu synthetisieren, und das Produkt mit der *Pme*I Schnittstelle zu ligieren.

D. Erwartetes Produkt.

Jeweils 6 der auf der Platte nach der Transformation erhaltenen Klone wurden untersucht. Zunächst wurde durch ein Verdau mit *Eco*RI und *Xho*I untersucht, ob man eine Verlängerung des Abschnittes um die Länge des aufgeklappten Loops feststellen kann. Da der Unterschied etwa 32 bp beträgt, ist der Laufunterschied der Bande gegenüber der Kontrolle auf einem 1,5% Agarosegel nicht besonders groß. Dennoch ist wie in Abbildung 29 A gezeigt, ein geringer Laufunterschied sichtbar. Um sicher zu sein, dass es sich bei den größeren Fragmenten um die von uns gewünschte aufgefüllte Form handelt, wurden alle Klone noch sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in der Tabelle von Abb. 29 B aufgetragen. Abb. 29 C zeigt exemplarisch ein positives Sequenzierergebnis wobei der lila Balken die aufgeklappte Loopsequenz von der Erkennungssequenz des *Bam*HI (GGATCC) bis zum aufgeklappten *Bam*HI (GGATC) kennzeichnet. Wie es zu den falschen Orientierungen kommen kann, wird im Diskussionsteil diskutiert.

A



Klon Nr. 1 – 12 ; K = Kontrolle (Ausgangsvektor)

B

	Klon Nr.	Sequenz :	Klon Nr.	Sequenz :
f.O. = falsche Orientierung des „loops“	1	OK (f.O.)	7	OK (f.O.)
	2	Mutiert	8	OK
	3	Mutiert	9	Mutiert
	4	OK	10	OK (f.O.)
	5	OK (f.O.)	11	OK
	6	Mutiert	12	OK (f.O.)

C

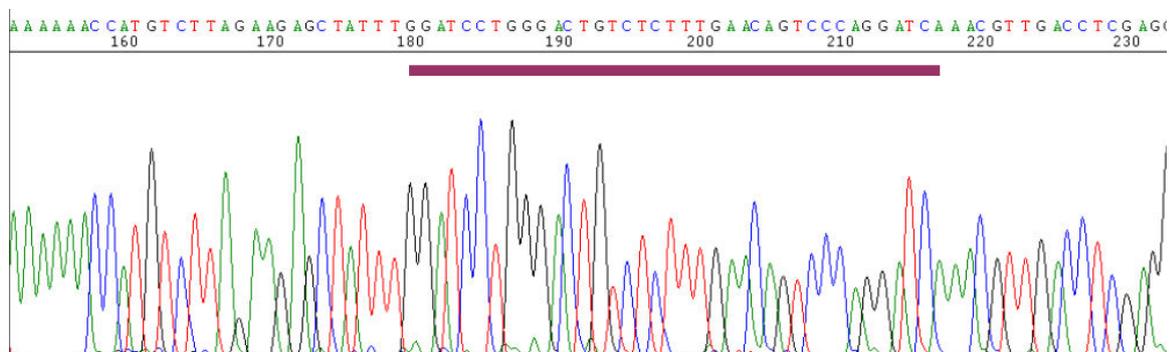


Abb. 29 Ergebnis des Vorversuchs

A: Kontrollverdau der erhaltenen Klone mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI*.
(Fragmentgrößen der Kontrolle: 324 bp; Fragmentgrößen der positiven Konstrukte: 366 bp)

B: Ausgewertete Sequenzierergebnisse

C: Beispiel einer positiven Sequenzierung (cl.11). Mit dem lila Balken ist die aufgeklappte Loopsequenz von der Erkennungssequenz des *BamHI* (GGATCC) bis zum aufgeklappten *BamHI* (GGATC) gekennzeichnet.

3.4.3 Linkeradaptation

Der für diese Methode benötigte Vektor wurde durch eine Modifikation des Vektors von 3.3 erhalten. Zwischen der *PacI* und *PmeI* Schnittstelle wurde der in Abb. 30 abgebildete Linker kloniert.

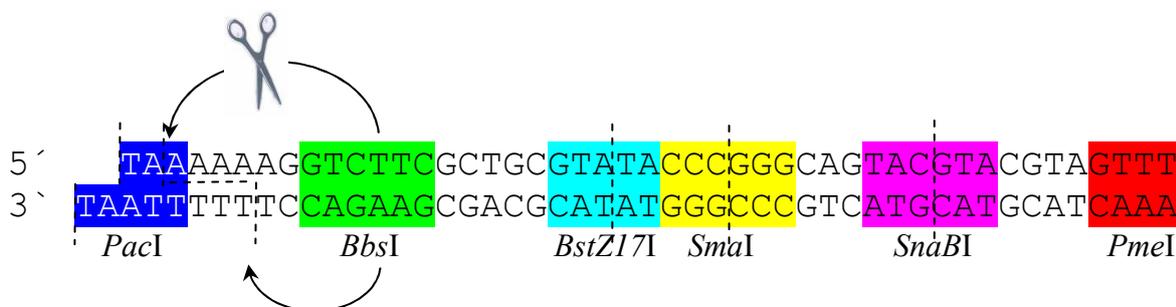


Abb. 30 Linker zwischen *PacI* und *PmeI*. Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind farblich markiert. Gestrichelte Linien zeigen deren Schnittstellenmuster an.

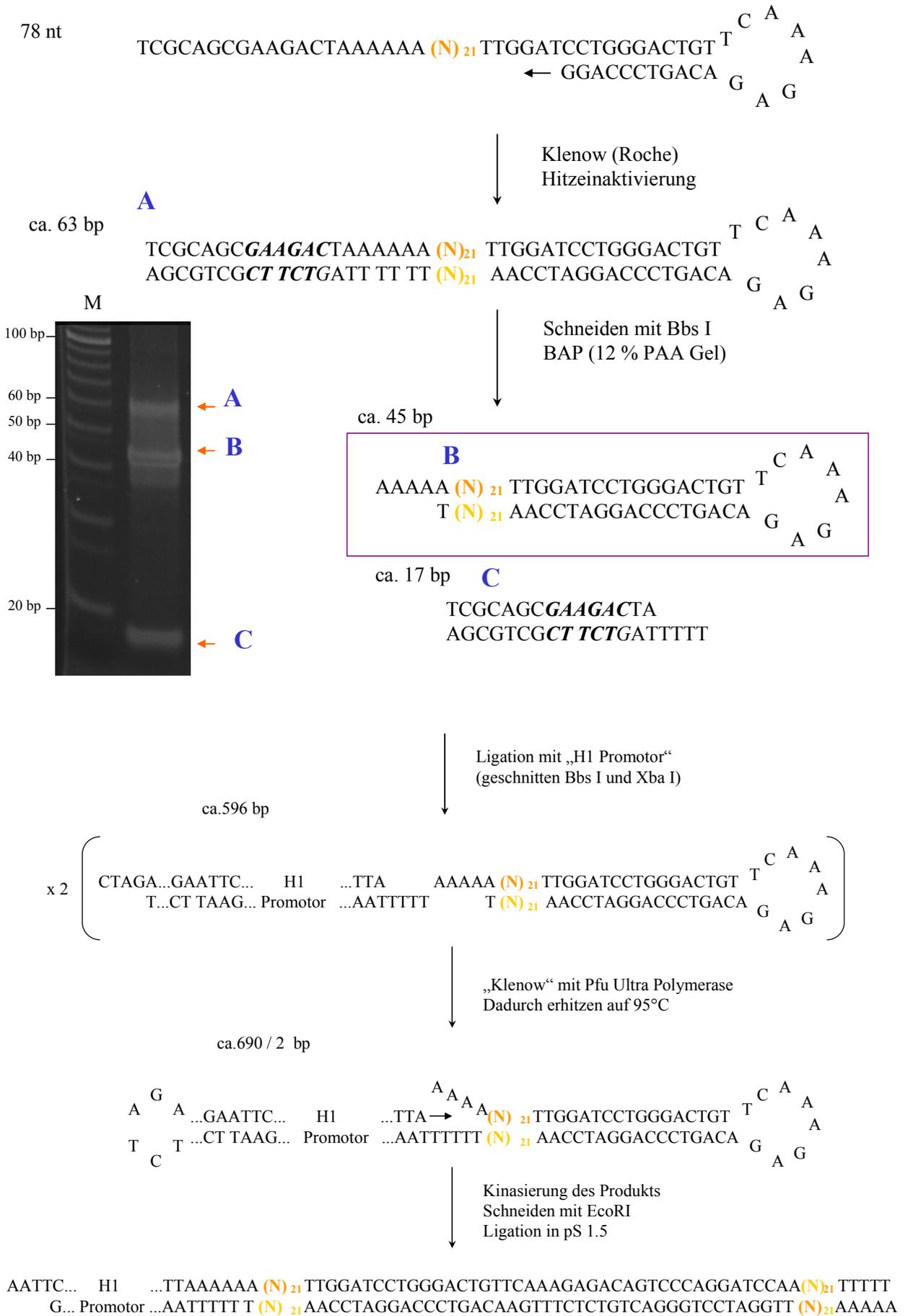
Neben vielen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die beim Schneiden glatte Enden hinterlassen, wurde die Sequenz für das *BbsI* Enzym eingeführt. Dieses Enzym schneidet jenseits der Erkennungssequenz und hinterlässt einen 4 Basen langen Überhang. Der Vorteil ist, dass diese Basen keine Palindrome sein müssen. Dadurch ist es möglich, dass zwei gleiche Fragmente nicht mit sich selber ligieren können. Diese Eigenschaft wird später noch sehr wichtig sein. Da die Erkennungsschnittstelle von *PacI* nur Basen enthält die zum komplementären Strang lediglich jeweils 2 Wasserstoffbrücken bilden, wurde diese Sequenz durch die von *BsmI* mittels Mutagenese-PCR ersetzt. Auch wurde eins von sechs „As“ deletiert.

3.4.3 Testung der Methode anhand einer bekannten Sequenz

Das chemisch synthetisierte 78 Nukleotid lange Oligonukleotid wurde in einer 50 μ M Lösung für 4 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend in einem Eisbad möglichst schnell abgekühlt, so dass es zur intramolekularen Hybridisierung kam. Dieses hybridisierte Oligo wurde mittels Klenow aufgefüllt. Die einzelnen nun beschriebenen Schritte sind in Abbildung 31 nacheinander dargestellt. Die Klenowpolymerase wurde hitzeinaktiviert, um zu vermeiden, dass das „klebrige Ende“ des anschließenden Verdauungsauch aufgefüllt wird. Der Verdauungserfolg erfolgt mit dem Restriktionsenzym *BbsI*. Das Ergebnis eines unvollständigen Verdauungsauch (bei dem man noch den Ausgangs oligonukleotid gut sehen kann) ist auf dem Polyakrylamidgel in Abbildung 31 gezeigt.

Mit dem Buchstaben A wird der durch Klenow aufgefüllten „loop“ (63 bp) gekennzeichnet. B zeigt den mit *BbsI* geschnittene, aufgefüllte „loop“ (45 bp). Mit C wird das von dem Oligonukleotid abgeschnittene Fragment (17 bp) kenntlich gemacht. Mittels der alkalinen Phosphatase wird das Phosphat am 5'Ende entfernt. Der erhaltene Loop wird an den aus dem pSuper-Plasmid mit *BbsI* und *XbaI* herausgeschnittenen H1 Promotor (Abb. 32 Spalte 1) an einem Ende ligiert. Das andere Ende des H1 Promotors kann mit einem weiteren H1 Promotor ligieren, so dass eine doppelte Haarnadelschleife mit zwei H1 Promotoren und zwei „loops“ entsteht. Abbildung 32 Spalte 3 zeigt die Ligation des Promotors mit sich selbst und dem „loop“. Anhand einer „Auffüllreaktion“ soll an den „gaps“ das 5' Ende abgehoben werden und die Synthese des Doppelstranges in 5' → 3' Richtung erfolgen. In Abb. 32 Spalte 5 ist das Ergebnis auf dem Agarosegel dargestellt. Bei der erwarteten Größe von 690 bp (2 x 251 + 2 x 94) konnte man keine Bande feststellen. Die Erklärung hierfür ist, dass es zu einer vollständigen Denaturierung bei der Aktivierung der Pfu Ultra Polymerase bei 95°C kommt, und bei der anschließenden Abkühlung die intramolekulare- gegenüber der intermolekularen-Hybridisierung bevorzugt stattfindet. Somit bildet sich eine „loop“-Struktur am 5'Ende des H1 Promotors, verursacht durch die *XbaI* Erkennungssequenz. Gezeigt wird dies durch den in Abbildung 32 Spalte 3 aufgetragene Ausgangszustand, und dem Ergebnis nach einer 3 minütigen Denaturierung bei 95°C (Abbildung 32 Spalte 4).

Das durch die „Auffüllreaktion“ erhaltene Produkt wird kinasiert und mit *EcoRI* geschnitten. Das Schneiden mit *EcoRI* ist nötig, um die Loopstruktur am 5'Ende zu entfernen und auch um ein gerichtetes Klonieren in den pSsh-empf Vektor zu ermöglichen. Bei dem pSsh-empf Vektor wurde der ursprüngliche H1 Promotor mit den Enzymen *EcoRI* und *PmeI* (ein Enzym das ein glattes Ende hinterlässt) herausgeschnitten und durch die generierte H1 + EGFP-sh Sequenz ersetzt. Die für die Funktionalität störende überschüssige Loopsequenz wurde anschließend durch den *BamHI* Verdau herausgeschnitten, durch eine Gelelektrophorese vom Vektor abgetrennt und dieser dann religiert. Das erhaltene Produkt umfasst den H1 Promotor gefolgt von zwei komplementären Sequenzen gegen das EGFP Gen getrennt voneinander durch eine Loopstruktur, das die *BamHI* Restiktionssequenz enthält.



H1 ...TTAAAAA (N)₂₁ TTGGATCCTGGGACTGTTCAAAGAGACAGTCCCAGGATCCAA(N)₂₁ TTT TT
 Promotor ...AATTTTT T (N)₂₁ AACCTAGGACCCTGACAAGTTTCTCTGTTCAGGGTCCTAGGTT (N)₂₁ AAAAA



Verdau mit Bam HI
 Religation

H1 ...TTAAAAA (N)₂₁ TTGGATCCAA(N)₂₁ TTT TT → Klonierung in
 Promotor ...AATTTTT T (N)₂₁ AACCTAGGTT (N)₂₁ AAAAA lentivirales Plasmid

Abb. 31 Schematische Darstellung der Generierung einer randomisierten Bibliothek nach der Methode 4. Die einzelnen Schritte sind im Text beschrieben.

Das Gelbild zeigt - den durch Klenow aufgefüllten Loop (63Bp) A.
 - den mit *BbsI* geschnittenen, aufgefüllten Loop (45Bp) B. und das davon abgeschnittene Fragment (17Bp) C.

B. ist das erwünschte Produkt welches anschließend mit dem H1 Promotor ligiert wird.

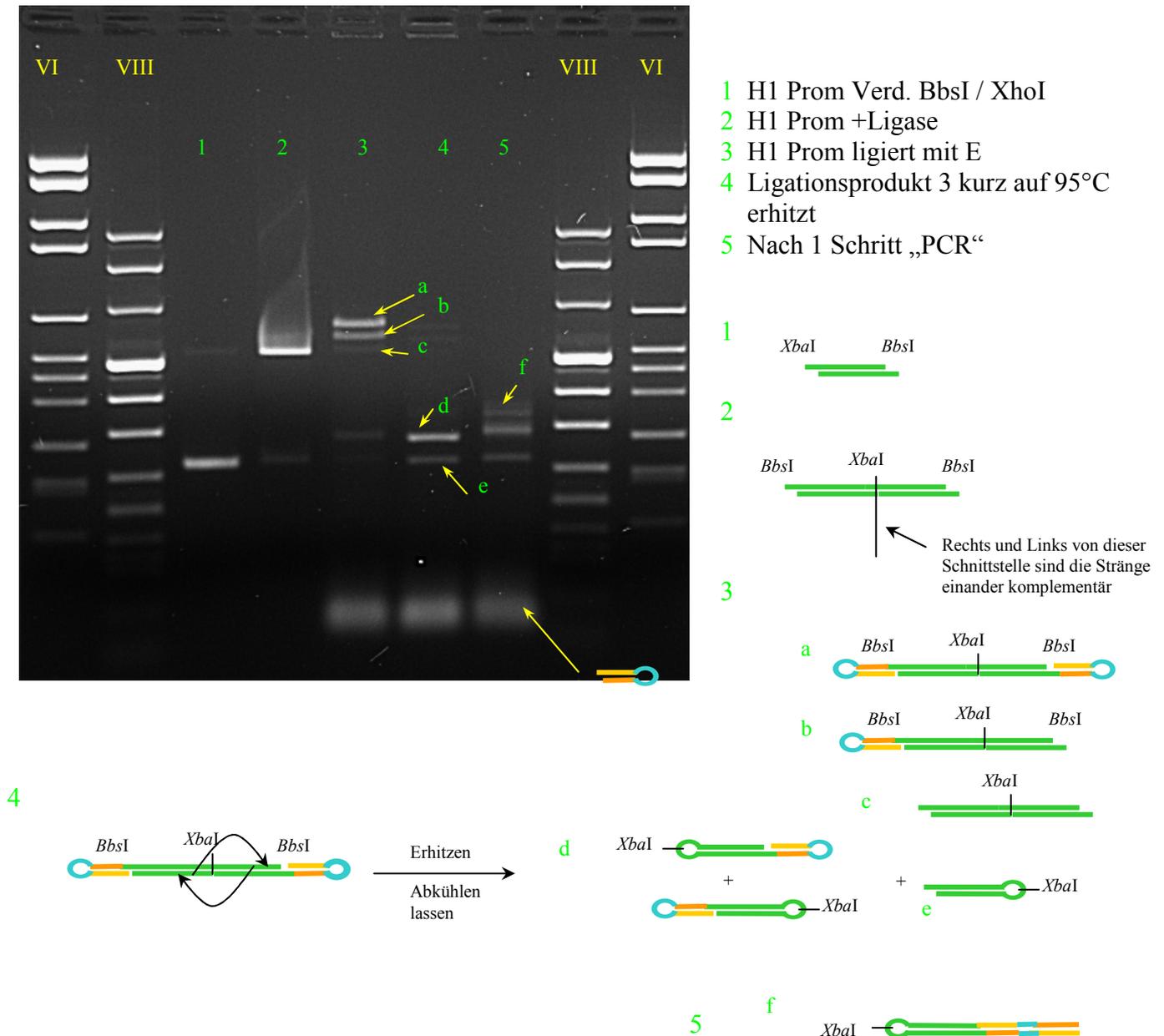


Abb. 32 Agarosegeldarstellung der einzelnen Klonierungsschritten der Generierung der randomisierten Bibliothek nach Methode 4.

Größenmarker VI und VIII.

1. Aus dem pSuper Vektor mit den Restriktionsenzymen *BbsI* und *XbaI* herausgeschnittener H1 Promotor.
2. Ligation des in Spalte 1 aufgetragenen H1 Promotors (Tandembildung an der *XbaI* Schnittstelle)
3. Ligation des H1-Promotors mit dem mit *BbsI* geschnittenen und aufgefüllten Loop.
 - a) vollständige Ligation: 2 H1 Promotoren + 2 Loops
 - b) unvollständige Ligation : 2 H1 Promotoren + 1 Loop
 - c) Ligation von nur den 2 H1 Promotoren
4. Erhitzung des Ligationsergebnisses von 3. auf 95 °C und schneller Abkühlung.
 - d) H1 Promotor intramolekular gefaltet mit Loop
 - e) H1 Promotor intramolekular gefaltet ohne Loop
5. Auffüllen des Konstruktes ab dem Nick mit der Pfu Ultra Polymerase.
 - f) aufgefülltes Konstrukt

3.4.3.1 Vergleich verschiedener Polymerasen bei verschiedenen Synthesetemperaturen

Wie schon im Vorversuch gezeigt wurde, vermögen auch andere Polymerasen ab dem „*gap*“ die komplementäre Sequenz zu bilden, indem sie den schon vorhandenen Strang verdrängen. Um die Effizienz der verschiedenen Polymerasen zu testen, wurde das Ligationsprodukt des mit *BbsI* und *XbaI* geschnittenen H1-Promotors mit dem Loop (und auch mit sich selbst) mit der für die jeweilige Polymerase optimalen Puffer versehen. Nach Zusatz von dNTPs und der entsprechenden Polymerase wurde die Reaktion bei der für die Polymerase optimalen Temperaturbedingung durchgeführt. Das Ergebnis wurde nebeneinander aufgetragen (Abbildung 33).

In der Spalte der Klenow-Polymerase (Spalte 1) sieht man dasselbe Muster wie bei der Bst Polymerase (Spalte 3). Man kann fünf Banden erkennen. Die oberste Bande liegt bei 690 bp und entspricht der Größe des zu erwartenden Produkts. Allerdings ist diese Bande sowohl bei der Klenow-Polymerase wie auch bei der Bst Polymerase nicht sehr stark. Die zweite Bande liegt bei 592 bp und entspricht der Größe von 2 Loops (2 x 45 bp) und zwei H1-Promotoren (2 x 251 bp). Das lässt vermuten, dass es sich um das Edukt handelt. Die dritte Bande liegt bei 502 bp was die Größe des mit sich selbst ligierten H1 Promotors ist. Die vierte (345 bp) und fünfte Bande (251 bp) erscheint auch bei der Pfu Ultra Polymerase. Bei der Pfu Ultra-Polymerase kann man die ersten drei Banden nicht sehen. Das kommt durch die Denaturierung (95 °C), bei der die Doppelstränge voneinander getrennt werden. Bei der anschließenden Abkühlung erfolgt die Hybridisierung so gut wie ausschließlich intramolekular. Das erklärt die Abwesenheit der ersten drei Banden. Die vierte Bande bei Spalte 1 und 3 bzw. die erste bei Spalte 4 ist das erwünschte Produkt in einer anderen Form als Bande 1. Die *XbaI* Schnittstelle bildet auf der einen Seite einen „*loop*“ während die Polymerase den Loop auf der anderen Seite durch die Bildung des Gegenstranges ab dem „*gap*“ entfernt hat. Die fünfte Bande entspricht dem unligierten H1-Promotor (251 bp). Ganz unten ist überschüssiger, nicht ligierter (dephosphorylierter) „*loop*“ (45 bp) zu erkennen. Die Phi 29 Polymerase (Lane 2) zeigt ein etwas anderes Muster. Bande 1 entspricht von der Höhe den Banden 2 von Spalte 1 und 3 und muss die doppelte Haarnadelschleife sein (Loop-Promotor-Promotor-Loop). Die zweite Bande der Phi 29 Polymerase-Reaktion hat eine Höhe von 547 bp. Das entspricht der Ligation zweier Promotoren mit nur einem Loop auf einer Seite. Das erklärt auch die vierte Bande bei 296 bp. Hier hat die Polymerase im Gegensatz zu den anderen 3 Polymerasen den Loop nicht aufgefüllt. Somit entspricht diese Bande dem Edukt, wobei die *XbaI* Schnittstelle den anderen Loop bildet. Die Phi 29 Polymerase eignet sich daher nicht zur Synthese des Doppelstranges ausgehend von einem „*gap*“. Die anderen

drei Polymerasen sind in der Lage, das erwünschte Produkt zu synthetisieren, wobei allerdings die Pfu Ultra das eindeutigste Ergebnis erzeugt.

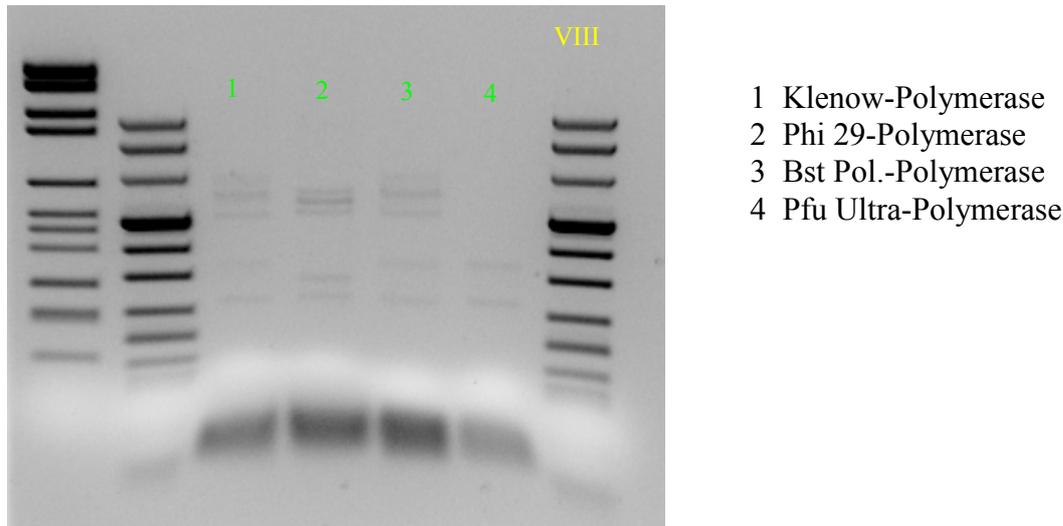


Abb. 33 Testung verschiedener Polymerasen.

3.4.3.2 Funktionalitätsüberprüfung von EGFP

Das Klonierergebnis der in 3.4.3 beschriebenen Generierung einer antiGFP-shRNA wurde auf Funktionalität überprüft. Damit soll gezeigt werden, dass die im Punkt 3.4.6 generierten randomisierten shRNAs durchaus in der Lage sind, die Genexpression zu inhibieren.

3.4.3.3 Sequenzüberprüfung

Wie man anhand der Abbildung 34 sehen kann, stimmt die Sequenz mit der erwarteten Sequenz des EGFP-Gens überein (ab Position 73 der Sequenzierung). Durch intramolekulare Rückfaltung bricht die Sequenzierung vorzeitig ab, wenn das Konstrukt nicht vorher am Loop mit *Bam*HI geschnitten wurde. Dies macht zwei Sequenzierungen nötig, da die Sequenz zwischen H1 Promotor und der *Bam*HI-Schnittstelle überprüft werden soll, wie auch die Sequenz (nicht dargestellt) jenseits der *Bam*HI-Schnittstelle (bis zum Transkriptionsterminationssignal).

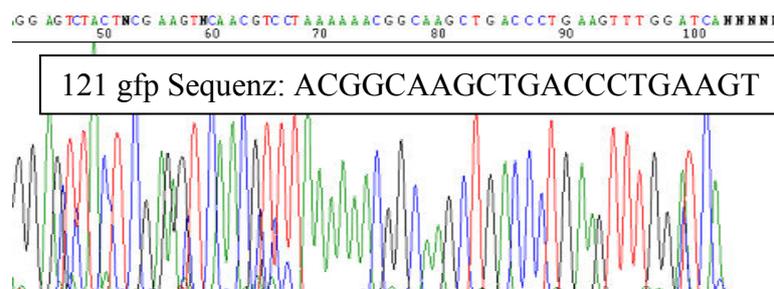


Abb. 34 Kontrolle der Sequenz der durch diese Methode hergestellten antiGFP-shRNA ausgehend von einem Primer, der in der H1-Promotorregion bindet.

3.4.3.4 Transiente Transfektion

Bevor Zellen stabil mit dem lentiviralen Viruspartikel die die Bibliothek kodieren transduziert werden, wurde das Konstrukt gegen das EGFP Gen durch eine Kotransfektion dreier Plasmide durch Lipofectamine in BHK21 Zellen getestet (vgl. 2.2.11).

Der aus einer der FACS Messungen erstellte Graph zeigt, das sich die Effizienz der Reduktion durch die shRNA (das durch diese vierte Methode hergestellte Konstrukt) nicht sonderlich von der Kontrolle pS-121gfp unterscheidet.

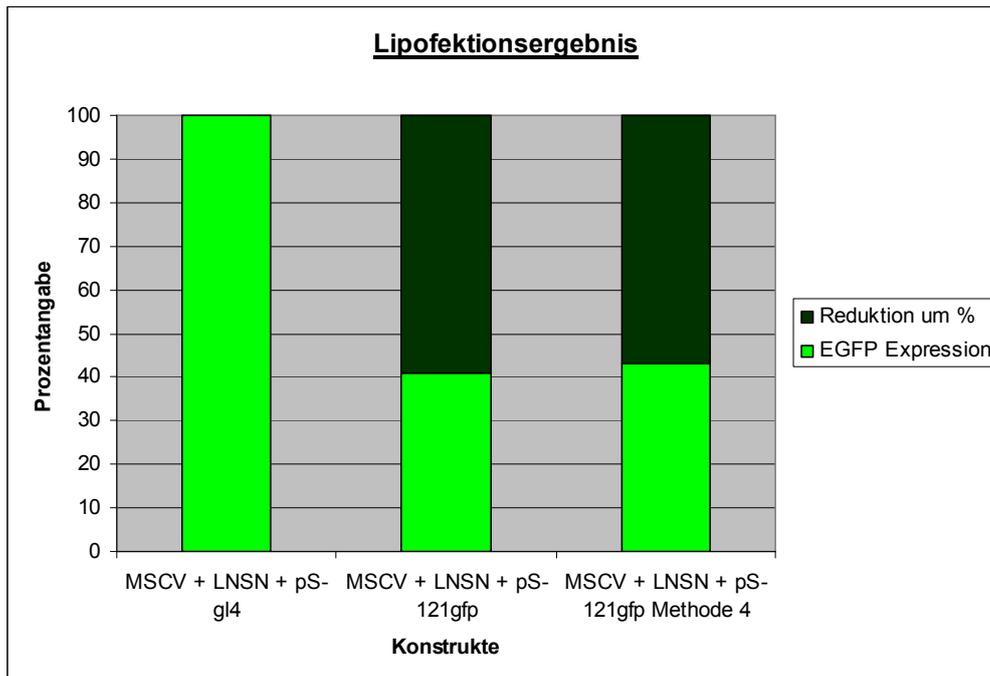


Abb. 35 Lipofektionsergebnis: Dargestellt ist die EGFP Expression und die Reduktion in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (pS-gl4).

Der Promotor mit der shRNA Sequenz wurde aus dem pSuper Plasmid herausgeschnitten und in den lentiviralen SR-shRNA empf. Vektor kloniert. Mit diesem Plasmid ist es möglich, virale Überstände zu generieren, die für eine Integration ins Wirtsgenom erforderlich ist, um eine stabile Expression zu erhalten.

3.4.3.5 Stabile Transduktion

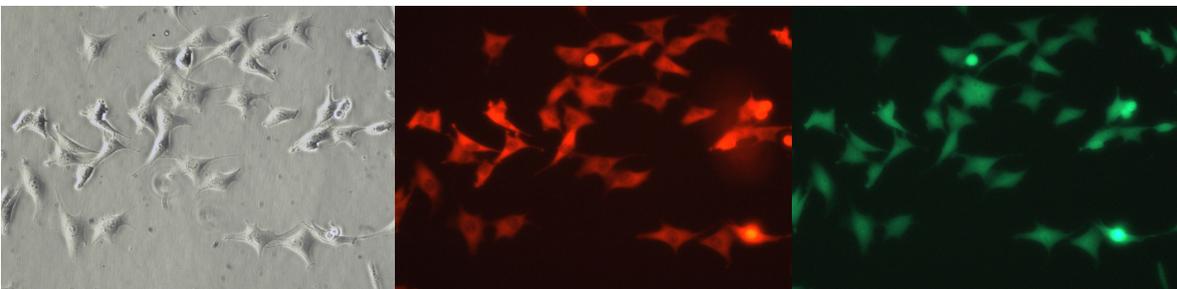
Um zu zeigen, dass die transiente Reduktion auch stabil in Zellen zu sehen ist, wurden Zellen die beständig das GFP-Protein exprimieren (BaF 4h GFP) mit den Konstrukten SR gl4 (Kontrolle), SR 121 gfp (positiv Kontrolle), SR 121 gfp mit BamHI Loop und das mit dieser letzten Methode hergestellte SR 121 gfp transfiziert. Die Abbildung 36 zeigt die transfizierten

Zellen im Durchlicht, und nach UV-Anregung des rotfluoreszierenden RFP-Proteins (Vektor) und des grünfluoreszierenden GFP-Proteins (der BAF 4h GFP).

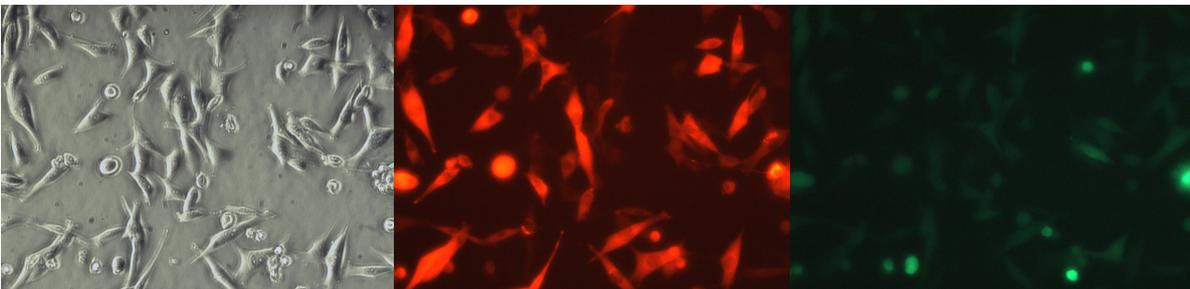
Mock



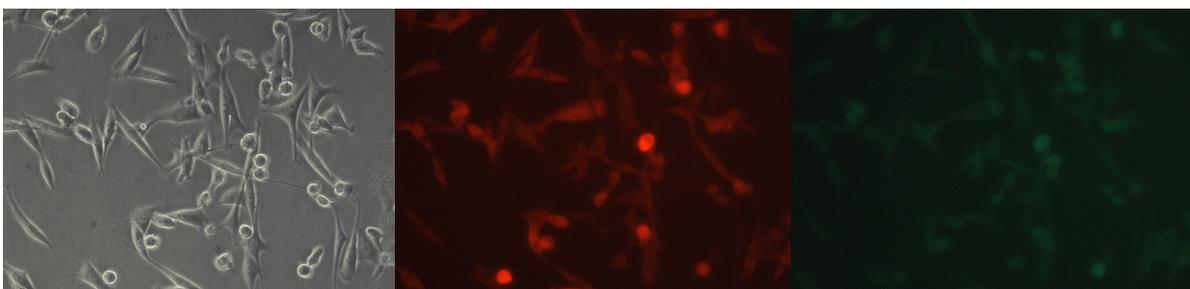
SR gl4



SR 121 gfp



SR 121 gfp mit BamHI Loop



SR 121 gfp Methode 4

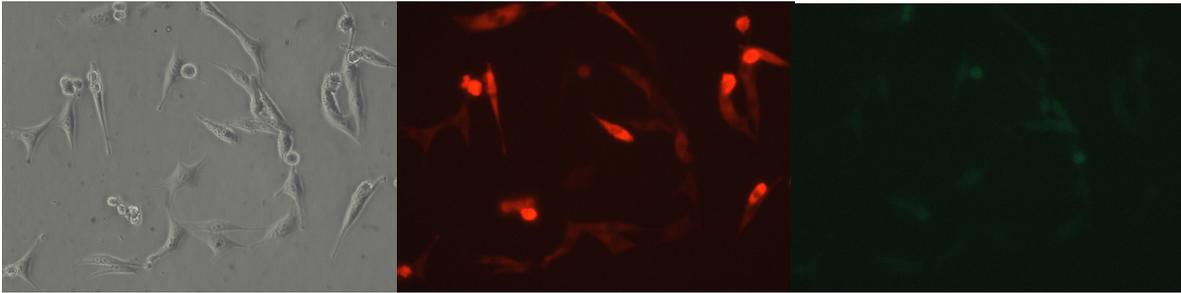


Abb.36 BaF 4h gfp Zellen im Durchlicht, und nach UV-Lichtanregung (zur Sichtbarmachung des RFPs und des GFPs).

3.4.3.6 Nachweis der Reduktion auf Proteinebene

Von den transduzierten, gesorteten BaF 4h gfp Zellen wurden am Tag 8 Gesamtzelllysate hergestellt.

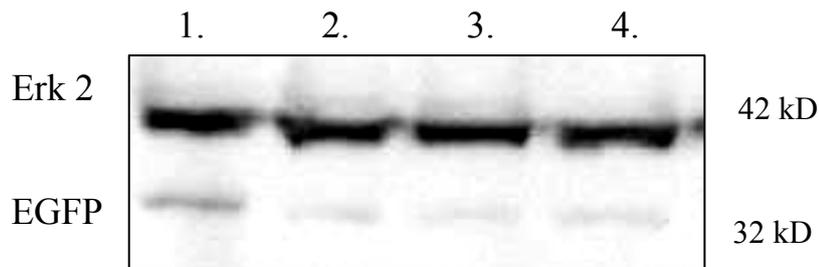


Abb. 37 Western Blot von Ganzzelllysaten von BaF 4h gfp die mit:

1. SR gl4
2. SR 121 gfp
3. SR 121 gfp Bam Loop
4. SR 121 gfp Methode 4 transduziert wurden.

Wie man anhand der Abbildung 37 sehen kann, ist die Reduktion der Expression des EGFPs mit dem Konstrukt, das durch diese vierte Methode hergestellt wurde vergleichbar mit denen der Kontrollen SR 121 gfp und SR 121 gfp Bam Loop. Die Spalte die mit dem Konstrukt SR gl4 transduziert wurde, zeigt die nicht reduzierte EGFP-Expression.

3.4.4 Generierung der Bibliothek

Die randomisierte shRNA Bibliothek wurde nach demselben Prinzip wie die shRNA gegen das EGFP Gen generiert. Statt der 21 Nukleotid langen definierten Sequenz wurde eine Zufallsverteilung der Nukleotide bei diesen Positionen angestrebt. Die einzelnen Schritte der Klonierung sind auf der nächsten Seite dargestellt. Im ersten Bild A ist auf einem PAA-Gel der Verdau des mit Klenow aufgefüllten Oligonukleotid mit dem Restriktionsenzym *BbsI* aufgetragen. Unverdaut ist die Bande 63 bp groß. Durch den Verdau wird dieses 63 bp große Klenow-Polymeraseprodukt in ein 45 bp und einem 18 bp großes Fragment gespalten. Das Restriktionsprodukt mit dem H1-Promotor ligiert. Es hat sich gezeigt, dass der Verlust des Produkts bei der PAA-Gel-Aufreinigung und anschließender Eluation größer ist, als wenn man für den nachfolgenden Ligationsschritt den Restriktionsansatz nach der Dephosphorylierung des 5'Phosphats durch die alkalische Phosphatase nur durch eine Säule (Nucleotide Removal Kit) von Salzen und den Enzymen säubert. Es folgt ein Ligationsschritt mit dem aus dem pSuper mit *BbsI* und *XbaI* herausgeschnittenen H1-Promotor (Abbildung B). In der nächsten Abbildung C ist das Ligationsergebnis aufgetragen. In der ersten und zweiten Spalte nach dem Marker, ist die Ligation des H1-Promotors mit der dephosphorylierten „loop“-Sequenz des EGFPs (E) und der randomisierten Bibliothek (R). In der dritten Spalte ist die Ligation des H1-Promotors mit sich selbst aufgetragen. Der Pfeil mit dem Buchstaben „a“ zeigt die Banden der zwei H1-Promotoren die über die *XbaI* Schnittstelle palindromisch miteinander ligiert wurden. Buchstabe „b“ zeigt die Bande bei der zwei H1 Promotoren miteinander ligiert sind, jedoch nur an einer der beiden durch *BbsI* generierten Schnittstellen der dephosphorylierte Loop ligiert ist. Buchstabe „c“ zeigt das erwünschte Produkt, bei dem die zwei H1-Promotoren an beiden Enden den „loop“ ligiert haben. Buchstabe „d“ zeigt die nicht ligierten und die nicht geschnittenen Konstrukte die in der Abbildung A gezeigt wurden.

Das Gel in Abbildung D zeigt nach dem Marker das Ligationsprodukt aus Abbildung C Spalte A. Anschließend ist 7 x das Ergebnis der Pfu Ultra Polymerasereaktion aufgetragen. Die Hauptbande entspricht dem Produkt bei dem ab dem „gap“ die komplementäre Sequenz gebildet wurde. Darunter befinden sich die restlichen H1-Loop Ligationen, bei denen die Polymerasereaktion nicht stattgefunden hat (Ausgangsprodukt).

Die unterste Bande entspricht dem nicht an einen Loop ligierten H1-Promotor. Die Bandenhöhe ist nur noch halb so hoch (297 bp), weil es zu einer intermolekularen Rückfaltung ab der *Xba I* Schnittstelle kommt.

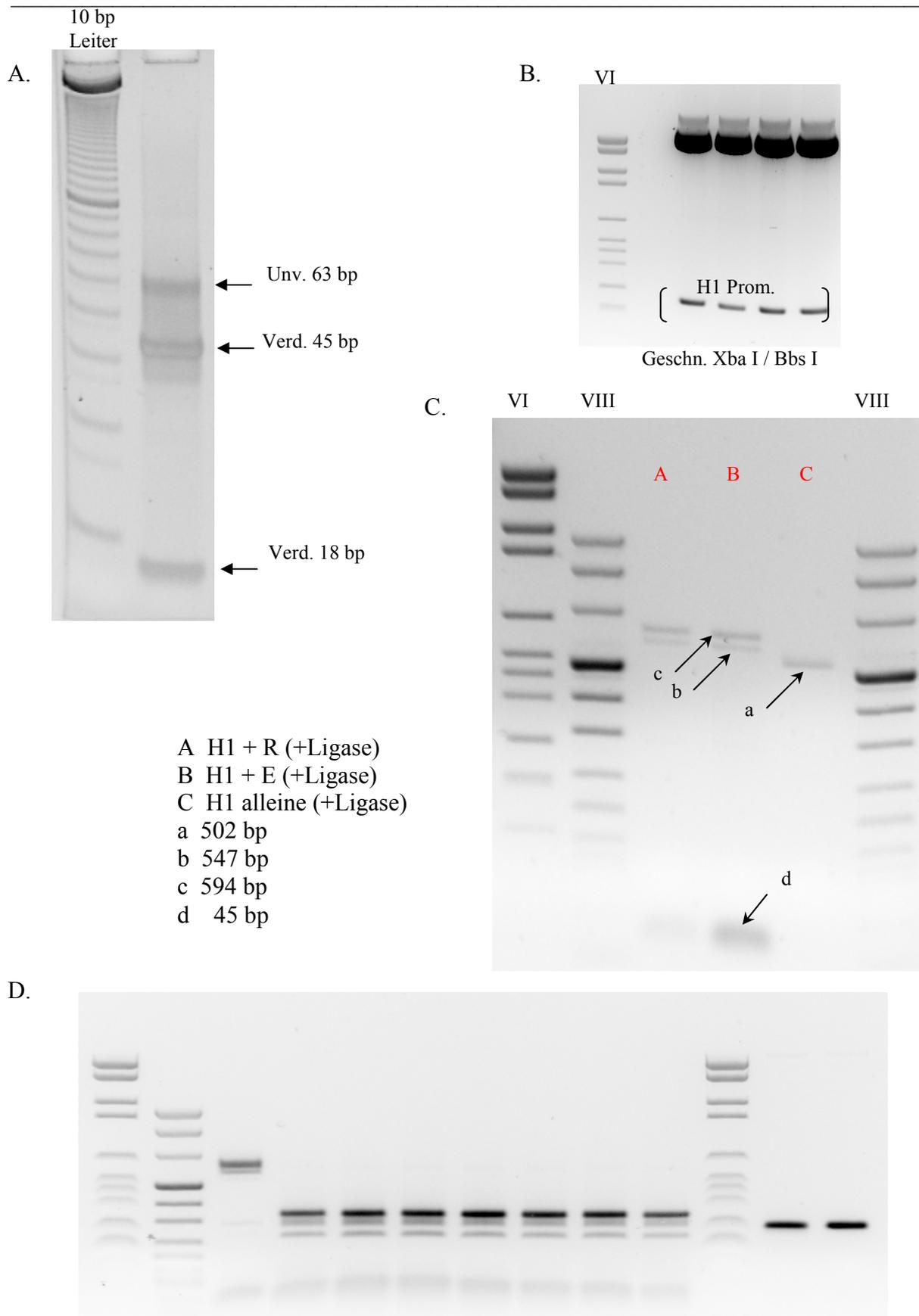
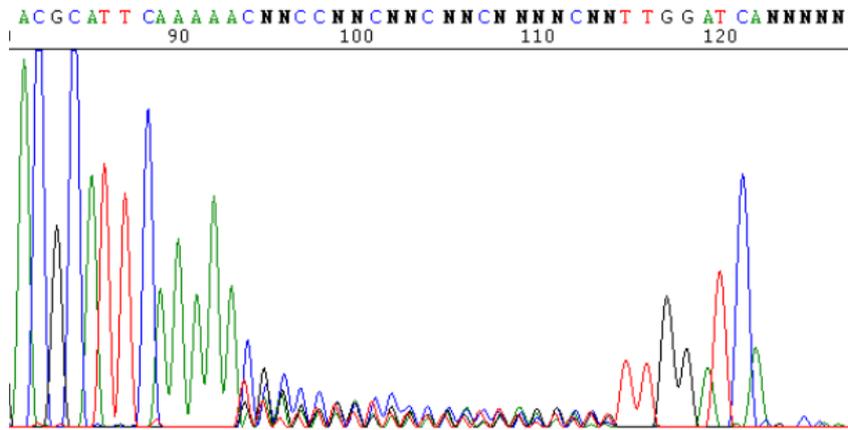


Abb. 38 Klonierungsschritte auf A: 12 % PAA und B,C,D: auf 1,5 % Agarose-Gele aufgetragen. Siehe nähere Beschreibung im Text.

3.4.4.2 Sequenzierung / Verteilung

Die hier vorgestellte Methode verwendet nicht die „RCA“. Folglich wurde erneut untersucht, ob eine statistische Gleichverteilung der Nukleotide anzutreffen ist. Während Abbildung 39 die Sequenzierung von ca. 1×10^6 vereinigter Klone zeigt, ist in der Tabelle in Abbildung 40 die Häufigkeit der einzelnen Nukleotide an den jeweiligen Positionen aufgetragen. Wie man anhand der Tabelle sehen kann, kann man durchaus von einer Gleichverteilung sprechen.

A.



B.

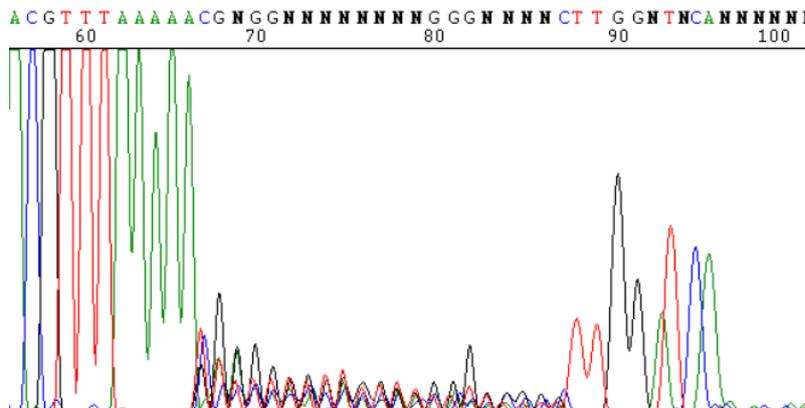


Abb. 39 Sequenzierung von ca. 1×10^6 vereinigter Klone. Um den vorzeitigen Abbruch der Sequenzierung wegen der Haarnadelstruktur zu verhindern, wurde der Vektor vor der Sequenzierung mit *Bam*HI geschnitten. Abgebildet ist die Sequenz bis zur *Bam*HI Schnittstelle ausgehend vom H1 Promotor (A) und die Sequenz bis zur *Bam*HI Schnittstelle, ausgehend von der T3Promotor-Region (B).

Ergebnisse

Position:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Summe:	
Anzahl:																							
"A"	7	15	17	12	16	19	14	16	11	15	13	18	16	19	15	15	15	13	14	12	14	306	
"T"	13	13	7	11	11	11	11	5	12	10	11	7	13	13	13	12	10	11	10	12	7	223	
"G"	10	10	11	12	12	9	13	13	13	8	12	7	11	8	10	10	13	9	14	7	15	227	
"C"	17	9	12	12	8	8	9	13	11	14	11	15	7	7	9	10	9	14	9	16	11	231	
	47							47										47				987	
																							246,75
Prozentuale Anteil:																							
"A"	15	32	36	26	34	40	30	34	23	32	28	38	34	40	32	32	32	28	30	26	30	31%	
"T"	28	28	15	23	23	23	23	11	26	21	23	15	28	28	28	26	21	23	21	26	15	23%	
"G"	21	21	23	26	26	19	28	28	28	17	26	15	23	17	21	21	28	19	30	15	32	23%	
"C"	36	19	26	26	17	17	19	28	23	30	23	32	15	15	19	21	19	30	19	34	23	23%	

Abb. 39 Tabelle der Sequenzierdaten von 47 unterschiedlichen Klonen. In der ersten Tabelle wird die Anzahl, und in der Zweiten das prozentuale Verhältnis jeder Base in einer bestimmten Position innerhalb der randomisierten Sequenz.

3.4.4.2 Klone / µg DNA (Ausbeute)

Die Ausbeute an Klonen pro µg Ausgangs DNA Oligonukleotid schwankt etwas, da sie stark von der Effizienz der Ligationsschritten, der Effizienz des Verdaus sowie von der Ausbeute der Säulenaufreinigung der DNA nach dem Agarosegel abhängt.

Berechnungen haben eine Ausbeute von ca. 3×10^6 Klone / µg Ausgangs-DNA ergeben.

3.5 Anwendung der Bibliothek

Die Anwendung der Bibliothek ist sehr vielseitig. Sie kann zum Beispiel zur Identifikation von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Protagonisten wichtiger Signalkaskaden dienen. Trotz der enormen Fortschritte in den letzten Jahren bei der Sichtbarmachung verschiedener Expressions- und Differenzierungsstadien der Zellen, ist es das einfachste, nach der durch die Bibliothek übermittelte Überlebensvorteile transfizierter Zellen zu suchen.

Der durchgeführte funktionelle Assay besteht aus dem Entzug von Zytokinen einer zytokinabhängigen Zelllinie die mit der generierten Bibliothek transduziert wurde.

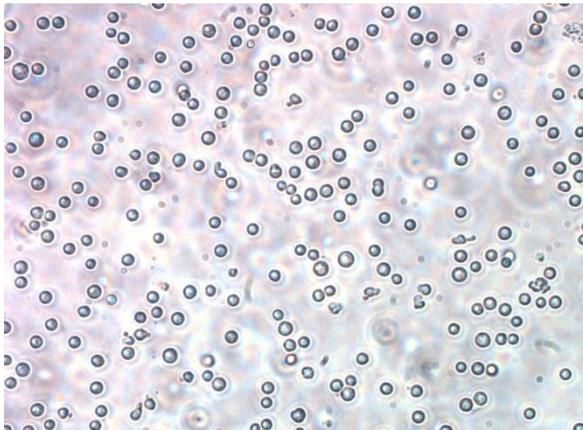
3.5.1 Voruntersuchungen der Zelllinie 32D

Für die Untersuchung ist es essentiell, dass die zytokinabhängige Zelllinie 32D zu 100 % faktorabhängig ist. Nach längeren Kulturperioden, bei denen das Zytokin IL3 nur mangelhaft vorhanden ist, selektioniert man die Zellen heraus, die durch Mutationen oder andere Einflüsse weniger bis gar nicht mehr zytokinabhängig sind. Deshalb ist es wichtig vor jedem Versuch die vollständige Faktorabhängigkeit der eingesetzten Zellen zu untersuchen.

3.5.1.1 Faktorabhängigkeit der 32D-Zelllinie

In den unteren zwei Bildern sind 32D Zellen in 100 facher Vergrößerung abgelichtet am Tag 0 und am Tag 3 nach IL3 Faktorentzug. Mit einer 200 fachen Vergrößerung ist der Tag 9 nach IL-3 Entzug im dritten Bild dargestellt.

a)



b)



c)

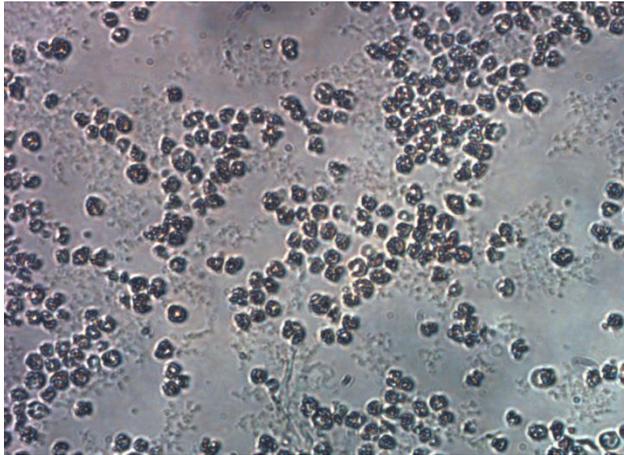


Abb. 40 32D Zellen bei 100 facher Vergrößerung A-B bzw. 200 facher Vergrößerung C.

a) Tag 0 nach IL3 Faktorentzug

b) Tag 3 nach IL3 Faktorentzug

c) Tag 9 nach IL3 Faktorentzug

Wie man anhand der Abbildung 40 sieht, sind die Zellen am Tag 0 zu 100 Prozent vital. Dieser Versuch wurde mit mehr als 1×10^7 Zellen durchgeführt. Somit ist die 32D Zelllinie zu 100 % IL3 faktorabhängig. Dieser Ansatz wird als Kontrolle vor jeder Transduktion wiederholt.

3.5.1.2 Beeinflussung der Faktorabhängigkeit durch 2 lentiviralen Kontrollkonstrukte

Bei der Evaluation der Bibliothek werden 32D Zellen mit lentiviralen Konstrukten transduziert. Es ist wichtig, vorher zu wissen, ob das lentivirale Konstrukt ohne eine funktionelle, gegen ein endogenes Gen gerichtete siRNA, allein durch die Integration faktorunabhängig macht. Dazu wurden 32D Zellen mit zwei verschiedenen Konstrukten (SR-gl4 und SEW-gl4), die eine irrelevante shRNA exprimieren, mit hoher MOI transfiziert. Die FACS-Messung ergab eine 94 bzw 98 prozentige Transfektionseffizienz. Am Tag 4 nach Transfektion wurden diese Zellen nach mehrmaligem Herauswaschen des IL3 Zytokins im faktorfreien Medium ausgesät. Insgesamt wurden vier 96 Well-Platten mit einer Zelldichte von 1×10^5 pro Well ausgesät. Von den 384 Kammern die mit ins gesamt ca. $3,8 \times 10^7$ Zellen belegt wurden, sind insgesamt zwei Klone hochgewachsen. Diese Klone wurden in IL3 freiem Medium expandiert und genomische DNA Isoliert. Die Untersuchung der Integrationlokation steht noch aus.

3.5.2 Funktioneller Assay der Bibliothek

Mit einer Komplexität von 1×10^5 randomisierter lentiviraler Konstrukte wurde Virus generiert, mit denen 32D Zellen transduziert wurden. Obwohl bei dieser noch recht geringen Komplexität wenig zu erwarten ist, sind doch mit einer etwa 5 fachen Häufigkeit (im Vergleich zu der oben erwähnten Kontrolle) einzelne Zellen sichtbar, die über 14 Tage vital blieben. In geringem Maße haben sie sich auch vermehrt, jedoch bei weitem nicht mit der Teilungsrate von 32D Zellen mit IL3. Einer dieser Klone ist in Abbildung 41 dargestellt. Wie man sieht, sind diese Zellen nach Anregung mit UV Licht auch rot 41 b (das heißt mit der lentiviralen Bibliothek transduziert).

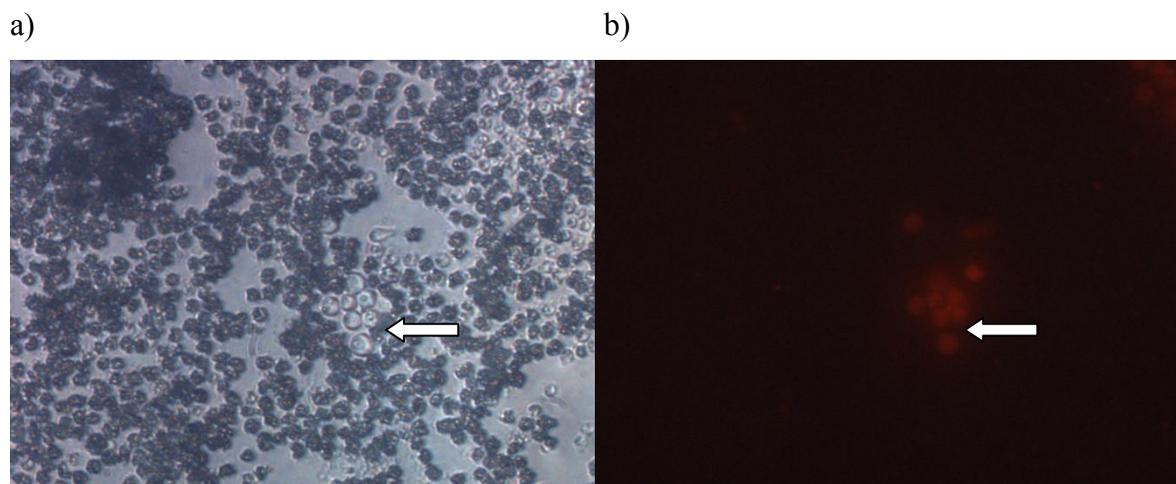


Abb. 41 32D Zellen die mit der Bibliothek transduziert wurden, am Tag 14 nach Faktorentzug. a) Durchlicht b) nach UV-Lichtanregung.

Beim Versuch diese Zellen in IL 3 freiem Medium zu expandieren sind diese gestorben. Mit IL 3 wachsen sie wie untransduzierte Zellen. Weil die Klone nicht wirklich IL3 Faktorunabhängig sind, wurden sie nicht weiter untersucht.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten der Generierung randomisierter si/shRNA Bibliotheken vorgestellt. Diese Bibliotheken können wichtig sein zur funktionellen Genanalyse und Untersuchungen von Wechselwirkungen in dem Zusammenspiel der Genexpressionsprodukte in der Zelle.

Die Einschränkung von RNAi-Bibliotheken ergibt sich durch den Selektionsschritt. Es können nur Gene gefunden werden, deren Herunterregulation zu einem selektierbaren Phänotyp führt. Trotz dieser Einschränkung gibt es noch genügend Einsatzmöglichkeiten für RNAi-Bibliotheken.

4.1 Statistische Einwände

Zunächst soll diskutiert werden, ob die Generierung einer randomisierten si/shRNA Bibliothek aus statistischer Sicht überhaupt sinnvoll ist. Als Beispiel soll das Gen p53 dienen. Es soll in diesen Beispiel die pessimistische Annahme gelten, dass lediglich 10% der getesteten si/shRNAs effizient (>70% Inhibition) sind (eigene und publizierte Daten lassen eine Wahrscheinlichkeit von bis zu 50 % erwarten; Harborth et al. 2003). Für die siRNA-Bibliothek ergibt sich eine (maximale) Komplexität von $4^{19} = 2,75 \times 10^{11}$, während sich für die shRNA-Bibliothek $4^{20} = 1,1 \times 10^{12}$ und $4^{21} = 4,39 \times 10^{12}$ ergibt. Aus der Länge der p53 Sequenz ergeben sich ca. 2600 verschiedene si/shRNA-Sequenzen, von denen, gemäß obiger Annahme, 10% also 260, effizient sein sollen.

Da Studien zur systematischen Punktmutagenese von siRNAs (bzw. entsprechender mRNA) aber zeigen, dass die 5' und 3' terminalen Dinukleotide, also Position 1,2,18 und 19 (bzw. 19 und 20 für shRNA der Methode 3.1 // Position 20 und 21 für shRNA der Methode 3.3 und 3.4) einer siRNA ihre Aktivität nicht messbar beeinflussen (Du et al. 2005; Chen et al. 2004), ergeben sich für jede mögliche siRNA-Sequenz 16 Permutationen, wenn man, wie in der Publikation untersucht, nur eine Punktmutation an den beiden terminalen Dinukleotiden im Vergleich zur p53 Sequenz erlaubt (1). Berücksichtigt man zusätzlich, dass auch A-C und G-U „Mismatch“ gut toleriert werden, ergeben sich für die mittleren 15 (siRNA) bzw. 16 oder 17 (shRNA) Nukleotide zusätzlich zur Originalsequenz 15 bzw. 16 Permutationen, wenn lediglich ein „erlaubter“ „Mismatch“ toleriert wird (2).

Unter diesen Annahmen ergeben sich die folgenden Erwartungswerte:

$$p = b^x$$

mit p = Wahrscheinlichkeit, dass keiner der Klone in der Bank enthalten ist

b = Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelner Klon nicht ein gesuchter ist

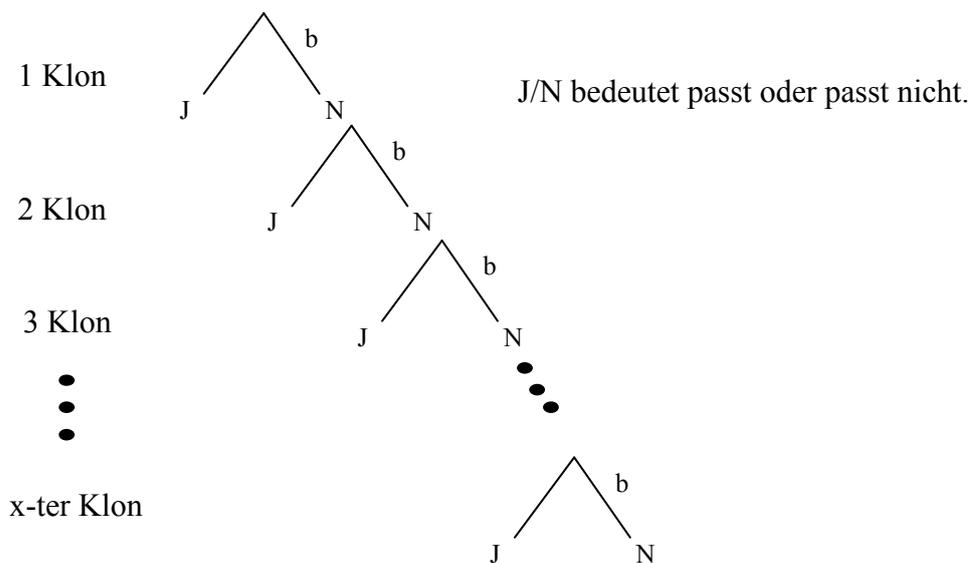
x = Anzahl unterschiedlicher si/shRNAs in der Bank

Zunächst einmal zur Formel:

b beschreibt folgende Wahrscheinlichkeit: Man wählt aus allen möglichen Oligonucleotiden eines aus und das Gewählte passt nicht (ist also eine Niete). Es gibt insgesamt 4^{21} Oligonukleotide, bei 10% Effizienz gibt es ca. 260 passende, d.h. $4^{21} - 260$ nicht passende. Der Anteil (oder Wahrscheinlichkeit) der nicht-Passenden an allen Möglichen ist dann $b = (4^{21} - 260) / 4^{21}$

Einfach berechnen lässt sich die Wahrscheinlichkeit p , dass unter allen x Oligonukleotiden der Bank „kein passendes“ ist, das ist das Gegenteil von „mindestens einer passt“. Soll die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens eines passt z.B. 90% sein, ist die Wahrscheinlichkeit dass keines passt 10%; p ist dann 10% (d.h. 0,1).

Um p zu bestimmen geht man nun folgendermaßen vor: Man wählt einen nach dem anderen aus der Bank und prüft ob dieser passt. Uns interessiert jetzt nur der Fall, dass keiner passt, d.h. im Baumdiagramm der Weg außen rechts:



Wie oben gezeigt ist die Wahrscheinlichkeit, dass es nicht passt, jedes Mal b , also bei x Oligonukleotiden der Bank ist $b \times b \times b \times \dots = b^x = p$ die Wahrscheinlichkeit dass kein Oligonukleotid passt.

Randomisierte Oligonukleotide von:

20 bp $\rightarrow 4^{20}$ Möglichkeiten = $1,1 \times 10^{12}$

Die mRNA von p53 umfasst 2629 bp. Wenn „nur“ 10 % der möglichen siRNAs >70% inhibieren, wären das ca. 260 funktionelle siRNAs.

Wahrscheinlichkeit, kein Klon zu bekommen:

$$p = b^x$$

mit p = Wahrscheinlichkeit, dass keiner der Klone in der Bank enthalten ist

b = Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelner Klon nicht ein gesuchter ist

x = Anzahl unterschiedlicher si/shRNAs in der Bank

$$b = (x - \text{Anzahl von möglichen Treffern}) / x$$

Bei einer Anzahl von möglichen Treffern = 260

$$b = (4^{20} - 260) / 4^{20} = 0,99999999976$$

Mit einer 50%igen Wahrscheinlichkeit, einen passenden Klon zu finden, ist $p = 0,5$ und es ergibt sich:

$$p = b^x \Leftrightarrow 0,5 = 0,99999999976^x \Leftrightarrow x = \ln(0,5) / \ln(0,99999999976) \approx \underline{2,88 \times 10^9}$$

(1)

Bei 4 möglichen Punktmutationen an Position 1, 2, 19 und 20 (nur 1 Mutation / siRNA)

$$4 + 4 + 4 + 4 = 16 \rightarrow 260 \times 16 = 4160$$

Bei einer Anzahl von möglichen Treffern = 4160

$$b = (4^{20} - 4160) / 4^{20} = 0,999999996216$$

$$\text{für } p = 0,5 \Leftrightarrow 0,5 = 0,999999996216^x \quad x = \ln(0,5) / \ln(0,999999996216) \approx \underline{1,83 \times 10^8}$$

(2)

Bei einer erlaubten Basenpaarung von A mit C neben der herkömmlichen Paarung mit T bzw.

U: $N = 20$

Abzüglich der zwei ersten und der zwei letzten Basen, die im ersten Punkt berücksichtigt werden: $20 - 4 = 16$

Als „Erwartungswert“ wäre jede Position mit 25% Wahrscheinlichkeit ein A: $16 \times 0,25 = 4$

Diese vier As können mit C und mit T bzw. U Basenpaarbildungen eingehen $4 \times 2 = 8$

Daraus würde sich eine Anzahl an möglichen Treffern um ein 8 Faches erhöhen:

$$260 \times 16 \times 8 = 33280 \rightarrow \underline{x = 2,29 \times 10^7}$$

Zusammenfassend sehe ich gute Chancen, eine gewünschte si/shRNA für ein bestimmtes Gen zu finden. Wenn man noch optimistisch 50 % der möglichen siRNAs als Effizient berechnet,

erniedrigt sich der Wert x sogar noch auf $4,58 \times 10^6$. (Mit freundlicher Hilfe von Prof. L. Baringhaus, Institut für mathematische Stochastik)

4.2 Synthetische Bibliotheken vs. cDNA- Bibliotheken

Die Verwendung von cDNA-Bibliotheken bei der Herstellung von shRNAs nach der REGS Methode ermöglicht eine erhöhte Trefferquote pro hergestelltes Konstrukt, da das Konstrukt aus einem Fragment transkribierter mRNA stammt. Wenn die Zellen, aus denen die cDNA gewonnen wird noch mit den Zielzellen mit denen die Experimente der si/shRNA-Bibliothek durchgeführt werden übereinstimmt, erwartet man die meisten effektiven shRNAs-Regulationen. Bei unterschiedlichen Zellen werden viele spezifische Gene nicht durch die shRNA-Bibliothek erfasst, da die transkribierten Abschnitte des Genoms bei der Expression zellspezifischer Gene abweicht.

Die Synthese der cDNA ist mit erheblichen Aufwand und Kosten verbunden. Auch muss sicher gestellt werden, dass die cDNA-Bank möglichst vollständig in ein Vektorsystem kloniert wird, welches nach Möglichkeit stabil ist (keine Rekombinationen). Auch muss die Größe der Bibliothek richtig abgeschätzt werden, da die Quantität der in cDNA umgeschriebener mRNAs verschiedener Gene stark schwankt. Die Gefahr besteht darin, dass die Bibliothek einen großen Überschuss an Fragmenten enthält, die stärker exprimiert werden, und dadurch cDNA umgeschriebener mRNAs die weniger häufig vorkommen verloren gehen. Viele sehr wenig exprimierte oder durch starke Regulation sehr wenig vorhandenen mRNA werden kaum ein Konstrukt bilden können. Ein großer Nachteil ist, dass man Speziesgebundene shRNA Bibliotheken generiert, die nicht universal anwendbar sind.

Anders verhält es sich mit der vollständigen synthetischen Bibliothek. Bei solch einer Bibliothek kann theoretisch jede Kombination einer shRNA vorhanden sein, so dass man speziesunabhängig ist. Der Nachteil ist die enorme Anzahl an Konstrukten, die man benötigt, um das gesamte Spektrum abzudecken.

4.3 Nachteile einer siRNA-Bibliothek

Der größte anzunehmende Nachteil dieser Methode ist, dass sich der Sense- und der Antisense-Strang in der Zelle finden müssen, bevor es zu einer effektiven Aufnahme in den RISC-komplex kommen kann. Es wäre auch möglich, dass sich die gleichzeitige Transkription der entgegengesetzten Stränge gegenseitig behindern, so dass die Transkriptionsrate deutlich herabgesetzt ist. In dieser Arbeit wurde zwar die Funktionsweise der einzelnen Promotoren getestet, und festgestellt, dass der H1 Promotor ähnliche

Transkriptionsraten liefert wie der U6 Promotor, doch fehlte der Assay um zu sehen, ob die gleichzeitige Transkription genauso gut von statten geht. Nach Literaturangaben (Zheng et al. 2003; Chen et al. 2005; Kaykas and Moon 2004) dürfte dies aber kein Problem darstellen, und die Effektivität der Expressionshemmung ähnlich sein wie die der shRNA. Dies konnten wir aber anhand unserer Versuche nicht zeigen.

4.4 Vor- und Nachteile der vier dargestellten Methoden

4.4.1 Die erste Methode

Die „*restriction enzyme generated siRNA*“ (REGS) Methode ist eine Methode um anhand von cDNA funktionelle shRNAs zu generieren. Wie publiziert, haben wir die Reduktion von EGFP ausgehend von dessen cDNA zeigen können. Diese Methode verwendet zum Schneiden der cDNA sechs verschiedene Restriktionsenzyme die jeweils eine Erkennungssequenz von vier Basen haben und nach dem Verdau einen 5'GC Überhang hinterlassen. Weil die Enzyme eine Erkennungssequenz von nur vier Basen haben, schneiden sie relativ häufig die cDNA. Die 750 bp große DNA, die für das EGFP codiert, wird von diesen Enzymen 23-mal geschnitten. Das bedeutet, dass im Durchschnitt die DNA nach ca. 32 Basen einmal geschnitten wird. Da man siRNAs mit einer Länge von 19 Nukleotiden durch den Verdau mit *MmeI* generieren möchte, ist diese durchschnittliche Schnittfrequenz schon recht optimal. Bei einem Gen wie das EGFP (750 bp) würde durch diese Methode 23 möglich funktionelle siRNAs generiert werden können. Die Wahrscheinlichkeit liegt hoch, dass bei diesen 23 mehrere siRNAs in der Lage sind, effizient die Expression des Zielgens zu hemmen (Effizient = >75%). Das Problem dieser Methode liegt zum einen darin, dass 50 Prozent der geschnittenen cDNA Fragmente nicht mit der Sense, sondern mit der Antisense-Orientierung an den Loop ligiert, was zu nicht funktionellen shRNAs führt. Das andere Problem ist, dass die Erkennungssequenzen oft sehr dicht beieinander liegen, so dass die Fragmente geringer als 19 bp ausfallen, was zu Mehrfachligationen verschiedener Fragmente führt, wie in Abbildung 7 gezeigt wurde, die wiederum nicht funktionell sind. Bei Fragmenten mit einer Länge von 35 bp kann der Loop an beiden Enden ligieren. Somit kommt es auf die Position an, welche der beiden *MmeI* Schnittstellen zuerst erkannt wird, ob nun das Fragment mit der richtigen Länge in Sense- oder Antisense-Orientierung am Loop gebunden ist. Bei einem Fragment von 35 bp würde das bedeuten, dass das Fragment das an dem anderen Loop liegt bleibt nur noch eine Länge von (35 bp – 19 bp) 16 bp besitzt. Somit gilt es abzuwägen, ob man alle sechs Restriktionsenzyme verwendet um eine möglichst große

Diversität zu erhalten, oder aber die Anzahl reduziert, was allerdings auf Kosten der Vielfalt geht. Wegen der 50 % Wahrscheinlichkeit der Ligation des Loops an dem „verkehrten“ Ende der cDNA, macht es wenig Sinn durch die Ligation eines zweiten Loops ein gerichtetes Klonieren zu ermöglichen. Da der sh-RNA-Loop palindromisch ist (AAGGATCCTT), würde dies an der Gesamtwahrscheinlichkeit das Fragment in *sense*-Richtung zu erhalten, nichts ändern. Bei der Verwendung eines mit nur einem Enzym zu schneidenden 3'Loops, würde der Verdau mit großer Wahrscheinlichkeit sogar effektiver sein.

Ein großer Nachteil dieser Methode sind die vielen Syntheseschritte und die je nach Handhabung 4-5 PAA-Gele einschließen, bei dessen Eluation ein gewisser Anteil der eingesetzten DNA verloren geht.

4.4.2 Die zweite Methode

Die Generierung einer siRNA-Bibliothek durch die Gegenüberstellung zweier Pol III Promotoren bildet die einfachste Form der Bibliotheksgenerierung. Leider ist die Reduktion der Expression in meinen Händen sehr gering gewesen. Die Arbeitsgruppe, die diese Methode publizierte, erreichte eine 70 - 90 % Reduktion, was sie anhand der Inhibition der Luziferaseexpression eindrucksvoll demonstrierten. Wir konnten anhand von Sequenzierungsergebnissen nachweisen, dass wir in der Lage sind, eine siRNA-Bibliothek mit einer recht hohen Diversität zu generieren. Diese Methode wurde aber nicht weiter verfolgt, da die Validierung durch die Herunterregulation der EGFP Genexpression bei uns nur um ca. 5 % sichtbar war. Mögliche Ursachen wurden in 4.3 diskutiert.

4.4.3 Die dritte Methode

Bei der dritten Methode wurde eine randomisierte Sequenz verwendet. Das hat den Vorteil, dass man nicht mehr auf eine bestimmte cDNA zurückgreifen muss, wie bei 3.1, sondern die Möglichkeit hat, alle nur erdenklichen Kombinationen und somit das gesamte Spektrum der möglichen siRNAs für alle Organismen, die den RNAi-Mechanismus besitzen, zu erhalten. Da es keine cDNA gibt, die auf die richtigen Länge zugeschnitten werden muss, kann das Oligo so konzipiert werden, das an der einen Seite der Loop, und auf der anderen Seite ein ihm gleiches Konstrukt ligiert wird. (Konfiguration: Loop, randomisierte Sequenz, Linker, randomisierte Sequenz, Loop (Abb. 18)).

Dadurch, dass es sich um ein Dumbbell handelt, wo die Spiegelebene in der Mitte ist (wobei jedoch rechts und links unterschiedliche randomisierte Sequenzen sind), muss man die Primer auch innerhalb dieses Linkers in der Mitte setzen, um bei der RCA und dem anschließenden

Verdau vollständige Sequenzen von sense und antisense verbunden durch die Loopsequenz zu erhalten. Der anfängliche kurze Denaturierungs- und Hybridisierungsschritt ist sehr entscheidend, da für die RCA ein Enzym verwendet wird, dessen Temperaturoptimum bei 30°C liegt und das nicht hitzestabil ist (somit kann keine erneute Hybridisierung des Primers an den Ausgangsdumbbell stattfinden). Das hat den Vorteil, dass man für den anschließenden Verdau keine Aufreinigung benötigt, weil ein Denaturierungsschritt die Polymeraseaktivität dauerhaft unterbindet.

Da die Sequenz des Linkers gleich ist, hängt die Hybridisierung durch den Linker vom Hybridisierungsumfeld (der randomisierten Sequenz) ab. Sequenzierungen des Ergebnisses nach der RCA und anschließender Klonierung haben gezeigt, dass das Verhältnis, das bei der Ausgangs-Verteilung von jeweils 25 % je Base lag, nun aber bei 19 % für Adenin, 11 % für Thymin, 29 % für Guanin und 41 % für Cytosin liegt (3.3.3). Anhand von Modifikationen der Verteilung des eingesetzten Oligos kann man wieder eine anähernde Gleichverteilung erreichen (Tabelle 25b).

4.4.4 Die vierte Methode

Wegen den verbesserungsfähigen Ergebnissen und der nicht sehr flexiblen und doch immer noch recht aufwendigen Prozedur, wurde versucht, sich von der RCA zu lösen und die Syntheseschritte weiter zu vereinfachen. Dies gelang mit der vierten Methode (3.4).

Wie bei 3.3 wurde versucht, das Muster: Loop, Bibliothek, H1-Promotor // H1-Promotor, Bibliothek, Loop herzustellen. Der Unterschied besteht hauptsächlich in der direkten Ligation des H1-Promotors mit einem dephosphorylierten Loop welches die Bibliothek enthält. Durch die Abwesenheit der Phosphatgruppe, entsteht nach der Ligation ein *gap* (Lücke), von wo aus die Polymerase den kürzeren Strang am 3'Ende anhand der Matrize auffüllt und dabei den Strang mit dem dephosphorylierten Ende in 5'→3' Richtung abhebt.

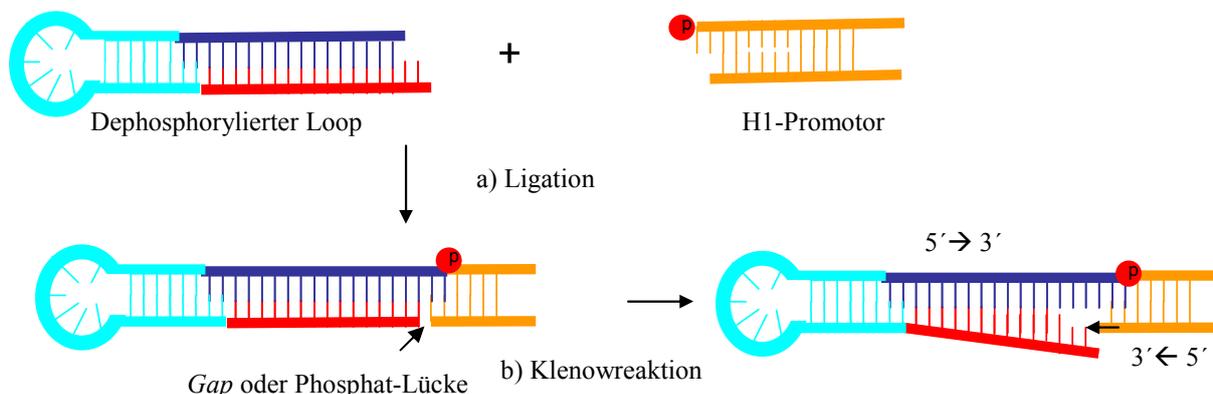


Abb. 42 Schema der Synthese der Bibliothek nach der vierten Methode.

a) Ligation des H1-Promotors mit dem dephosphorylierten Loop

b) Synthese des Gegenstranges

Interessanterweise war das Ergebnis dieser Pfu Ultra-Polymerase-Reaktion genau halb so lang wie erwartet. Wie in Abbildung 32 gezeigt werden konnte, kommt dies durch eine intramolekulare Umhybridisierung des H1-Promotors (nach dem Denaturierungsschritt) zustande, die unter den vorherrschenden Bedingungen fast ausschließlich entsteht.

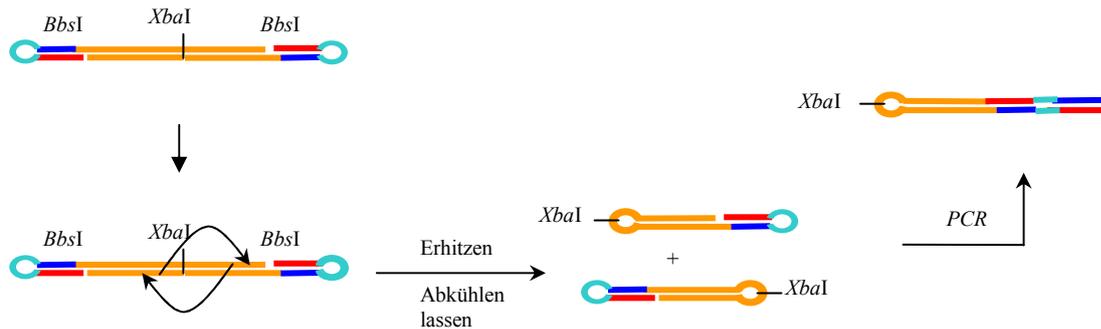


Abb. 43 Schema der Umhybridisierung des H1-Promotors nach der Denaturierung

Nach anschließendem Verdau mit *EcoRI* konnte dieses Konstrukt sowohl in den lentiviralen SRsh-empf Vektor als auch in den pSuper sh-empf Vektor kloniert werden, die mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PmeI* (einem *Bluntendcutter*) geschnitten wurden. Der Vorteil der Ligation in den Expressionsvektor pSuper sh-empf liegt in der um ca. ein zehnfaches höhere Klonzahl pro Transformationsansatz und der Abwesenheit von Rekombinieren. Der Vorteil der direkten Klonierung in das lentivirale Konstrukt ist, dass man ein Klonierungsschritt spart, was bei einer Ausbeute von 1×10^6 Klone / $100 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension eine Menge Arbeitersparnis und Zeitgewinnung bedeutet.

Mit verschiedenen Methoden wurde versucht, die Ausbeute der Transformation und somit die Vielfalt der Bibliothek zu erhöhen. Da jeder Neuansatz ein linearer Anstieg der Diversität bedeutet, wurde hauptsächlich versucht, anhand der Ligationmethode und Transformationseffizienz die Klonzahl um ein Vielfaches zu erhöhen. Dabei wurde die Ligation mit Hexamincobaltchlorid sowie Polyethylenglycol optimiert und die Transformation elektrisch mit und ohne Aufreinigung und mit selbstgemachten bzw. gekauften Bakterienstämme getestet, verglichen und dabei optimale Bedingungen geschaffen. Da die Anzahl der unerwünschten Rekombinierer dank stabilerer Bakterienstämme stark

reduziert werden konnte, blieb die direkte Ligation in das lentivirale Konstrukt weiterhin trotz der Einschränkungen bei der Klonzahl, eine realisierbare Option.

Da durch die kurzen shRNAs der Bibliothek wie in Abbildung 27 gezeigt, keine erhöhte Interferonantwort ausgelöst wird, ist die Bibliothek für viele funktionelle *Assays* einsetzbar und zum *screenen* von interessanten Phänomenen bei Proliferationsassays so wie Überlebenssignale bei Zusatz oder Entzug von Faktoren wie Zytokine oder Toxine.

4.5 Vergleich mit si/shRNA-Bibliotheken aus der Literatur

Im September 2008 ist die Publikation von Y. Wang erschienen (Wang et al. 2008), der ein Enzym welches ein Einzelstrangbruch verursacht verwendet. Ausgehend von diesem Strangbruch synthetisiert er den komplementären Strang einer shRNA-Bibliothek. Dies ist ein sehr interessanter Ansatz, der gut in unser System passen könnte. Untersuchungen haben aber gezeigt, dass in unseren Händen, ein für unser System passendes Enzym, welches auch ein Strangbruch verursachen soll, nicht so effektiv arbeitet. Daher sind wir bei der Ligation eines dephosphorylierten Loops an ein phosphorylierten Promotor bzw. Vektors geblieben, da wir dadurch auch Sequenzunabhängig sind. Ansonsten ist die Methode von Wang in der Herstellung recht aufwendig. Einfacher wäre die Bibliotheksgenerierung von H. Wu (Wu et al. 2007). Diese kommt der Generierung unserer Bibliothek schon sehr nahe obwohl unsere Bibliotheksgenerierung einfach besser ist. Die Arbeitsgruppe von Wu verwendet eine Ligation mit einem Loop mit einem Überhang von einer einzelnen Base, was sehr unvorteilhafte Auswirkung auf Ligationen hat. Des Weiteren verwendet sie den H1 Promotor die sie bei der generierung des Doppelstranges verwenden nicht weiter, sondern es scheint fast ein überflüssiges Anhängsel der PCR zu sein.

4.6 Anwendung der Bibliothek

Die 32D Zellen sind Faktorabhängige Zellen, die jedoch unter Umständen faktorunabhängig werden können. Diese Umstände können spontane Mutationen sein, die durch lange Kultivierungsperioden entstehen. Auch ein Mangel an IL3 kann eine Selektion von Zellen fördern, die den Wachstumsfaktor nicht im normalen Maßstab brauchen. Durch Insertionen von lentiviralen Konstrukten ins Genom kann auch IL3 Unabhängiges Wachstum entstehen, wie in 3.5.1.2 gezeigt werden konnte. Allerdings steht in diesem Fall noch die Analyse des Ortes der Integration aus.

5. Ausblick

Die hier vorgestellten vier Methoden dienen der Generierung einer randomisierten si/shRNA Bibliothek, die in der Lage sein soll, die gezielte Expressionshemmung jedes Genes von eukaryotischen Organismen durch den RNA-Interferenzmechanismus herbeizuführen.

Dadurch ist es nötig, eine Komplexität zu erreichen, die in 4.1 diskutiert wurde. Um das zu erreichen wird nun der H1 Promotor nicht mehr aus dem Vektor herausgeschnitten, sondern die Bibliothek nach 3.4 direkt im Vektorsystem synthetisiert. Dabei wird gleich das lentivirale Konstrukt verwendet, wodurch nur noch intramolekulare Ligationen nötig sind, welche wesentlich effektiver als intermolekulare sind. Allerdings hat man dadurch ein vermehrtes Problem mit Rekombinationen.

Diese Weiterentwicklungen und Optimierungen, sowie zunehmende Verbesserungen in der Ausbeute der erhaltenen Klone sind noch nötig, um diese Methode zu einem wichtigen Werkzeug für funktionelle Genanalysen werden zu lassen.

Anwendbarkeit auf die Generierung von miRNA Basierte shRNA Bibliotheken. Dessen Vorteile und Nachteile.

Um die Vorteile der miRNA Prozessierung zu nutzen, kann man die Expression der shRNA mit einer miRNA Sequenz flankieren und auch den entsprechenden Loop verwenden. Dazu wurde in letzter Zeit vermehrt die miR 30 Sequenz verwendet. Der untere Vorschlag basiert auf den Erkenntnissen der vierten Methode und ergibt als Produkt eine miR 30 ähnliche Struktur. Der Unterschied liegt darin, dass die Sequenz, die später die „reife“ miRNA bildet bei *sense*- und *antisense*- Sequenz nicht die für miRNA typische *mismatches* enthält. Es wäre zu untersuchen, welche Vorteile aus dieser „second generation“ sh-RNA Bildung hervorgeht.

AntiEGFP 120-141:

62

AGGATCCGGAAGACTTCACTAgaacttcagggtcagcttgccgTTTTTAATTAACCATGGGC

Vektor:

...CAGTGAGCGAGCGaCACTGCXXCTCCTCXXXGAAGACXXnTGCCTACTGC...

...GTCACCTCGCTCGcGTGACGXXGAGGAGXXXCTTCTGXXnACGGATGACG...



Verdau Bbs I / BseRI
(Heat inactivation)

...CAGTGAGCGAGCGa CACTGCXXCTCCTCXXXGAAGACXX nTGCCTACTGC...
...GTCACCTCGCTCG CtGTGACGXXGAGGAGXXXCTTCTGXXnACG GATGACG...

↓ Loop Klenow + BtsI Verdau + BAP
Ligation mit Vektor

(N)_{2x} TAGTGAAGCCACGCATGTAGGTCGATa
Ct (N)_{2x} ATCACTTCGGTGCGTACATCCGCATa

↓ 1 Schritt PCR (Pfu Ultra)

(N)_{2x} TAGTGAAGCCACGCA TGTAggTCGat
5 ...ACAGTGAGCGa
3 ...TGTCACCTCGCt (N)_{2x} ATCACTTCGGTGCGTACATccGCat

↓ Ligation
Verdau mit BcgI

TAGTGAAGCCACGCA TGTAGGCGTATTATCGACCTACATGCGTGGCTTCACTA
ATCACTTCGGTGCGTACATccGCATAATAGCTGGATGTACGCACCGAAGTGAT

↓ Religation

Ergebnis:

5 ...ACAGTGAGCGa (N)_{2x} TAGTGAAGCCACGCATGTA (N)_{2x} nTGCCTACTGC...
3 ...TGTCACCTCGCt (N)_{2x} ATCACTTCGGTGCGTACAT (N)_{2x} nACGGATGACG...

Nach Transkription:

5' ...GAAUUCAAGGUAUAUUGCUGUUGACAGUGAGCGa (N)_{2x} UAGUGAAGC
3' ...CCUAGGGCUCCGUCAUCCGU (N)_{2x} AUGUACGCAC

6. Literatur

- Bahramian, M. B. and H. Zarbl (1999). Transcriptional and posttranscriptional silencing of rodent alpha (I) collagen by a homologous transcriptionally self-silenced transgene. *Mol. Cell. Biol.* 19: 274-283.
- Bass, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101: 235-238.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409(6818): 363-366.
- Bevilacqua, A., R. P. Erickson and V. Hieber (1988). Antisense RNA inhibits endogenous gene expression in mouse preimplantation embryos: lack of double-stranded RNA „melting“ activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(3): 831-835.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards and R. Agami (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Burns, J. C., T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano and J. K. Yee (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(17): 8033-8037.
- Calegari, F., W. Haubensak, D. Yang, W. B. Huttner and F. Buchholz (2002) Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (22): 14236-14240.
- Caplen, N. J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire and R. A. Morgan (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9742-9747.
- Cerutti, L., N. Mian and A. Bateman (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the piwi domain. *Trends Biochem Sci* 25, 481-482.
- Chang, K., S.J. Elledge and J. Hannon (2006). Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries. *Nature Methods* 3(9), 707-714.
- Chen, M., L. Zhang, H.Y. Zhang, X. Xiong, B. Wang, Q. Du, B. Lu, C. Wahlestedt and Z. Liang (2005). A universal plasmid library encoding all permutations of small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(7): 2356-2361.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura and R. Shiekhattar (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
- Chiu, Y. L., and T. M. Rana (2003). SiRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 9(9): 1034-1048.

-
- Clark, J. and S. Ding (2006). Generation of RNAi Libraries for High-Throughput Screens. *J. Biomed Biotechnol.* 2006; 2006(4): 45716.
- Cogni, C., J. T. Irelan, M. Schumacher, T. J. Schmidhauser, E. U. Selker, G. Macino (1996). Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmatic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* 15(12): 3153-3163.
- Doi, N., S. Zenno, R. Ueda, H. Ohki-Hamazaki, K. Ui-Tei and K. Saigo (2003). Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr Biol* 13,41-46.
- Dorsett, Y. and T. Tuschl (2004). SiRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 3, 318-329.
- Downward, J. (2005). RNA interference libraries prove their worth in hunt for tumor suppressor genes. *Cell* 121(6): 813-815.
- Downward, J. (2004). Use of RNA interference libraries to investigate oncogenic signalling in mammalian cells. *Oncogene* 23(51): 8376-8383.
- Du, Q., H. Thonberg, J. Wang, C. Wahlestedt and Z. Liang (2005). A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res.* 33 (5): 1671-1677.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature* 411(6836): 494-498.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, K. Weber and T. Tuschl (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26(2): 199-213.
- Fire, A., M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-811.
- Goodbourn, S., L. Didcock and R. E. Randall (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen Virol.* 81 : 2341-2346.
- Greenberger, J. S., R. Eckner, W. Ostertag, B. Colletta, S. Boshetti, H. Nagasawa, A. Karpas, R. Weichselbaum and W. Moloney (1980). Release of spleen focus-forming virus (SFFV) from differentiation inducible promyelocytic leukemia cell lines transformed in vitro by Friend leukemia virus. *Virology* 105 :425-435.

-
- Greenberger, J. S., M. A. Sakakeeny, R. K. Humphries, C. J. Eaves and R. J. Eckner (1983). Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 2931-2935.
- Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch and R. Shiekhattar (2005). Human RISC couples MicroRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123(4): 631-640.
- Haase, A. D., L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Laine, R. Sack, A. Gatignol and W. Filipowicz (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6, 961-967.
- Haley, B. and P. D. Zamore (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 11(7): 599-606.
- Haller, O., G. Kochs and F. Weber (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344: 119-130.
- Hamilton, A. J., D. C. Baulcombe (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286 (5441): 950-952.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach and G. J. Hannon (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404 (6775): 293-296.
- Harborth, J., S. M. Elbashir, K. Vandeburgh, H. Manninga, S. A. Scaringe, K. Weber and T. Tuschl (2003). Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13 (2): 83-105.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P. D. Zamore (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* 293(5531): 834-838.
- Hutvagner, G., and P. D. Zamore (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297(5589): 2056-2060.
- Jian, R., T. Peng, S. Deng, J. Jiang, F. Hu, J. An and X. Cheng (2005). A simple strategy for generation of gene knockdown constructs with convergent H1 and U6 promoters. *Eur J Cell Biol* 85(5):433-40.
- Kamath, R. S., M. Martinez-Campos, P. Zipperlen, A. G. Fraser and J. Ahringer (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.*
- Kamath, R. S., A. G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D. P. Welchman, P. Zipperlen and J. Ahringer (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421(6820): 231-237.

-
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* 95: 1017-1026.
- Khvorova, A., A. Reynolds and S. D. Jayasena (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2): 209-216.
- Kittler, R., G. Putz, L. Pelletier, I. Poser, A. K. Heninger, D. Drechsel, S. Fischer, I. Konstantinova, B. Habermann, H. Grabner, M. L. Yaspo, H. Himmelbauer, B. Korn, K. Neugebauer, M. T. Pisabarro and F. Buchholz (2004). An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432: 1036-1040.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lau, N. C., L. P. Lim, E. G. Weinstein and D. P. Bartel (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- Lee, N. S., T. Dohjima, G. Bauer, H. Li, M. J. Li, A. Ehsani, P. Salvaterra and J. Rossi (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat. Biotechnol.* 20(5): 500-505
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and Ambros (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
- Lee, R. C. and V. Ambros (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee, Y. S., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. He, E. J. Sontheimer and R. W. Carthew (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69-81.
- Liu, Q., T. A. Rand, S. Kalidas, F. Du, H. E. Kim, D. P. Smith and X. Wang (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301, 1921-1925.
- Lohmann, J. U., I. Endl and T. C. Bosch (1999). Silencing of developmental genes in hydra. *Dev. Biol.* 214: 211-214.
- Luo, B., A. D. Heard and H. F. Lodish (2004). Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA (SPEED). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(15): 5494-5499.
- MacRae, I. J., K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. N. Brooks, W. Z. Cande, P. D. Adams and J. A. Doudna (2006). Structural basis for Double-Stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311(5758): 195-198.
- Martinez, J., and T. Tuschl (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 18(9): 975-980.

-
- Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel and P. D. Zamore (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123(4): 607-620.
- Matzke, A. J., F. Neuhuber, Y. D. Park, P. F. Ambros and M. A. Matzke (1994). Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol Gen Genet* 244(3): 219-229.
- Migliaccio, G., A. R. Migliaccio, B. L. Kreider, G. Rovera and J. W. Adamson (1989). Selection of Lineage-restricted Cell Lines Immortalized at Different stages of hematopoietic differentiation from the murine cell line 32D. *Cell Biology* (109): 833-841.
- Miyagishi, M. and K. Taira (2003). Strategies for generation of an siRNA expression library directed against the human genome. *Oligonucleotides* 13: 325-333.
- Miller, A. D., D. G. Miller, J. V. Garcia, C. M. Lynch (1993). Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.* 217: 581-599.
- Misquitta, L. and B. M. Paterson (1999). Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-I): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 1451-1456.
- Montgomery, M. K., S. Xu and A. Fire (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(26): 15502-15507.
- Mourelatos, Z., J. Dostie, S. Paushkin, A. Sharma, B. Charroux, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann and G. Dreyfuss (2002). MiRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Gene Dev.* 16(6): 720-728.
- Myslinski, E., J. C. Amé, A. Krol and P. Carbon (2001). An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1 RNA gene. *Nucleic Acids Research* 29(12): 2502-2509.
- Naldini, L., U. Bloemer, F. H. Gage, D. Trono and I. M. Verma (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11382-11388.
- Naldini, L., U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma and D. Trono (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272(5259): 263-267.
- Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen (1990). Introduction of a chimeric shalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Ngo H., C. Tschudi, K. Gull and E. Ullu (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(25): 14687-14692.

-
- Nykänen, A., B. Haley and P. D. Zamore (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107(2): 309-321.
- Orban, T. I., E. Izaurralde (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11(4): 459-469.
- Pandit, N. N., V. E. Russo (1992). Reversible inactivation of a foreign gene, *hph*, during the asexual cycle in *Neurospora crassa* transformants. *Mol Gen Genet* 234(3): 412-422.
- Patkaniowska, A. (2005). Biochemical and cell biological analysis of the mechanism of RNA Interference in human cells.
- Paule, M. R. and R. J. White (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Research* 28(6): 1283-1298.
- Pham, J. W., J. L. Pellino, Y. S. Lee, R. W. Carthew and E. J. Sontheimer (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves target mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117, 83-94.
- Parker, J., S. M. Roe and D. Barford (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434, 663-666.
- Rand, T. A., S. Petersen, F. Du, X. Wang (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123(4): 621-629.
- Reboul, J., P. Vaglio, F. J. Rual, P. Lamesch, M. Martinez, C. M. Armstrong, S. Li et al. (2003). *C. elegans* ORFeome version 1.1: experimental verification of the genome annotation and resource for proteome-scale protein expression. *Nat Genet.* 34(1): 35-41.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz and G. Ruvkun (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403(6772): 901-906.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall and A. Khvorova (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.* 22(3): 326-330.
- Rinn, J. L., G. Euskirchen, P. Bertone, R. Martone, N.M. Luscombe, S. Hartman, P. M. Harrison, F. K. Nelson, P. Miller, M. Gerstein, S. Weissman and M. Snyder (2003). The transcriptional activity of human Chromosome 22. *Genes Dev.* 17(4): 529-540.
- Rivas, F. V., N. H. Tolia, J. J. Song, J. P. Argon, J. Liu, G. J. Hannon and L. Joshua-Tor (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struc Mol Biol* 12(4): 340-349.
- Romano, N. and G. Macino (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.* (22): 3343-3353.
- Sánchez-Alvarado, A. and P. A. Newmark (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96: 5049-5054.

-
- Scherer, L. and J. J. Rossi (2004). Therapeutic applications of RNA interference: recent advances in siRNA design. *Adv. Genet.* 52: 1-21.
- Scherr, M., and M. Eder (2002). Gene Transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Current Gene Therapy* 2, 45-55.
- Scherr, M., K. Battmer, A. Ganser and M. Eder (2003). Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle* 2:3, 251-257.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, B. Haley and P. D. Zamore (2002). Evidence that siRNA function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* 10,537-548.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin and P. D. Zamore (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2): 199-208.
- Schwarz, D. S., Y. Tomari and P. D. Zamore (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr Biol* 14(9): 787-791.
- Sen, G., T. S. Wehrman, J. W. Myers and H. M. Blau (2004). Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nature Genetics* 36(2): 183-189.
- Shirane, D., K. Sugao, S. Namiki, M. Tanabe, M. Iino and K. Hirose (2004). Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs. *Nature Genetics* 36(2): 190-196.
- Sijen, T., J. Fleenor, F. Simmer, K. L. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R. H. Plasterk and A. Fire (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107(4): 465-476.
- Silva, J. M., M. Li, K. Chang, W. Ge, M. Golding, R. Rickles, D. Siolas, G. Hu, P. J. Paddison, M. R. Schlabach, N. Sheth, J. Bradshaw, J. Burchard, G. Cavet, R. Sachidanandam, W. R. McCombie, M. A. Cleary, S. J. Elledge and G. J. Hannon (2005). Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature Genetics* 37(11): 1281-1288.
- Song, J. J., S. K. Smith, G. J. Hannon and L. Joshua-Tor (2004). Crystal structure of Argonaute and its implication for RISC slicer activity. *Science* 305(5689): 1434-1437.
- Tahbaz, N., F. A. Kolb, H. Zhang, K. Jaronczyk, W. Filipowicz and T. C. Hobman (2004). Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep* 5, 189-194.
- Tijsterman, M., R. F. Ketting and R. H. Plasterk (2002). The genetics of RNA silencing. *Annu. Rev. Genet.* 36: 489-519.
- Tomari, Y., T. Du, B. Haley, D. S. Schwarz, R. Bennett, H. A. Cook, B. S. Koppetsch, W. E. Theurkauf and P. D. Zamore (2004a). RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* 116, 831-841.

-
- Tomari, Y., C. Matranga, B. Haley, N. Martinez and P. D. Zamore (2004b). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306,1377-1380.
- Tomari, Y., and P. D. Zamore (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes & Dev* 13, 3191-3197.
- Tuschl, T., P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel and P. A. Sharp (1999). Target mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 13(24): 3191-3197.
- Van der Krol, A. R., L. A. Mur, M. Beld, J. N. Mol and A. R. Stuitje (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2(4): 291-299.
- Vella, M., and F. J. Slack (2005). *C.elegans* microRNAs. WormBook The online review of *C.elegans* biology
http://www.wormbook.org/chapters/www_microRNA/microRNAs.pdf
- Wang, Y., Z.E. Wang, M.G. Cotticelli and R. Wilson (2008). A Random shRNA-Encoding Library for Phenotypic Selection and Hit-Optimization. *PLoS ONE* 2008 3(9):e3171
- Wargelius, A., S. Ellingsen and A. Fjose (1999). Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 156-161.
- Waterhouse, P. M., M. W. Graham and M. B. Wang (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13959-13964.
- Winston, W. M., C. Molodowitch and C. P. Hunter (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295(5564): 2456-2459.
- Wu H., H. Din and Y.Y. Mo (2007). Generation of shRNAs from randomized oligonucleotides. *Biol Proced online* 9: 9-17.
- Yang, D., F. Buchholz, Z. Huang, A. Goga, C. Y. Chen, F. M. Brodsky and J. M. Bishop (2002). Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(15): 9942-9947.
- Ye, F. and E.R. Signer (1996). RIGS (repeat-induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(20): 10881-10886.
- Zeng, Y. and B. R. Cullen (2002). RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 8, 855-860.
- Zheng, L., J. Liu, S. Batalov, D. Zhou, A. Orth, S. Ding and P. G. Schultz (2004). An approach to genomwide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 101(1): 135-140.

7. Anhang

Danksagung:

„Halleluja! Ich danke dem HERRN von ganzem Herzen.

Groß sind die Werke des HERRN; wer sie erforscht, der hat Freude daran.“

Psalm 111,1-2

Mit der Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei allen, die bei der Vorbereitung, dem Entstehen und der Vollendung dieser Arbeit mitgewirkt haben, herzlich zu bedanken.

Frau Prof. Scherr und Herr Prof. Eder für die Betreuung all die Jahre hindurch, den unzähligen Besprechungen, die guten Vorschläge und der Hilfe bei auftretenden Problemen.

Bei Iris möchte ich mich für die Hilfe bei der Zellkultur und den Viruspräparationen bedanken. Du bist die „Maxi-Königin“ geblieben ;-)

Karin danke ich für die freundschaftliche Arbeitsplatznachbarschaft und die Überlassung der Arbeitsplatte jenseits der Bleistiftmarkierung☺. Nicht zu vergessen sind die zahlreichen praktischen Tipps und die netten Gespräche (fachlich und auch nicht so fachliches).

Letizia und ihre zwei Kinder bereiteten mir auch Freude zwischen der Arbeit („kleine interessante Experimente die Spaß machen“).

Besonders bedanken möchte ich mich auch noch bei den anderen Doktoranden. Ihr habt ein super Arbeitsklima geschaffen. So haben wir nach und nach eine tolle Clique gebildet. Die Zeit mit Euch war und ist spitze. Vielen Dank Uschi, Michael, Stephi, Ewa und Yildirim.

Weiterhin möchte ich allen danken, die kritisch meine Entwürfe gelesen, Inhalte diskutiert und mir zahlreiche wertvolle Anregungen gegeben haben.

Ganz herzlich danke ich auch all denen, die mich mit Engagement über das Fachliche hinaus nach Kräften unterstützt haben, die an die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt und mich somit immer wieder motiviert haben, ins Besondere meine Familie. Danke!

Zuletzt möchte ich noch meinem Schatz Nadiya für die Zeit danken, die sie für die Fertigstellung dieser Arbeit hat abtreten müssen. Meine Nadieschda.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Die Arbeit wurde selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literaturquellen und Hilfsmitteln angefertigt. Die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Diese Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet und ist keiner anderen Hochschule vorgelegt worden.

Hannover, den 18. Dezember 2008

Daniel Schäfer

Hannover, den 18. Dezember 2008

Lebenslauf

Name: Daniel Schäfer
Anschrift: Maneckestr. 15 – 30625 Hannover
Telefon: 05011/ 70030561
E-Mail: Daniel.Schaefer@stud.uni-hannover.de

Geburtsdatum: 04. April 1979
Geburtsort: Montevideo / Uruguay
Staatsangehörigkeit: deutsch / uruguayisch
Familienstand: verheiratet seit 09.08.2008

Tätigkeit der Eltern: Missionare in Südamerika (z.Zt. in Argentinien)

Schulbildung und Studium:

1984 Vorschule in der evangelischen Schule „Bethesda“ (in Uruguay)
1985 Eintritt in die erste Klasse an der selben Schule
Dez. 1987 – April 1988 Deutschlandaufenthalt mit Schulbesuch: 3. Klasse
1990 nach dem Umzug nach Argentinien, kam ich in die 6. Klasse der deutschen Schule „Instituto Ballester“
Dez. 1990 – Febr. 1991 Deutschlandaufenthalt mit Schulbesuch: 6. Klasse
1991 Beginn der Sekundarstufe
Dez. 1992 – Febr. 1993 Deutschlandaufenthalt mit Schulbesuch: 8. Klasse
1994 Wahl für den naturw. Bereich mit Schwerpunkten in Biologie und Chemie
Deutsches Sprachdiplom der KMK Stufe I
Dez. 1994 – Febr. 1995 Deutschlandaufenthalt mit Schulbesuch: 10. Klasse
Febr. 1996 Einmonatiges Praktikum bei der Firma „Höchst“
Deutsches Sprachdiplom der KMK Stufe II
Dez. Argentinischer Sekundarschulabschluss
1997 Abitur an der Goethe Schule nach dem dafür zusätzlich eingerichteten Schuljahr
Umzug nach Deutschland
1998/99 Zivildienst als Pflegehilfe im Krankenhaus Hannover Nordstadt
WS 1999/2000 Beginn des Dipl. Biochemiestudiums an der Universität Hannover
Sept. 2001 Diplomvorprüfung mit - gut - bestanden
Jan. 2005 Diplomprüfung mit - gut - bestanden mit den Wahlpflichtfächern org. Chemie und Pharmakologie
Diplomarbeit zum Thema: „Gentransfer von siRNAs in hämatopoetische Zellen“ erstellt.
seit Jan. 2005 Erstellung der Promotionsarbeit mit dem Thema: „Generierung und funktionelle Anwendung einer randomisierten *sh-* und *si-RNA Library*“ an der Med. Hochschule Hannover.

Hobbys: Klavier, Gesang, ev. Gemeindearbeit, ehrenamtlicher Mitarbeiter der JVA-Hannover im Bereich Seelsorge.

Publikationen:

Scherr M, Venturini L, Battmer K, Schaller-Schoenitz M, Schaefer D, Dallmann I, Ganser A, Eder M.
Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function.
Nucleic Acids Res. 2007;35(22):e149. Epub 2007 Nov 19.

Chaturvedi A, Battmer K, Schaefer D, Ganser A, Eder M, Scherr M.
Comparison between molecularly defined and conventional therapeutics in a conditional BCR-ABL cell culture model.
Oligonucleotides. 2007 Spring;17(1):22-34.

Mancini A, El Bounkari O, Norrenbrock AF, Scherr M, Schaefer D, Eder M, Banham AH, Pulford K, Lyne L, Whetton AD, Tamura T.
FMIP controls the adipocyte lineage commitment of C2C12 cells by downmodulation of C/EBP alpha.
Oncogene. 2007 Feb 15;26(7):1020-7. Epub 2006 Aug 7.