Aus dem Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck Direktor: Prof. Dr. Georg Sczakiel

Entwicklung von Nukleinsäurewirkstoffen zur Charakterisierung von *major satellite repeat*-Transkripten im murinen Zellsystem

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion für Naturwissenschaften

vorgelegt von Nancy Dominique Jahn aus Neuhaus am Rennweg

Lübeck, im Herbst 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. G. Sczakiel angefertigt.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Sczakiel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Walther Traut

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2011Prüfungsvorsitzender:Prof. Dr. Thomas PetersZum Druck genehmigt:12.06.2011

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst zu haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Dissertation wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und es wurde kein erfolgloser Promotionsversuch unternommen.

Lübeck, den 20.10.2010 Nancy Jahn

Abkürzungsverzeichnis

Ago2	Argonaute2
α	Alpha
APS	Ammoniumpersulfat
as	antisense
AS-ON	Antisense-Oligonukleotid
AT-Gehalt	Adenosin-Thymidin-Gehalt
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaar
β	Betta
cDNA	complementary DNA
C. elegans	Caenorhabditis elegans
C/EBΡα,β,δ	CCAAT/enhancer-binding protein α,β,δ
Ci	Currie
CpG	Cytosin-Guanosin Dinukleotid
cpm	counts per minute
Dicer	RNAse III-ähnliche dsRNA spezifische Endonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
	GmbH
eccDNA	Extrachromosomale Zirkuläre DNA
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FKS	Fötales Kälberserum
γ	Gamma
Gapmer	Chimäre Oligonukleotide
GC-Gehalt	Guanosin-Cytosin-Gehalt
°C	Grad Celsius
G1/G0-Phase	Gap1/Gap0-Phase
G2/M-Phase	Gap2/Mitose-Phase
h	Stunden
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HSF1	Hitzeschock Transkriptionsfaktor 1
ICAM-1	Intrazelluläres Adhesionsmolekül-1
IL-1β	Interleukin-1β
<i>iv-</i> T	<i>in vitro</i> -Transkript

kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
LINE1	long intersperesed repeat element 1
LNA	locked nucleic acid
Lsh	Lymphoid spezifische Helikase
LTR	long terminal repeat
μFa	Mikrofarad
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOP	Morpholino Phosphoroamidate
M-Phase	Mitose
Ν	Anzahl an Versuchen
ms	Millisekunde
MS3 bzw. 4	major satellite 3 bzw. 4
msrSE	major satellite repeat Sequenzeinheiten
ncRNA	nicht kodierende RNA
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NonRT	RNA, die nicht in cDNA umgeschrieben wurde
NP95	95 kDa mouse nuclear protein
nt	Nukleotide
NTC	Non Template Control
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
рН	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-
	Konzentration
piRNA	piwi interacting RNA
pmol	picomol
PNA	peptide nucleic acid
Poly-A	polyadenyliert
PTO	Phosphorothioat
PTO-ON	Phosphorothioat-modifiziertes Oligonukleotid
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
RISC	RNA-induced gene silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNase H	Ribonuklease H
RNase A/T1	Ribonuklease A/T1

RNAi	RNA-Interferenz
rpm	revolution per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT-qPCR	Reverse Transkription mit angeschlossener quantitativer
	Polymerase Kettenreaktion
sat III	satellite III repeat
S. pombe	Schizosaccharomyzes pombe
SINE	short intersperesed repeat element
siRNA	small interfering RNA
SNF2/Helikase	Chromatin-Remodellierungsprotein
S-Phase	Synthesephase, Replikation
ssRNA	Einzelstrang RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermophilus aquaticus
TAR	transactivation response element
TCA	Trichloressigsäure
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer RNA
UV	Ultraviolet
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
YY1	Ying Yang 1
2´-O-Alkyl-ON	2´-O-Alkyl-modifizierte Oligonukleotide

1	Ein	leitung		1
	1.1	Repetitiv	ve DNA-Elemente als Bestandteile des Mausgenoms	1
	1.1.	1 <i>Maj</i>	or satellite repeat-DNA	3
	1.1.	2 Maj	or satellite repeat-Transkripte	6
	1.2	Nukleins	äurewirkstoffe	8
	1.2.	1 Anti	sense-Oligonukleotide	9
	1.2.	2 siRN	NAs	13
	1.3	Zielstellu	ung	16
2	Mat	terial		17
	2.1	Geräte		17
	2.2	Chemika	alien	18
	2.3	Verbrau	chsmaterialien	19
	2.4	Enzyme	, Kits & Größenmarker	20
	2.5	Zelllinier	n & Zellkulturmaterialien	20
	2.6	Bakterie	nstämme	20
	2.7	Lösunge	en und Puffer	21
	2.8	Oligonuk	deotide und siRNA	22
	2.8.	1 Olig	onukleotide	22
	2.8.	2 Moo	difizierte Oligonukleotide	23
	2.8.	3 siRl	NAs	24
	2.9	Plasmide	е	24
3	Met	thoden		25
	3.1	Molekula	arbiologische Methoden	25
	3.1.	1 Nuk	leinsäure-Analytik	25
	3.	.1.1.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
	3.	.1.1.2	Analytische native Agarose-Gelelektrophorese	25
	3.	.1.1.3	Präparative native Agarose-Gelelektrophorese	25
	3.	.1.1.4	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	26
	3.	.1.1.5	Northern Blot	26
	3.	.1.1.6	DotBlot-Analyse	27
	3.	.1.1.7	Analytische native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
	3.	.1.1.8	Analytische denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
	3.	.1.1.9	RNA-Isolierung	28
	3.	.1.1.10	DNase Behandlung von RNA-Extrakten	28
	3.	.1.1.11		28
	ა. ე	. I. I. IZ	Aikalische KINA-Hyulolyse	29
	ა. ე	. 1. 1. 13		29
	3.	. 1. 1. 14		29

	3.1.1.15	Hybridisierung von siRNA	30
	3.1.1.16	Radioaktive 5`-Endmarkierung von Oligonukleotiden	30
	3.1.1.17	Abtrennung freier Nukleotide mittels G ₅₀ -Gelfiltration	30
	3.1.1.18	Bestimmung der Kinasierungseffizienz mittels Trichloressig	säure-
		Fällung (TCA-Fällung)	31
	3.1.1.19	In Vitro-Transkription	32
	3.1.1.20	cDNA-Synthese oder Reverse Transkription	32
	3.1.1.21	Quantitative-PCR (qPCR)	32
	3.1.1.22	Konventionelle PCR	34
	3.1.2 Mik	robiologische Methoden	34
	3.1.2.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	34
	3.1.2.2	Elektroporation von Bakterien	35
	3.1.2.3	Glyzerinkulturen von Bakterien	35
	3.1.2.4	Präparation von Plasmid-DNA	35
	3.1.2.5	Restriktionsanalyse von Plasmiden	35
	3.1.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	35
	3.1.2.7	Kolonie-PCR	36
	3.1.2.8	Klonierung von ms-sense-pcDNA3.1(+) und ms-as-pcDNA3.1(+).	36
	3.1.2.9	Klonierung von pGEMT-74bp-ms	37
3	3.2 Zellbiolo	ogische Methoden	37
	3.2.1 Kul	tivierung von Säugerzellen	37
	3.2.2 Kry	okonservierung	38
	3.2.3 Zel	Izahl- und Zellvitalitätsbestimmung	38
	3.2.4 Tra	nsfektion von NIH3T3-Zellen	38
	3.2.5 Hitz	zeschockbehandlung von NIH3T3-Zellen	39
	3.2.6 Syr	nchronisierung von NIH3T3-Zellen in der G $_0$ -Phase des Zellzyklus	39
	3.2.7 Dur	rchflusszytometrie (FACS)	39
	3.2.7.1	FACS-gestützte Zellzyklusanalyse	40
	3.2.8 Bes	stimmung der Transfektionseffizienz	40
	3.2.9 Flu	oreszenzmikroskopie	41
4	Ergebniss	e	42
4	.1 Charakt	terisierung von <i>major satellite repeat</i> -Transkripten in NIH3T3-Zellen	42
	4.1.1 Unt	tersuchung von major satellite repeat-Transkripten mittels Norther	n Blot-
	Ana	alyse	42
	4.1.1.1	Strangspezifische Hybridisierung von sense- und antisense	major
		satellite repeat-Transkripten	43
	4.1.1.2	major satellite repeat-Transkripte in NIH3T3-Zellen	44
	4.1.2 Unt	tersuchung von <i>major satellite repeat</i> -Transkripten mittels RT-qPCF	र46
	4.1.2.1	Spezifischer Nachweis von major satellite repeat-Transkripten	mittels
		RT-qPCR	47

4.1.2.2	2	Sensitivität d Transkripten	es qPCR	Nachweises	von <i>major</i>	satellite repeat- 49
4.1.2.3	3	Bestimmung c	ler msrSE il	n unbehandelte	en NIH3T3-Zel	len50
4.1.3	Indul	ktion von <i>sens</i>	e major sa	<i>tellite repeat</i> -Tr	anskripten nao	ch Hitzeschock 50
4.1.4	Zwis	chenfazit				52
4.2 Entw	wicklu	ng von oligon	neren Nukle	einsäurewirksto	offen zur Supp	ression von <i>major</i>
121	Com	epear-manski nutoraostützte	Strukturar	alvee von <i>m</i> a	ior satallita ra	noat Transkrinten
4.2.1		putergestutzte				
4.2.2	Biolo Oligo	gische Aktivita nukleotide	ät der gege	n <i>major satellit</i>	e repeat-Trans	skripte gerichteten55
4.2.2.2	1	Biologische Al	ktivität der F	PTO-modifizier	ten AS-ON	55
4.2.2	2.1.1	Konzentratio	onsabhängi	ge Suppressio	on von <i>majol</i>	r satellite repeat-
		Transkripter	n durch ms1	I-und ms2-PTC)	
4.2.2	2.1.2	Einfluss der	PIO-ON L	ânge auf die n	najor satellite	<i>repeat</i> -Expression 57
4.2.2	2.1.3	Wirksamkei	t von ms3-F	TO in NIH3T3	-Zellen	
4.2.2	2.1.4	Sequenzspe	ezifität de	r ms1-PTO	vermittelten	Reduktion der
4.2.2	2.1.5	Strangspezi	fische Sup	pression von	sense major	satellite repeat-
		Transkripter	n durch ms?	I-PTO		61
4.2.	2.1.6	Bestimmung	g des IC ₅₀ v	on ms1-PTO		64
4.2.2	2.1.7	ms1-PTO v major satell	ermittelt Si ite repeat-T	uppression vor ranskripten	n hitzeschock	induzierten sense
4.2.1	2.1.8	Transfektior	nseffizienz \	on AS-ON in N	NH3T3-Zellen	68
4.2.2.2	2	Biologische Al	ktivität von (Gapmer modifiz	zierten AS-ON	l69
4.2.2	2.2.1	Konzentratio	onsabhängi	ger Einfluss	von ms1-Ga	pmer und ms2-
4223	3	Biologische	Aktivität de	er deden <i>ma</i> l	ior satellite	repeat-Transkripte
7.2.2.		gerichteten sif	RNAs			
4.2.2	2.3.1	ms1-siRNA	vermittelt	eine leichte	Reduktion de	er <i>major satellite</i>
		<i>repeat</i> -Expr	ession			71
4.2.	2.3.2	ms1-siRNA	und ms2-s	iRNA supprimi	eren die Hitze	eschock-induzierte
		major satell	<i>ite repeat</i> -E	xpression		73
4.2.2	2.3.3	Transfektior	nseffizienz v	on siRNAs in I	NIH3T3-Zellen	74
4.2.3	Zwis	chenfazit				75
4.3 Biol	ogisc	ne Funktion vo	on <i>major</i> sa	<i>tellite repeat</i> -T	ranskripten	
4.3.1	Funk	tionsanalyse	durch Ül	perexpression	von <i>major</i>	satellite repeat-
	Tran	skripten				76
4.3.1.1	1	Einfluss der Ü	Überexpress	sion von s <i>ense</i>	e- und antiser	nse major satellite
		re <i>peat</i> -Transk	ripten auf d	ie Proliferation	von NIH3T3-Z	Zellen78

	4.3.2	2 Ana	alyse der	Proliferation	von	NIH3T3-	Zellen	nach	Reduk	tion	von	major
		sat	ellite repea	at-Transkripte	en dui	rch ms1-F	РΤО					79
	4.	3.2.1	ms1-PTC	O vermittelte	Supp	ression d	ler <i>maj</i>	or sate	ellite re	peat-l	Expre	ession
			steigerte	die Proliferat	ion ve	on NIH3T	3-Zelle	en				80
	4.	3.2.2	Einfluss	der ms1-PTC)-veri	mittelten	Hemm	ung ai	uf die F	Prolife	eratio	n von
			NIH3T3-2	Zellen nach H	litzes	chock						83
	4.	3.2.3	Einfluss	der ms1-PTC)-verr	nittelten I	Hemmu	ing au	f die P	rolifer	ation	nach
			Synchror	nisation von N	ІНЗТ	3-Zellen	•••••					86
	4.3.3	3 Zwi	schenfazi	t								90
5	Disl	kussior	າ									91
	51	Nachwa	his und Ch	araktorisiorur		n maiors	atollito	ronoa	Trane	krinta	n	01
	5.2	Finfluse	der AS-	ON Chamia	iy vui auf	die Evor		von	maior	satall	ito ra	onost
	5.2	Transkrinten				-10-04- 06						
	53	Riologis	che Funkt	ion von <i>mai</i> o	r sate	llite rene	<i>at</i> -Tran	skrinte	 n		•••••	101
	54	Aushlick			Sale			Skipt	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,			105
	0.4	/ (0501101										100
6	Zus	ammer	nfassung							•••••		106
7	Anh	nang										108
	7.1	Literatu	rverzeichn	iis								108
	7.2	Lebensl	auf				Fehle	! Text	marke	nicht	t defi	i niert.

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von *major satellite repeat*-Transkripten der Maus. Dafür wurden Nukleinsäurewirkstoffe entwickelt und auf ihre biologische Wirksamkeit, im Sinne der Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten, hin überprüft. Weiterhin wurden diese Nukleinsäurewirkstoffe eingesetzt um die biologische Funktion von *major satellite repeat*-Transkripten zu untersuchen.

Im ersten Kapitel der Einleitung wird ein allgemeiner Überblick über repetitive DNA-Elemente als Bestandteil des Mausgenoms gegeben und die *major satellite repeat*-DNA und deren Transkripte näher vorgestellt. Im zweiten Kapitel werden die Eigenschaften und Wirkmechanismen der in diese Arbeit verwendeten Nukleinsäurewirkstoffe (Antisense-Oligonukleotide & *small interfering*-RNAs) erläutert.

1.1 Repetitive DNA-Elemente als Bestandteile des Mausgenoms

Die Entdeckung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger der genetischen Information durch Avery *et al.* (1944) markierte den Anfang der Molekularbiologie. Durch die Erschließung der dreidimensionalen Struktur der DNA durch Watson und Crick im Jahr 1953 konnten beide unmittelbar darauf deren Replikationsmechanimus ableiten (Watson & Crick, 1953 a,b) und so einen entscheidenden Schritt in der Weitergabe der genetischen Information aufklären. In eukaryotischen Organismen liegt die DNA als lineares doppelhelikales Molekül in Form von Chromosomen vor. Durch Assoziation mit basischen Histonproteinen wird die DNA kompaktiert und ist als dichte Struktur in der Mitose sichtbar. Renaturierungsexperimente durch Britten & Kohne (1968) zeigten erstaunlicherweise, dass die eukaryotische DNA aus einer Vielzahl sich wiederholender DNA-Sequenzen aufgebaut ist. Dies wurde durch die Sequenzanalyse verschiedener eukaryotischer Genome, wie dem Mausgenom, bestätigt (Waterston *et al.*, 2002).

Für das Mausgenom, dass im haploiden Zustand aus 19 Autosomen und 2 Gonosomen besteht, wird eine Zahl von 3 x 10⁴ proteinkodierenden Genen angenommen (Waterston *et al.*, 2002). Ein Großteil der DNA besteht jedoch aus nicht proteinkodierenden Sequenzen. Diese setzen sich vor allem aus repetitiven DNA-Elementen, Pseudogenen und RNA-Genen zusammen, die für ribosomale- (rRNA), transfer-RNA (tRNA) und mikroRNAs (miRNAs) kodieren (Okazaki *et al.*, 2002; Waterston *et al.*, 2002).

Die Sequenzanalyse des murinen Genoms zeigte weiterhin, dass etwa 40 % der gesamten DNA aus sogenannten repetitiven DNA-Elementen besteht (Waterston et al., 2002). Diesen historisch meist als "Müll" oder parasitäre DNA bezeichneten Elementen kommt vor allem im Hinblick auf die Evolution des Genoms und dessen Stabilität eine wichtige Rolle zu (Tomilin, 2008; Richard et al., 2008). Man unterscheidet zwei Klassen von repetitiven DNA-Elementen, einerseits mobile, aus Retrotransposons hervorgegangene Seguenzen und andererseits nicht kodierende, repetitive Seguenzen wie Satelliten- und Telomer-DNA (Tomilin, 2008). Transposonelemente nehmen im Mausgenom mit 39 % den Hauptanteil repetitiver Sequenzen ein und werden aufgrund ihrer replikativen Strategien in zwei Gruppen untergliedert (Waterston et al., 2002; Feschotte, 2008). Die Gruppe der Retrotransposons, zu denen die long interspersed repeat elements (LINEs), short interspersed repeat elements (SINEs) und die long terminal repeats (LTRs) gehören, verbreiten sich durch ein RNA-Intermediat, während die DNA-Transposons durch Ausschneiden und Einfügen ihre Position im Genom verändern (Ostertag & Kazazian, 2001; Feschotte, 2008). Interessanterweise findet man LINEs vor allem in Gen-armen und AT-reichen Abschnitten des Genoms, während SINEs meist in GC-reichen und kodierenden Bereichen lokalisiert sind. Dagegen zeigen LTRs und DNA-Transposons keine Präferenz bezüglich des GC-Gehalts und ihrer Lokalisation (Waterston et al., 2002; Tomilin, 2008). Aktive Transposons aus der Gruppe der LINEund LTR-Elemente verändern das murine Genom durch Insertion oder Mutation und können somit Krankheiten verursachen (Ostertag & Kazazian, 2001). Neben der aktiven Veränderung des murinen Genoms durch Transposonelemente (Insertion und Mutation) haben die Lokalisation, der epigenetische Status (Methylierung von CpG-Dinukleotiden, Histonmodifikationen) und die Interaktion von Transposonelementen mit Proteinen einen Einfluss auf die Struktur und die Regulation des murinen Genoms (Feschotte, 2008; Tomilin, 2008).

Satelliten-DNAs gehören zur Gruppe repetitiver Elemente, die aus sich wiederholenden, nicht kodierenden DNA-Sequenzen aufgebaut sind (Jones, 1973). Im Vergleich zu mobilen Transposonelementen nehmen Satelliten-DNAs, mit etwa 4 %, einen geringeren Teil des Mausgenoms ein (Waterston *et al.*, 2002). Satelliten-DNAs können in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Waterston *et al.*, 2002; Plohl *et al.*, 2008). Dazu gehören Minisatelliten und Mikrosatelliten, die eine Monomerlänge von 2 bp – 6 bp bzw. 15 bp - 60 bp aufweisen und vorrangig in euchromatischen Bereichen der Chromosomen eingebettet sind (Plohl *et al.*, 2008). Satelliten-DNAs, mit einer Monomerlänge von 100-400 bp, sind vor allem im konstitutiven Heterochromatin, welches

Einleitung

während des gesamten Zellzyklus kompaktiert vorliegt, lokalisiert (Hennig, 1999; Francastel *et al.*, 2000). Zu dieser Gruppe von Satelliten-DNAs gehören auch *major* und *minor satellite repeats*, die eine Monomerlänge von 234 bp bzw. 120 bp haben (Hörz & Altenburger, 1981; Wong & Rattner, 1988). Dabei sind Satelliten-DNAs als Bestandteil von Zentromeren und Telomeren am Aufbau und der Segregation von Chromosomen beteiligt (Ugarković, 2005; Plohl *et al.*, 2008).

1.1.1 *Major satellite repeat-DNA*

Satelliten-DNAs bestehen aus sich wiederholenden Einheiten von nicht kodierenden DNA-Sequenzen, die nach Dichtegradientenzentrifugation separiert von der genomischen-DNA als "Satelliten-Bande" nachweisbar sind (Jones, 1973). Der erste Nachweis von Satelliten-DNA im Mausgewebe erfolgte durch Kit (1961). Aus Renaturierungsexperimenten ging hervor, dass es sich um repetitive Seguenzen handelt, welche nach Hybridisierung mit komplementärer DNA eine chromosomale Lokalisation im perizentromeren Heterochromatin aufwiesen und außer auf dem Y-Chromosom, auf allen akrozentrischen Mauschromosomen gefunden wurden (Waring & Britten, 1966; Pardue & Gall, 1970). Erste strukturelle Untersuchungen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen zeigten zwei verschiedene Spaltungsmuster von repetitiven Sequenzen (Typ A und Typ B), die zu einer Länge von ungefähr 245 bp pro repeat-Einheit führten (Hörz & Zachau, 1977). In weiterführenden Experimenten konnten Hörz & Altenburger (1981) eine Konsensussequenz für *major* (γ) Satelliten-DNA aus genomischen Fragmenten herleiten. Es handelt sich dabei um eine 234 bp lange Einheit, die auffallend AT-reich (62 %) ist. Die Konsensussequenz ist aus 4 homologen Untereinheiten (I - IV, siehe Abbildung 1.1.1 B) aufgebaut und kann nochmals in jeweils zwei alternierende Äquivalente ($\alpha_1 \& \beta_1$ bis $\alpha_4 \& \beta_1$) β_4 ; siehe Abbildung 1.1.1 B) unterteilt werden. Des Weiteren konnte eine starke Methylierung der in der Sequenz enthaltenen CpG-Dinukleotide festgestellt werden (Hörz & Altenburger, 1981). Die *major satellite repeat*-Konsensussequenz wurde durch Analyse 30 genomischer Klone bestätigt (Vissel & Choo, 1989). Nach Restriktion und Southern Blot-Analyse muriner genomischer DNA konnte der Hauptanteil der major satellite repeat-DNA als ununterbrochene repetitiv angeordnete Sequenzeinheit mit einer Größe von 240 kb bis > 2000 kb nachgewiesen werden (Vissel & Choo, 1989). Durch die Analyse des Mausgenoms wurde ein genomischer Anteil an major satellite repeats von 3,6 % bestimmt (Waterston et al., 2002). Minor satellite repeats, die eine Konsensussequenz von 120 bp und eine chromosomale Lokalisation im Zentromer aufweisen, sind mit einem genomischen Anteil von < 0,1 % geringer im Mausgenom repräsentiert (Wong & Rattner, 1988; Waterston *et al.*, 2002). In der folgenden Darstellung (Abbildung 1.1.1 A) ist die Lokalisation der beiden Satelliten-DNAs und anderer repetitiver Elemente schematisch dargestellt.



Abbildung 1.1.1: Schematischer Aufbau der *major satellite repeat*-DNA. A) Dargestellt ist die Lokalisation der *major satellite repeat*-DNA und anderer repetitiver DNA-Elemente auf einem Interphase Mauschromosom (verändert nach Martens *et al.*, 2005). B) Gezeigt wird die repetitive Struktur der *major satellite repeat*-DNA nach Hörz & Altenburger (1981). (I - IV: Homologe Untereinheiten, α_I - β_I _V: alternierende Äquivalente)

Neuere Studien konnten zwei weitere Satelliten-DNA-Elemente im murinen Zentromer detektieren. Dabei handelt es sich um die major satellite 3 bzw. 4 (MS3 & MS4), die beide GC-reich sind und Längen von 150 bp bzw. 300 bp haben (Kuznetsova et al., 2005). Während MS4 neben major satellite repeat-DNA im perizentromeren Bereich lokalisiert ist, konnte man MS3 zusammen mit minor satellite repeat-DNA im zentromeren Heterochromatin nachweisen (Kuznetsova et al., 2006). Neben einer chromosomassoziierten Lokalisation können multimere major satellite repeat-Einheiten häufig als extrachromosomale zirkuläre DNA (eccDNA) vorliegen (Flores et al., 1988). Es wird davon ausgegangen, dass major satellite repeat-eccDNAs während der Replikation gebildet werden (Cohen et al., 2006). Die Verdopplung von major satellite repeat-DNA erfolgt in der mittleren Phase der Replikation (S-Phase), während euchromatische Bereiche in der frühen und zentromere minor satellite repeat-DNA in der späten S-Phase repliziert werden (Quivy et al., 2004; Guenatri et al., 2004). Während der Mitose bleiben die sich separierenden Chromatiden über die major satellite repeat-DNA bis zur Metaphase miteinander verbunden. Sie bilden damit die letzten vor der Zellteilung assoziierten Chromatidbereiche (Guenatri et al., 2004; Kuznetsova et al., 2007).

Die *major satellite repeat*-DNA kann durch Proteine mit unterschiedlicher Funktion assoziiert sein (Ugarković, 2005). Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor Ying Yang 1 (YY1), der sowohl als Transkriptionsaktivator als auch Transkriptionsrepressor fungieren kann und zur Familie der *Polycomb group* Proteine gehört, erkennt eine minimale Konsensussequenz von 3 nt in einem 12 nt langen Bindungsmotiv (Wilkinson *et al.*, 2006; Hyde-DeRuyscher *et al.*, 1995). Die m*ajor satellite repeat*-DNA enthält neun Sequenzelemente die dieser minimalen Konsensussequenz entsprechen und die in proliferierenden Zellen, aber nicht in Zellen die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden, durch YY1 gebunden werden (Shestakova *et al.*, 2004). Interessanterweise ist YY1 auch in die Expression von LINE-1 Retrotransposons involviert (Kurose *et al.*, 1995; Athanikar *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte die 9 nt lange Bindungssequenz, der in der Differenzierung von Adipozyten exprimierten Transkriptionsfaktoren *CCAAT/enhancerbinding protein* α , β und δ (C/EBP α , β und δ), achtmal in der *major satellite repeat*-DNA identifiziert werden. Diese binden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Reifung von Adipozyten an die perizentromeren Regionen (Tang & Lane, 1999; Liu *et al.*, 2007).

1.1.2 *Major satellite repeat*-Transkripte

Die *major satellite repeat*-DNA ist im perizentromeren Heterochromatin eingebettet. Diese Form des konstitutiven Heterochromatins, das durch methylierte CpG-Dinukleotide und transkriptionsreprimierende Histonmodifikationen (zur Übersicht siehe Lachner *et al.*, 2003) gekennzeichnet ist, liegt während des gesamten Zellzyklus stark kondensiert vor und übernimmt eine strukturelle Funktion bei der Segregation der Chromosomen (Richards & Elgin, 2002; Maison & Almouzni, 2004).

Im Hinblick auf die major satellite repeat-DNA wurde eine differentielle Methylierung von CpG-Dinukleotiden beobachtet. Während die major satellite repeat-DNA-Sequenzen in somatischen Zellen der Maus (Leber, Niere, Hirn) hypermethyliert sind, ist in Keimzellen (Spermatozyten und Oozyten) eine Hypomethylierung nachweisbar (Ponzetto-Zimmerman & Wolgemuth, 1984; Sanford et al., 1984). Darüber hinaus kommt es zur Anreicherung reprimierender Histonmodifikationen (Methylierung von Histon 3 am Lysinrest 9 und 27 und von Histon 4 am Lysinrest 20) an major satellite repeat-DNA-Sequenzen in embryonalen Stammzellen der Maus (Martens et al., 2005). Obwohl die aufgeführten Punkte auf eine transkriptionsinerte Struktur hinweisen, konnte Harel et al. bereits im Jahr 1968 major satellite repeat-RNA in verschiedenen Geweben und Zelllinien der Maus nachweisen. Erweitert wurde das Wissen über major satellite repeat-Transkripte durch die Arbeit von Gaubatz & Cutler (1990), die eine Expression in seneszenten Herzmuskelzellen feststellen konnten, wobei die beobachteten Transkripte keine einheitliche Länge aufwiesen und in einem Größenbereich von 6 kb bis > 9,5 kb nachzuweisen waren. Die Untersuchung anderer Gewebe durch die Arbeitsgruppe um Dollé ergab sowohl eine Expression in fötalen Zellen als auch im adulten Leber- und Hodengewebe der Maus (Rudert et al., 1995). Die Transkripte wiesen ebenfalls unterschiedliche Längen auf und umfassten einen Größenbereich von 1,8 kb bis 3,5 kb. Neben dieser Beobachtung wurde ein negativer Einfluss von Retinoinsäure auf die major satellite repeat-Expression gemessen, wobei die Behandlung mit der Differenzierung der untersuchten P19-Zellen einherging. Im Vergleich dazu wiesen Retinoinsäuredifferenzierte embryonale Stammzellen der Maus eine höhere major satellite repeat-Expression auf als undifferenzierte Stammzellen und embryonale Fibroblasten (Martens et al., 2005). Durch in situ-Hybridisierung, unter Verwendung strangspezifischer Sonden, wurde in Zellen des zentralen Nervensystems die differentielle Expression von major satellite repeat-Transkripten mit sense- als auch antisense-Orientierung nachgewiesen (Rudert et al., 1995). Untersuchungen embryonaler Stammzellen der Maus zeigten zudem

eine Anreicherung von *major satellite repeat*-Transkripten in der polyadenylierten (Poly-A) Fraktion der RNA (Lehnertz *et al.*, 2003; Martens *et al.*, 2005).

In murinen Zellen konnte unter Verwendung einer einzelstrangspezifischen RNase (RNase A) eine RNA-Komponente beschrieben werden, die zur Aufrechterhaltung des perizentromeren Heterochromatins notwendig ist (Maison et al., 2002; Muchardt et al., 2002). Die Deletion von Dicer, einem in die RNA-Interferenz (RNAi) involvierten Enzym, dass als Doppelstrang-RNA-spezifische Ribonuklease fungiert und langkettige Vorläufer-RNA-Moleküle prozessiert, führt sowohl in vivo als auch in vitro zu Differenzierungsstörungen, die einhergehen mit der Erhöhung von major satellite repeat-Transkripten (Bernstein et al., 2003; Kanellopoulou et al., 2005; Murchinson et al., 2005). Es konnte jedoch kein eindeutiger Einfluss auf perizentromere Heterochromatinmarker (DNA-Methylierung, Histonmodifikationen) nachgewiesen werden. Die Deletion von Argonaute2 (Ago2), dass ebenfalls in den RNAi-Mechanismus involviert und als Doppelstrang-RNAspezifische Endonuklease für die Degradation der Ziel-RNA verantwortlich ist, hatte keinen Einfluss auf die major satellite repeat-Expression (Morita et al., 2007). Aus Untersuchungen in Schizosaccharomyzes pombe (S. pombe) ist bekannt, dass doppelsträngige zentromere Satelliten-Transkripte als Vorläufer für small interfering RNAs (siRNAs) dienen, die zur Bildung und Aufrechterhaltung des zentromeren Heterochromatins beitragen (Volpe et al., 2002). Da jedoch bis heute keine major satellite repeat-RNAs mit einer Größe zwischen 20 nt und 30 nt nachgewiesen werden konnten, ist die Rolle von major satellite repeat-Transkripten im Hinblick auf die RNA-vermittelte Stilllegung des perizentromeren Heterochromatins nicht klar.

Ein weiteres Effektorprotein der *major satellite repeat*-Transkription ist die Lymphoidspezifische Helikase Lsh, die ein Mitglied der SNF2/Helikase-Familie von Chromatin-Remodellierungsproteinen ist und während der murinen Embryogenese ubiquitär exprimiert wird (Jarvis *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2004). Lsh ist als Modulator der CpG-Methylierung in murinen embryonalen Stammzellen notwendig für die Aufrechterhaltung reprimierender Histonmodifikationen (Yan *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006). Die Deletion von Lsh führt sowohl in Mausembryos als auch in embryonalen Fibroblasten zur Detektion von *major satellite repeat*-Transkripten, die eine Länge von 0,2 kb bis 4 kb aufweisen. Darüber hinaus konnte ebenfalls eine Anreicherung von Lsh an der *major satellite repeat*-DNA, LINE-1-DNA und anderen repetitiven DNA-Elementen gefunden werden (Huang *et al.*, 2004). Die *major satellite repeat*-Transkription wird weiterhin durch NP95 reguliert. Dieses Protein ist Teil des Replikationskomplexes und wird spezifisch in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus in verschiedenen Mausgeweben und murinen embryonalen Stammzellen exprimiert (Uemura *et al.*, 2000; Muto *et al.*, 2002; Bonapace *et al.*, 2002). Die Hemmung von NP95 führt zu einer Erhöhung der *major satellite repeat*-Expression in NIH3T3-Zellen, die begleitet wird von der Hyperacetylierung verschiedener Lysinreste am Histon 4 (Papait *et al.*, 2007). Die dargestellten Befunde unterstützen den Beitrag der *major satellite repeat*-DNA im Hinblick auf die Stabilisierung des Genoms, die Funktion der *major satellite repeat*-Transkripte bleibt jedoch offen.

Nähere Hinweise auf eine mögliche Rolle von major satellite repeat-Transkripten kommen aus dem humanen System. Sowohl in den zentromeren als auch perizentromeren Bereichen akrozentrischer Chromosomen sind verschiedene Subfamilien der satellite III repeat-DNA (sat III) lokalisiert (Jarmuż et al., 2007). Nach Hitzeschock konnte die Bindung des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors HSF1 an die sat III-DNA des Chromosoms 9 in primären humanen Fibroblasten nachgewiesen werden (Jolly et al., 2002). Darüber hinaus wurde eine Induktion von polyadenylierten sense sat III-Transkripten (Transkription vom Zentromer zugewandten DNA-Strang) gemessen, wohingegen unter normalen Zellkulturbedingungen nur eine geringe sat III-Expression nachweisbar war (Rizzi et al., 2004; Valgardsdottir et al., 2005). Ähnlich dem murinen System weisen die humanen sat III-Transkripte keine einheitliche Länge auf (Jolly et al., 2004; Rizzi et al., 2004). Nach Hitzeschockinduktion verbleiben die sat III-Transkripte am Ort ihrer Transkription im perizentromeren Heterochromatin und liegen dort assoziiert mit verschiedenen Proteinen (HSF1, RNA-Polymerase II und Spleißfaktoren) in distinkten nukleären Subkompartimenten vor, die als nukleäre Stresspartikel bezeichnet werden (Jolly et al., 2002; Jolly et al., 2004; Denegri et al., 2002; Metz et al., 2004; Chiodi et al., 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur in Anwesenheit von sat III-Transkripten Spleißfaktoren in nukleären Stresspartikeln akkumulieren (Metz et al., 2004; Chiodi et al., 2004). Ausgehend davon wird angenommen, dass humane sat III-Transkripte an der Regulation des Spleißmechanismus unter Stressbedingungen beteiligt sind.

1.2 Nukleinsäurewirkstoffe

Zur Untersuchung von *major satellite repeat*-Transkripten wurden Nukleinsäurewirkstoffe entwickelt, die spezifisch gegen *major satellite repeat*-Transkripte gerichtet sind. Es gibt verschiedene Gruppen von Nukleinsäurewirkstoffen (zur Übersicht siehe: Bhindi *et al.*, 2007; Eckstein, 2007). Da *major satellite repeat*-Transkripte als nicht kodierende RNAs vorliegen, wurden Nukleinsäurewirkstoffe entwickelt, die zur Degradation der RNA führen. Dafür wurden neben Antisense-Oligonukleotiden siRNAs gewählt. Im Folgenden werden diese Klassen näher vorgestellt.

1.2.1 Antisense-Oligonukleotide

Antisense-Oligonukleotide (AS-ON) sind einzelsträngige Oligonukleotide, die erstmals 1978 durch Zamecnik & Stephenson beschrieben wurden. Durch die Hybridisierung mit ihrer komplementären Ziel-RNA, können die zirka 20 nt langen AS-ON die Genexpression durch verschiedene Mechanismen inhibieren (Chan *et al.*, 2006). In Abbildung 1.2.1 sind diese Mechanismen schematisch dargestellt und werden im Folgenden näher erläutert.



Abbildung 1.2.1: Wirkmechanismen von Antisense-Oligonukleotiden (verändert nach Chan et al., 2006).

In Abwesenheit von AS-ON findet die normale Genexpression statt, die über die transkribierte mRNA zu translatierten Polypeptiden führt (1). Durch das Einbringen eines AS-ON kommt es zunächst zur Bildung eines partiellen Doppelstrangs zwischen der Ziel-RNA und dem AS-ON. Dem folgt die Induktion von RNase H, einer Nuklease die spezifisch RNA-Moleküle einer DNA-RNA-Heteroduplex sowohl im Nukleus (2) als auch im Zytoplasma (3) hydrolysieren kann und so die Genexpression unterbindet. Darüber hinaus kann die Hybridisierung zwischen AS-ON und mRNAs zur translationalen Repression führen, wobei durch Assoziation mit der 5'CAP-Struktur (4) oder einer Exon-Intron Grenze der pre-mRNA (5) die Reifung der mRNA beeinträchtigt wird. Des Weiteren können AS-ON zur sterischen Behinderung der Ribosomenbindung (6) führen und somit die Genexpression reduzieren.

Die Fähigkeit einen der genannten Prozesse zu vermitteln, wird unter anderem durch die Modifikation des AS-ON bestimmt. Diese chemischen Veränderungen können sowohl das Rückgrat, die Riboseeinheit, als auch die Nukleobasen betreffen. Darüber hinaus ist die Position auf der Ziel-RNA und deren Sekundärstruktur, die entweder experimentell oder durch computergestützte Analyse auf geeignete Zielregionen hin untersucht werden kann, ein wichtiges Kriterium für die biologische Wirksamkeit (Patzel *et al.*, 1999 ; Smith *et al.*, 2000).

Chemisch unmodifizierte AS-ON werden schnell durch Nukleasen degradiert. Die Einführung verschiedener chemischer Modifikationen führten zu einer verbesserten Stabilität und sind ihrer zeitlichen Entwicklungsabfolge nach in Generationen in Abbildung 1.2.2 eingeordnet.



Abbildung 1.2.2: Ausgewählte chemische Modifikationen von Antisense-Oligonukleotiden (Kurreck, 2003; Chan *et al.*, 2006).

Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide (PTO-ON) stellen die erste Generation an chemisch veränderten Oligonukleotiden dar, deren Synthese erstmals durch Eckstein und Kollegen beschrieben wurde (De Clercq *et al.*, 1969; Eckstein, 2000). Bei dieser Rückgrat-Modifikation am Internukleotidphosphat wird eines der nicht brückenbildenden Sauerstoffatome durch ein Schwefelatom ersetzt. Neben der erhöhten Nukleaseresistenz, im Vergleich zu unmodifizierten AS-ON, weisen PTO-ON eine längenabhängige aber sequenzunabhängige Affinität zu zahlreichen zellulären Proteinen auf, die zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann (Dias & Stein, 2002). PTO-ON vermitteln ihre Wirkung durch Induktion von RNase H, wobei die Affinität zur Ziel-RNA geringer ist als bei unmodifizierten AS-ON, was sich in einer erniedrigten Schmelztemperatur der Heteroduplex widerspiegelt (Furdon *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1988).

Die in der zweiten Generation entwickelten 2'-O-Alkyl-modifizierten Oligonukleotide zeichnen sich ebenfalls durch eine verbesserte Nukleaseresistenz aus. Des Weiteren haben sie eine erhöhte Affinität für ihre Ziel-RNA und sind im Vergleich zu PTO-ON weniger toxisch (Monia *et al.*, 1993; Crooke, 2004). Vollständig modifizierte 2'-O-Alkyl-ON vermitteln ihre biologische Aktivität über einen RNase H-unabhängigen Mechanismus

(Monia *et al.*, 1993) der abhängig von der Lokalisation auf der Ziel-RNA, zur translationalen Repression führt (Baker *et al.*, 1997; Sierakowska *et al.*, 1996).

Aus der Kombination von AS-ON der ersten und zweiten Generation wurden Gapmer-Oligonukleotide (Gap: Zwischenraum) entwickelt. Diese an den endständigen Bereichen 2'-O-Alkyl- und im Zentrum Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotide vermitteln ihre biologische Aktivität durch Induktion von RNase H, wobei ein minimaler Zwischenraum von fünf PTO-Nukleotiden ausreichend ist (Monia *et al.*, 1993).

Die Optimierung der Affinität zur Ziel-RNA und der Nukleaseresistenz, sowie die Reduktion von zytotoxischen Nebeneffekten führte zu AS-ON der dritten Generation. Neben modifizierten DNA- und RNA-Oligonukleotiden, wie zum Beispiel locked nucleic acid (LNA), kam es durch Substitution der Riboseeinheit und des Phosphodiestherrückgrats zur Entwicklung von peptid nucleic acid (PNA) und Morpholino Phosphoroamidaten (MOP) (Kurreck, 2003). LNA-modifizierte Ribonukleotide sind aufgrund ihrer zusätzlichen Methylenbrücke, die das 2'-Sauerstoffatom mit dem 4'-Kohlenstoffatom der Riboseeinheit verbindet, konformationell eingeschränkt. Dies führt sowohl zu einer höheren Affinität zur Ziel-RNA als auch zu einer erhöhten Schmelztemperatur einer LNA-RNA Heteroduplex. Darüber hinaus wird eine RNase Hvermittelte RNA-Hydrolyse unterbunden (Vester & Wengel, 2004). Chimäre DNA-LNA Gapmer AS-ON mit einem Zwischenraum von 7-8 DNA-Nukleotiden induzieren jedoch eine RNase H-katalysierte RNA-Hydrolyse (Kurreck et al., 2002). PNA-modifizierte AS-ON sind Desoxyribonukleinsäureanaloga, bei denen das Phosphodiestherrückgrat durch ein Pseudopeptidrückgrat ersetzt wurde. Neben einer starken Affinität zur Zielsequenz weisen sie eine hohe Nuklease- und Peptidaseresistenz auf und finden Einsatz in der Spleiß-Korrektur und bei der Stranginvasion chromsomaler DNA (Nielsen, 2004). MOP sind ebenfalls DNA-Analoga. Neben dem Austausch der Riboseeinheit ist das Phosphodiesterrückgrat durch eine Phosphoroamidatbindung ersetzt. Somit sind sie stabil gegenüber Nukleasen und Peptidasen. Sie finden Einsatz in der Spleiß-Korrektur und der translationalen Hemmung durch Beeinträchtigung der Ribosomenbindung (Amantana & Iversen, 2005).

Im Hinblick auf die klinische Relevanz spielen vor allem PTO-ON eine große Rolle. Vitravene (Fomivirsen) der Firma ISIS Pharmaceuticals ist das erste zugelassene PTO-ON zur Behandlung der Infektion mit Cytomegalievirus (Orr, 2001). Neben AS-ON der ersten Generation befinden sich auch Oligonukleotide der zweiten und dritten Generation in klinischen Studien (zur Übersicht siehe Kurreck, 2003; Chan *et al*, 2006; Eckstein, 2007).

1.2.2 siRNAs

Kurze doppelsträngige-RNA Moleküle stellen neben AS-ON einen sehr potenten Wirkstoff zur Regulation der Genexpression dar (Juliano *et al.*, 2005; Rayburn & Zhang, 2008). Sie vermitteln ihre biologische Funktion sowohl posttranskriptionell, durch die Spaltung komplementärer Ziel-RNA, als auch transkriptionell, durch Modulation epigenetischer Faktoren (Zamore & Haley, 2005).

Aus Pflanzen und aus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) war bekannt, dass sowohl kurze dsRNAs als auch *sense*- und *antisense*-RNAs zur Reduktion von komplementären mRNAs fähig sind (zur Übersicht siehe: Wassenegger & Pélissier, 1998; Guo & Kemphues, 1995). Wegweisende Experimente aus der Arbeitsgruppe um Mello zeigten, dass im Vergleich zu Einzelstrang-RNAs (ssRNA), Doppelstrang-RNAs (dsRNA) ein größeres Potential haben mit der Genexpression zu interferieren und begründeten somit den Begriff der RNA-Interferenz (RNAi) (Fire *et al.*, 1998). In der nachfolgenden Darstellung (Abbildung 1.2.3) ist der Mechanismus der RNAi, unter Berücksichtigung verschiedener dsRNA-Moleküle, dargestellt. Die mit Zahlen dargestellten Prozesse werden im folgenden Teil näher erläutert.



Abbildung 1.2.3: RNAi-Mechanismen (verändert nach Rana, 2007). RISC: *RNA-induced silencing complex*, Multiproteinkomplex; Dicer: RNAse III-ähnliche dsRNA spezifische Endonuklease; Ago2: nukleolytisch aktiver Bestandteil von RISC, RNase H-ähnliche Endonuklease; in rot dargestellt der *sense-* (*passenger*) Strang der siRNA oder die reife mRNA; in blau dargestellt der *antisense-* (*guide*) Strang der siRNA, der komplementär zur reifen mRNA ist.

(1) Lange dsRNA-Moleküle oder *hairpin*-RNA Konstrukte werden durch Dicer, einer RNase III-ähnlichen Ribonuklease, prozessiert. Sie weisen danach eine Länge von 19-26 bp mit einem 2 nt-Überhang am 3`-Ende auf und werden als *small interfering* RNA (siRNAs) bezeichnet (Hamilton & Baulcombe, 1999; Hammond *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 2001 und Elbashir *et al.*, 2001a). Da lange dsRNAs in Säugerzelllinien kaum funktionell sind und die Induktion einer Interferon-vermittelten Immunantwort hervorrufen, werden 21 nt lange siRNAs direkt in Zellen appliziert und erzeugen eine starke Suppression der Ziel-RNA (Elbashir *et al.*, 2001b). Nach der Prozessierung durch Dicer (1) oder direkter Applikation (2) assoziieren die am 5`-Ende phosphorylierten siRNAs mit dem *RNA-induced silencing complex* (RISC), der aus mehreren Proteinen aufgebaut ist (Hammond *et al.*, 2000; Meister & Tuschel, 2004). Dabei entscheidet die thermodynamische Stabilität des 5`-Endes der siRNA, welcher der beiden Stränge als *guide*-Strang geladen wird (3) (Schwarz *et al.*, 2003). Der aktivierte

Einleitung

RISC-Komplex (4) bindet im Anschluss die komplementäre Ziel-RNA und leitet deren Degradation durch einen endonukleolytischen Schnitt, definiert durch das 5'-Ende des quide-Stranges, ein (5) (Elbashir et al., 2001c). Nach Dissoziation der gespaltenen Ziel-RNA werden beide Fragmente durch Exonukleasen degradiert (Orban & Izaurralde, 2005) und der weiterhin aktive RISC-Komplex (6) kann erneut komplementäre Ziel-RNA spalten (Hutvágner & Zamore, 2002; Haley & Zamore, 2004). Das Schlüsselenzym des RNAi-Prozesses ist Argonaute2 (Ago2), eine RNase H-ähnliche Endonuklease (Tabara et al., 1999; Hammond et al., 2001; Meister et al., 2004; Liu et al., 2004). Die spezifische Degradation der Ziel-RNA setzt eine vollständige Komplementarität mit dem guide-Strang der siRNA voraus (Jackson et al., 2003; Haley & Zamore, 2004). Es können jedoch auch mRNAs mit geringerer Komplementarität in den RNAi-Mechanismus eintreten und so unerwünschte Effekte, abseits der eigentlichen Ziel-RNA, hervorrufen (off-target-Effekte) (Lin et al., 2005; Fedorov et al., 2006). Im Weiteren hat die Sekundärstruktur der Ziel-RNA einen großen Einfluss auf ihre Supprimierbarkeit durch siRNAs (Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003; Overhoff et al., 2005; Schubert et al., 2005; Brown et al., 2005; Kurreck, 2006). Die chemische Modifikation von siRNAs, unter Berücksichtigung der Aufrechterhaltung der Funktionalität, kann einerseits die Stabilität der siRNAs erhöhen und andererseits unerwünschte Wechselwirkungen unterbinden (Jackson et al., 2006).

Neben AS-PTO sind siRNAs eine potente neue therapeutische Wirkstoffklasse (Bumcrot *et al.*, 2006; Grimm & Kay, 2007). Neben Therapieansätzen für Stoffwechsel-, Krebs- und Entzündungserkrankungen (Soutschek *et al.*, 2004; Pulukuri *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006) befinden sich sowohl antidegenerative als auch antivirale siRNA-Wirkstoffe in klinischen Untersuchungen (zur Übersicht siehe Novobrantseva *et al.*, 2008; Eckstein, 2007).

1.3 Zielstellung

Die biologische Bedeutung von Maus *major satellite repeat*-Transkripten ist kaum verstanden. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, diese Transkripte strukturell und funktionell näher zu charakterisieren.

Dafür mussten zuerst Nachweismethoden etabliert werden, die Aufschluss über die strangspezifische Expression der Transkripte ermöglichten.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Nukleinsäurewirkstoffe entwickelt werden, die zur Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten führen, um funktionelle Untersuchungen betreiben zu können.

2 Material

2.1 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese Sub-Cell®GT Avanti[™]J-25 Zentrifuge Axiovert 25, Mikroskop CO₂ Water Jacketed Inkubator Elektroporation Gene Pulser[®] II **Elektroporation Pulse Controller plus** Elektroporation Capacitance Extender plus FACSCalibur[™] (Durchflusszytometer) Feinwaage Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (HBO 100) Fluotest[®], 254 nm und 366 nm UV Lampe Function Line (Brutschrank) GeneAmp[®] 5700 HERAsafe, Sterilwerkbank Hettich Rotixa 120R Zentrifuge Hettich Rotixa/RP Zentrifuge Hybridisierungsofen Hybridisierungsröhrchen **IKAMAG[®]RCT** Image Eraser Lab 850 pH-Meter Microfuge[®] R Millipore Wasseraufbereitungsanlage NanoDrop[®] ND-1000 Spektralphotometer Neubauer Zählkammer PAA-Gelelektrophoresesystem Peristaltik Pumpe Minipuls3 Phospholmager screen Pipetman (2-1000 µl) Powerpack 300 Thermomixer 5436 Typhoon 8600 Variable Mode Imager **UNO II, PCR-Block** UV-Tisch, 312 nm VacuGene XL VacuGene Pump VarioCam, Geldokumentation Vibrofix VF1 Electronic

Biorad, München Beckman, Fullerton, CA, USA Zeiss, Göttingen Forma Scientific, Marietta, OH, USA Biorad, München Biorad, München Biorad, München **BD** Biosciences, Heidelberg Sartorius, Göttingen Zeiss, Jena Heraeus Instruments, Hanau Heraeus Instruments, Hanau Applied Biosystems, Darmstadt Heraeus Instruments, Hanau Hettich Zentrifugen, Tuttlingen Hettich Zentrifugen, Tuttlingen Heraeus Instruments, Hanau Biometra, Göttingen IKA Labortechnik, Staufen GE-Healthcare, Chalfont St Gilles, UK Schott Geräte (Merck), Mainz Beckman, Fullerton, CA, USA Millipore Corp., Billerica, MA, USA PeQLab Biotechnologies, Erlangen Brandt, Ludwigshafen Whatman/Biometra, Göttingen Gilson, Middleton, WI, USA GE-Healthcare, Chalfont St Gilles, UK Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich Biorad, München Eppendorf, Hamburg GE-Healthcare, Chalfont St Gilles, UK Biometra, Göttingen Phase, Lübeck GE-Healthcare, Chalfont St Gilles, UK GE-Healthcare, Chalfont St Gilles, UK Phase, Lübeck IKA Labortechnik, Staufen

Wallac 1219 Liquid Scintillation Counter Wasserbad W22

2.2 Chemikalien

Agarose Ampicillin Ammoniumperoxodisulfat (APS) Borsäure Bromphenolblau Bovines Serum Albumin (Fraktion V) Chloroform dNTPs Dimethylsulfoxid (DMSO) $Na_2H(PO_4) \ge H_2O$ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Essigsäure Ethanol (p.a.) Ethidiumbromid FACSFlow[™] Ficoll 400 Formaldehyd Formamid [γ³²-P]-ATP Glycerin Harnstoff Isoamylalkohol Isopropanol Kaliumchlorid (KCI) Kaliumdihydrogenphosphat Lachsspermien DNA (10g/l) Lipofectamine 2000 Methylen Blau Millipore Aqua Natriumacetat Natriumchlorid (NaCl) Natriumdodecylsulfat (SDS) Natriumhydroxid (NaOH) Paraformaldehyd Roti[®]Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 7,5-8) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (125:24:1; pH 4,5) Propidiumiodid

PerkinElmer, Boston, MA, USA Medingen (Preiss Daimler), Wilsdruf

Cambres, Rockland, ME, USA Serva, Heidelberg Roth, Karlsruhe Merck. Darmstadt Sigma, Sternheim Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Peqlab, Erlangen Sigma, Sternheim Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Becton & Dickinson, Heidelberg Sigma-Aldrich, Deisenhofen Fluka, Buchs, Schweiz Merck, Darmstadt Hartmann, Braunschweig Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Sigma-Aldrich, Deisenhofen Millipore Corp., Billerica, MA, USA Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Deisenhofen Merck, Darmstadt Merck-Suchardt, Hohenbrunn

Roth, Karlsruhe

Fluka, Buchs, Schweiz Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Material

Qiazol Lysis Reagent Rotiphrese Gel 40 % Rotiszint[®] eco plus ready to use Salzsäure (HCI) Stains All TEMED Trichloressigsäure (TCA) Trihydroxymethylaminomethan (TRIS) Triton[®]X-100 Xylencyanolblau

2.3 Verbrauchsmaterialien

ART[®] 10 Reach[™] Pipet Tips

ART[®] 20P Pipet Tips

Biosphere[®] Filter Tips (100 µl) Biosphere[®] Filter Tips (200 µl) Cellstar® serologische Einwegpipetten Cellstar[®] 15 und 50 ml PP-Test Tubes Cellstar[®] 12 well Cell Culture Plate Combitipps (1,25 ml – 12 ml) Elektroporationsküvette (2 mm gap)

Filter tip FT 1000 (G) GF 50 Glasfaser Rundfilter Hybond-N Klebefolie, optisch klar *Kryo-Vials*, steril Mikro-Schraubröhre (1,5 ml, PP) Nick[™]-Columns Pipettenspitzen (200-1000 µl) Pipettenspitzen (10 µl)

Reagiergefäß (1,5 ml) Reaktionsgefäße Multiply[®]-µStrip Pro 4er Kette Roth-Messflaschen (20 ml, Typ *"Vial")* Safe-seal Reagiergefäß (2 ml, PP) 96 well Multiply[®] PCR Platte Tissue Culture Flask (25 und 75 cm²) Tissue Culture Plate (6 well) Qiagen, Hilden Roth Karlsruhe Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Deisenhofen Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Deisenhofen Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Roth, Karlsruhe

Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Greiner Bio-one, Frickenhausen Greiner Bio-one, Frickenhausen Greiner Bio-one, Frickenhausen Eppendorf, Hamburg Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA Greiner Bio-one, Frickenhausen Schleicher & Schuell, Dassel GE-Healthcare, Chalfont St Gilles, UK Sarstedt, Nümbrecht Greiner Bio-one, Frickenhausen Sarstedt. Nümbrecht GE-Healthcare, Chalfont St Gilles, UK Sarstedt, Nümbrecht Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Roth, Karlsruhe Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt. Nümbrecht Sarstedt, Newton, NC, USA Sarstedt, Newton, NC, USA

2.4 Enzyme, Kits & Größenmarker

Alkalische Phosphatase (1U/µl) Restriktionsenzyme RNase A (Dnase & Proteasefrei) RNase A/T1 Mix T4 DNA Ligase T4 Polynukleotide Kinase Tag DNA Polymerase (mit Thermopol Puffer) Turbo[™] Dnase Gene Elute[™] Plasmid Miniprep Kit pGEM[®]-T Easy Vector System Qiagen[®] Plasmid Maxi Kit (25) gPCR[™] Core Kit for Sybr[®] Green I RevertAid[™] First strand cDNA Synthesis Kit **T7** Transcription Kit VenorGEM Mycoplasmentest Wizard[®] SV Gel and PCR Cleanup System GeneRuler[™] 50 bp DNA Ladder GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder RiboRuler[™] RNA High Range Ladder 10 bp DNA Leiter

Roche, Mannheim Fermentas, Burlington, Canada NEB, Beverly, MA, USA Ambion, Austin, TX, USA Sigma, Steinheim Promega, Madison, WI, USA Qiagen, Hilden Eurogentec, Seraing, Belgien Fermentas, Burlington, Canada Fermentas, Burlington, Canada Minerva Biolabs, Berlin Promega, Madison, WI, USA Fermentas, Burlington, Canada Fermentas, Burlington, Canada Fermentas, Burlington, Canada Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.5 Zelllinien & Zellkulturmaterialien

Die Zelllinie NIH3T3 (DSMZ No.: ACC59) wurde von Professor Johannes Gerdes, Forschungszentrum Borstel, zur Verfügung gestellt.

DMEM mit GlutaMAX I und Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Östereich
FKS Gold	PAA, Pasching, Östereich
Opti-MEM I	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Linaris, Bettingen am Main

2.6 Bakterienstämme

Escherichia coli (E. coli) JM109	Promega, Madison, WI, USA
E.coli TOP10	Invitrogen, Carlsbard, CA, USA

2.7 Lösungen und Puffer

PBS (pH 7,4) NaCl KCl Na₂HPO₄ KH₂PO₄	137 mM 2,7 mM 10 mM 1,8 mM	<u>TBS (pH 7,4)</u> NaCl KCl Tris base	137 mM 2,7 mM 25 mM
<u>10 x TBE (pH 8,0)</u>		<u>50 x TAE (pH 8,5)</u>	
Tris/HCI	890 mM	Tris/HCI	2 M
Borsäure	890 mM	Eisessig	1 M
EDTA (pH 8,3)	20 mM	EDIA	0,1 M
<u>20 x SSC (pH 7,0)</u>		10 x MOPS-Puffer (pH 7	7 <u>,0)</u>
NaCl	3 M MOPS	0,2 M	~
Tri Natriumcitrat	0,5 M	Tri Natriumcitrat	20 mM
рН 7,0		EDTA (pH 8,0)	10 mM
10 x RNase A/T1-Pu	ffer (pH 7,4)	Carbonatpuffer (pH 10,	<u>5)</u>
MgCl ₂	100 mM	Na ₂ CO ₃ (100mM)	70 % (v/v)
Tris/HCI	100 mM	NaHCO ₃ (100 mM)	30 % (v/v)
Neutralisationspuffe	er (pH 7,4)	alkalische Lösung	
Tris/HCL	0,1M	NaOH	50 mM
		NaCl	10 mM
50 x Denhardt Reag	enz (Sterilfiltriert)	Prähybridisierungspuff	er (Northern Blot)
Ficoll 400	1 % (w/v)	SSC	6 x
BSA Fraktion V	1 % (w/v)	Denhardt Reagenz	10 x
Polyvinylpyrrolidone	1 % (w/v)	SDS	0,2 % (w/v)
Hybridisierungspuff	er (Northern Blot)	Membran-Stripping-Lös	sung
SSC	6 x	SSC	0,1 x
Denhardt Reagenz	5 x	SDS	0,1 % (w/v)
SDS	0,2 % (w/v)		
2x RNA-Ladepuffer		<u>6x DNA-Ladepuffer</u>	
EDTA	0,5 mM	TAE	1 x
Formamid	95 % (v/v)	Ficoll 400	25 % (w/v)
SDS	0,025 % (w/v)	Bromphenolblau	0,0025 % (w/v)
Bromphenolblau	0,025 % (w/v)	Xylencyanolblau	0,0025 % (w/v)
Xylencyanolblau	0,025 % (w/v)		
Ethidiumbromid	0,025 % (v/v)		

Stains-all Färbelös	sung	<u>siRNA-Hybridisierungspuffer</u>			
Tris/HCI (pH 8,8)	15 mM	Tris/HCI (pH 7,4)	20 mM		
Stains-all	0,005% (w/v)	NaCl	100 mM		
Formamid	10 % (v/v)				
Isopropanol	25 % (v/v)				
H ₂ O	65 % (v/v)				
Zellfixierungslösu	ng in PBS (FACS)	Permeabilisierungslös	ung in PBS (FACS)		
Paraformaldehyd	2 % (w/v)	Triton X 100	0,25 % (v/v)		
DNA Färbelösung	in PBS (FACS)	<u>Methylenblaulösung</u>			
RNase A	30 µg/ml	Methylenblau	0,03 % (w/v)		
Propidiumiodid	50 µg/ml	Natriumacetat (pH 5,2)	0,3 M		
in PBS	-				
LB-Flüssigmedium	<u>ı (pH 7,4)</u>	LB-Plattenmedium (pH 7,4)			
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)		
Pepton Nr. 140	1 % (w/v)	Pepton Nr. 140	1 % (w/v)		
NaCl	1 % (w/v)	NaCl	1 % (w/v)		
pH7,4		Agar	1,5 % (w/v)		
		pH 7,4			

2.8 Oligonukleotide und siRNA

2.8.1 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm), Biozym scientific (Hess. Oldendorf) und IBA (Göttingen) bezogen und sind in Tabelle 2.7.1 dargestellt.

Tabelle 2.8.1:	Verwendete	Oligonukleotide

Primer	Anwendung	Sequenz (5 `- 3`)	
	qPCR	GACGACTTGAAAAATGACGAAATC	
ms-forward (Lennertz <i>et al.</i> , 2003)	Kolonie PCR Northern Blot		
ms-reverse (Lehnertz <i>et al</i> ., 2003)	qPCR	CATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC	
	Kolonie-PCR Northern Blot		
mBeta-Actin 885F	qPCR	ATGGAATCCTGTGGCATCCAT	
mBeta-Actin 1024R	qPCR	TTCTGCATCCTGTCAGCAATG	
T7-Primer	Kolonie-PCR PCR	TAATACGACTCACTATA	
7SK2-reverse	Northern Blot	AAAAGAAAGGCAGACTGCCACATG	
PcDNA3.1/BGH reverse (Invitrogen, Carlsbad)	PCR	TAGAAGGCACAGTCGAGG	

2.8.2 Modifizierte Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden sowohl modifizierte Desoxyribonukleotiode als auch Ribonukleotide verwendet. Desoxyribonukleotide sind durch Großbuchstaben, Ribonukleotide durch Kleinbuchstaben, Phosphorothioatestherbrücken durch "s" und 2'-O-Methyl-modifizierte Ribonukleinsäuren sind kursiv dargestellt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm), Tibmol Biol (Berlin), IBA (Göttingen) bzw. Metabion (Martinsried) bezogen und sind in Tabelle 2.8.2 dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`		GC-
Dezelchnung			Gehalt [%]
ms1-PTO	AsTsTsTsTsCsAsGsTsTsTsTsCsTsCsGsCsCsAsT	20	35
ms2-PTO	TsTsCsTsCsAsTsTsTsCsCsGsTsGsAsTsTsTsT	20	30
ms3-PTO	AsTsGsGsCsGsAsGsAsAsAsAsCsTsGsAsAsAsAsT	20	35
ms1-mut-PTO	AsTsTsTsTsAsCsGsTsTsTsTsCsTsGsCsCsCsAsT	20	35
ms1-inv-PTO	TsAsCsCsGsCsTsCsTsTsTsTsGsAsCsTsTsTsA	20	35
TM6-4-PTO	(TsCsGsTsGsT) ₄	24	50
1840B/20-PTO	AsTsCsAsGsAsTsGsCsGsTsGsGsCsCsTsAsGsTsG	20	55
AUG-C/20-PTO	GsAsGsCsCsAsTsAsGsCsGsAsGsGsCsTsGsAsGsG	20	65
Sc1570-PTO	CsGsGsAsGsCsGsAsTsAsCsCsGsAsGsGsGsT	18	67
Sc1840/18-2-PTO	GsGsTsCsAsGsAsCsCsAsGsTsGsAsGsTsTsC	18	56
Sc592e-PTO	GsGsTsGsTsCsAsAsCsAsGsAsAsCsTsGsGsG	18	39
r-as360-PTO	AsGsGsAsAsGsGsTsTsTsAsGsCsTsGsTsT	18	39
r-as1920-PTO	AsTsCsAsGsGsCsTsAsGsAsCsTsTsTsAsAsC	18	39
r-as2400-PTO	AsAsCsCsAsTsTsAsCsCsAsGsTsCsCsAsTsA	18	39
H-2280-3-PTO	TsAsCsAsAsCsCsTsGsTsAsCsAsAsCsTsGsT	18	39
As1585i-PTO	GsTsAsTsTsTsCsTsTsGsAsTsCsTsTsCsCsG	18	39
As1585a-PTO	TsGsTsAsGsTsCsTsGsTsAsTsTsTsCsTsTsG	18	34
As1585b-PTO	TsGsTsTsGsTsAsGsTsCsTsGsTsAsTsTsTsC	18	34
ON-705-Cy3	Cy3-cscsuscsususascscsuscsasgsususascsa	18	44
Ms1-GAPmer	auuusTsCsAsGsTsTsTsTsCsTsCsGsccau	20	25
Ms2-GAPmer	uucusCsAsTsTsTsTsCsCsGsTsGsAsuuuu	20	25
TM6-4 (2`OMe)	(tcgtgt) ₄	24	50

Tabelle 2.8.2: Verwendete modifizierte Oligonukleotide

2.8.3 siRNAs

Die verwendeten siRNAs wurden als Einzelstränge von der Firma Biomers (Ulm) oder IBA (Göttingen) bezogen.

ms1-siRNA:	as-ms1:	5`-auuuucaguuuucucgccau-3`
	s-ms1:	5`-auggcgagaaaacugaaaau-3`
ms2-siRNA:	as-ms2:	5`-uucucauuuuccgugauuuu-3`
	s-ms2:	5`-aaaaucacggaaaaugagaa-3`
si-scr3:	s-scr3:	5`-cggacgcacuggucugaccggTT-3`
	as-scr3:	5`-ccggucagaccagugcguccgTT-3`
Cy3-siLam:	s-Lam :	5`-Cy3-cuggacuuccagaagaacaTT-3`
	as-Lam:	5`-uguucuucuggaaguccagTT-3`

2.9 Plasmide

psPT19-Sat-s	Vogelsang, Bachelorarbeit (2006)
pCRII-Sat-as	Vogelsang, Bachelorarbeit (2006)
pCRII-ß-Aktin-as	Vogelsang, Bachelorarbeit (2006)
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
ms-sense-pcDNA3.1(+)	siehe Abschnitt 3.1.2.8
ms-as-pcDNA3.1(+)	siehe Abschnitt 3.1.2.8
pEGFP-N1	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
pGEM-Teasy	Promega, Madison, WI, USA
pGEMT-74bp-ms	siehe Abschnitt 3.1.2.9

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Nukleinsäure-Analytik

3.1.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren basiert auf deren Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Messung der Absorption erfolgte am NanoDrop (PeqLab, ND-1000). Für die Berechnung der Konzentration von doppelsträngiger DNA (dsDNA) wurde die Relation $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ µg/ml}$, für einzelsträngige DNA (ssDNA) $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 33 \text{ µg/ml}$ bzw. für einzelsträngige RNA (ssRNA) $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 40 \text{ µg/ml}$ zugrundegelegt.

3.1.1.2 Analytische native Agarose-Gelelektrophorese

Entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 0,7–3 % (w/v) hergestellt und mit jeweils 0,0004 % (v/v) Ethidiumbromid zur optischen Darstellung der DNA versetzt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE und als Probenauftragspuffer wurde ein 6x DNA-Probenpuffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern (Biorad) bei 80–120 V für 30–60 min. Zur Größenbestimmung wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt (GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder, Fermentas). Die DNA wurde über UV-Licht visualisiert.

3.1.1.3 Präparative native Agarose-Gelelektrophorese

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten einer spezifischen Größe wurde der PCR- oder Restriktions-Ansatz auf ein 2–3 %iges (w/v) Agarosegel (siehe Abschnitt 3.1.1.2) aufgetragen und bei 80–100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Unter Verwendung von UV-Licht wurde die DNA visualisiert, ausgeschnitten und anschließend mittels Wizard[®] SV Gel and PCR Cleanup System laut Herstellerangaben isoliert. Im Anschluss wurde die Konzentration und die Integrität des Fragments durch analytische native Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

3.1.1.4 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Um RNA unabhängig von Sekundärstrukturen und somit entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet, die 0,2 M Formaldehyd enthielten. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Die Proben wurden mit Ethidiumbromid-haltigem 2x RNA-Probenpuffer vermischt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Elektrophorese in horizontalen Gelkammern (Biorad) bei 4 – 5 V pro cm Laufstrecke des Gels. Als Größenstandard wurde eine RiboRuler[™] RNA High Range Ladder (Fermentas) verwendet. Durch UV-Licht wurde die RNA visualisiert und auf ihre Integrität hin überprüft.

3.1.1.5 Northern Blot

Der Northern Blot (Alwine et al., 1977, 1979) dient der Analyse der Länge, Orientierung und Abundanz der untersuchten RNA. Dafür wurde isolierte RNA (6-15 µg) in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Nach Visualisierung der RNA-Integrität mittels UV-Licht, erfolgte der Vakuumtransfer (VacuGene XL, VacuGene Pump; GE-Healthcare) auf eine Nylon-Membran (Hybond N, GE Healthcare). Dafür wurde das Gel zum Entfernen des überschüssigen Formaldehyds 10 min im Wasserbad äquilibriert. Die Membran wurde durch 5 minütige Inkubation im Wasserbad aktiviert. Im Anschluss wurde der Northern Blot aufgebaut und ein Vakuum von 85 mbar angelegt. Danach wurde das Agarosegel für jeweils 10 min mit alkalischer Lösung bzw. mit Neutralisationslösung überschichtet, um dann für 4 – 6 h mit 20 x SSC inkubiert zu werden. Nach dem Transfer wurde die Membran für 3 min bei 312 nm (UV-Tisch, Phase) und 2 min bei 254 nm (UV-Tisch, Phase) quervernetzt. Zur Prähybridisierung wurde die Membran in Hybridisierungsröhrchen (Biometra) überführt und mit vorgewärmter Prähybrdisierungslösung bei 42 °C für 2 h unter Rotation inkubiert (Hybridisierungsofen, Heraeus). Als Sonden dienten radioaktiv markierte Oligonukleotide (siehe Abschnitt 3.1.1.16), die mit 1,2x 10⁵ CPM/ml in den auf 42 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffer gegeben wurden. Die Hybridisierung erfolgte durch Rotation bei 42 °C über Nacht. Nach entfernen der Sonde wurde die Membran gewaschen. Das Waschprotokoll wurde der jeweiligen Sonde spezifisch angepasst. Die Bedingungen sind in Tabelle 3.1.1 dargestellt.
Sonde	Waschbedingungen	
ms forward	1 x 3 min, RT, 50 ml 4 x SSC+0,1 % SDS (w/v)	
IIIS-IOI Wald	3 x 5 min, 42 °C, 50 ml 2 x SSC + 0,1 % SDS (w/v)	
me_reverse	1 x 3 min, RT, 50 ml 4 x SSC + 0,1 % SDS (w/v)	
1113-1676136	3 x 5 min, 42 °C, 50 ml 0,1 x SSC + 0,1 % SDS (w/v)	
75K2 rovoroo	1 x 3 min, RT, 50 ml 4 x SSC + 0,1 % SDS (w/v)	
7 SRZ-IEVEISE	3 x 5 min, 42 °C, 50 ml 2 x SSC + 0,1 % SDS (w/v)	

Tabelle 3.1.1: Waschbedingungen im Northern Blot

Nach dem Waschen wurde die Membran in Folie eingeschweißt und auf einer Phospholmager Platte (GE-Healthcare) exponiert. Die Analyse der Hybridisierungssignale erfolgte mittels Autoradiografie am Phospholmager (GE-Healthcare). Im Anschluss wurde die Stärke der Hybridisierungssignale mittels des Programms ImageQuant 5.2 (GE-Healthcare) ausgewertet. Zur Normalisierung wurde das Hybridisierungssignal der 7SK-RNA der jeweiligen Probe herangezogen.

3.1.1.6 DotBlot-Analyse

Die Untersuchung der Spezifität und Sensitivität der im Northern Blot verwendeten Sonden ms-*forward* und ms-*reverse* erfolgte mittels DotBlot-Analyse. Dafür wurden die durch *in vitro*-Transkription erzeugten *major satellite repeat*-Transkripte (*sense* und *antisense*) in unterschiedlichen Kopienzahlen (10¹¹–10⁷) eingesetzt. Die in vitro Transkripte wurden mit 2 x RNA Gelladepuffer versetzt, für 10 min bei 70 °C denaturiert und im Anschluss auf eine Nylon-Membran (Hybond N, GE Healthcare) aufgetragen, getrocknet und 3 min bei 312 nm (UV-Tisch, Phase) quervernetzt. Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgte wie in Abschnitt 3.1.1.5 beschrieben. Zur Entfernung überschüssiger Sondenmoleküle wurden die Membranen wie in Tabelle 3.1.1 gezeigt, gewaschen und im Anschluss für 24 h auf einer Phospholmager Platte exponiert (GE-Healtcare). Die Analyse erfolgte mittels Autoradiografie am Phospholmager (GE-Healtcare) durchgeführt.

3.1.1.7 Analytische native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Darstellung doppelsträngiger siRNAs wurden 15 %-ige native Polyacrylamidgele mit einer Größe von 110 x 120 x 1 mm verwendet. Die PAA-Lösung wurde mit 1 x TBE-Puffer angesetzt und durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED und 1 % (v/v) APS (10 %) zum Polymerisieren gebracht. Die Elektrophorese erfolgte in einem vertikalen PAA-Gelsystem (Whatman/Biometra) mit 1 x TBE als Laufpuffer. Nach einem 30-minütigen Gelvorlauf bei 4 °C wurden die Proben, die im Verhältnis 1 : 2 mit Ficoll-Auftragspuffer versetzt waren, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei maximal 4 W und 4 °C. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit Stains-all-Färbelösung visualisiert.

3.1.1.8 Analytische denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität einzelsträngiger Oligonukleotide wie Phosphorothioate oder DNA-Primer wurden 15 %-ige denaturierende Polyacrylamidgele (PAA) verwendet. Dazu wurde die PAA-Lösung mit 8 M Harnstoff und 1 x TBE-Puffer angesetzt. Die Proben wurden 1:2 mit Formamid gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Sowohl der Gelvorlauf als auch der Gellauf fanden bei 50 °C, mit 1 x TBE als Laufpuffer, in einem vertikalen PAA-Gelelektrophoresesystem (Whatman/Biometra) statt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit Stains-all-Färbelösung visualisiert.

3.1.1.9 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen erfolgte unter Verwendung von Qiazol-Reagent (Qiagen) nach Herstellerangaben. Der RNA-enthaltende Überstand wurde zusätzlich zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert und im Anschluss, wie im Herstellerprotokoll angegeben, gefällt. Die aufgereinigte RNA wurde in RNasefreiem Wasser gelöst und bei –80 °C gelagert.

3.1.1.10 DNase Behandlung von RNA-Extrakten

Die isolierte Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von Turbo[™] DNase (Ambion) nach Herstellerangaben inkubiert, durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und anschließend mittels Ethanol (EtOH) präzipitiert (siehe Abschnitt 3.1.1.13 & 3.1.1.14).

3.1.1.11 RNase Behandlung von RNA-Extrakten

Der Abbau von RNA erfolgte durch Inkubation mit RNase A/T1-Mix (2 mg/ml RNase A; 5000 U/ml RNase T1; Fermentas) in 1 x RNase-Puffer für 30 min bei 37 °C. Im Anschluss wurden die Proben Phenol/Chloroform extrahiert und mittels EtOH gefällt (siehe Abschnitt 3.1.1.13 & 3.1.1.14).

3.1.1.12 Alkalische RNA-Hydrolyse

Die Hydrolyse von RNA wurde in einem Carbonatpuffer (Na₂CO₃ /NaHCO₃ = 7:3; v/v; pH 10,5) durchgeführt. Dafür wurden 3 μ I der Nukleinsäurelösung mit 3 μ I des Puffers gemischt und 15 min bei 90 °C inkubiert.

3.1.1.13 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Nukleinsäuren aus Lösungen zu isolieren oder nach einer enzymatischen Reaktion weiter aufzureinigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Zur Reinigung von DNA wurde eine gepufferte Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1; v/v; Roth) mit einem pH-Wert von 7,5 – 8,0 verwendet. Die Aufarbeitung der RNA erfolgte mit einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (125:24:1; v/v; Fluka), die einen pH-Wert von 4,8 aufwies. Die zu extrahierende Lösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, 5 min geschüttelt und anschließend 20 min bei 4 °C und 20.000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit einem Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1; v/v) versetzt. Nachdem die Proben erneut 5 min geschüttelt wurden, erfolgte die Phase wurde abgenommen und die darin enthaltenen Nukleinsäuren wurden mittels EtOH (siehe Abschnitt 3.1.1.14) präzipitiert.

3.1.1.14 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren wurde eine Fällung durchgeführt. Dabei wurden DNA-Proben mit 1/10 Volumen an Natriumacetat (3 M; pH 5,2) versetzt und nach Zugabe des 2,5-fachem Volumen an EtOH (absolut, reinst) gemischt. Die Fällung von RNA erfolgte unter Verwendung von 3 M Natriumacetat (pH 4,8). Nach Durchmischung der Proben wurden diese Übernacht bei –20 °C inkubiert und durch Zentrifugation (30 min, 4 °C und 20.000 x g) die Nukleinsäuren pelletiert. Im Anschluss daran wurden die Präzipitate mit 75 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser gelöst.

3.1.1.15 Hybridisierung von siRNA

Die Hybridisierung von siRNA-Einzelsträngen fand unter äquimolaren Verhältnissen in siRNA-Hybridisierungspuffer statt. Dafür wurde der Ansatz 5 min bei 95 °C denaturiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Mittels nativer Polyacrylamid-Gelelktrophorese (siehe Abschnitt 3.1.1.7) wurde die Vollständigkeit der Hybridisierung überprüft.

3.1.1.16 Radioaktive 5`-Endmarkierung von Oligonukleotiden

Mittels T4-Polynukleotidkinase (Fermentas) konnten synthetische Oligonukleotide am 5`Ende phosphoryliert werden. Der Kinasierungsansatz wurde, wie in Tabelle 3.1.2 aufgeführt, in einem Volumen von 20 µl hergestellt.

rabono ernizi randolerangeaneatiz	
Komponente	Eingesetzte Stoffmengen
Oligonukleotid	16 pmol
[γ ³² P]ATP (5000 Ci/mmol)	16 pmol
10 x PNK Puffer A	1 x
T4 Polynukleotidkinase (10000 U/µl)	10 U

Tabelle 3.1.2: Kinasierungsansatz

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 70 °C denaturiert. Überschüssiges ATP wurde durch Gelfiltration (siehe Abschnitt 3.1.1.17) abgetrennt. Die Gesamtaktivität eines Aliquots wurde anschließend in 3 ml Szintillationscocktail im Szintillationszähler bestimmt. Des Weiteren wurde die Kinasierungseffizienz mittels Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung, siehe Abschnitt 3.1.1.18) analysiert.

3.1.1.17 Abtrennung freier Nukleotide mittels G₅₀-Gelfiltration

Um überschüssige Nukleotide abzutrennen, wurden die Proben nach der Kinasierungsreaktion auf eine mit 3 ml Millipore H₂O äquilibrierte G₅₀-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) vollständig aufgetragen. Im Anschluss wurde die Probe einmal mit 400 μ l H₂O gewaschen und daraufhin mit 400 μ l H₂O eluiert.

3.1.1.18 Bestimmung der Kinasierungseffizienz mittels Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung)

Ausgehend von der Tatsache, dass freie Nukelotide durch TCA-Fällung von kinasierten Oligonukleotiden abgetrennt werden können, wurde die Kinasierungseffizienz der radioaktiv markierten Oligonukleotide mittels TCA-Fällung bestimmt (Sambrook & Russel, 2001).

Nach Abschluss der Kinasierungsreaktion wurden 2 µl des Ansatzes abgenommen und durch Zugabe von Wasser auf ein Volumen von 40 µl gebracht (entspricht der Verdünnung nach Gelfiltration). Anschließend wurden 11 µl dieser Verdünnung entnommen und mit 209 µl Lachsspermien DNA (1g/l) aufgefüllt. Aus diesem Ansatz wurden jeweils 2 Aliquots (je 10 µl) direkt in 3 ml Szintillationscoktail überführt und als Gesamtaktivität gemessen. Des Weiteren wurden 2 Aliquots (je 90 µl) mit jeweils 1,5 ml eiskalter 10 %iger TCA aufgefüllt und 10 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden GF 50 Glasfaser Rundfilter (Schleicher & Schuell; \emptyset 25 mm) mit 1 ml, 10 %-iger TCA, äquilibriert. Die gefällten Ansätze wurden vollständig auf die Filter aufgebracht und mittels Unterdruck, erzeugt durch eine Peristaltikpumpe, durchgesaugt. Die Filter wurden je zweimal mit eiskalter 10 %-iger TCA und Ethanol (absolut, reinst) gewaschen, getrocknet, mit 3 ml Szintillationslösung überschichtet und im Szintillationszähler gemessen. Parallel wurde die Aktivität eines leeren Filters als Hintergrund bestimmt und von den gemessenen Werten abgezogen. Die Effizienz der Reaktion wurde durch die Formel 3.1.1 bestimmt.

Formel 3.1.1: Bestimmung der Kinasierungseffizienz in Prozent.

Darüber hinaus wurde die spezifische Aktivität der markierten Oligonukleotide mittels der Formel 3.1.2 berechnet.



Formel 3.1.2: Bestimmung der spezifischen Aktivität (CPM/µg). % KE: Anteil der eingebauten Aktivität; VF: Verdünnungsfaktor; RV: Reaktionsvolumen

3.1.1.19 In Vitro-Transkription

Die Herstellung von sense- bzw. antisense major satellite-in vitro-Transkripten erfolgte unter Verwendung des T7 Transkriptions Kit der Firma Fermentas. Dafür wurde der Vektor pCR-sat-as (erzeugt sense in vitro-Transkript) mittels Spe I (Fermentas) bzw. psPT19-sat-s (erzeugt antisense in vitro-Transktipt) durch Eco RV linearisiert. Die in vitro-Transkription erfolgte nach Herstellerangaben, wobei jeweils 1 µg des linearisierten Plasmids eingesetzt wurden. Nach der Reaktion wurden die Integrität der erzeugten *in vitro*-Transkripte sowohl direkt, als auch nach RNase A/T1- bzw. Turbo[™] Dnase-Behandlung (siehe Abschnitt 3.1.1.11 bzw. 3.1.1.10) auf einem nativen Agarosegel überprüft. Der Hauptanteil der *in vitro*-Transkripte wurde mit Turbo[™] DNase wie in Abschnitt 3.1.1.10 beschrieben behandelt. Anschließend wurden die freien Nukleotide durch Gelfiltration abgetrennt (siehe Abschnitt 3.1.1.17). Nach Phenol/Chloroform Extraktion (siehe Abschnitt 3.1.1.13) wurden die *in vitro*-Transkripte wurde bestimmt und abschließend wurde deren Länge in einem 5 %-igen denaturierenden PAA-Gel überprüft (siehe Abschnitt 3.1.1.8).

3.1.1.20 cDNA-Synthese oder Reverse Transkription

Mittels RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) wurde isolierte Gesamt-RNA (100-500 ng), unter Verwendung von *random hexamer*-Primern nach Herstellerangaben, in cDNA umgeschrieben (20 µl Ansatz) und anschließend mit dem 7,5-fachen Volumen an Wasser verdünnt und bei –80 °C gelagert.

3.1.1.21 Quantitative-PCR (qPCR)

Die Analyse der *major satellite repeat*-Transkripte wurde mittels qPCR im GeneAmp[®]5700 (Applied Biosystems) unter Verwendung des qPCR[™] Core kit for SYBR[®]Green 1 (Eurogentec) durchgeführt.

Die Reaktion wurde in 96-Loch-Platten in einem Gesamtvolumen von 25 μ l angesetzt, wobei 5 μ l cDNA (siehe Abschnitt 3.1.1.20) als Template eingesetzt wurden. In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 3.1.3) ist die Zusammensetzung eines Reaktionsmixes (20 μ l) für das *major satellite repeat*- (74 bp) und β -Aktin-Amplikon (139 bp), welches zur Normalisierung und Kontrolle des Einflusses verschiedener Behandlungen diente, dargestellt.

Komponente	Endkonzentration für <i>major</i> satellite repeat-Amplikon (ms- forward, ms-reverse Primerpaar)	Endkonzentration für β-Aktin- Amplikon (mBeta-Actin 885F, mBeta-Actin 1024R Primerpaar)
10 x Reaktionspuffer	1 x	1 x
50 mM Mg₂Cl	1,5 mM	3,5 mM
5 mM dNTP-Mix	200 µM pro Nukleotid	200 µM pro Nukleotid
forward Primer	150 nM	300 nM
reverse Primer	150 nM	300 nM
HotGoldStar (5 U/µI)	0,025 U/µI	0,025 U/µl
SYBR [®] Green (1:200 in DMSO)	0,75 x	0,75 x

Tabelle 3.1.3: qPCR-Ansatz zur Untersuchung der major satellite repeat- und ß-Aktin-Expression.

Die PCR-Reaktion erfolgte im oben angegebenen Gerät unter Verwendung folgender Parameter:

- Aktivierung des Enzyms: 10 min bei 95 °C
- 40 Zyklen: 15 sec bei 95 °C; 1 min bei 60 °C

Im Anschluss folgte die Auswertung der Daten mittels SDS 2.1 Software (Applied Biosystems). Die Bestimmung der relativen *major satellite repeat*-Expression erfolgte anhand der Formel 3.1.3, wobei davon ausgegangen wurde, dass die Amplifikation der exponentiellen Funktion 2ⁿ (n: Zyklenzahl) folgt.

Del maior estallite repeat Expression -	240-Ct major satellite repeat
Rei. <i>major satellite repeat</i> Expression	240-Ct β-Aktin

Formel 3.1.3: Bestimmung der relativen *major satellite repeat*-Expression. Ct: Thresholdcycle (Zyklenzahl, bei dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt).

Die Effizienz der qPCR-Amplifikation von *major satellite repeat*-DNA und β -Aktin-DNA wurde durch Einsetzen von 10² bis 10⁷ Kopien der Plasmide pGEMT-74bp-ms (*major satellite repeat*, siehe Abschnitt 3.1.2.9) und pCRII- β -Aktin-as (β -Aktin, siehe Abschnitt 2.9) in der qPCR ermittelt (siehe Tabelle 3.1.3). Nach der qPCR wurden die gemessenen Ct-Werte über die logarithmisch transformierten Kopienzahlen aufgetragen und die Geradengleichungen für *major satellite repeat* mit y = -3,246x + 38,66 (n=2) und β -Aktin: y = -3,13x + 38,04 (n=2) ermittelt. Ausgehend davon konnte die Effizienz der qPCR-Amplifikation durch einsetzen in die Formel 3.1.4 mit 103 % für die *major satellite repeat*-DNA und 108 % für die β -Aktin-DNA berechnet werden.

Effizienz (%) = 10-1/Steigung -1

Formel 3.1.4: Bestimmung der Amplifikationseffizienz. Steigung: gibt die Steigung der durch Amplifikation einer Standardreihe erhaltenen linearen Ausgleichsgeraden an. Durch Einsetzen der Ct-Werte, die für die cDNA-Proben gemessen wurden, kann für

major satellite repeat-Transkripte ebenfalls die Anzahl der Sequenzeinheiten bestimmt werden.

Konventionelle PCR 3.1.1.22

Die konventionelle PCR wurde unter Verwendung der Tag-Polymerase und des Thermopol-Puffers der Firma NEB durchgeführt. Es wurden 5 µl cDNA (3.1.1.20) oder Plasmid-DNA als Template in einem 25 µl Gesamtansatz verwendet. Entsprechend der Herstellerangaben setzt sich ein PCR-Ansatz wie in Tabelle 3.1.4 aufgeführt zusammen.

Tabelle 3.1.4: Ansatz einer konventionellen PCR			
Komponente	Endkonzentration in 25 µl		
10 x Thermopol Puffer	1 x		
dNTP Mix (10 mM)	200 nM		
Primer (10 µM)	300 nM		
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,2 U/µI		

Tabelle 3.1 4.	Ansatz oinor	konventionellen	PCR
Tapelle 3.1.4:	Ansatz einer	Konventionellen	PUR

Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

- 2 min 94 °C
- 30 Zyklen: 30 sec bei 94 °C; 30 sec bei 50 °C; 1 min bei 72 °C

3.1.2 **Mikrobiologische Methoden**

3.1.2.1 Herstellung elektrokompetenter E.coli-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde 1 Liter LB-Medium mit einer Übernachtkultur des entsprechenden Bakterienstammes angeimpft und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 bei 37 °C geschüttelt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde pelletiert und zweimal mit Wasser (500 ml) gewaschen. Im Anschluss wurde die pelletierten Bakterien in 40 ml 10 %-igem Glyzerin aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurde in 1 ml 10 %-igen Glyzerin resuspendiert, in 100 µl Aliguots in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.2.2 Elektroporation von Bakterien

Zum Einbringen von Plasmiden in Bakterienzellen wurden 40 µl elektrokompetente JM109-Zellen oder Top10-Zellen mit 10–100 ng Plasmid bei 4 °C gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit 2 mm Elektrodenabstand (Molecular BioProducts) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Ohm, 25 µFa und 2,5 kV für ca. 5 ms am Gene Amp II der Firma Biorad. Im Anschluss wurden die Zellen zügig mit 960 µl LB-Medium verdünnt und 30 min bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agarplatten, die mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum versetzt waren, ausgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Kolonienzahl am Folgetag bestimmt.

3.1.2.3 Glyzerinkulturen von Bakterien

Zur Lagerung von Bakterienstämmen über einen längeren Zeitraum, wurden Glyzerinkulturen angelegt. Dafür wurden 500 μ l der Bakterienlösung (OD_{600 nm} = 0,6) mit 500 μ l einer 87 %-igen sterilen Glyzerinlösung gemischt und bei –80 °C gelagert.

3.1.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

Abhängig von der benötigten Quantität an Plasmid-DNA wurde diese entweder mittels Gene Elute[™] Plasmid Miniprep Kit (Sigma) oder Qiagen[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des jeweiligen Herstellers isoliert.

3.1.2.5 Restriktionsanalyse von Plasmiden

Zur Restriktionsanalyse wurden 1 µg Plasmid-DNA mit dem geeigneten Restriktionsenzym nach Herstellerangaben inkubiert und durch native Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 3.1.1.2).

3.1.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (Fermentas) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die ligierten Fragmente wurden nach Fällung mittels Elektroporation in *E.coli* transformiert (siehe Abschnitt 3.1.2.2).

3.1.2.7 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR sollte die Insertion und die Orientierung von DNA-Fragmenten in den jeweiligen Plasmid-Vektor überprüft werden. Dafür wurde ein Reaktionsansatz von 25 µl unter Verwendung der Taq DNA Polymerase und des Thermopol-Puffers der Firma NEB wie in Tabelle 3.1.4 gezeigt angesetzt.

Komponente	Endkonzentration in 25 µl		
10 x Reaktionspuffer	1 x		
10 mM dNTP-Mix	200 µM		
ms-forward Primer	300 nM		
ms-reverse Primer	300 nM		
T7-Primer	300 nM		
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,2 U/µl		

In einem Ansatz wurde entweder die Primerkombination ms-*forward* Primer und T7-Primer oder ms-*reverse* Primer und T7-Primer gewählt. Nachdem der Reaktionsansatz vorgelegt war, wurden einzelne Kolonien gepickt und in den Ansatz getaucht. Die PCR-Reaktion wurde unter den nachstehenden Bedingungen durchgeführt:

- Aufschluss der Zellen: 5 min 95 °C
- 35 Zyklen: 40 sec bei 95 °C; 40 sec bei 60 °C; 1 min bei 72 °C

Die gewonnenen Fragmente wurden mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 3.1.1.2).

3.1.2.8 Klonierung von ms-sense-pcDNA3.1(+) und ms-as-pcDNA3.1(+)

Zur Überexpression von sense- bzw. antisense major satellite repeat-Transkripten wurde die major satellite repeat-DNA Sequenz sowohl in sense- als auch in antisense-Orientierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert. Das major satellite repeat-DNA Fragment wurde durch Restriktionsverdau mit BstX1 aus dem psPT19-sat-s Plasmid präpariert und mittels Gelextraktion aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.1.1.3). Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen) wurde durch Restriktionsverdau mit BstX1 linearisiert, mittels alkalischer Phosphatase (Roche) dephosphoryliert, durch Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt und im Anschluss mit EtOH präzipitiert (siehe Abschnitt 3.1.1.13, 3.1.1.14). Die Ligation (siehe Abschnitt 3.1.2.6) des major satellite repeat-DNA Fragments und des pcDNA3.1(+) Vektors erfolgte in einem molaren Verhältnis von 1:3. Das Ligationsprodukt wurde im Anschluss in elektrokompetente JM109-Zellen durch Elektroporation transformiert (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Die Transformationsansätze wurden auf ampicillinhaltigen Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Mittels Kolonie-PCR (siehe Abschnitt 3.1.2.7) wurde die Orientierung der inserierten *major satellite repeat*-DNA Fragmente überprüft. Jeweils ein Klon pro Orientierung wurde in ampicillinhaltigem Flüssigmedium angezogen und deren Plasmide isoliert (siehe Abschnitte 3.1.2.4). Die Sequenz der Plasmide ms*sense*-pcDNA3.1(+) als auch ms-as-pcDNA3.1(+) wurde durch Sequenzierung (MWG, München) bestimmt.

3.1.2.9 Klonierung von pGEMT-74bp-ms

Das in der qPCR erzeugte 74 bp *major satellite repeat*-DNA Fragment (siehe Abschnitt 3.1.1.21) wurde mittels Wizard[®] SV Gel and PCR Cleanup System (Promega) aus einem präparativen Agarosegel aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.1.1.3). Im Anschluss wurde das 74 bp *major satellite repeat*-DNA Fragment in den pGEM[®]-T Vektor, unter Verwendung des pGEM[®]-T Vector Systems (Promega), kloniert (pGEMT-74bp-ms). Der Vektor pGEMT-74bp-ms wurde durch Elektroporation in elektrokompetente JM109-Zellen eingebracht (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Die Transformationsansätze wurden auf ampicillinhaltigen Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Positive Klone wurden in ampicillinhaltigem Flüssigmedium angezogen und deren Plasmide wurden isoliert (siehe Abschnitt 3.1.2.4). Nach Restriktionsanalyse (siehe Abschnitt 3.1.2.5) wurde die Sequenz von pGEMT-74bp-ms durch Sequenzierung (MWG, München) bestimmt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Als Zellkulturmodell diente die Zelllinie NIH3T3 vom Typ *swiss mouse embryo*. Diese adhärent wachsenden Zellen wurden im Inkubator (Forma Scientific) bei konstant 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Passagieren erfolgte im subkonfluenten Zustand (60 – 80 % Konfluenz) der Kultur. Nach 20 Passagen wurde ein neues Zellaliquot (Kryokultur) verwendet. Mit Hilfe eines PCR-basierten Nachweises (VenorGEM, Mínerva Biolabs) wurden die Zellen regelmäßig auf Mycoplasmen-kontaminationen hin untersucht.

3.2.2 Kryokonservierung

Zum Einlagern von Zellen wurden diese während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und in einem Medium, bestehend aus 20 % FKS und 10 % DMSO in einer Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Jeweils 1 ml Aliquots wurden in spezielle Kryoröhrchen (Greiner) überführt und in einem Isopropanol-Bad mit einer Temperaturabnahme von ca. 1 °C/min auf –80 °C gekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.2.3 Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmung

Mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau (Sigma-Aldrich) kann in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl und Vitalität der zu untersuchenden Zellen, wie vom Hersteller angegeben, bestimmt werden. Der Farbstoff kann nur durch geschädigte Membranen permeieren und färbt somit tote Zellen an, welche im Durchlichtmikroskop blau erscheinen. Die Vitalität der Zellen wurde unter Verwendung der angegebenen Formel (3.2.1) berechnet.

Formel 3.2.1: Zellzahl und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau.

3.2.4 Transfektion von NIH3T3-Zellen

NIH3T3-Zellen wurden am Vortag ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60 – 80 % aufwiesen. Die Transfektion mit Lipofectamin[™]2000 (Invitrogen) erfolgte nach Herstellerangaben. Hierfür wurde das Transfektionsreagenz mit OptiMEM-Medium (Invitrogen) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz mit einem Volumen der ebenfalls in OptiMEM-Medium verdünnten Nukleinsäuren gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transfektion von kurzen Oligonukleotiden und siRNA lag die Endkonzentration von Lipofectamin[™]2000 bei 5 µg/ml, wobei der Transfektionsmix direkt zu den einmal mit OptiMEM-Medium gewaschenen NIH3T3-Zellen gegeben wurde. Bei Transfektion von Plasmiden lag die Endkonzentration des Transfektionsreagenz bei 10 µg/ml. Nach einmaligem Waschen der NIH3T3-Zellen mit OptiMEM erfolgte die Zugabe des Transfektionsgemisches, dass zuvor zu gleichen Teilen mit Vollmedium gemischt worden war. Unabhängig von der zu transfizierenden Nukleinsäure wurden NIH3T3-Zellen im

Anschluss 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde der Transfektionsansatz durch Vollmedium ersetzt und die NIH3T3-Zellen wurden für die in den Experimenten notwendigen Zeiträume weiterkultiviert.

3.2.5 Hitzeschockbehandlung von NIH3T3-Zellen

Zur Induktion von Hitzeschock wurden NIH3T3-Zellen 1 h bei 42 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Wasserdampfatmosphäre im Inkubator (Forma Scientific) in Vollmedium inkubiert.

3.2.6 Synchronisierung von NIH3T3-Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus

Um NIH3T3-Zellen in der G1/G0-Phase des Zellzyklus zu arretieren, wurden diese nach Aussaat in Vollmedium und Übernachtkultur unter Standardbedingungen am Folgetag einmal mit PBS (37 °C) gewaschen und anschließend in DMEM + 0,4 % FKS für 48 h bis 72 h inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 3.2.7.1) konnte der Anteil an Zellen in der G1/G0-Phase bestimmt werden.

3.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS steht für *fluorescence activated cell sorting*. Bei dieser Form der Durchflusszytometrie wird die relative Fluoreszenz einzelner Zellen einer Zellsuspension gemessen. Die Zellen werden dabei durch eine Durchflussküvette gesogen und bewegen sich einzeln durch einen fokussierten Laserstrahl. Die Homogenität der zu messenden Zellpopulation wird mittels der Intensitäten von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht jeder Zelle analysiert. Dabei weisen tote Zellen oder zelluläre Bestandteile eine geringere Streulichtintensität auf, während Zellaggregate hohe Intensitäten an Vorwärts- und Seitenstreulicht zeigen. Mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur[™] (BD Biosciences) können die Fluoreszenzsignale mittels 4 verschiedener Bandpassfilter analysiert werden. (siehe Tabelle 3.2.1).

Tabelle 3.2.1: Bandpassfilter im FACSCalibur™

Bandpassfilter	Wellenlängen detektiert	
FL1	500-560 nm	
FL2	543-627 nm	
FL3	> 650 nm	
FL4	645-676 nm	

3.2.7.1 FACS-gestützte Zellzyklusanalyse

Zur Analyse des Zellzyklus wurden NIH3T3-Zellen trypsiniert und anschließend in 10 % (v/v) FKS in PBS (4 °C) resuspendiert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle weiteren Schritte bei 4 °C oder auf Eis. Nach dem Pelletieren der Zellen (4000 rpm; 1 min) wurden diese einmal mit 1 ml PBS gewaschen und erneut bei 4000 rpm, 1 min sedimentiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert und mit 500 µl einer 2 % Paraformaldehydlösung (w/v) in PBS für 10 min (alle 3 min geschüttelt) aemischt. Die fixierten NIH3T3-Zellen wurden für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und in 500 µl Permeabilisierungslösung (siehe Abschnitt 2.7) aufgenommen und 5 min inkubiert. Nach 5-minütiger Sedimentation bei 1000 x g wurden die Zellen in 500 - 800 µl Propidiumiodid-haltiger Färbelösung (siehe Abschnitt 2.7) aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Analyse des DNA-Gehalts erfolgte durch den Farbstoff Propidiumiodid im FACSCalibur[™] (BD Biosciences) unter Verwendung der Software CellQuest[™]Pro (Version 4.0.2, BD Bioscience). Es wurden jeweils 15.000 Zellen pro vermessen. Die Zellpopulation wurde mit Hilfe des Vorwärtsund Probe Seitwärtsstreulicht auf ihre Integrität hin überprüft. Im Anschluss wurde sowohl die Fläche als auch die Weite des Fluoreszenzsignals im Bandpassfilter FL2 gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von WinMDI 2.8 (WinMDI Version 2.8; Copyright[©] 1993-1998 Joseph Trotter). Zur Diskriminierung zusammenhaftender Zellen (Dubletten) wurde die Fluoreszenzweite über die Fluoreszenzfläche der Zellen in einem Punkt-Diagramm (DotBlot) Diagram aufgetragen. Mittels eines Akguisitionsfensters (Gate) wurden die Zellen ausgeschlossen, die eine höhere Fluoreszenzweite aufwiesen. Dies wurde für alle untersuchten Proben durchgeführt. Die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen wurde als Fläche des Fluoreszenzsignals in einem Histogramm dargestellt. Die Bestimmung der einzelnen Zellzyklusphasen erfolgte durch Überlagerung mehrerer Proben in diesem Modus und wurde im Anschluss für alle untersuchten Proben des Experiments verwendet. Der Anteil der Zellen pro Zellzyklusphase wurde als Prozentsatz der im Aquisitionsfenster detektierbaren Zellen bestimmt.

3.2.8 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von chemisch modifizierten Oligonukleotiden wurde Cy3-ON-705, für siRNA wurde Cy3-siLam, verwendet. Die Aussaat von NIH3T3-Zellen erfolgte am Vortag in Vollmedium und die sich anschließende Transfektion wurde,

wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, durchgeführt. Sofort nach der Transfektion wurden die Zellen dreimal mit OptiMEM und einmal mit PBS gewaschen, trypsiniert und anschließend in 1 ml 10 % FKS (v/v) resuspendiert. Nach dem Pelletieren (1 min, 1500 x g, 4 °C) wurden die Zellen dreimal mit PBS (4 °C) gewaschen und in einer 1 %-igen Paraformaldehydlösung für 10 min auf Eis fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 min bei 1000 x g und 4 °C sedimentiert, um daraufhin in 500 µl PBS (4 °C) resuspendiert zu werden. Die Analyse erfolgte im FACSCalibur[™] (BD Biosciences) mittels CellQuest[™]Pro (Version 4.0.2; BD Biosciences). Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen gemessen. Die Fluoreszenzhöhe wurde mittels FL2 detektiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels WinMDI 2.8 (WinMDI Version 2.8; Copyright[©] 1993-1998 Joseph Trotter). Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von Plasmiden wurde der für das enhanced green fluorescent protein kodierende Vektor pEGFP-N1 (BD Biosciences) verwendet. Dafür wurden NIH3T3-Zellen ausgesät und am darauf folgenden Tag, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, transfiziert. Nach Transfektionsende wurden die Zellen 24 h regeneriert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert, in 10 % FKS (v/v) in PBS resuspendiert und pelletiert (4000 rpm, 1 min, 4 °C). Dem einmaligen Waschen mit PBS (4 °C) folgte die Aufnahme der Zellen in 500 µl PBS (4 °C). Die Anzahl der fluoreszierenden NIH3T3-Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (HBO 100) der Firma Zeiss in Bezug zur nicht fluoreszierenden Gesamtzellzahl bestimmt.

3.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Bestimmung der Transfektionseffizenz von pEGFP-N1-transfizierten NIH3T3 erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (HBO 100) der Firma Zeiss. Die darin enthaltenen Standardfiltersätze sind in Tabelle 3.2.2 zusammengefasst. Die Anzahl der transfizierten Zellen wurde unter Verwendung des 38HE-Filters mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

Filtername	Anregungsfilter (nm)	Strahlenleiter (nm)	Emissionsfilter (nm)
49:DAPI/Hoechst (blau)	G 365	FT 395	BP 445/50
38HE: eGFP/FITC (grün)	BP 470/40	FT 495	BP 525/50
43HE: Cy3 (rot)	BP 550/25	FT 570	BP 605/70

Tabelle 3.2.2: Filtersätze des Axiovert 200M (HBO 100)

BP: Bandpassfilter; FT: Strahlenfilter

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, *major satellite repeat*-Transkripte unter Verwendung spezifischer Nukleinsäurewirkstoffe strukturell und funktionell zu charakterisieren.

Dafür wurden im ersten Teil der Arbeit Nachweissysteme, basierend auf der Northern Blot-Analyse und der RT-qPCR etabliert, die eine Expressionsanalyse von *major satellite repeat*-Transkripten ermöglichten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Nukleinsäurewirkstoffe entwickelt, die spezifisch gegen *major satellite repeat*-Transkripte gerichtet sind. Deren Wirksamkeit wurde mittels der Northern Blot-Analyse und der RT-qPCR untersucht.

Basierend auf den entwickelten Nukleinsäurewirkstoffen wurden im dritten Teil dieser Arbeit erste Analysen zur biologischen Funktion von *major satellite repeat*-Transkripten durchgeführt. Darüber hinaus wurde überprüft, ob durch Überexpression von *major satellite repeat*-Transkripten eine biologische Funktion ableitbar ist.

4.1 Charakterisierung von *major satellite repeat*-Transkripten in NIH3T3-Zellen

In der Literatur ist die Expression von *major satellite repeat*-Transkripten nur wenig beschrieben (Gaubatz & Cutler, 1990; Rudert *et al.*, 1995; Lu & Gilbert, 2007). Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse wurden Nachweissysteme aufgebaut, um *major satellite repeat*-Transkripte strukturell und funktionell zu charakterisieren. In murinen embryonalen Fibroblasten konnten *major satellite repeat*-Transkripte durch semiquantitative-PCR nachgewiesen werden (Martens *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die undifferenzierte embryonale Fibroblastenzellinie NIH3T3 für die Untersuchungen verwendet.

4.1.1 Untersuchung von *major satellite repeat*-Transkripten mittels Northern Blot-Analyse

Aus *in situ*-Hybridsierungsexperimenten ging hervor, dass *major satellite repeat*-Transkripte nicht nur als *sense*- sondern auch als *antisense*-Transkripte vorliegen (Rudert *et al.*, 1995). Basierend auf der Northern Blot-Analyse erfolgte die Beschreibung von *major satellite repeat*-Transkripten jedoch unabhängig von ihrer Orientierung (Gaubatz & Cutler, 1990; Rudert *et al.*, 1995). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit unter

Ergebnisse

Verwendung der Northern Blot-Analyse ein strangspezifischer Nachweis von major *repeat*-Transkripten entwickelt. Aufgrund der satellite geringen Stärke der Hybridisierungssignale (Vogelsang, Bachelorarbeit, 2006) und Hybridisierungssignalen mit dem RNA-Größenstandard und ribosomalen RNAs (Vogelsang, Bachelorarbeit, 2006; Gaubatz & Cutler, 1990; Rudert et al., 1995) erwies sich die Verwendung von längeren RNA- und cDNA-Sonden als unzureichend. Aufgrund dieses Wissens wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals die radioaktiv markierten 24 nt langen Oligonukleotide msforward und ms-reverse als Sonden in der Northern Blot-Analyse eingesetzt (siehe Abschnitt 2.8.1). Dabei ist ms-forward komplementär zum antisense- und ms-reverse komplementär zum sense- Strang von major satellite repeat-Transkripten.

4.1.1.1 Strangspezifische Hybridisierung von *sense*- und *antisense major satellite repeat*-Transkripten

Der Nachweis von *sense-* und *antisense major satellite repeat*-Transkripten machte es erforderlich, zuerst die Strangsspezifität der radioaktiv markierten Oligonukleotide ms*forward* und ms-*reverse*, die als Sonden in der Northern Blot-Analyse verwendet werden, zu überprüfen. Die Analyse erfolgte unter Verwendung von jeweils 10¹⁰ Kopien an *sense-* bzw. *antisense major satellite repeat-in vitro*-Transkripten im DotBlot. Zur Hybridisierung wurden die Sonden mit einer spezifischen Aktivität von 1-4 x 10⁸ CPM/µg Oligonukleotid eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1.1 dargestellt.



Abbildung 4.1.1: Spezifischer Nachweis von sense- und antisense major satellite repeat-Transkripten in der DotBlot-Analyse. Es wurden jeweils 10¹⁰ Kopien des sense- bzw. antisense-in vitro-Transkripts (*iv*T) auf die Membran aufgetragen. Die Membranen wurden mit 1,2 x 10⁵ CPM/ml der jeweiligen Sonde inkubiert, gewaschen und 24 h exponiert (siehe Abschnitt 3.1.1.6). Das sense-*iv*T wurde mit der ms-*reverse*-Sonde, dass antisense-*iv*T mit der ms-*forward*-Sonde nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiografie. Die Spezifität wurde anhand von Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics) bestimmt.

Die Auswertung der DotBlot-Analyse zeigte, dass sowohl ms-forward als auch msreverse spezifisch an ihr komplementäres *major satellite repeat-in vitro*-Transkript binden. Die Spezifität der Sonden liegt nach quantitativer Auswertung der Hybridisierungssignale bei 99 %. Somit war eine strangspezifische Analyse von *major satellite repeat*-Transkripten möglich.

4.1.1.2 major satellite repeat-Transkripte in NIH3T3-Zellen

Aus der DotBlot-Analyse ging hervor, dass sense- und antisense major satellite repeat-Transkripte unter Verwendung von ms-reverse bzw. ms-forward spezifisch detektiert werden können. In Folge dessen sollte die major satellite repeat-Expression in NIH3T3-Zellen mittels Northern Blot-Analyse untersucht werden. Dafür wurde die Gesamt-RNA aus unbehandelten, exponentiell wachsenden NIH3T3-Zellen isoliert. Untersuchungen von Cohen et al. zeigten, dass in NIH3T3-Zellen ein großer Anteil an extrachromosomaler zirkulärer major satellite repeat-DNA vorliegt (Cohen et al., 2006). Aus diesem Grund wurde die isolierte Gesamt-RNA zusätzlich mit RNase A/T1 bzw. Turbo[™] DNase (Ambion) behandelt, um mögliche DNA-Kontaminationen auszuschließen und ein reines RNA-Signal zu detektieren. Anschließend wurden sowohl die unbehandelten als auch die RNase A/T1- und die Turbo[™] DNase-behandelten RNA-Proben mittels Northern Blot-Analyse unter Verwendung der strangspezifischen Sonden überprüft. Durch die Methylenblau-Färbung der Northern Blot-Membran wurde einerseits die Quantität der eingesetzten RNA und andererseits die Effizienz des RNase A/T1-Behandlung überprüft. Als Hybridisierungskontrolle wurde die abundant exprimierte 7SK-RNA in der Northern Blot-Analyse nachgewiesen (Wassarman & Steitz, 1991; Chen et al., 2004). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1.2. dargestellt.



Abb.4.1.2: Analyse von major satellite repeat-Transkripten im Northern Blot. Es wurde Gesamt-RNA aus exponentiell wachsenden NIH3T3-Zellen präpariert (siehe Abschnitt 3.1.1.9). Aufgetragen sind: 15 µg unbehandelte Gesamt-RNA, 15 µg Turbo[™] DNase-behandelte RNA (siehe Abschnitt 3.1.1.10) und ein Volumenequivalent (bezogen auf Turbo[™] DNase-behandelte RNA) an RNase A/T1-behandelter RNA (siehe Abschnitt 3.1.1.11). Die Proben wurden wie in Abschnitt 3.1.1.4 & 3.1.1.5 elektrophoretisch beschrieben, aufgetrennt, geblottet und mit 1,2 x 10⁵ CPM/ml der jeweiligen Sonde hybridisiert und nach 48 h Exposition mittels Autoradiografie ausgewertet (siehe Abschnitt 3.1.1.5). Parallel ist die mittels Methylenblau gefärbte Hybond-N Membran dargestellt, um die verschiedenen Behandlungen zu überprüfen. Als Größenmarker wurde eine High Range RNA-Leiter (Fermentas) mitgeführt.

Die eingesetzte Gesamt-RNA wurde mittels Methylenblau-Färbung der Northern Blot-Membran auf ihre Integrität und Quantität hin überprüft. Wie in Abbildung 4.1.2 ersichtlich hatte die Behandlung mit Turbo[™]DNase keinen Einfluss auf die Integrität der eingesetzten RNA. Weiterhin wurde die mit Turbo[™]DNase behandelte RNA in gleicher Quantität wie die unbehandelte RNA eingesetzt. Die Behandlung der RNA mit RNase A/T1 führte zu deren vollständigen Abbau.

In der Northern Blot-Analyse können Hybridisierungssignale für die *sense*- und *antisense*-Orientierung von *major satellite repeat*-Transkripten in allen drei RNA-Präparationen dargestellt werden. Es fällt auf, dass keine einheitlichen Längen, sondern verschiedene Spezies an *major satellite repeat*-Transkripten vorliegen, die in einem Größenbereich von < 0,2 kb bis > 6 kb nachweisbar sind.

In der unbehandelten RNA-Probe können die stärksten Hybridisierungssignale sowohl für sense- als auch antisense major satelltite repeat-Transkripte detektiert werden. Nach Behandlung der RNA-Proben mit RNase A/T1 bzw. Turbo[™] DNase ist das Hybridisierungssignal, unabhängig von der Transkriptorientierung, schwächer. Im Hinblick auf die Größenverteilung können jedoch Unterschiede in den jeweiligen RNA-Proben nachgewiesen werden. Die unbehandelte RNA-Probe weist, unabhängig von der

Transkriptorientierung, Hybridisierungssignale in einem Größenbereich von < 0,2 kb bis > 6 kb auf. Im Vergleich dazu können in der Turbo[™] DNase-behandelten RNA-Probe Transkriptlängen von 1 kb bis > 6 kb in *sense*- bzw. 4 kb bis > 6 kb in *antisense*-Orientierung nachgewiesen werden. Die mittels RNase A/T1-behandelte RNA-Probe weist, unabhängig von der Transkriptorientierung, Hybridisierungssignale in einem Größenbereich von < 0,2 kb bis 2 kb auf. Dies ist auf DNA-Kontaminationen zurückzuführen. Unter Verwendung der alkalischen Hydrolyse, zum Abbau der RNA, konnte diese DNA-Kontamination bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass eine DNase-Behandlung der NIH3T3-RNA notwendig ist, um ein eindeutiges RNA-Signal für *major satellite repeat*-Transkripte darzustellen.

Mittels der in Abbildung 4.1.2 dargestellte Northern Blot-Analyse, können sowohl sense- als auch antisense major satellite repeat-Transkripte in NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden. Somit ist eine qualitative Aussage über die Größe und die Orientierung von major satellite repeat-Transkripten in NIH3T3-Zellen möglich.

4.1.2 Untersuchung von *major satellite repeat*-Transkripten mittels RT-qPCR

Die Northern Blot-Analyse zeigte, dass *sense*- und *antisense major satellite repeat*-Transkripte in NIH3T3-Zellen exprimiert werden und somit eine qualitative Beurteilung der *major satellite repeat*-Expression möglich ist. Zur quantitativen Untersuchung der *major satellite repeat*-Expression wurde die RT-qPCR angewendet. Dafür wurde das Primerpaar ms-*forward* und ms-*reverse* benutzt (siehe Abschnitt 2.8.1), dass schon in der Northern Blot-Analyse zum strangspezifischen Nachweis von *major satellite repeat*-Transkripten angewendet wurde. Die Bindungsstellen des Primerpaares sind in Abbildung 4.1.3 A schematisch dargestellt. Aufgrund der repetitiven Natur von *major satellite repeat*-Sequenzen können mittels dieses Primerpaares Fragmente verschiedener Länge in der konventionellen PCR-Reaktion amplifiziert werden. Sie weisen eine Größe auf, die sich um jeweils 234 bp unterscheidet, wobei das kleinste Fragment eine Länge von 74 bp hat (siehe Abbildung 4.1.3 B). Für die quantitative Analyse der *major satellite repeat*-Expression ist der Nachweis eines definierten Fragments notwendig. Deshalb sollten zuerst die Reaktionsbedingungen der RT-qPCR optimiert werden.



Abbildung 4.1.3: PCR-Amplifikation der *major satellite repeat*-cDNA mittels ms-forward und msreverse Primern. A) Schematische Darstellung der repetitiven *major satellite repeat*-Sequenz und der Bindungsstellen der verwendeten Primer (ms-forward und ms-reverse). Die Länge der amplifizierten *major satellite repeat*-Fragmente ist angegeben. B) Analyse von *major satellite repeat*-Fragmenten nach konventioneller PCR (siehe Abschnitt 3.1.1.22), unter Verwendung des Primerpaars ms-forward und msreverse, in einem 1 %-igen Agarosegel. Als Größenstandard wurde eine 1 kb Leiter (Invitrogen) verwendet.

4.1.2.1 Spezifischer Nachweis von *major satellite repeat*-Transkripten mittels RT-qPCR

In Abbildung 4.1.3 B ist das Ergebnis einer RT-PCR Amplifikation von *major satellite repeat*-Transkripten repräsentativ dargestellt. Als Hauptprodukte sind DNA-Fragmente mit einer Länge von 74 bp, 308 bp und 542 bp nachzuweisen. Um eine gesicherte quantitative Aussage über die *major satellite repeat*-Expression zu ermöglichen, mussten die RT-qPCR Bedingungen so optimiert werden, dass ausschließlich ein Fragment mit definierter Länge amplifiziert wurde. Dies gelang durch die Optimierung der MgCl₂-Konzentration, wie in Abbildung 4.1.4 A & B dargestellt.



Abbildung 4.1.4 A & B: Optimierung der qPCR Bedingungen zum Nachweis von major satellite repeat -Transkripten. RNA wurde aus unbehandelten NIH3T3-Zellen istoliert, mit Turbo[™]DNase behandelte und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde unter Verwendung verschiedener MgCl₂-Konzentration und der Primer ms-forward und ms-reverse die qPCR durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine Wasserprobe (NTC: *Non Template Control*) mitgeführt. Die Analyse der *major satellite repeat*-qPCR-Produkte erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel. Als Größenstandard wurde eine 1 kb Plus Leiter von Invitrogen verwendet.

Wie aus Abbildung 4.1.4 A & B hervorgeht, konnte in den cDNA-Proben unter Verwendung von 1,5 mM MgCl2 ein 74 bp langes *major satellite repeat*-PCR-Fragment amplifiziert werden. Die mitgeführte NTC-Kontrolle (Non Template Control; Wasser) wies kein PCR-Fragment auf, ebenso wie die NonRT-Kontrolle (RNA-Probe, die nicht in cDNA umgeschrieben wurde; Daten nicht gezeigt).

Die Sequenz, des mit 1,5 mM MgCl₂ amplifizierten 74 bp großen *major satellite repeat*-Fragments, wurden nach Klonierung in den pGEM[®]-T Vektor durch Sequenzierung verifiziert. Der Vergleich der Sequenzen (pGEMT-74bp-ms, zwei Klone) mit der *major satellite repeat*-Referenzsequenz von Hörz & Altenburger ergab eine Komplementarität von 97 % (Hörz & Altenburger, 1981).

Durch die Optimierung der MgCl₂-Konzentration konnte das Ziel eines fragment- und sequenzspezifischen Nachweises von *major satellite repeat*-Transkripten in der qPCR ermöglicht werden.

4.1.2.2 Sensitivität des qPCR Nachweises von major satellite repeat-Transkripten

Durch die Optimierung der qPCR Bedingungen können *major satellite repeat*-Transkripte sequenzspezifisch nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.1.2.1). Im Weiteren wurden die Sensitivität und Effizienz des qPCR Nachweises überprüft. Dafür wurde eine Standardplasmidreihe des pGEMT-74bp-ms-Plasmids in einer Kopienzahl von 10² bis 10⁷ in die optimierte qPCR eingesetzt. In Abbildung 4.1.5 ist der Zusammenhang zwischen dem in der qPCR gemessenen Ct-Werten und der in die Reaktion eingesetzten Kopienzahl des Standardplasmids pGEMT-74bp-ms dargestellt.



Abbildung 4.1.5: Sensitivität der mittels qPCR nachweisbaren *major satellite repeat*-Amplifikation. Halblogarithmische Darstellung der Ct-Werte in Bezug auf die eingesetzte Kopienzahl des Standardplasmids pGEMT-74bp-ms ($10^2 - 10^7$ Kopien; siehe Abschnitt 2.9). Die lineare Regression ergab eine Geradengleichung von: y = -3,246 x + 38,66 mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99 (Dreifachbestimmung: MW, n=2).

Die halblogarithmische Darstellung (Abbildung 4.1.5) der in der qPCR ermittelten Ct-Werte bezogen auf die Kopienzahl des eingesetzten Standardplasmids pGEMT-74bp-ms ergab nach linearer Regression eine Geradengleichung von: y = -3,246 x + 38,66. Mit Hilfe dieser Geradengleichung kann eine Effizienz der *major satellite repeat*-Amplifikation von 100 % in der qPCR bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.1.1.22). Dies entspricht einer exponentiellen Anreicherung mit der Funktion 2ⁿ (n= Zyklenzahl der PCR). Als Nachweisgrenze für die qPCR errechnet sich ein Wert von 100 Kopien der 74 bp langen *major satellite repeat*-Sequenzeinheit (diese werden im Folgenden als msrSE bezeichnet). Da die *major satellite repeat*-Transkripte unterschiedliche Größen aufweisen (siehe Abschnitt: 4.1.2), spiegelt der so ermittelte Wert die Menge an msrSE wieder.

Neben der quantitativen Bestimmung der msrSE kann auch die relative *major satellite repeat*-Expression, unabhängig von einer Standardplasmidreihe, bestimmt werden. Dazu wurden die Ct-Werte für *major satellite repeat*- und β -Aktin-Amplifikation in den cDNA-Proben mittels qPCR gemessen. Im Anschluss wird die Amplifikatmenge beider, wie in Abschnitt 3.1.1.21 beschrieben, bestimmt. Der Quotient aus *major satellite repeat*- und β -Aktin-Amplifikatmenge gibt die relative Expression von *major satellite repeat*-Transkripten an. Die Bestimmung der β -Aktin-Expression in den cDNA Proben ermöglichte gleichzeitig die Überprüfung des Einflusses chemischer und physikalischer Behandlungen auf NIH3T3-Zelle.

4.1.2.3 Bestimmung der msrSE in unbehandelten NIH3T3-Zellen

Durch Verwendung einer Standardplasmidreihe kann die Menge der msrSE in NIH3T3-Zellen bestimmt werden. Zur Bestimmung der Anzahl der msrSE in unbehandelten NIH3T3-Zellen wurden Zellen verwendet die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellzahl wurde bestimmt und die *major satellite repeat*-Expression (sowohl *sense* als auch *antisense major satellite repeat*-Transkripte) wurde mittels RT-qPCR gemessen. Bezogen auf die Zellzahl ergab sich für unbehandelte NIH3T3-Zellen ein Wert von $6 \times 10^2 \pm 2,6 \times 10^2$ msrSE/Zelle. Im Hinblick auf die Quantität der RNA konnte ein Wert von $4,1 \times 10^4 \pm 7,7 \times 10^3$ msrSE/ng RNA für unbehandelte NIH3T3-Zellen berechnet werden. Aus dem Quotient der *major satellite repeat*-und der β-Aktin-Expression errechnete sich ein Wert von $0,060 \pm 0,004$ für die relative *major satellite repeat*-Expression in unbehandelten NIH3T3-Zellen. Die angegebenen Werten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (n=2).

4.1.3 Induktion von sense major satellite repeat-Transkripten nach Hitzeschock

Aus dem humanen System ist bekannt, dass sat III-RNAs nach Hitzeschock zeitabhängig induziert werden (Rizzi *et al.*, 2004; Valgardsdottir *et al.*, 2005). Deshalb wurde überprüft, ob die *major satellite repeat*-Expression ebenfalls durch Hitzeschock stimulierbar ist. Dafür wurden NIH3T3-Zellen, wie in Abschnitt 3.2.5 näher ausgeführt, eine Stunde bei 42 °C inkubiert, anschließend bei 37 °C regeneriert und zu verschiedenen Zeitpunkten aufgeschlossen. Die RNA wurde isoliert und anschließend mit Turbo[™] DNase behandelt. Neben der Northern Blot-Analyse erfolgte die Bestimmung der relativen *major satellite repeat*-Expression in der RT-qPCR (sowohl *sense*- als auch *antisense*-Strang von *major satellite repeat*-Transkripten). Die Daten sind in Abbildung 4.1.6 zusammengefasst.



Abbildung 4.1.6: Zeitabhängige Induktion von *major satellite repeat*-Transkripten durch Hitzeschock. NIH3T3-Zellen wurden für 1 h bei 42 °C inkubiert und im Anschluss bei 37 °C regeneriert. Die Zellen wurden zu den in den Darstellungen angegebenen Zeitpunkten aufgeschlossen. Die RNA wurde isoliert und mit Turbo[™] DNase behandelt. A) Northern Blot-Analyse: Jeweils 6 µg Turbo[™] DNase behandelte RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit 1,2 x 10⁵ CPM/ml der jeweiligen spezifischen Sonde (siehe Abb.: 4.1.1) hybridisiert und nach 48 h Exposition mittels Autoradiografie ausgewertet. Als Größenmarker wurde eine *High Range* RNA Leiter (Fermentas) mitgeführt. B) Dargestellt ist die relative *major satellite repeat*-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessene *major satellite repeat*- und β-Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung; MW ± Stabw, n=1), K: entspricht der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h bei 37 °C.

Anhand der Northern Blot-Analyse (Abbildung 4.1.6 A) wird deutlich, dass *sense major satellite repeat*-Transkripte zeitabhängig induziert werden, während der *antisense* Strang keine ersichtliche Veränderung in der Abundanz aufweist. Der größte Signalunterschied ist 2-3 h nach Hitzeschock zu beobachten. Nach diesem Zeitpunkt fällt das Signal wieder ab, um nach 24 h für beide Orientierungen wieder leicht anzusteigen.

Dabei liegen, wie in unbehandelten Zellen, RNA-Spezies mit Längen von 1 kb bis > 6 kb für das *sense* Transkript und 24 h nach Hitzeschock für das *antisense* Transkript vor.

Diese Daten werden durch die Ergebnisse der RT-qPCR unterstützt. Dort können ebenfalls nach 2-3 h die größten Werte der relativen *major satellite repeat*-Expression gemessen werden. Im Vergleich zur Kontrolle (37 °C) kommt es 2 h nach Hitzeschockbehandlung zu einer vierfache Induktion der relativen *major satellite repeat*-Expression.

Somit ist die Expression von *sense major satellite repeat*-Transkripten durch Hitzeschock transient induzierbar.

4.1.4 Zwischenfazit

In dieser Arbeit konnten erstmals sense- und antisense major satellite repeat-Transkripte in der Northern Blot-Analyse nachgewiesen werden. Sense major satellite repeat-Transkripte weisen eine Größe zwischen 1 kb und > 6 kb sowohl unter normalen Zellkulturbedingungen als auch Hitzeschockbedingungen auf. Antisense major satellite repeat-Transkripte sind unter normalen Zellkulturbedingugen mit einer Länge von 4 kb bis > 6 kb detektierbar und können 24 h nach Hitzeschock mit einer Größe von 1 kb bis > 6 kb nachgewiesen werden.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass *sense major satellite repeat*-Transkripte nach Hitzeschock transient induziert werden. Dies korreliert mit den Daten der RT-qPCR.

Die Northern Blot-Analyse ermöglicht eine qualitative Aussage über die Größe und Orientierung von *major satellite repeat*-Transkripten. Unter Verwendung der RT-qPCR kann die Gesamt-*major satellite repeat*-Expression quantitativ ermittelt werden. Dabei werden sowohl *sense*- als auch *antisense major satellite repeat*-Transkripte nachgewiesen. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde die *major satellite repeat*-Expression mit Hilfe der RT-qPCR bestimmt und die Ergebnisse mittels Northern Blot-Analyse verifiziert.

4.2 Entwicklung von oligomeren Nukleinsäurewirkstoffen zur Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten

Antisense-Oligonukleotide (AS-ON) und small interfering-RNAs (siRNAs) sind potente Wirkstoffe zur Supression von mRNAs und anderen RNAs (Vickers et al., 2003; Grünweller et al., 2003; Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003; Miyagishi et al., 2003; Bilanges & Stokoe, 2005). Die Konzeption wirksamer Oligonukleotide ist nicht nur von der Sequenz sondern vor allem von der Struktur der Ziel-RNA abhängig gegen welche diese gerichtet sind (Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003; Overhoff et al., 2005; Schubert et al., 2005; Brown et al., 2005; Kurreck, 2006). Neben experimentellen Verfahren gibt es theoretische, computergestützte Ansätze zur Analyse von RNA-Sekundärstrukturen, auf deren Basis biologisch aktive AS-ON und siRNAs entwickelt werden (Kretschmer-Kazemi Far et al., 2001; Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003; Overhoff et al., 2005; Schubert et al., 2005). Ausgehend davon sollte die Sekundärstruktur von major satellite repeat-Transkripten analysiert, zugängliche Bereiche identifiziert und daraus oligomere Sequenzen zur Suppression der Transkripte abgeleitet werden. Die sowohl als AS-ON (Phosphorothioat und Gapmer) als auch siRNA synthetisierten Oligonukleotide sollten im Anschluss auf ihre biologische Wirksamkeit gegenüber major satellite repeat-Transkripten überprüft werden.

4.2.1 Computergestützte Strukturanalyse von *major satellite repeat*-Transkripten

Durch die computergestützte Analyse der Sekundärstruktur von RNAs können potente Oligonukleotide zur Suppression dieser RNAs entwickelt werden (Kretschmer-Kazemi Far *et al.*, 2005; Bo *et al.*, 2006; Westerhout & Berkhout, 2007; Shao *et al.*, 2007). Mit Hilfe dieser Analyse wurde die Sekundärstruktur von *major satellite repeat*-Transkripten untersucht. Die Strukturvorhersage für *sense* und *antisense major satellite repeat*-Transkripte wurde mittels des Computerprogramms mfold2.3 (Zuker, 1989; Mathews, *et al.*, 1999) durchgeführt. Dabei wurde eine exemplarische Sequenzlänge von 4 Repeateinheiten angenommen. Die Struktur wurde in Fenstergrößen von 600 nt bestimmt, wobei diese mit einer Schrittweite von 100 nt auf der RNA verschoben wurden. Für jede Fenstergröße wurden die fünf energieärmsten RNA-Strukturen berechnet und die Häufigkeit ungepaarter Sequenzbereiche mit einer Länge von > 10 nt in allen Strukturen

Ergebnisse

Strukturvorhersagen konserviert waren, wurden als zugänglich definiert (Patzel *et al.*, 1999). In Abbildung 4.2.1 A sind die zugänglichen Bereiche im Kontext von vier konsekutiven *major satellite repeat*-Einheiten dargestellt. Anhand der zugänglichen Bereiche wurden für *antisense major satellite repeat*-Transkripte ein und *sense major satellite repeat*-Transkripte zwei Zielsequenzen ausgewählt. Aus den Zielsequenzen wurden komplementäre Oligonukleotide mit einer Länge von 20 nt abgeleitet. Dabei wurden die gegen den *sense* Strang von *major satellite repeat*-Transkripten gerichteten Oligonukleotide als ms1 und ms2 und das gegen den *antisense* Strang gerichtete Oligonukleotid, als ms3 bezeichnet (ms: *major satellite repeat*). In Abbildung 4.2.1 B sind die Sekundärstrukturen der Zielsequenzen und die dazu komplementären Oligonukleotide ms1, ms2 und ms3 dargestellt.



sense major satellite repeat-Transkript

antisense major satellite repeat-Transkript

Abbildung 4.2.1: Position und Struktur offener Bereiche in *major satellite repeat*-Transkripten. A) Lokalisation der offenen Bereiche bezogen auf vier konsekutive sense bzw. antisense major satellite repeat-Transkripteinheiten B) Bindungsstellen der komplementären Oligonukleotide ms1, ms2 und ms3, dargestellt in der energieärmsten Struktur von sense bzw. antisense major satellite repeat-Transkripten, die mit mfold2.3 bestimmt wurde (ms: *major satellite repeat*).

4.2.2 Biologische Aktivität der gegen *major satellite repeat*-Transkripte gerichteten Oligonukleotide

Aus der computergestützen Analyse der Sekundärstruktur von major satellite repeat-Transkripten konnten für das antisense-Transkript ein (ms3) und für das sense-Transkript zwei (ms1 und ms2) komplementäre Oligonukleotide abgeleitet werden (siehe Abschnitt 4.2.1). Im Weiteren wurde überprüft, ob diese Oligonukleotide geeignet sind, major satellite repeat-Transkripte zu supprimieren. Dafür wurden diese mit verschiedenen chemischen Modifikationen synthetisiert. Einerseits wurden die Oligonukleotide als chemisch modifizierte AS-ON dargestellt, die einen RNA Abbau durch RNase H induzieren (Furdon et al., 1989; Monia et al., 1993). Andererseits wurden sie als siRNAs synthetisiert, um eine RNAi-abhängige Degradation zu überprüfen (Elbashir et al., 2001b). Die AS-ON wurden als Phosphorothioat-modifizierte Desoxyribonukleinsäuren (PTO) und als Gapmer, bei denen die vier endständigen Nukleotide als 2'-OMethyl-modifizierte Ribonukleinsäuren und die inneren Basen als Phosphorothioat-modifizierte Desoxyribonukleinsäuren vorlagen, dargestellt (siehe Abschnitt 2.8.2). Im Weiteren wurden die siRNAs als komplementäre RNA-Doppelstränge eingesetzt (siehe Abschnitt 2.8.3). In Tabelle 4.2.1 sind die chemischen Modifikationen angegeben, in denen die Oligonukleotide ms1, ms2 und ms3 dargestellt wurden.

		Ziel-RNA		
Oligonukleotid	Chemische Modifikation	sense major satellite repeat- Transkript	<i>antisense major satellite repeat</i> - Transkript	
AS-ON	PTO	ms1, ms2	ms3	
	Gapmer	ms1, ms2		
siRNA		ms1, ms2		

Tabelle 4.2.1: Chemische Modifikation der Oligonukleotide und deren Zielsequenzen.

4.2.2.1 Biologische Aktivität der PTO-modifizierten AS-ON

Ausgehend von den verschiedenen Modifikationen, in denen die Oligonukleotide dargestellt waren, wurden zuerst die PTO-modifizierten Oligonukleotide auf ihre Wirksamkeit gegenüber *major satellite repeat*-Transkripten in NIH3T3-Zellen überprüft.

4.2.2.1.1 Konzentrationsabhängige Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten durch ms1-und ms2-PTO

In ersten Experimenten wurde die biologische Aktivität der beiden, gegen sense major satellite repeat-Transkripte gerichteten, PTO-Oligonukleotide ms1-PTO und ms2-PTO überprüft. Dafür wurden NIH3T3-Zellen mit 200 nM bzw. 500 nM ms1- bzw. ms2-PTO, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, transfiziert und nach 24 h Regeneration aufgeschlossen. Als Kontrollen wurden NIH3T3-Zellen mitgeführt die nur mit Lipofectamin[™]2000 (LK) behandelt wurden und Zellen die mit dem Kontroll-PTO TM6-4-PTO, dessen Sequenz keine Homologie zum Mausgenom aufweist, transfiziert wurden. Die RNA wurde extrahiert und nach Behandlung mit Turbo[™] DNase in cDNA umgeschrieben. Mittels der gPCR wurde die major satellite repeat- und β-Aktin-Expression bestimmt. Es wurden keine Unterschiede in der ß-Aktin-Expression der untersuchten Proben festgestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.2 zusammengefasst.



Abbildung 4.2.2: Konzentrationsabhängige Hemmung von *major* satellite repeat-Transkripten durch ms1- und ms2-PTO. Dargestellt ist die relative *major* satellite repeat-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessenen *major* satellite repeat- und β -Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW \pm Stabw., n=2). (LK: LipofectaminTM2000-Kontrolle)

Bei Betrachtung der relativen *major satellite repeat*-Expression zeigt sich, dass sowohl die Behandlung mit ms1- als auch ms2-PTO eine Hemmung im Vergleich zur TM6-4-PTO Kontrolle vermittelt. Dabei kann nach Transfektion von 200 nM für ms1-PTO eine Reduktion auf 40 % und von ms2-PTO auf 51 % gemessen werden. Die Erhöhung der transfizierten Konzentration auf 500 nM an ms1-PTO führt zu einer Erniedrigung auf 25 % bzw. durch ms2-PTO auf 24 % im Bezug zur Kontrolle. Die für die *relative major satellite repeat*-Expression bestimmten Werten nach Transfektion von ms1- bzw. ms2-PTO liegen über dem der in der Lipofectamin[™]2000-Kontrolle bestimmt wurde. Das basale Expressionsniveau von *major satellite repeat*-Transkripten, dass durch den Wert der

Lipofectamin[™]2000-Kontrolle dargestellt ist, wird somit nach Transfektion von ms1- bzw. ms2-PTO nicht unterschritten.

Neben der Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression durch ms1- bzw. ms2-PTO im Vergleich zu TM6-4-PTO fiel auf, dass sich die relative *major satellite repeat*-Expression durch Transfektion des Kontroll-PTOs (TM6-4-PTO, 200 nM) verglichen mit der mitgeführten Lipofectamin[™]2000-Kontrolle um das 24-fache erhöhte. Die Erhöhung der Konzentration von 200 nM auf 500 nM des transfizierten Kontrolloligonukleotids (TM6-4-PTO) führte darüber hinaus zu einer weiteren Erhöhung der rleativen *major satellite repeat*-Expression. Bei dem eingesetzten Kontroll-PTO (TM6-4-PTO) handelt es sich um ein 24 nt langes Oligonukleotid, während ms1-PTO bzw. ms2-PTO ein Länge von 20 nt aufweisen. Aufgrund dieser Daten wurde der Einfluss der Länge des verwendeten Kontroll-PTO auf die relative *major satellite repeat*-Expression überprüft.

4.2.2.1.2 Einfluss der PTO-ON Länge auf die major satellite repeat-Expression

Durch Transfektion des 24 nt langen TM6-4-PTO konnte eine konzentrationsabhängige Erhöhung der relativen *major satellite repeat*-Expression in NIH3T3-Zellen beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.2.2.1.1). Um eine geeignete Kontrolle zur Überprüfung des in Abschnitt 4.2.2.1.1 gezeigten Hemmeffekts von ms1- und ms2-PTO zu finden, wurden PTO-ON verschiedener Längen getestet. Neben der Untersuchung von TM6-4-PTO (24-mer) wurden ebenso die Oligonukleotide 1840B/20-PTO als 20-mer sowie ras2400-PTO als 18-mer verwendet. Im Weiteren wurden sowohl die mit ms1-PTO als auch ms2-PTO transfizierten und die nur mit Lipofectamin[™]2000 inkubierten NIH3T3-Zellen als Kontrolle mitgeführt. Die NIH3T3-Zellen wurden mit jeweils 200 nM der angegebenen PTO-ON transfiziert. Die RNA wurde 24 h nach Transfektion isoliert und nach Behandlung mit Turbo[™] DNase in cDNA umgeschrieben. Die Expression von *major satellite repeat*-Transkripten und β-Aktin wurde mittels qPCR bestimmt. Das β-Aktin-Expressionsniveau zeigte in allen untersuchten Proben vergleichbare Werte. Die Ergebnisse sind als relative *major satellite repeat*-Expression in Abbildung 4.2.3 dargestellt.



Abbildung 4.2.3: Einfluss der Länge von PTO-modifizierten ON auf die *major satellite repeat*-Expression. Dargestellt ist die relative *major satellite repeat*-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessene *major satellite repeat*- und β -Aktin- Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW \pm Stabw, n=2). (LK: Lipofectamin[™] 2000-Kontrolle) Es wurden jeweils 200 nM PTO-ON in die Transfektion eingesetzt.

Der Vergleich der relativen *major satellite repeat*-Expression in NIH3T3-Zellen zeigt, dass diese von der Länge der transfizierten PTO-ON Kontrolle abhängig ist. Dabei konnte nach Transfektion des 24 nt langen TM6-4-PTO eine relative *major satellite repeat*-Expression von $0,22 \pm 0,13$ bestimmt werden, während diese nach Behandlung mit dem 18 nt langen r-as2400-PTO bei $0,09 \pm 0,03$ lag. Nach Transfektion weiterer 18 nt langer PTO-ON (siehe Abschnitt 2.8.2) konnte eine, dem r-as2400-PTO vergleichbare, relative *major satellite repeat*-Expression gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu 24 nt und 18 nt langen PTO-ON konnte nach Transfektion von 1840B/20-PTO eine relative *major satellite repeat*-Expression von $0,17 \pm 0,05$ bestimmt werden, wobei auch hier der Vergleich mit anderen 20 nt langen PTO-ON diese Daten bestätigte (Daten nicht gezeigt).

Die Transfektion der 20 nt langen, gegen *sense major satellite repeat*-Transkripte gerichteten, PTO-ON ms1-PTO bzw. ms2-PTO führte im Bezug auf alle verwendeten Kontrollen zu den niedrigsten relativen *major satellite repeat*-Expressionen in NIH3T3-Zellen.

Da ms1- und ms2-PTO, mit 35 % bzw. 30 % einen geringen GC-Gehalt aufweisen, wurde ebenfalls dessen Einfluss auf die relative *major satellite repeat*-Expression überprüft. Ausgehend von den getesteten PTO-ON Kontrollen, die einen GC-Gehalt von 35-67 % aufweisen (siehe Abschnitt 2.8.2), konnte kein Einfluss auf die relative *major satellite repeat*-Expression festgestellt werden. Wie schon in Abschnitt 4.2.2.1.1 beschrieben, wird das basale Expressionsniveau von *major satellite repeat*-Transkripten, dass durch den Werte der Lipofectamin[™]2000-Kontrolle dargestellt ist, in dem hier gezeigten Experiment, nach Transfektion von ms1- bzw. ms2-PTO nicht unterschritten.

Darüber hinaus konnte ebenfalls, wie in Abschnitt 4.2.2.1.1 gezeigt, eine Erhöhung der relativen *major satellite repeat*-Expression nach Transfektion des Kontrolloligonukleotids TM6-4-PTO im Vergleich zur mitgeführten Lipofectamin[™]2000-Kontrolle nachgewiesen werden. Die Steigerung der relativen *major satellite repeat*-Expression war auch nach Transfektion von 1840B/20-PTO bzw. r-as2400-PTO messbar, fiel aber im Vergleich zu TM6-4-PTO (24-fach im Vergleich zur Lipofectamin[™]2000-Kontrolle) geringer aus (1840B/20-PTO: 17-fach; r-as2400-PTO: 9-fach im Vergleich zur Lipofectamin[™]2000-Kontrolle).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass PTO-modifizierte Kontrolloligonukleotide, die keine Zielsequenz in NIH3T3-Zellen haben, die relative *major satellite repeat*-Expression induzieren. Die Induktion ist abhängig von der Länge der transfizierten Kontroll-PTOs. Der GC-Gehalt der Kontroll-PTOs hat keinen Einfluss auf die relative *major satellite repeat*-Expression. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den weiteren Versuchen zu Charakterisierung der gegen *major satellite repeat*-Transkripte gerichteten 20-mer PTO-ON, dass 20 nt lange 1840B/20-PTO als Kontrolle verwendet.

4.2.2.1.3 Wirksamkeit von ms3-PTO in NIH3T3-Zellen

Aus der strangspezifischen Analyse von *major satellite repeat*-Transkripten ging hervor, dass diese sowohl in *sense*- als auch *antisense*-Orientierung in NIH3T3-Zellen exprimiert werden (siehe Abschnitt 4.1.1.2). Nach Überprüfung der Sekundärstruktur des *antisense*-Strangs mittels computergestützter Analyse durch mfold2.3 (Zuker, 1989; Mathews, *et al.*, 1999) wurde der für AS-ON zugänglicher Sequenzbereich ms3 identifiziert und dessen komplementäre Sequenz als PTO-ON synthetisiert. Um die Wirksamkeit von ms3-PTO zu überprüfen, wurde es in einer Konzentration von 200 nM in NIH3T3-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde 1840B/20-PTO und im Weiteren ms1-PTO verwendet. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion aufgeschlossen, die RNA wurde isoliert und mit TurboTM DNase behandelt. Nach der cDNA Synthese erfolgte die Analyse der *major satellite repeat*- und der β-Aktin-Expression mittels qPCR. Die relative *major satellite repeat*- Expression der untersuchten Proben ist in Abbildung 4.2.4 dargestellt. Für die β-Aktin Expression konnte in allen untersuchten Proben vergleichbare Werte gemessen werden.



Abbildung 4.2.4: Biologische Wirksamkeit von ms3-PTO. Dargestellt ist die relative *major satellite repeat*-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessenen *major satellite repeat*- und β -Aktin- Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW \pm Stabw, n=2). Es wurden jeweils 200 nM PTO-ON in die Transfektion eingesetzt.

Die Transfektion von ms3-PTO, dass gegen den antisense-Strang von major satellite repeat-Transkripten gerichtet ist, führt im Vergleich zur 1840B/20-PTO Kontrolle zu einer Erhöhung der relativen major satellite repeat-Expression. Im Gegensatz dazu, kann nach Behandlung mit ms1-PTO, dessen Zielsequenz auf dem sense major satellite repeat-Transkript liegt, eine 91 % Reduktion der relativen major satellite repeat-Expression im Bezug auf die 1840B/20-PTO-Kontrolle gemessen werden. Anhand dieser Ergebnisse kann die biologische Wirksamkeit von ms1-PTO bestätigt werden, während ms3-PTO keine biologische Wirksamkeit im Sinne einer Suppression der major satellite repeat-Expression zeigt.

4.2.2.1.4 Sequenzspezifität der ms1-PTO vermittelten Reduktion der Expression von *major satellite repeat*-Transkripten

Im Vergleich zur Kontrolle 1840B/20-PTO, bewirkte das gegen sense major satellite repeat-Transkripte gerichtete ms1-PTO ein starke Suppression der major satellite repeat-Expression in NIH3T3-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.2.1.2). Um zu überprüfen, ob diese Suppression sequenzspezifisch ist, wurden zwei weitere PTO-modifizierte Oligonukleotide eingesetzt. Bei diesen handelt es sich einerseits um ms1-inv-PTO und andererseits um ms1-mut-PTO. Wie aus der Bezeichnung hervorgeht, sind beide an die komplementäre Zielsequenz ms1 angelehnt. Dabei stellt ms1-inv-PTO die inverse Sequenz von ms1-PTO dar. ms1-mut-PTO unterscheidet sich von ms1-PTO in 4 nt, die so eingebracht sind, dass sie die Bindungssequenz an *sense major satellite repeat*-Transkripte unterbrechen. Beide sind in Abbildung 4.2.5 dargestellt. Um den Einfluss von ms1-inv- und ms1-mut-PTO auf die *major satellite repeat*- Expression zu überprüfen, wurden NIH3T3-Zellen mit jeweils 200 nM ms1-inv- bzw. ms1-mut-PTO transfiziert. Weiterhin wurden 1840B/20-PTO und ms1-PTO in der Analyse mitgeführt. Die Extraktion der RNA erfolgte 24 h nach Transfektion. Die Turbo[™] DNase behandelte RNA wurde mittels RT-qPCR analysiert. Die Ergebnisse sind als relative *major satellite repeat*-Expression in Abbildung 4.2.5 zusammengefasst. Das Expressionsniveau von β -Aktin zeigte in allen untersuchten Proben vergleichbare Werte.



Abbildung 4.2.5: Sequenzspezifische Reduktion von *major satellite repeat*-Transkripten. Dargestellt ist die relative *major satellite repeat*-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessenen *major satellite repeat*- und β -Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW ± Stabw, n=2). Jeweils 200 nM der angegebenen PTO-ON wurden in die Transfektion eingesetzt.

Aus den in Abbildung 4.2.5 dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass die Transfektion von NIH3T3-Zellen mit ms1-inv-PTO bzw. ms1-mut-PTO zu einer vergleichbaren relative *major satellite repeat*-Expression der Zellen führen, wie unter Verwendung von 1840B/20-PTO. Die Behandlung mit ms1-PTO führt zur Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression in Bezug auf alle verwendeten Kontrollen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die beobachtete Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO sequenzspezifisch ist und durch einen Antisense-Mechanismus vermittelt wird. Dies lässt vermuten, dass es sich um eine RNase H-vermittelte Reduktion der *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO handelt.

4.2.2.1.5 Strangspezifische Suppression von *sense major satellite repeat*-Transkripten durch ms1-PTO

Die Behandlung von NIH3T3-Zellen mit ms1-PTO führt zur sequenzspezifischen Suppression der *major satellite repeat*-Expression. Die Reduktion der *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO wurde in der RT-qPCR, unabhängig von der Transkriptorientierung, bestimmt. Um zu überprüfen, ob ms1-PTO spezifisch den *sense* Strang von *major satellite repeat*-Transkripten supprimiert, wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden NIH3T3-Zellen mit 200 nM 1840B/20-, ms1-mutbzw. ms1-PTO transfiziert und nach 24 h Regenerationszeit die RNA isoliert und mit Turbo[™] DNase behandelt. Die Northern Blot-Analyse erfolgte unter Verwendung der radioaktiv markierten Oligonukleotide ms-*reverse* und ms-*forward*, die spezifisch an den *sense*- bzw. *antisense*-Strang von *major satellite repeat*-Transkripten binden (siehe Abschnitt 4.1.1.1 & 4.1.1.2). Als Hybridisierungskontrolle wurde die 7SK-RNA nachgewiesen. Parallel wurde ein Teil der isolierten RNA in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR untersucht. Dabei wies die β-Aktin Expression unabhängig vom transfizierten PTO-ON vergleichbare Werte auf. Die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse und der RT-qPCR sind in Abbildung 4.2.6 A & B dargestellt.

Aus der in Abbildung 4.2.6 A gezeigten Northern Blot-Analyse geht hervor, dass sowohl *sense*- als auch *antisense major satellite repeat*-Transktipte nach Transfektion von 1840/20-PTO und ms1-mut-PTO nachweisbar sind. Die Transkripte weisen unabhängig von der Orientierung eine Größenverteilung von < 0,2 kb bis > 6 kb auf. Nach Transfektion von ms1-PTO kann man eine deutliche Reduktion von *sense major satellite repeat*-Transkripten beobachten.

Für die *antisense*-Orientierung können nach Transfektion von ms1-PTO *major satellite repeat*-Transkripte mit einer Größenverteilung von 1 kb bis > 6 kb nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den verwendeten Kontrollen ist das Hybridisierungssignal schwächer und weist eine geringere Größenverteilung auf.

Die Auswertung der Northern Blot-Analyse mittels ImageQuant 5.2 (GE-Healthcare, siehe Abschnitt 3.1.2.2) ergab für die *sense*-Orientierung nach Transfektion von ms1-PTO eine Reduktion der *major satellite repeat*-Expression auf 11 % im Vergleich zur ms1-mut-PTO Kontrolle. Im Vergleich zur ms1-mut-PTO Kontrolle hatte das Hybridisierungssignal für die *antisense*-Orientierung von *major satellite repeat*-Transkripten nach Transfektion von ms1-PTO eine Signalstärke von 41 %. Neben der stransgspezifischen Suppression von *sense major satellite repeat*-Transkripten durch ms1-PTO kann ebenfalls eine Reduktion von *antisense major satellite repeat*-Transkripten gemessen werden.


Abbildung 4.2.6: Spezifität der ms1-PTO vermittelten *major satellite repeat*-Transkript Hemmung. Es wurden jeweils 200 nM des jeweiligen PTO-ON in die Transfektion eingesetzt. A) Northern Blot: Jeweils 6 µg Turbo[™] DNase behandelte RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit 1,2 x 10⁵ CPM/ml der jeweiligen Sonde hybridisiert und nach 48 h Exposition mittels Autoradiografie ausgewertet. Als Hybridisierungskontrolle wurde 7SK-RNA nachgewiesen B) Dargestellt ist die relative *major satellite repeat*-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessenen *major satellite repeat*- und β-Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung, MW ± Stabw, n=1).

Mittels der RT-qPCR (Abbildung 4.2.6 B), bei der die Gesamtmenge an *major satellite repeat*-Transkripten nachgewiesen wird, kann nach Transfektion von ms1-PTO eine Reduktion der *major satellite repeat*-Expression auf 25 % im Vergleich zu ms1-mut-PTO gemessen werden. Errechnet man den Mittelwert der Reduktion von *sense*- und *antisense major satellite repeat*-Transkripten, die in der Northern Blot-Analyse ermittelt wurden, beträgt diese 28 %. Somit sind die Ergebnisse, welche Northern Blot-Analyse und RT-qPCR zur Expression von *major satellite repeat*-Transkripten ergeben, vergleichbar.

Stellt man die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse von unbehandelten NIH3T3-Zellen (siehe Abbildung: 4.1.2) denen nach Transfektion von NIH3T3-Zellen mit PTO-ON gegenüber, fällt auf, dass durch Transfektion von Kontroll-PTOs die Hybridisierungssignale für *sense*- und *antisense major satellite repeat*-Transkripte stärker werden. Die Größenverteilung der nachgewiesenen *major satellite repeat*-Transkripte unterscheidet sich ebenfalls, wobei sich eine größere Vielfalt an *major satellite repeat*-Transkriptlängen nach Transfektion der Kontroll-PTOs darstellt. Dies bestätigt die in Abschnitt 4.2.2.1.1 und 4.2.2.1.2 mittels RT-qPCR gemessene Ergebnisse, die zeigen, dass die Transfektion von Kontroll-PTOs, die keine Zielsequenz in NIH3T3 aufweisen, zur Induktion der relativen *major satellite repeat*-Expression im Vergleich zur Lipofectamin[™]2000-Kontrolle führten.

4.2.2.1.6 Bestimmung des IC₅₀ von ms1-PTO

In Abschnitt 4.2.2.1 konnte eine konzentrationsabhängige Erniedrigung der *major* satellite repeat-Expression durch ms1-PTO im Vergleich zu TM6-4-PTO gezeigt werden. Da mit ms1-mut-PTO eine Kontrolle gleicher Länge zur Verfügung stand, wurde unter Verwendung eines größeren Konzentrationsbereiches diese Abhängigkeit näher charakterisiert. Dafür wurden ms1-PTO und ms1-mut-PTO in Konzentrationen von 1 - 1000 nM in NIH3T3-Zellen transfiziert und die relative *major satellite repeat*-Expression mittels RT-qPCR analysiert. Das β -Aktin-Expressionsniveau zeigte in allen untersuchten Proben vergleichbare Werte. In Abbildung 4.2.7 A ist die konzentrationsabhängige Veränderung der relativen *major satellite repeat*-Expression dargestellt. Die auf ms1-mut-PTO bezogene prozentuale Suppression der relativen *major* satellite repeat-Expression durch ms1-PTO ist in Abbildung 4.2.7 B gezeigt.



Abbildung 4.2.7: Konzentrationsabhängige Hemmung von *major satellite repeat*-Transkripten durch ms1-PTO. A) Dargestellt ist die relative *major satellite repeat*-Expression, die sich als Quotient der in der RTqPCR gemessenen *major satellite repeat*- und β -Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW ± Stabw, n=2). B) Halblogarithmische Darstellung der prozentualen Reduktion der *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO, bezogen auf die jeweilige ms1-mut-PTO Kontrolle der gleichen Konzentration. Die Bestimmung des IC₅₀ erfolgte mittels einer 4-Parameter-Gleichung in GraFit 5.0.6 (Erithacus Software).

Ausgehend von der in Abbildung 4.2.7 A dargestellten relativen Expression von *major satellite repeat*-Transkripten kann man bis zu einer transfizierten Konzentration von 10 nM keinen Unterschied zwischen den verwendeten PTO-Oligonukleotiden beobachten. Während man eine leichte Hemmung (13 %) von *major satellite repeat*-Transkripten nach Behandlung mit 30 nM ms1-PTO bezüglich der Kontrolle nachweisen kann, verstärkt sich die Reduktion nach Transfektion von 100 nM und 300 nM (73 % bzw. 61 %) und erreicht ihren größten Wert bei 1 μ M ms1-PTO mit 78 %. Des Weiteren ist festzustellen, dass die Erhöhung der Konzentration, vor allem von ms1-mut-PTO, zu einer Erhöhung der *major satellite repeat*-Expression führt. Die Analyse des Verlaufs der Hemmung führt zu einem IC₅₀ von 48 ± 8 nM und ist in Abbildung 4.2.7 B dargestellt.

4.2.2.1.7 ms1-PTO vermittelt Suppression von hitzeschockinduzierten *sense* major satellite repeat-Transkripten

Durch Hitzeschockbehandlung werden *sense major satellite repeat*-Transkripte zeitabhängig in NIH3T3-Zellen induziert (siehe Abschnitt 4.1.3). Dabei kann die größte Veränderung 2-3 h nach Hitzeschock gemessen werden. Da mit ms1-PTO ein potentes AS-ON zur Suppression von *sense major satellite repeat*-Transkripten zur Verfügung stand, wurde überprüft, ob diese Induktion reprimiert werden kann. Dafür wurden die NIH3T3-Zellen 24 h nach Transfektion von 200 nM 1840B/20-PTO, ms1-mut-PTO bzw. ms1-PTO, 1 h bei 42 °C inkubiert und nach zweistündiger Regenerationszeit aufgearbeitet. Die RNA wurde isoliert und mit Turbo[™] DNase behandelt. Im Anschluss erfolgte die Northern Blot-Analyse unter Verwendung der radioaktiv markierten, strangspezifischen Sonden ms-*forward* und ms-*reverse*. Als Hybridisierungskontrolle wurde 7SK-RNA verwendet. Parallel dazu wurde ein Anteil der RNA in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. In Abbildung 4.2.8 A sind die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse und in Abbildung 4.2.8 B die der relativen *major satellite repeat*-Expression dargestellt, die sich aus den Daten der qPCR errechnet. Das Expressionsniveau von β-Aktin war in allen untersuchten Proben vergleichbar.



Abbildung 4.2.8: Hemmung von *major satellite repeat*-Transkripten durch ms1-PTO nach Hitzeschockbehandlung. Es wurden 200 nM des jeweiligen PTO-ON in die Transfektion eingesetzt. Nach 24 h Regeneration wurde die Zellen für 1 h bei 42 °C inkubiert und im Anschluss 2 h bei bei 37 °C regeneriert und dann aufgeschlossen. A) Northern Blot: Jeweils 6 µg Turbo[™] DNase behandelte RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit $1,2 \times 10^5$ CPM/ml der jeweiligen Sonde hybridisiert und nach 48 h Exposition mittels Autoradiografie ausgewertet. B) Dargestellt ist die relative *major satellite repeat*-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessene *major satellite repeat* und β-Aktin Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW ± Stabw, n=1).

In der Northern Blot-Analyse (siehe Abbildung: 4.2.8 A) sind sowohl *sense-* als auch *antisense major satellite repeat-*Transkripte nach Transfektion von 1840B/20-PTO und ms1-mut-PTO in Längenbereichen von < 0,2 kb bis > 6 kb nachweisbar. Nach Transfektion von ms1-PTO kommt es zur deutlichen Reduktion des Hybridisierungssignals für *sense major satellite repeat-*Transkripte, während man das *antisense-*Transkript, zwar mit geringerer Intensität als die Kontrollen, in einem Größenbereich von 1 kb bis > 6 kb nachweisen kann.

Die Auswertung der Northern Blot-Analyse mittels ImageQuant 5.2 (siehe Abschnitt 3.1.1.5) ergab, dass die Transfektion von ms1-PTO zu einer Reduktion der *sense major satellite repeat*-Transkripte um 87 % im Vergleich zur ms1-mut-PTO Kontrolle führte. Im Vergleich dazu das Signal für *antisense major satellite repeat*-Transkripte, bezogen auf

die ms1-mut-PTO Kontrolle, eine Signalstärke von 40 %. Wie schon in Abschnitt 4.2.2.1.5 beobachtet, kann auch nach zusätzlicher Hitzeschockbehandlung ein Reduktion von *antisense major satellite repeat*-Transkripten nach Transfektion von ms1-PTO gemessen werden.

Mittels der RT-qPCR (siehe Abbildung: 4.2.8 B) wurde die relative *major satellite repeat*-Expression bestimmt. Dabei konnte nach Transfektion von ms1-PTO eine Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression um 80 %, bezogen auf die ms-1mut-PTO Kontrolle, gemessen werden. Bestimmt man den Mittelwert der Hemmung von *sense* und *antisense major satellite repeat*-Transkripten, die mittels Northern Blot-Analyse detektiert wurden, errechnet sich ein Wert von 73 %. Wie schon in Abschnitt 4.2.2.1.5 beschrieben, sind die Ergebnisse aus Northern Blot-Analyse und RT-qPCR vergleichbar und liefern ähnliche Resultate.

Sense major satellite repeat-Transkripte werden transient durch Hitzeschock induziert (siehe Abschnitt 4.1.3). Aus diesem Grund wurde im Weiteren überprüft, ob diese Induktion auch nach Transfektion von PTO-ON beobachtbar ist. Dafür wurde die relative *major satellite repeat*-Expression der ms1-mut-PTO Kontrolle und der ms1-PTO Proben unter normalen Transfektions- und Hitzeschockbedingungen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.9 grafisch dargestellt.



Abbildung 4.2.9: Einfluss der Hitzeschockbehandlung auf die *major satellite repeat*-Expression nach Transfektion von PTO-ON. Dargestellt ist die relative *major satellite repeat*-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessene *major satellite repeat*- und β -Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW \pm Stabw, n=1). Es wurden jeweils 200 nM des jeweiligen PTO-ON in die Transfektin eingesetzt. (37 °C: normale Transfektionsbedingungen)

Vergleicht man die mittels RT-qPCR ermittelten Werte der Kontrolle (ms1-mut-PTO) unter normalen Transfektions- und Hitzeschockbedingungen ist eine Induktion der relativen *major satellite repeat*-Expression um das 1,2-fache messbar. Die Hitzeschockbedingung hat kaum einen zusätzlichen Einfluss auf die relative *major satellite repeat*-Expression, die wie in Abschnitt 4.2.2.1.5 gezeigt, vor allem durch die Transfektion von Kontroll-PTOs (ms1-mut-PTO, 1840B/20-PTO) induziert wird. Sowohl unter normalen

Zellkultur- als auch Hitzeschockbedingungen ist nach Transfektion von ms1-PTO eine Suppression der relativen *major satellite repeat*-Expression um 75 % bzw. 80 % messbar, was die biologische Wirksamkeit von ms1-PTO unterstreicht.

4.2.2.1.8 Transfektionseffizienz von AS-ON in NIH3T3-Zellen

Durch ms1- und ms2-PTO, die gegen *sense major satellite repeat*-Transkripte gerichtet sind, wird die relative *major satellite repeat*-Expression in NIH3T3-Zellen stark supprimiert (siehe Abschnitt 4.2.2.1.1). Im Weiteren wurde überprüft, mit welcher Effizienz PTO-ON in NIH3T3-Zellen durch Transfektion eingebracht wurden. Als Repräsentant für PTO-modifizierte Oligonukleotide wurde das Cy3-markierte ON-705 (ON-705-Cy3) verwendet (siehe Abschnitt 2.8.2). Das ON-705-Cy3 stellt eine 2'-OMe-modifizierte RNA dar, die durch Phosphothioesther verknüpft ist. NIH3T3-Zellen wurden wie in den vorhergehenden Versuchen mit 200 nM ON-705-Cy3 transfiziert und direkt im Anschluss an die Transfektion mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abschnitt 3.2.8). Neben den ON-705-Cy3 transfizierten Zellen wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.10 zusammengefasst.



Abbildung 4.2.10: Transfektionseffizienz von ON-705-Cy3 in NIH3T3 Zellen. Exemplarische Darstellung eines Histogramm-Plots bei dem die Zellzahl über der Fluoreszenzhöhe (FL2) aufgetragen ist (siehe Abschnitt 3.2.7.1). Neben den mit 200 nM ON-705-Cy3-transfizierten Zellen ist die unbehandelte Kontrolle gezeigt.

Im Vergleich zu der in schwarz dargestellten unbehandelten Kontrolle, welche die Autofluoreszenz von NIH3T3-Zellen widerspiegelt, konnte nach Transfektion des markierten Oligonukleotids ON-705-Cy3 eine deutliche Verschiebung des Fluoreszenz-Peaks, welcher die mit ON-705-Cy3 transfizierten Zellen darstellt, beobachtet werden. Der Anteil an transfizierten Zellen betrug 98,7 \pm 0,3 % (MW \pm Stabw, n=2). Diese Ergebnisse zeigen, dass PTO-modifizierte Oligonukleotide fast vollständig durch Transfektion in NIH3T3-Zellen eingebracht werden.

4.2.2.2 Biologische Aktivität von Gapmer modifizierten AS-ON

Eine aktuelle Verbesserung der ON-Chemie stellen Gapmer-modifizierte Oligonukleotide dar (Monia *et al.*, 1993; Lok *et al.*, 2002; Grünweller *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2004). Sie vermitteln, wie PTO-ON, die Spaltung der komplementären Ziel-RNA durch Induktion von RNase H (Inoue *et al.*, 1987; Shibahara *et al.*, 1987; Monia *et al.*, 1993; Crooke *et al.*, 1995). Aufgrund dessen wurden die Zielsequenzen ms1 und ms2, die gegen *sense major satellite repeat*-Transkripte gerichtet sind, als Gapmer-modifierzte ON verwendet und auf ihre biologische Aktivität in NIH3T3-Zellen hin überprüft.

4.2.2.2.1 Konzentrationsabhängiger Einfluss von ms1- Gapmer und ms2-Gapmer

Die Behandlung von NIH3T3-Zellen mit ms1- bzw. ms2-PTO, die gegen sense major satellite repeat-Transkripte gerichtet sind, führte zur Suppression der relativen major satellite repeat-Expression (siehe Abschnitt 4.2.2.1.1). Ausgehend davon wurde überprüft, ob die als Gapmer dargestellten Zielsequenzen ms1 und ms2, ebenfalls die major satellite repeat-Expression reduzieren. Dafür wurden NIH3T3-Zellen mit 200 nM bzw. 500 nM ms1-Gapmer bzw. ms2-Gapmer transfiziert. Als Kontrollen wurden NIH3T3-Zellen verwendet die mit TM6-4(2'-OMe) transfiziert oder nur mit Lipofectamin[™]2000 inkubiert wurden. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte 24 h nach Transfektion. Im Anschluss daran wurde die RNA isoliert und mit Turbo[™] DNase behandelt. Die major satellite repeat- und β-Aktin-Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert. In Abbildung 4.2.11 ist die relative major satellite repeat-Expression dargestellt. Die β-Aktin-Expression zeigte in allen untersuchten Proben vergleichbare Werte.





Abbildung 4.2.11: Biologische Wirksamkeit von ms1- und ms2-Gapmer. Dargestellt ist die relative major satellite repeat-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessenen major satellite repeat- und β -Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW \pm Stabw, n=1). (LK: Lipofectamin[™]2000-Kontrolle) Aus den Ergebnissen in Abbildung 4.2.11 geht hervor, dass die Transfektion von NIH3T3-Zellen mit 200 nM ms1- bzw. ms2-Gapmer zu einer Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression auf 70 % bzw. 90 % im Vergleich zur Kontrolle TM6-4 (2`- OMe) führte. Die Erhöhung der transfizierten Konzentration auf 500 nM zeigte keine Verstärkung der Suppression der relativen *major satellite repeat*-Expression, unabhängig davon, ob ms1-Gapmer oder ms2-Gapmer verwendet wurde. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die als Gapmer dargestellten komplementären Zielsequenzen ms1 und ms2 keine Suppression der *major satellite repeat*-Expression im Sinne der konzentrationsabhängigen Hemmung durch AS-ON zeigen.

Die Transfektion von ON-705-Cy3, als Repräsentant einer 2'-OMe-modifizierten-RNA, die durch Phosphothioesther verknüpft ist, ergab eine Transfektionseffizienz von 99 % in NIH3T3-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.2.1.8). Aufgrund der vergleichbaren chemischen Modifikation von ms1-Gapmer bzw. ms2-Gapmer und ON-705-Cy3, ist davon auszugehen, dass ms1- bzw. ms2-Gapmer ebenfalls mit dieser Effizienz transfiziert wurden. Die schwache Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression durch ms1 bzw. ms2-Gapmer ist somit unabhängig von deren Transfektionseffizienz.

Vergleicht man die Ergebnisse nach der Transfektion des 2`-OMe-modifizierten Kontroll-Oligonukleotids mit denen der Kontroll-PTOs, zeigen sich deutliche Unterschiede in der relativen *major satellite repeat*-Expression. Die relative *major satellite repeat*-Expression ist nach Transfektion von TM6-4 (2`-OMe) im Vergleich zur mitgeführten Lipofectamin[™]2000-Kontrolle dreifach höher, während nach Transfektion von ms1-mut-PTO eine 122-fachen Erhöhung des Expressionsniveaus von *major satellite repeat*-Transkripten im Vergleich zur Lipofectamin[™]2000-Kontrolle messbar ist (Daten nicht gezeigt).

Ausgehend vom Ziel dieser Arbeit biologisch wirksame Oligonukleotide zu entwickeln, die *major satellite repeat*-Transkripten supprimieren, wurden die Gapmer-modifizierten Oligonukleotide ms1-Gapmer und ms2-Gapmer, aufgrund ihrer ausbleibenden biologischen Wirksamkeit, nicht weiter untersucht.

4.2.2.3 Biologische Aktivität der gegen *major satellite repeat*-Transkripte gerichteten siRNAs

Neben AS-ON sind siRNAs potente Nukleinsäurewirkstoffe zur Degradation von komplementären Ziel-RNAs (Vickers *et al.*, 2003; Grünweller *et al.*, 2003; Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003; Miyagishi *et al.*, 2003; Bilanges & Stokoe, 2005). Dabei vermitteln siRNAs ihre Aktivität basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz, der gekennzeichnet ist durch die RISC-assoziierte Spaltung ihrer Ziel-RNA (Zamore & Haley, 2005; Rana, 2007). Aufgrund der Potenz von siRNAs wurden die Zielsequenzen ms1 und ms2, die gegen *sense major satellite repeat*-Transkripte gerichtet sind, als siRNAs verwendet und auf ihre biologische Wirksamkeit in NIH3T3-Zellen hin überprüft.

4.2.2.3.1 ms1-siRNA vermittelt eine leichte Reduktion der *major satellite repeat*-Expression

Die Transfektion von NIH3T3-Zellen mit ms1- bzw. ms2-PTO, die gegen *sense major sattelite repeat*-Transkripte gerichtet sind, führte zur Suppression der relativen *major satellite repeat*-Expression (siehe Abschnitt 4.2.2.1.1). Davon ausgehend wurde überprüft, ob die als siRNA dargestellten Zielsequenzen ms1 und ms2, ebenfalls eine biologische Funktion im Sinne der Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten in NIH3T3-Zellen vermitteln. Dafür wurden NIH3T3-Zellen mit 100 nM ms1- bzw. ms2-siRNA transfiziert. Als Kontrolle wurde si-scr3 (siRNA) verwendet, deren Sequenz keine Homologie zum Mausgenom aufweist. Weiterhin wurde NIH3T3-Zellen als Kontrolle mitgeführt die nur mit Lipofectamin[™]2000-Kontrolle inkubiert wurden. Die Aufarbeitung der NIH3T3-Zellen erfolgte 24 h nach Transfektion, indem die RNA isoliert und mit Turbo[™] DNase behandelt wurde. Im Anschluss wurde die *major satellite repeat*- und β-Aktin-Expression mittels RT-qPCR analysiert. In Abbildung 4.2.12 sind die Ergebnisse als relative *major satellite repeat*- Expression dargestellt. Das Expressionsniveau von β-Aktin war in allen untersuchten Proben gleich.



Abbildung 4.2.12: Biologische Aktivität von ms1- und ms2-siRNA. Dargestellt ist die relative major satellite repeat-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessenen major satellite repeat- und β-Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW \pm Stabw, n=2). Es wurden jeweils 100 nM der jeweiligen siRNA in die Transfektion eingesetzt. (LK: Lipofectamin[™]2000-Kontrolle)

Die Ergebnisse in Abbildung 4.2.12 zeigen, dass die Transfektion von ms1-siRNA in NIH3T3-Zellen zur Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression auf 55 %, bezogen auf die mitgeführte Kontrolle si-scr3, führt. Im Gegensatz dazu vermittelte ms2-siRNA keine Suppression der relativen *major satellite repeat*-Expression in NIH3T3-Zellen.

Wie schon in Abschnitt 4.2.2.2.1 beschrieben, fiel auch im Fall der hier verwendeten siRNA-Kontrolle si-scr3 auf, dass sich das relative *major satellite repeat*- Expressionsniveau nach deren Transfektion in NIH3T3-Zellen von dem der verwendeten PTO-Kontrolle (ms1-mut-PTO) unterscheidet. Im Vergleich zur Lipofectamin[™]2000-Kontrolle ist das Expressionsniveau nach Transfektion von si-scr3 sechsfach höher. Nach Transfektion von ms1-mut-PTO ist eine Erhöhung um das 122-fache im Vergleich zur Lipofectamin[™]2000-Kontrolle messbar (Daten nicht gezeigt).

Da ms1-siRNA eine biologische Wirksamkeit im Sinne der Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression nach Transfektion in NIH3T3-Zellen vermittelt, wurde im Weiteren überprüft, ob die transiente Induktion von *sense major satellite repeat*-Transkripten durch Hitzeschockbehandlung, nach Transfektion von ms1-siRNA supprimierbar ist.

4.2.2.3.2 ms1-siRNA und ms2-siRNA supprimieren die Hitzeschock-induzierte major satellite repeat-Expression

Wie in Abschnitt 4.2.2.1.7 gezeigt, konnte die Induktion von sense major satellite repeat-Transkripten nach Hitzeschock durch vorherige Transfektion von ms1-PTO supprimiert werden. Dies wurde ebenfalls für die, gegen die sense major satellite repeat-Transkripte gerichteten, siRNAs (ms1-siRNA & ms2-siRNA) überprüft. Dafür wurden NIH3T3-Zellen 24 h nach Transfektion von 100 nM ms1-, ms2-siRNA bzw. si-scr3 für eine Stunde bei 42 °C inkubiert und nach 2 h Regeneration aufgeschlossen. Nach der Turbo[™] DNase Behandlung der isolierten RNA erfolgte die Analyse der major satellite repeat- und β-Aktin-Expression mittels RT-qPCR. In Abbildung 4.2.13 ist die relative major satellite repeat- Expression dargestellt. Die Expression von β-Aktin zeigte in allen untersuchten Proben vergleichbare Werte. Als weitere Kontrolle ist die relative major satellite repeat-Expression nach Transfektion von si-scr3 ohne Hitzeschockbehandlung aufgeführt.



Abbildung 4.2.13: Biologische Wirksamkeit von ms1- und ms2-siRNA nach Hitzeschock. Dargestellt ist die relative *major satellite repeat*-Expression, die sich als Quotient der in der RTqPCR gemessenen *major satellite repeat*- und β -Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW \pm Stabw, n=2). Es wurden jeweils 100 nM der angegebenen siRNAs in die Transfektion eingesetzt. (37 °C: normale Transfektionsbedingungen)

Beim Vergleich der Ergebnisse nach Transfektion der Kontroll-siRNA si-scr3 in NIH3T3-Zellen unter normalen Transfektionsbedingungen (37 °C) und nach Hitzeschockbehandlung kann man eine 6,5-fache Induktion der relativen *major satellite repeat*-Expression durch Hitzeschock nachweisen. Diese Induktion kann durch die vorrangegangene Transfektion von ms1-siRNA bzw. ms2-siRNA supprimiert werden. Dabei reduziert ms1-siRNA die relative Expression von *major satellite repeat*-Transkripten auf 15 % und ms2-siRNA auf 40 % der si-scr3 Kontrolle nach Hitzeschockbehandlung. Der Wert für die relative *major satellite repeat*-Expression, der nach Transfektion von ms1-siRNA und Hitzeschock gemessen wurde, liegt unter dem Kontroll-siRNA si-scr3 unter normalen Transfektionsbedingungen. Somit vermittelt ms1-siRNA die vollständige Suppression der hitzeschockinduzierten relativen *major satellite repeat*-Expression.

4.2.2.3.3 Transfektionseffizienz von siRNAs in NIH3T3-Zellen

Aus den in Abschnitt 4.2.2.1.8 gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass die Transfektionseffizienz, des als Repräsentant für AS-ON eingesetzten ON-705-Cy3, 99 % betrug. In gleicher Weise wurde die Effizienz der Transfektion von siRNAs in NIH3T3-Zellen überprüft. Als repräsentative siRNA wurde die Cy3-markierte siLam (siLam-Cy3; siehe Abschnitt 2.8.3) verwendet. In Anlehnung an die Versuche zur siRNA-vermittelten Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten, wurden die NIH3T3-Zellen mit 100 nM siLam-Cy3 transfiziert und direkt danach mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abschnitt 3.2.8). Als Kontrolle wurden unbehandelte NIH3T3-Zellen mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.14 dargestellt.



Abbildung 4.2.14: Transfektionseffizienz von siLam-Cy3 in NIH3T3 Zellen. Exemplarische Darstellung eines Histogramm-Plots bei dem die Zellzahl über der Fluoreszenzhöhe (FL2) aufgetragen ist (siehe Abschnitt 3.2.7.1). Neben den mit 100 nM siLam-Cy3-transfizierten Zellen ist die unbehandelte Kontrolle gezeigt.

Im Vergleich zu der in schwarz dargestellten unbehandelten Kontrolle, kann nach Transfektion von siLam-Cy3 eine Verschiebung des Fluoreszenzpeaks, welcher die mit siLam-Cy3 transfizierten Zellen darstellt, nachgewiesen werden. Der Anteil der transfizierten Zellen betrug 94,2 \pm 1,3 % (Dreifachbestimmung: MW \pm . Stabw, n=1). Somit ist davon auszugehen das siRNAs fasst vollständig durch Transfektion in NIH3T3-Zellen eingebracht werden.

4.2.3 Zwischenfazit

Unter Anwendung der computergestützten Sekundärstrukturanalyse der *major satellite repeat*-Transkriptsequenz konnten zwei strukturell zugängliche Bereiche auf dem *sense*- sowie einer auf dem *antisense*-Strang identifiziert werden. Mit Hilfe dieser Daten wurden Zielsequenzen definiert und die daraus resultierenden komplementären Sequenzen ms1, ms2 und ms3 abgeleitet. Dabei sind ms1 und ms2 gegen den *sense*- und ms3 ist gegen den *antisense*-Strang von *major satellite repeat*-Transkripten gerichtet. Die Oligonukleotide wurden als PTO-ON, Gapmer und siRNA zur Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten in NIH3T3-Zellen eingesetzt.

Unter Verwendung von ms1- und ms2-PTO konnte eine konzentrationsabhängige Repression der relativen *major satellite repeat*-Expression in NIH3T3-Zellen gemessen werden, die für ms1-PTO einen IC₅₀ von 48 nM ergab. Die Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO ist sequenzspezifisch und wird durch einen Antisense-Mechanismus vermittelt, der vermutlich auf einer RNase H-vermittelten Spaltung des *sense major satellite repeat*-Transkripts beruht. Die transiente Induktion von *sense major satellite repeat*-Transkripten nach Hitzeschockbehandlung von NIH3T3-Zellen konnte unter Verwendung von ms1-PTO ebenfalls supprimiert werden.

Die Oligonukleotide ms1-Gapmer bzw. ms2-Gapmer zeigten keine biologischen Wirksamkeit, im Sinne der konzentrationsabhöngigen Reduktion der relativen *major satellite repeat*-Expression, in NIH3T3-Zellen.

Aus den Untersuchungen zur siRNA-vermittelten Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten ging hervor, dass sowohl ms1-siRNA als auch ms2-siRNA die hitzeschockinduzierte Expression von *sense major satellite repeat*-Transkripten in NIH3T3-Zellen reprimieren, während unter normalen Transfktionsbedingungen nur ms1-siRNA biologisch wirksam war.

Im Verlauf der Untersuchungen konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Transfektion von Kontroll-PTO-ON, die keine Homologie zum Mausgenom aufweisen, zu einem Anstieg der relativen *major satellite repeat*-Expression in NIH3T3-Zellen führten. Dabei kommt es sowohl zur Induktion des *sense*- als auch des *antisense*-Stranges der Transkripte. Im Gegensatz hierzu hatte die Transfektion der 2'-OMe-modifizierten Gapmer-Kontrolle bzw. die der siRNA-Kontrolle nur einen geringen Einfluss auf die *major satellite repeat*-Expression.

4.3 Biologische Funktion von *major satellite repeat*-Transkripten

Schon im Jahr 1968 konnte in der Arbeit von Harel *et al.* gezeigt werden, dass die *major satellite repeat*-DNA, eingebettet im perizentromeren Heterochromatin, transkribiert wird. Die biologische Funktion von *major satellite repeat*-Transkripten ist jedoch noch unbekannt. Hinweise auf eine mögliche biologische Bedeutung von *major satellite repeat*-Transkripten stammen aus Analysen von *minor satellite repeat*-Transkripten, die aus der Transkription der zentromeren *minor satellite repeat*-DNA hervorgehen (Bouzinba-Segard *et al.*, 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Überexpression von *minor satellite repeat*-Transkripten mit der Reduktion der Proliferation der untersuchten murinen Zelllinien einherging. Aufbauend auf diesen interessanten Daten wurde überprüft, ob die Überexpression von *major satellite repeat*-Transkripten einen Einfluss auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen hat.

Weiterhin stand mit ms1-PTO ein potentes AS-ON zur Suppression der *major satellite repeat*-Expression zur Verfügung (siehe Abschnitt 4.2.2.1.5), welches eingesetzt werden konnte, um die biologische Funktion von *major satellite repeat*-Transkripten in NIH3T3-Zellen näher zu untersuchen.

4.3.1 Funktionsanalyse durch Überexpression von *major satellite repeat*-Transkripten

In Anlehnung an die Arbeit von Bouzinba-Segard *et al.* (2006) wurde der Einfluss der Überexpression von *major satellite repeat*-Transkripten auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen untersucht. Hierfür wurde ein 326 bp langes *major satellite repeat*-Fragment in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+), wie in Abschnitt 3.1.2.8 beschrieben, kloniert. Dabei wurde das *major satellite repeat*-Fragment sowohl in *sense* als auch *antisense* Orientierung in pcDNA3.1(+) inseriert. Die Sequenzanalyse von ms-*sense*-pcDNA3.1(+) und ms-as-pcDNA3.1(+) (enthält die *major satellite repeat*-Sequenz in *antisense* Orientierung) ergab eine Komplementarität von 96 % zu der von Hörz und Altenburger beschriebenen Konsensussequenz (Daten nicht gezeigt; Hörz & Altenburger, 1981). Im Folgenden wird das Plasmid pcDNA3.1(+), dass als Kontrolle mitgeführt wurde, als Kontrollvektor (KV) bezeichnet, während ms-*sense*-pcDNA3.1(+) und ms-as-pcDNA3.1(+) durch die Abkürzungen ms-s-V bzw. ms-as-V dargestellt werden. Die Effizienz der Transfektion von Plasmiden in NIH3T3-Zellen wurde mittels des Kontrollplasmids pEGFP-N1 (1 µg/Ansatz), dass für das *enhanced green fluorescent*

proteine kodiert, bestimmt. Die Transfektionseffizienz betrug 50 % (Daten nicht gezeigt). Im Weiteren wurde 24 h nach Transfektion Vektoren KV, ms-s-V und ms-as-v die plasmidkodierte Expression der *major satellite repeat*-Transkripte mittels PCR überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3.1 dargestellt. Weiterhin wurde die Expression der plasmidkodierten *sense*- und *antisense major satellite repeat*-Transkripte in der Northern Blot-Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 4.3.1: Expression rekombinanter *major satellite repeat*-RNA in NIH3T3 Zellen. NIH3T3 Zellen wurden mit jeweils 1 µg KV (pcDNA3.1(+), leerer Vektor) bzw. ms-s-V (ms-*sense*-pcDNA3.1(+)) bzw. ms-as-V (ms-as-pcDNA3.1(+)) transfiziert. Nach 24 h wurden die RNA isoliert, mit Turbo[™]DNase behandelt und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte die Analyse mittels PCR unter Verwendung von T7- und pcDNA3.1/BGH reverse-Primer (siehe Abschnitt 2.8.1) Neben den cDNA Proben wurden auch NonRT-Kontrollen (RNA, die nicht in cDNA umgeschrieben wurde) und eine NTC-Kontrolle (<u>Non Template Control</u>; Wasser) in der PCR mitgeführt. Die Analyse der PCR-Fragmente erfolgte in einem 1,2 %-igen Agarosegel. Als Größenstandard diente eine 1 kb-Plus Leiter der Firma Invitrogen.

Die Ergebnisse in Abbildung 4.3.1 stellen die Expression rekombinanter *major satellite repeat*-RNA in NIH3T3-Zellen dar. Die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente stimmen mit der anhand der Plasmidsequenz errechneten Amplifikatlänge überein. Dabei kann mittels der Agarosegelelektrophorese für den Kontrollvektor (KV) ein Fragmentlänge von 176 bp bestimmt werden. Für ms-s-V und ms-as-V kann das um 326 bp längere, und somit für *major satellite repeat*-RNA kodierende, Amplifikat nachgewiesen werden. Wie erwartet, war in den Kontrollansätzen kein Amplifikat nachweisbar.

Mit Hilfe dieser Plasmidkonstrukte wurde der Einfluss der Überexpression von *sense*bzw. *antisense major satellite repeat*-Transkripten auf die Proliferation in NIH3T3-Zellen überprüft.

4.3.1.1 Einfluss der Überexpression von sense- und antisense major satellite repeat-Transkripten auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen

Unter Verwendung der Vektoren ms-s-V und ms-as-V wurde der Einfluss der Überexpression von *sense* bzw. *antisense major satellite repeat*-Transkripten auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen untersucht. Dafür wurden NIH3T3-Zellen mit jeweils 1 µg Plasmid/Ansatz an ms-s-V bzw. ms-as-V transfiziert. Als Kontrolle wurde der leere Vektor KV verwendet. Nach der Transfektion wurden NIH3T3-Zellen über einen Zeitraum von drei Tagen regeneriert. Alle 24 Stunden wurde die Zellzahl mittels Trypanblau (siehe Abschnitt 3.2.3) bestimmt (siehe Abbildung 4.3.2 B). Darüber hinaus wurde die RNA isoliert und nach Behandlung mit Turbo[™]DNase in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte die Analyse der *major satellite repeat*- und β -Aktin-Expression mittels q-PCR. Die relative *major satellite repeat*-Expression ist in Abbildung 4.3.2 A dargestellt. Das Expressionsniveau von β -Aktin wies unabhängig vom transfizierten Plasmidkonstrukt vergleichbare Werte auf.



Abbildung 4.3.2: Zeitverlauf der major satellite repeat-Expression und der Proliferation von NIH3T3-Zellen. NIH3T3-Zellen wurden mit jeweils 1 µg des jeweiligen Plasmids transfiziert. A) Dargestellt ist die relative major satellite repeat-Expression, die sich als Quotient der in der RTgPCR gemessenen major satellite repeatund β-Aktin-Expression errechnet (Dreifachbestimmung: MW \pm Stabw, n=1). B) Dargestellt ist die Gesamtzellzahl die mittels Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde (Dreifachbestimmung: MW \pm Stabw, n=1).

In Abbildung 4.3.2 A ist die zeitliche Veränderung der relativen *major satellite repeat*-Expression nach Transfektion der Plasmidkonstrukte dargestellt. Direkt nach Transfektion von NIH3T3-Zellen mit ms-s-V bzw. ms-as-V kann eine Zunahme der relativen *major satellite repeat*-Expression im Vergleich zum Kontrollvektor gemessen werden. Nach einem Tag sind die größten Werte zu verzeichnen, die nach Transfektion von ms-s-V 18,5- und ms-as-V 23-fach über dem des Kontrollvektors liegt. Daraufhin sinkt die relative *major satellite repeat*-Expression ab und ist nach drei Tagen wieder auf dem Ausgangsniveau.

Die zeitliche Veränderung der mittels Trypanblaufärbung bestimmten Zellzahl ist in Abbildung 4.3.2 B gezeigt, wobei nur geringe Unterschiede zwischen *sense*- bzw. *antisense major satellite repeat*-Transkript überexprimierenden und den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen messbar sind. Die Vitalität der Zellen betrug unabhängig vom transfizierten Vektor 80-90 %.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Überexpression von *sense*- bzw. *antisense major satellite repeat*-Transkripten keinen messbaren Einfluss auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen hat.

4.3.2 Analyse der Proliferation von NIH3T3-Zellen nach Reduktion von *major* satellite repeat-Transkripten durch ms1-PTO

Mit ms1-PTO wurde ein potentes AS-ON zur Suppression der *major satellite repeat*-Expression in NIH3T3-Zellen entwickelt (siehe Abschnitt: 4.2.2.1.6). Neben der ms1-PTOvermittelten Reduktion konnte ebenfalls eine Induktion von *major satellite repeat*-Transkripten nach Transfektion der Kontroll-PTO nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.2.2.1.2). Bei diesen Untersuchungen fiel auf, dass NIH3T3-Zellen die mit ms1-PTO transfiziert wurden eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den Zellen aufwiesen die mit Kontroll-PTOs behandelt wurden. Aufgrund dieser Beobachtung sollte der Einfluss der *major satellite repeat*-Expression auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen, unter Verwendung von ms1-PTO und Kontroll-PTOs, näher untersucht werden.

4.3.2.1 ms1-PTO vermittelte Suppression der *major satellite repeat*-Expression steigerte die Proliferation von NIH3T3-Zellen

Mit Hilfe dieses Experiments wurde der Einfluss der major satellite repeat-Expression auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen guantitativ bestimmt. Dafür wurden NIH3T3-Zellen mit 200 nM ms1-PTO bzw. der Kontrolle 1840B/20-PTO transfiziert und im Anschluss über drei Tage regeneriert. Alle 24 Stunden wurden die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung bestimmt (siehe Abbildung: 4.3.3 B). Parallel dazu wurde die RNA isoliert und nach Behandlung mit Turbo[™]DNase in cDNA umgeschrieben. Die Analyse der *major satellite repeat-* und β -Aktin-Expression erfolgte mittels g-PCR. Das Ergebnis dieser Messung ist als relative major satellite repeat-Expression in Abbildung 4.3.3 A dargestellt. Die Werte für die β -Aktin Expression war in alle untersuchten Proben vergleichbar.



Abbildung 4.3.3: Zeitverlauf der major satellite repeat-Expression und der Proliferation von NIH3T3-Zellen nach Transfektion. A) Dargestellt ist die relative major satellite repeat-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessenen major satellite repeat- und β-Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW ± Stabw, n=3). B) Gezeigt ist die Gesamtzellzahl, die mittels Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer wurde bestimmt (Doppelbestimmung: MW \pm Stabw, n=3). Es wurden jeweils 200 nM des jeweiligen PTO-ON in die Transfektion eingesetzt.

In Abbildung 4.3.3 A ist die zeitliche Veränderung der relativen *major satellite repeat*-Expression nach Transfektion von NIH3T3-Zellen mit ms1-PTO bzw. der Kontrolle 1840B/20-PTO dargestellt. Einen Tag nach der Transfektion kann der größte Unterschied der relativen *major satellite repeat*-Expression gemessen werden. Dabei weisen die mit ms1-PTO transfizierten NIH3T3-Zellen eine um 73 % verringerte *major satellite repeat*-

Ergebnisse

Expression auf, als die mit 1840B/20-PTO behandelten Zellen. Zu diesem Zeitpunkt (24 h) ist auch der größte Wert für die relative *major satellite repeat*-Expression nach Transfektion von 1840B/20-PTO zu verzeichnen. Sie ist 24 h nach Transfektion von 1840B/20-PTO 9-fach höher als zum Zeitpunkt 0 h. Zwei Tage nach Transfektion von 1840B/20-PTO fällt das *major satellite repeat*-Expressionsniveau wieder ab und erreicht 3 Tage nach Transfektion fast den Ausgangswert (0 h). Im Vergleich weisen die Werten für die relative *major satellite repeat*-Expression nach Transfektion von ms1-PTO nur geringe Unterschiede auf, wobei auch hier 24 h nach Transfektionsende der größte Wert gemessen werden kann, der 3-fach höher ist als zum Zeitpunkt 0 h.

Die zeitliche Veränderung der mittels Trypanblaufärbung bestimmten Zellzahl nach Transfektion von NIH3T3-Zellen mit ms1-PTO bzw. der Kontrolle 1840B/20-PTO ist in Abbildung 4.3.3 B gezeigt. Bis 24 h nach Transfektionsende ist kein Unterschied in der ermittelten Zellzahl feststellbar. Dies ändert sich nach 48 h. Während sich die Zellzahl der mit 1840B/20-PTO transfizierten NIH3T3-Zellen im Vergleich zum Vortag nicht verändert, kann eine Erhöhung der Zellzahl für die ms1-PTO transfizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt bestimmt werden. Drei Tage nach Transfektionsende ist der Unterschied zwischen 1840B/20-PTO und ms1-PTO behandelten NIH3T3-Zellen am deutlichsten ausgeprägt, obwohl unabhängig vom transfizierten PTO-ON ein Anstieg der Zellzahl messbar ist. Die NIH3T3-Zellen wiesen unabhängig von der Behandlung und zu allen untersuchten Zeitpunkten, ein Vitalität von 85-95 % auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transfektion von ms1-PTO im Vergleich zu 1840B/20-PTO zur Suppression der relativen *major satellite repeat*-Expression führt und eine gesteigerte Prolifertion der NIH3T3-Zellen zur Folge hat. Daraus ergab sich die Fragestellung, inwiefern die gesteigerte Proliferation von NIH3T3-Zellen nach Suppression der *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO, auf eine Veränderung im Zellzyklus von NIH3T3-Zellen zurückzuführen war. Dafür wurde eine Zellzyklusanalyse der ms1-PTO bzw. 1840B/20-PTO behandelten NIH3T3-Zellen mittels Durchfluss-zytometrie durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.7.1). Der DNA-Gehalt von NIH3T3-Zellen wurde anhand des interkalierenden Farbstoffs Propidiumiodid über einen Zeitraum von drei Tagen gemessen. Die Messung der Zellzyklusphasen beruht auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zellen. In der G1/G0-Phase weisen Zellen einen haploiden Chromosomensatz (1n) auf. Dieser wird während der Replikation (S-Phase) verdoppelt und beträgt in der G2/M-Phase 2n. Hiervon ausgehend erfolgte die Bestimmung der Zellzyklusphasen wie in Abschnitt 3.2.7.1 beschrieben. In Abbildung

4.3.4 ist die Zellzyklusverteilung von unbehandelten NIH3T3-Zellen ausgehend von deren DNA-Gehalt nach Färbung mit Propidiumiodid exemplarisch dargestellt.



Abbildung 4.3.4: Zellzyklusverteilung in NIH3T3-Zellen. Bestimmung des DNA Gehalts von unbehandelten NIH3T3-Zellen als Funktion der Fluoreszenzfläche (integrierte Fläche des Fluoreszenzsignals). Aufgetragen ist die Anzahl der Zellen über die Fläche des Fluoreszenzsignals aus FL2. Die Zellzyklusphasen wurden anhand des DNA-Gehalts der Zellen zugeordnet. Die Anzahl der Zellen die sich in der jeweiligen Zellzyklusphase befinden ist als prozentualer Anteil der gemessenen Gesamtzellzahl dargestellt.

Nach Festlegung der Zellzyklusphasen erfolgte die Bestimmung des prozentualen Anteils an NIH3T3-Zellen die sich in der jeweiligen Zellzyklusphase befanden. In Abbildung 4.3.5 ist die Zellzyklusverteilung von ms1-PTO bzw. 1840B/20-PTO transfizierten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.



Abbildung 4.3.5: Zellzyklusverteilung von NIH3T3-Zellen nach Transfektion von ms1-PTO und 1840B/20-PTO. Die mit jeweils 200 nM des jeweiligen PTO-ON transfizierten NIH3T3-Zellen wurden mittels FACS-Analyse (siehe Abschnitt 3.2.7.1) auf ihre Zellzyklusverteilung hin untersucht (Doppelbestimmung: MW – Stabw., n=3). Dafür wurden die Zellzyklusphasen, wie in Abbildung 4.3.4 gezeigt, festgelegt und der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase im Bezug zur gemessenen Gesamtzellzahl bestimmt.

Ergebnisse

Anhand der in Abbildung 4.3.5 gezeigten Ergebnissen, ist kein Einfluss der Suppression der relativen *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO (siehe Abbildung 4.3.3 A) auf die Zellzyklusverteilung von NIH3T3-Zellen im Vergleich zur Behandlung mit 1840B/20-PTO festgestellbar. Der prozentuale Anteil der Zellen in der G1/G0-Phase nahm über den gemessenen Zeitraum, unabhängig von der Reduktion der *major satellite repeat*-Expression, zu.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die gesteigerte Proliferation von NIH3T3-Zellen nach Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten durch ms1-PTO, nicht auf Veränderungen in der Zellzyklusverteilung der Zellen zurückzuführen ist.

4.3.2.2 Einfluss der ms1-PTO-vermittelten Hemmung auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen nach Hitzeschock

Sense major satellite repeat-Transkripte werden nach Hitzeschock in NIH3T3-Zellen transient induziert. Diese Induktion kann durch die vorherige Transfektion mit ms1-PTO reprimiert werden (Siehe Abschnitt: 4.1.3 & 4.2.2.1.7). Aus den in Abschnitt 4.3.2.1 gezeigten Ergebnissen ging hervor, dass die Erhöhung der major satellite repeat-Expression in NIH3T3 Zellen durch Transfektion von 1840B/20-PTO zu einer geringeren Proliferation im Vergleich zu ms1-PTO behandelten Zellen führte. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob eine zusätzliche Hitzeschockbehandlung nach Transfektion von ms1-PTO ebenfalls zu einer gesteigerten Proliferation von NIH3T3-Zellen, wie in Abschnitt 4.3.2.1 beschrieben, im Vergleich zu 1840B/20-PTO führt. Dafür wurden NIH3T3-Zellen mit 200 nM ms1-PTO bzw. 1840B/20-PTO transfiziert. Nach 24 h Regeneration wurden die Zellen für 1 h bei 42 °C inkubiert und im Anschluss für 2 h oder weitere 24 h bzw. 48 h regeneriert. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau bestimmt (siehe Abbildung 4.3.6 B). Im Weiteren wurde parallel dazu die RNA isoliert und nach Behandlung mit Turbo[™]DNase in cDNA umgeschrieben. Die Analyse der major satellite repeat- und β -Aktin-Expression erfolgte mittels q-PCR. Die daraus berechnete relative major satellite repeat-Expression ist in Abbildung 4.3.6 A dargestellt. Das Expressionsniveau von β-Aktin war in allen untersuchten Proben vergleichbar groß.



Abbildung 4.3.6: Zeitverlauf der major satellite repeat-Expression und der Proliferation von NIH3T3-Zellen nach Transfektion und Hitzeschock. Die Zellen wurden mit jeweils 200 nM des jeweiligen PTO-ON transfiziert. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 0 h (direkt nach Transfektion), nach 27 h (24 h nach Transfektion, 1 h bei 42 °C und 2 h Regeneration) 51 h (24 h nach Transfektion, 1 h bei 42 °C, 26 h Regeneration) und nach 75 h (24 h nach Transfektion, 1 h bei 42 °C. 50 h Regeneration). A) Dargestellt ist die relative major satellite repeat-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessenen major satellite repeat- und β-Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW ± Stabw, n=2). B) Gezeigt ist die Gesamtzellzahl, die mittels Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde (Doppelbestimmung: MW ± Stabw, n=2).

Die zeitliche Veränderung der relativen *major satellite repeat*-Expression nach Transfektion von PTO-ON und zusätzlichem Hitzeschock ist in Abbildung 4.3.6 A dargestellt. NIH3T3-Zellen, die mit ms1-PTO transfiziert und mit Hitzeschock behandelt wurden, weisen 27 h nach Transfektion eine um 65 % und 51 h nach Transfektion eine um 77 % reduzierte relative *major satellite repeat*-Expression, im Vergleich zu 1840B/20-PTO transfizierten Zellen, auf. Die Transfektion der Zellen mit 1840B/20-PTO und Hitzeschock hat 27 h nach Transfektion eine Induktion der relativen *major satellite repeat*-Expression um das 6-fache im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h (kein Hitzeschock) zur Folge. Im Weiteren Verlauf der Messung (51 h) nahm die relative *major satellite repeat*-Expression der mit 1840B/20-PTO transfizierten Zellen wieder ab und lag 75 h nach Transfektion auf dem Anfangsniveau. Im Vergleich dazu weisen die Werten der relativen *major satellite repeat*-Expression nach Transfektion von ms1-PTO geringere Unterschiede auf, wobei auch hier 27 h nach Transfektion der größte Wert gemessen wurde, wobei dieser 3-fach höher war als zum Zeitpunkt 0 h.

Die zeitliche Veränderung der Zellzahl (siehe Abbildung 4.3.6 B) nach Behandlung von NIH3T3-Zellen mit ms1-PTO bzw. 1840B/20-PTO und zusätzlichen Hitzeschock zeigt einen ähnlichen Verlauf wie unter normalen Zellkulturbedingungen (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Die mittels Trypanblaufärbung bestimmte Zellzahl der mit 1840B/20-PTO

transfizierten NIH3T3-Zellen verändert sich bis 51 h nach Transfektion (26 h nach Hitzeschock) kaum. Im Gegensatz dazu kann nach Transfektion von ms1-PTO 51 h nach Transfektionsende eine größere Zellzahl gemessen werde. Dieser Unterschied ist 74 h nach Transfektion (50 h nach Hitzeschock) noch deutlicher ausgeprägt. Die mittels Trypanblaufärbung bestimmte Vitalität der Zellen betrug, unabhängig vom transfizierten PTO-ON, zu allen angegebenen Zeitpunkten 85-95 %. Somit ist auch nach zusätzlicher Hitzeschockbehandlung von NIH3T3-Zellen eine verbesserte Proliferation durch Suppression der *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO nachzuweisen.

Inwieweit die gezeigte verbesserte Proliferation, der mit ms1-PTO transfizierten und hitzeschockbehandelten NIH3T3-Zellen (siehe Abbildung 4.3.5 B) auf Unterschieden in der Zellzyklusverteilung beruht, wurde mittels der Zellzyklusanalyse verifiziert. In Abbildung 4.3.7 ist die Zellzyklusverteilung der untersuchten NIH3T3-Zellen dargestellt.



Abbildung 4.3.7: Zellzyklusverteilung von NIH3T3-Zellen nach Transfektion von ms1-PTO und 1840B/20-PTO und nach Hitzeschock. Die NIH3T3-Zellen wurden mit jeweils 200 nM des jeweiligen PTO-ON transfiziert. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 0 h (direkt nach Transfektion), nach 27 h (24 h nach Transfektion, 1 h bei 42 °C und 2 h Regeneration) 51 h (24 h nach Transfektion, 1 h bei 42 °C, 26 h Regeneration) und nach 75 h (24 h nach Transfektion, 1 h bei 42 °C, 26 h Regeneration) und nach 75 h (24 h nach Transfektion, 1 h bei 42 °C, 50 h Regeneration). Dafür wurden NIH3T3-Zellen mittels FACS-Analyse (Abschnitt 3.2.7.1) auf ihre Zellzyklusverteilung hin untersucht (Doppelbestimmung: MW - Stabw, n=2). Die Zellzyklusphasen wurden, wie in Abbildung 4.3.4 gezeigt, festgelegt und der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase im Bezug zur gemessenen Gesamtzellzahl bestimmt.

Aufgrund der Ergebnisse, die in Abbildung 4.3.7 dargestellt sind, ist kein Unterschied in der Zellzyklusverteilung von NIH3T3-Zellen nach Transfektion von m1-PTO bzw. 1840B/20-PTO und zusätzlicher Hitzeschockbehandlung nachweisbar. Die prozentuale Zunahme an NIH3T3-Zellen in der G1/G0-Phase 75 h nach Transfektion (50 h nach Hitzeschock) ist ebenfalls unabhängig vom eingesetzten PTO-ON. In Anbetracht dieser Ergebnisse kann die verbesserte Proliferation von NIH3T3-Zellen, nach Suppression der hitzeschockinduzierten *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO, nicht auf Veränderungen im Zellzyklus zurückgeführt werden.

4.3.2.3 Einfluss der ms1-PTO-vermittelten Hemmung auf die Proliferation nach Synchronisation von NIH3T3-Zellen

Die ms1-PTO vermittelte Suppression der major satellite repeat-Expression führte im Vergleich zur Transfektion der Zellen mit 1840B/20-PTO zu einer verbesserten Proliferation der NIH3T3-Zellen (Siehe Abschnitt 4.3.2.1). Es konnte jedoch kein Unterschied in der Zellzyklusverteilung der mit ms1-PTO und 1840B/20-PTO transfizierten NIH3T3-Zellen beobachtet werden. Da NIH3T3-Zellen zu Beginn der Versuche eine heterogene Zellzyklusverteilung aufwiesen, bestand der Verdacht, dass mögliche Veränderungen des Zellzyklus dadurch überdeckt wurden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der major satellite repeat-Expression auf die Proliferation und die Zellzyklusverteilung in synchronisierten NIH3T3-Zellen überprüft. Dafür wurden die Zellen für 48 h unter serumdepletierten Bedingungen kultiviert und so in der G0-Phase des Zellzyklus arretiert (Daten nicht gezeigt, siehe Abschnitt 3.2.6). Die Transfektion der PTO-ON (200 nM) erfolgte 4 h vor Beendigung der Synchronisation. Neben ms1-PTO wurden die Kontroll-PTOs 1840B/20-PTO und ms1-mut-PTO mitgeführt. Nach Ende der Transfektion wurden die Zellen mit Vollmedium regeneriert und somit der Zellzyklus induziert. Aus vorangegangenen Versuchen war bekannt, dass synchronisierte NIH3T3-Zellen 12 h nach Zugabe von Vollmedium in die S-Phase übergehen (Daten nicht gezeigt). Deshalb erfolgte die Untersuchung der relativen major satellite repeat-Expression und der Zellzyklusverteilung direkt und 24 h nach Induktion des Zellzyklus, somit nach Abschluss der Transfektion (siehe Abbildung 4.3.8 A & 4.3.9). Für die Analyse der relativen major satelite repeat-Expression wurde die RNA der transfizierten Zellen isoliert und nach Behandlung mit Turbo[™]DNase in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der major satellite repeat- und β-Aktin-Expression mittels g-PCR. Die β-Aktin-Expression wies dabei in allen untersuchten Proben vergleichbare Werte auf. Im Weiteren wurde die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung über einen Zeitraum von 3 Tagen bestimmt. Diese ist in Abbildung 4.3.8 B dargestellt.



Abbildung 4.3.8: Zeitverlauf der major satellite repeat-Expression und der Proliferation in synchronisierten NIH3T3-Zellen nach Transfektion. Die Zellen wurden 48 h unter serumdepletierten Bedingungen Synchronisiert und 4 h vor Ende mit jeweils 200 nM des jeweiligen PTO-ON transfiziert. Die Analysen erfolgten zu den in der Darstellung angegebenen Zeitpunkten. A) Dargestellt ist die relative major satellite repeat-Expression, die sich als Quotient der in der RT-qPCR gemessene satellite repeat- und maior β-Aktin-Expression errechnet (Doppelbestimmung: MW \pm Stabw, n=2). B) Gezeigt ist die Gesamtzellzahl, die mittels Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde (Doppelbestimmung: MW ± Stabw, n=2).

In Abbildung 4.3.8 A sind die Ergebnisse der zeitlichen Veränderung der relativen major satellite repeat-Expression in synchronisierten und PTO-ON transfizierten NIH3T3-Zellen dargestellt. Zusätzlich zu dem in den vorherigen Abschnitten verwendeten 1840B/20-PTO wurde in diesen Experimenten ms1-mut-PTO mitgeführt, welches als spezifische Kontrolle der antisense-vermittelten Hemmung verwendet wurde. Direkt nach der Transfektion (Induktion des Zellzyklus), kann eine Erhöhung der relativen major satellite repeat-Expression nach Transfektion von ms1-mut-PTO im Vergleich zur 1840B/20-PTO um das 2-fache gemessen werden. Einen Tag nach Transfektion ist für die ms1-mut-PTO transfizierten NIH3T3-Zellen eine um dass 3,7-fach geringere relative major satellite repeat-Expression nachweisbar, während sich die Werte für die mit 1840B/20-PTO transfizierten Zellen zu beiden gemessenen Zeitpunkten kaum veränderten. Die Transfektion von ms1-PTO hat zum Zeitpunkt 0 h eine 62 %-ige und nach einem Tag eine 73 %-ige Reduktion der relativen major satellite repeat-Expression im Vergleich zur ms1-mut-PTO-Kontrolle zur Folge. Im Vergleich zur 1840B/20-PTO-Kontrolle konnte eine ms1-PTO vermittelte Suppression der relativen major satellite repeat-Expression um 20 % zum Zeitpunkt 0 h und 88 % zum Zeitpunkt 24 h nachgewiesen werden.

Die zeitliche Veränderung der mittels Trypanblaufärbung bestimmten Zellzahl ist in Abbildung 4.3.7 B zusammengefasst. Einen Tag nach Transfektion (Induktion des Zellzyklus) ist die Zellzahl, unabhängig von transfizierten PTO-ON, geringer als direkt nach Transfektion (Zeitpunkt 0 h). Die Zellzahl der mit ms1-PTO transfizierten NIH3T3-Zellen stieg zwei Tage nach Transfektionsende wieder an. Für die NIH3T3-Zellen die mit ms1-mut-PTO bzw. 1840B/20-PTO transfiziert wurden, konnten sowohl nach 24 h als auch nach 48 h vergleichbare Zellzahlen bestimmt werden, wobei deren Zellzahl 2 Tage nach Transfektion geringer war als die der mit ms1-PTO transfizierten Zellen. Drei Tage nach Transfektionsende konnte eine Erhöhung der Zellzahl für ms1-mut-PTO behandelte Zellen gemessen werden. Dem gegenüber veränderte sich die Zellzahl der mit 1840B/20-PTO transfizierten Zellen 72 h nach Transfektionsende kaum im Vergleich zum Zeitpunkt 48 h. Wie schon zwei Tage nach Transfektionsende konnte eine Zunahme der Zellzahl, 72 h nach Transfektionsende für die mit ms1-PTO behandelten Zellen gemessen werden. Die Vitalität der Zellen lag unabhängig von den verwendeten PTO-ON, zu allen untersuchten Zeitpunkten bei 85-95 %. Die gezeigten Daten machen deutlich, dass die Suppression der major satellite repeat-Expression durch ms1-PTO in synchronisierten NIH3T3-Zellen zu einer verbesserten Proliferation der Zellen im Vergleich zu ms1-mut-PTO und 1840B/20-PTO behandelten Zellen führt.

Im Weiteren wurde die Zellzyklusverteilung der synchronisierten und mit PTO-ON transfizierten NIH3T3-Zellen überprüft. In Abbildung 4.3.9 ist Zellzyklusverteilung der untersuchten NIH3T3-Zellen dargestellt.



Abbildung 4.3.9: Zellzyklusverteilung von synchronisierten NIH3T3-Zellen nach Transfektion von ms1-PTO, ms1-mut-PTO und 1840B/20-PTO. Die Zellen wurden 48 h unter serumdepletierten Bedingungen Synchronisiert und 4 h vor Ende mit jeweils 200 nM des jeweiligen PTO-ON transfiziert. Die NIH3T3-Zellen wurden mittels FACS-Analyse (Abschnitt 3.2.7.1) auf ihre Zellzyklusverteilung zu den in der Darstellung angegebenen Zeitpunkten untersucht (Doppelbestimmung: MW - Stabw, n=2). Dafür wurden die Zellzyklusphasen, wie in Abbildung 4.3.4 gezeigt, festgelegt und der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase im Bezug zur gemessenen Gesamtzellzahl bestimmt.

Aus den Ergebnissen in Abbildung 4.3.9 geht hervor, dass sich 85 % der untersuchten NIH3T3-Zellen, unabhängig vom transfizierten PTO-ON, direkt nach der Transfektion (Induktion des Zellzyklus) in der G1/G0-Phase befanden und somit synchronisiert vorlagen. Einen Tag nach Transfektionsende nahm der prozentuale Anteil an NIH3T3-Zellen in der S-Phase, unabhängig vom transfizierten PTO-ON, zu. Die Größe dieses Zuwachses war jedoch unterschiedlich. Nach Transfektion von ms1-PTO und ms1-mut-PTO befanden sich annähernd 33 % der Zellen in der S-Phase, während es nach Transfektion von 1840B/20-PTO nur 22 % waren. Dabei verringerte sich der prozentuale Anteil der Zellen die sich in der G1/G0-Phase befanden nach Transfektion von ms1-PTO bzw. ms1-mut-PTO auf 56 %. Im Vergleich dazu konnten 70 % der Zellen die mit 1840B/20-PTO transfiziert wurden in der G1/G0-Phase nachgewiesen werden. Somit war der Anteil der proliferierenden NIH3T3-Zellen 24 h nach Transfektion von ms1-PTO und ms1-mut-PTO größer als nach Transfektion von 1840B/20-PTO.

Die Unterschiede in der Zellzyklusverteilung nach Transfektion ms1-PTO bzw. 1840B/20-PTO erklären die in Abbildung 4.3.8 B gezeigte Verringerung der Zellproliferation nach Transfektion von 1840B/20-PTO. Dem gegenüber weisen die mit ms1-PTO bzw. ms1-mut-PTO transfiziert NIH3T3-Zellen vergleichbare Zellzyklusverteilungen auf, obwohl sich deren Zellproliferation unterscheidet (siehe Abbildung 4.3.8 B). Somit kann kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Zellzyklusverteilung und der Zellproliferation nach Transfektion von PTO-ON nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz besteht eine Korrellation zwischen der Zellproliferation und der *major satellite repeat*-Expression, die zeigt, dass die ms1-PTO-vermittelte Suppression der *major satellite repeat*-Expression mit einer verbesserten Proliferation der Zellen einhergeht (siehe Abbildung 4.3.3 A & B und Abbildung 4.3.8 A & B).

4.3.3 Zwischenfazit

Auf der Suche nach der biologischen Funktionen von *major satellite repeat*-Transkripten wurden zwei unterschiedlich experimentelle Ansätze verwendet. Einerseits wurde der Einfluss der plasmidkodierten Überexpression von *sense* bzw. *antisense major satellite repeat*-Transkripten auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen untersucht. Andererseits wurde überprüft, ob die ms1-PTO vermittelte Suppression der *major satellite repeat*-Expression die Proliferation von NIH3T3-Zellen beeinflusst.

Die plasmidkodierte Überexpression von *sense*- bzw. *antisense major satellite repeat*-Transkripten in NIH3T3-Zellen hatte keinen Einfluss auf deren Proliferation.

Die Hemmung von *sense major satellite repeat*-Transkripten durch ms1-PTO wurde sowohl in synchronisierten als auch nicht synchronisierten NIH3T3-Zellen analysiert. Nach Sppression von *major satellite repeat*-Transkripten durch ms1-PTO konnte unter nicht synchronisierten Bedingungen eine verbesserte Proliferation von NIH3T3-Zellen im Vergleich zu 1840B/20-PTO behandelten Zellen gemessen werden, wobei keine Unterschiede in der Zellzyklusverteilung der Zellen messbar waren. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch nach einer zusätzlichen Hitzeschockbehandlung gemessen.

Wie unter nicht synchronisierten Bedingungen, konnte auch nach Arritierung der Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus und Transfektion von ms1-PTO eine Suppression der *major satellite repeat*-Expression nachgewiesen werden, die mit einer verbesserten Proliferation der Zellen im Vergleich zu den Kontroll-PTOs (1840B/20-PTO & ms1-mut-PTO) einherging. Dabei konnte aus der Analyse der Zellzyklusverteilung kein eindeutiger Zusammenhang zur Proliferation der Zellen abgeleitet werden.

5 Diskussion

5.1 Nachweis und Charakterisierung von *major satellite repeat*-Transkripten

In der vorliegenden Arbeit wurden major satellite repeat-Transkripte charakterisiert. Dafür wurde sowohl die Northern Blot-Analyse als auch die RT-qPCR zu deren Nachweis etabliert. Während major satellite repeat-Transkripte mittels RT-gPCR erstmals quantitativ nachgewiesen wurden, konnte unter Verwendung der Northern Blot-Analyse die Orientierung und Größe der Transkripte aufgeklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals 24 nt lange Sonden zum strangspezifischen Nachweis von major satellite repeat-Transkripten eingesetzt (zum Vergleich siehe Tabelle 5.1). Da diese Sonden sowohl über eine hohe Strangspezifität für die jeweilige Orientierung der Transkripte verfügten, als auch eine strangspezifische Sensitivität aufwiesen, die es ermöglichte 10⁸ Kopien an sense- bzw. antisense major satellite-Transkripten detektieren zu können (Daten nicht gezeigt), erwiesen sie sich als am besten geeignet, um major satellite repeat-Transkripte strangspezifisch nachzuweisen. Unter Verwendung dieser Sonden konnte erstmals sense- und antisense major satellite repeat-Transkripte in NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass beide eine heterogene Größenverteilung aufwiesen. Während der sense-Strang einen Größenbereich von 1 kb bis größer als 6 kb umfasst, konnte der antisense-Strang mit einer Größenverteilung von 4 kb bis größer als 6 kb nachgewiesen werden. Um auszuschließen das es sich bei den nachgewiesenen major satellite repeat-Transkripten um seguenzhomologe DNA handelt. wie schon in der Arbeit von Gaubatz & Cutler (1980) beschrieben, wurden die zu untersuchenden RNA-Proben mit Turbo DNase behandelt (siehe Abbildung: 4.1.2). Mittels einer RNase A/T1 Behandlung und der alkalischen Hydrolyse konnte sowohl der RNA-Charakter der major satellite repeat-Signale, als auch das Vorhandensein von major satellite repeat-DNA bestätigt werden (siehe Abbildung: 4.1.2). Neben chromosomaler DNA handelt es sich möglicherweise auch um zirkuläre major satellite repeat-DNA, wie sie in der Arbeitsgruppe um Cohen beobachtet wurde (Cohen et al., 2006).

In dieser Arbeit wurden *major satellite repeat*-Transkripte unterschiedlicher Längen nachgewiesen. Diese Ergebnisse sind mit denen aus der Literatur konsistent (siehe Tabelle 5.1). Unterschiede sind jedoch in den nachgewiesenen Größenverteilungen zu verzeichnen (siehe Tabelle 5.1). Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Bachelorarbeit von Vogelsang (2006) konnten *sense*- und *antisense major satellite*

repeat-Transkripte mit einer vergleichbaren Größenverteilung, durch die 24 nt langen Oligonukleotid-Sonden, in NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5.1). Dem gegenüber waren die zur Untersuchung von *major satellite repeat*-Transkripten verwendeten Sonden, die in den anderer Arbeiten genutzt wurden, länger und im Hinblick auf die Orientierung der Transkripte nicht strangspezifisch (siehe Tabelle 5.1). Darüber hinaus wurden in diesen Arbeiten andere Zellsysteme verwendet, was ebenfalls ein Grund für die Unterschiede in den nachweisbaren Größenverteilungen von *major satellite repeat*-Transkripten sein könnte.

Mittels der Northern Blot-Analyse konnten in dieser Arbeit sowohl *sense-* als auch *antisense major satellite repeat-*Transkripte mit ein Länge von mehr als 6 kb nachgewiesen werden, wobei über die maximale Größe der Transkripte nur eine Vermutung angestellt werden kann. Ein genaueres Ergebnis ergab die Maustranskriptomanalyse. Diese gibt eine Länge von rund 15 kb für die Transkripte an (Okazaki *et al.*, 2002). Diese Länge ist nicht ungewöhnlich. Das Maustranskriptom weist mehrere nichtkodierende hochmolekulare RNAs (macro ncRNA) auf. Mit einer Länge von ungefähr 18 bzw. 108 kb sind die *X inactive specific transkript* RNA (*Xist*)- und die *antisense Igf2r* RNA (*Air*) Beispiele für macro ncRNAs (Furuno *et al.*, 2006).

Die Vielzahl an unterschiedlichen Längen mit denen major satellite repeat-Transkripte in der Northern Blot-Analyse nachweisbar sind, ist möglicherweise auf unterschiedliche Transkriptionsinitiationsequenzen zurückzuführen. Experimente zur Bestimmung dieser Transkriptionsinitiationssequenzen, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, ergaben keine aussagekräftigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). In der Literatur sind verschiedene Seguenzmotive in der major satellite repeat-DNA beschrieben, die von Proteinen wie YY1 (Transkriptionsaktivator/Repressor) und C/EBP α,β , und δ (Transkriptionsfaktoren) als Bindungssequenzen genutzt werden können (Shestakova et al., 2004, Tang & Lane, 1999; Liu et al., 2007). Darüber hinaus konnte die Assoziation von sal like 1 (Sall1), einem Transkriptionsrepressor, an major satellite repeat-DNA nachgewiesen werden (McLeskey et al., 2002; Yamashita et al., 2007). Im Weiteren konnten major satellite repeat-Transkripte in der polyadenylierten RNA-Fraktion detektiert werden (Lehnertz et al., 2003, Martens et al., 2005, Lu & Gilbert, 2007). Chromatinimmunopräzipitationsstudien zeigten, dass eine direkte Interaktion zwischen major satellite repeat-DNA und RNA Polymerase II vorliegt (Schoeftner & Blasco, 2008) und die transkribierten major satellite repeat-RNAs im perizentromeren Heterochromatin lokalisiert sind (Lu & Gilbert, 2007). Somit kann von einer RNA Polymerase II-abhängigen Transkription ausgegangen werden, wobei die Transkriptions-

Diskussion

initiationssequenzen nicht identifiziert werden konnten. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die Initiation der Transkription auch von Sequenzen der MS4-Satelliten-DNA ausgehen, die in der *major satellite repeat-*DNA eingebettet sind (Kuznetsova *et al.*, 2006). Ebenso können auch in die *major satellite repeat-*DNA insertierten LINE1-Retrotransposon Elemente die Transkription der *major satellite repeat-*DNA initiieren (Huang *et al.*, 2004). Diese verfügen sowohl über eine interne Initiationssequenz, als auch einen im 5`untranslatierten Bereich (5`UTR) lokalisierten *antisense* Promotor (Speek, 2001) und würden so die Transkription beider *major satellite repeat-*Transkriptstränge erklären.

Während die Northern Blot-Analyse eine gualitative Charakterisierung (Länge und Orientierung) von major satellite repeat-Transkripten ermöglicht, ist der in dieser Arbeit erstmals beschriebene RT-qPCR Ansatz für deren quantitativen Nachweis geeignet. Die hier beschriebene RT-gPCR hat eine Effizienz von 100 % und eine Nachweisgrenze von 100 Kopien des major satellite repeat-Amplikons. Unter Verwendung eines Plasmids als Standard (siehe Abschnitt 4.1.2.2) konnte in der RT-gPCR durchschnittlich eine Anzahl major satellite repeat-Kopien/Zelle (major satellite 600 repeat-Sequenzvon einheiten/Zelle), in exponentiell wachsenden NIH3T3-Zellen, detektiert werden. Da major satellite repeat-Transkripte als repetitive Sequenzen mit unterschiedlichen Größen vorliegen, ist keine Aussage darüber möglich, ob die im Mittel bestimmten 600 Kopien/Zelle, von einem oder mehreren Transkripten stammen. Somit kann keine absolute Anzahl an major satellite repeat-Transkripten/Zelle mit dieser Methode bestimmt werden. Es ist jedoch möglich mit Hilfe der RT-qPCR Daten, die Kopienzahl/ng RNA zu bestimmen. Dies erlaubt die Berechnung der einzusetzenden Mindestmenge an RNA, um in der Northern Blot-Analayse ein Hybridisierungssignal für major satellite repeat-Transkripte zu detektieren. Die zusätzliche Detektion von β -Aktin (Amplifikationseffizienz: 100 %) in der RT-gPCR ermöglicht die Berechnung der relative Expression von major satellite repeat-Transkripten und gibt Aufschluss über den Einfluss verschiedener Behandlungen, wie Transfektion und Hitzeschock, auf den Metabolismus der Zellen. Somit liefert die RT-qPCR ein breites Spektrum an Daten zur Analyse von major satellite repeat-Transkripten.

Aus dem humanen System ist bekannt, dass die *sense*-Transkripte der sat III *repeat*-DNA, die im perizentromeren Heterochromatin der akrozentrischen Chromosomen lokalisiert ist, nach Hitzeschock induziert werden (Rizzi *et al.*, 2004; Valgardsdottir *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Beobachtung wurde in NIH3T3-Zellen überprüft, welchen Einfluss die Hitzeschockbehandlung auf die Expression von *major satellite repeat*-Transkripte hat.

Diskussion

Dies wurde sowohl mittels Northern Blot-Analyse als auch RT-qPCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass sense major satellite repeat-Transkripte transient durch Hitzeschock in NIH3T3-Zellen induziert werden. Zwei Stunden nach der Hitzeschockbehandlung konnte eine vierfache Erhöhung der major satellite repeat-Expression gemessen werden. Die sense major satellite repeat-Transkripte waren mit Längen von 1 kb bis > 6 kb nachweisbar. Die antisense major satellite repeat-Transkripte konnten erst nach 24 h Regeneration mit einer Größenverteilung von 1 kb bis > 6 kb detektiert werden. Während die Konzentration an sense major satellite repeat-Transkripten nach Hitzeschockbehandlung transient zunimmt, weisen diese Transkripte sowohl unter normalen Zellkulturbedingungen (37 °C) als auch nach Hitzeschock eine Längenverteilung von 1 kb bis > 6 kb auf. Dies könnte möglicherweise bedeuten, dass unter normalen Zellkulturbedingungen und nach Hitzeschock die gleichen Transkriptionsinitiationssequenzen in der sense major satellite repeat-DNA genutzt werden, diese unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren gebunden jedoch von und somit in unterschiedlicher Stärke transkribiert werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten im humanen System nachgewiesen werden. Dort kommt es ebenfalls zur transienten Induktion von sense sat III-Transkripten durch Hitzeschock (Jolly et al., 2004, Valgardsdottir et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die sense sat III-Transkripte nach Hitzeschock am perizentromeren Heterochromatin verbleiben und dort kolokalisiert mit Hitzeschockfaktor HSF1, Spleissfaktoren und RNA Polymerase II nachgewiesen werden können (Jolly et al., 2004; Metz et al., 2004). Die Analyse der hitzeschockinduzierten sense sat III-RNAs ergab, dass diese alle polyadenyliert vorlagen (Valgardsdottir et al., 2005). Neben der Induktion durch Hitzeschock wurden noch andere Stressstimuli untersucht und es zeigte sich, dass die Induktion von sense sat III-Trankskripten eine generelle Reaktion auf Stress darstellt, die durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Valgardsdottir et al., 2007).

Quelle	Spezies/ Gewebe	Nachweis- Verfahren	Sonden	Transkript- orientierung	Transkriptlängen	DNase-Behandlung
Gaubatz & Cutler, 1990	Maus/ seneszentes Herzgewebe	Northern Blot-Analyse	DNA-Sonde: 235 bp <i>major satellite repeat</i> -Fragment in psat-Plasmid	nicht spezifiziert	6 bis >9,5 kb	durchgeführt
Rudert <i>et al</i> ., 1995	Maus/ P19-Zellen	Northern Blot-Analyse	cDNA- Sonden: - 433 nt - ≈3,5 kb - ≈1,6 kb	nicht spezifiziert	1,8 kb	nicht durchgeführt
Rudert <i>et al</i> ., 1995	Maus/ P19-Zellen Fötales-, Leber-, Hoden-Gewebe	<i>in situ</i> -Hybridisierung	RNA-Sonden: 433 nt sense-Transkript 433 nt antisense-Transkript	antisense	1,8 bis 3,5 kb	nicht durchgeführt
Huang <i>et al</i> ., 2004	Maus/ embryonale Fibroblasten (Lsh -/-)	Northern Blot-Analyse	Keine Angabe	nicht spezifiziert	0,2 bis 4 kb	durchgeführt
			RNA-Sonden: antisense sense	sense antisense	0,5 bis 6 kb 0,5 bis > 6 kb	
Vogelsang, 2006, Bachelorarbeit	Maus/ NIH3T3-Zellen	Northern Blot-Analyse	cDNA-Sonden: antisense sense	sense antisense	0,5 bis 6 kb 0,5 bis 6 kb	durchgeführt
			Oligonukleotid-Sonden: Maj sat Rev: 24 nt Maj sat For: 24 nt	sense antisense	1 bis > 6 kb 1 bis > 6 kb	
Lu & Gilbert, 2007	Maus/ C127-Zellen	Northern Blot-Analyse	DNA Sonde: 8 x 234 bp <i>major satellite repeat</i> - Frag- ment in pγSat-Plasmid	nicht spezifiziert	0,2 bis > 6 kb	durchgeführt
Vorliegende Arbeit	Maus/ NIH3T3-Zellen	Northern Blot-Analyse	Oligonukleotid-Sonden: Maj sat Rev: 24 nt Maj sat For: 24 nt	sense antisense	1 bis > 6 kb 4 bis > 6 kb	durchgeführt

Tabelle 5.1: Nachweisverfahren für major satellite repeat-Transkripte

Diskussion

5.2 Einfluss der AS-ON Chemie auf die Expression von *major* satellite repeat-Transkripten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es Nukleinsäurewirkstoffe zu entwickeln, die zur strangspezifischen Suppression von major satellite repeat-Transkripten führen. Mit ms1-PTO wurde ein PTO-modifiziertes AS-ON entworfen, dass sense major satellite repeat-Transkripte konzentrationsabhängig supprimiert. Es weist einen IC₅₀ Wert von 48 nM auf. Die Hemmung von sense major satellite repeat-Transkripten wird in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Aus diesem Grund sind keine Vergleichswerte für die spezifische Wirksamkeit des entwickelten PTO-ON verfügbar. Anhand der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen ist jedoch eine allgemeine Einordnung der Wirksamkeit von ms1-PTO möglich. Von Boulmé und Mitarbeitern wurde ein gegen den TAR-Stemloop der HIV-RNA gerichtetes PTO-ON beschrieben, dass einen IC₅₀ von 7 nM aufwies (Boulmé et al., 1998). Die Arbeitsgruppe um Kurreck entwickelte ein PTO-ON, dessen Zielsequenz in der Vallinoid Rezeptor Subtyp 1 mRNA lag und einen IC₅₀ von 70 nM aufwies (Grünweller et al., 2003). PTO-ON mit einem IC₅₀ im zweistelligen nanomolaren Bereich (as2B: 47 nM; as3B: 22 nM), die gegen die mRNA des ICAM-1 Rezeptors gerichtet sind, wurden in der Arbeit von Kretschmer-Kazemi Far & Szcakiel (2003) beschrieben. Da die spezifische Wirksamkeit von ms1-PTO (IC_{50} = 48 nM) ebenfalls im nanomolaren Bereich liegt, kann es als potentes PTO-ON eingestuft werden.

Die Strangspezifität von ms1-PTO, das gegen sense major satellite repeat-Transkripte gerichtet ist, wurde mittels der Northern Blot-Analyse untersucht. Dabei konnte neben der fast vollständigen strangspezifischen Suppression von sense major satellite repeat-Transkripten ebenfalls eine Reduktion der antisense-Transkripte nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.2.2.1.5). Diese Reduktion war sowohl unter normalen Transfektionsbedingungen als auch nach zusätzlichem Hitzeschock detektierbar (siehe Abschnitt 4.2.2.1.5 & 4.2.2.1.7). Der Vergleich der Seguenz von ms1-PTO und von antisense major satellite repeat-Transkripten ergab eine Sequenzkomplementarität von 3 Basenpaaren (Daten nicht gezeigt). Für die Aktivierung der RNase Hvermittelten Spaltung sind jedoch mindestens 5 komplementäre Basenpaare in einem PTO-ON-mRNA-Hybrid notwendig (Monia et al., 1993). Somit kann eine RNase Hvermittelte Spaltung der antisense major satellite repeat-Transkripte durch ms1-PTO ausgeschlossen werden. Aus der Analyse zentromerer Satelliten-DNAs von S.pombe und Vertebraten ging hervor, dass diese sowohl in sense als auch antisense-Orientierung transkribiert werden und als RNA-Hybride nachweisbar sind (Volpe et al., 2002,

Fukagawa *et al.*, 2004). Möglicherweise kommt es bei den in dieser Arbeit untersuchten *sense*- und *antisense major satellite repeat*-Transkripten ebenfalls zur Bildung von RNA-Hybriden und damit zur Stabilisierung der beiden RNAs. Insofern könnte eine Suppression des *sense*-Stranges durch ms1-PTO auch zu einer Reduktion der RNA-Hybride und somit zur Destabilisierung des *antisense*-Stranges führen, was die beobachtete Reduktion des *antisense*-Stranges erklären würde.

Weiterhin wurde mit dem ms3-PTO ein AS-ON gegen antisense major satellite repeat-Transkripte entwickelt. Im Gegensatz zum ms1-PTO konnte bei den mit ms3-PTO durchgeführten Experimenten keine AS-ON vermittelte Suppression nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.2.2.1.3), obwohl antisense major satellite repeat-Transkripte in NIH3T3-Zellen exprimiert werden (siehe Abschnitt 4.1.1.2). Ein Grund hierfür könnte möglicherweise in der gewählten Zielsequenz für ms3 und deren RNA-Sekundärstruktur liegen. Der Vergleich der mittels mfold2.3 vorhergesagten RNA-Sekundärstrukturen zeigt, dass die RNA-Zielsequenz von ms1 über 13 konsekutive ungepaarte Basen verfügt, während die von ms3 nur 8 ungepaarte Basen aufweist. Somit verfügt die RNA-Zielsequenz von ms3 über eine geringere strukturelle Zugänglichkeit, was ein Grund für die fehlende biologische Wirksamkeit von ms3-PTO sein könnte. Diese Annahme wird unterstützt durch Ergebnisse aus der Arbeit von Kretschmer-Kazemi Far *et al.* (2005), die zeigt, dass eine geringere strukturelle Zugänglichkeit der Ziel-RNA mit einer geringeren biologischen Wirksamkeit der untersuchten AS-ON einhergeht.

In den Experimenten zur Charakterisierung der in dieser Arbeit entwickelten PTO-ON wurde auch ein gegensätzlicher Einfluss auf die *major satellite repeat*-Expression beobachtet. Die Transfektion von Kontroll-PTOs, die zur Kontrolle des Einflusses der chemischen Modifikation eingesetzt wurden und keine Homologie zum Mausgenom aufweisen, führten zur konzentrations- und längenabhängigen Induktion der *major satellite repeat*-Expression (siehe Abschnitt 4.2.2.1.1 & 4.2.2.1.2). Dabei wurden sowohl *sense*-als auch *antisense major satellite*-Transkripte induziert (siehe Abschnitt 4.2.2.1.5). Für den besseren Vergleich der Einflüsse verschiedener AS-ON und siRNAs auf die *major satellite repeat*-Expression in NIH3T3-Zellen sind deren Werte in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Einfluss der in dieser Arbeit untersuchten Nukleinsäurewirkstoffe auf die relative major satellite repeat-Expression. Die angegebenen Werte der relativen major satellite repeat-Expression wurden bei normalen Transfektionsbedingungen 24 h nach Transfektion und bei zusätzlichem Hitzeschock 27 h nach Transfektion mittels RT-qPCR bestimmt (MW \pm Stabw.) Die relative major satellite repeat-Expression stellt den Quotient aus der in der RT-qPCR gemessenen major satellite repeat- und der β -Aktin-Expression dar. Es wurden mindesten 2 unabhängige Versuche zur Bestimmung des MW \pm Stabw. herangezogen.

		relative <i>major satellite repeat</i> - Expression		
Bezeichnung	Eingesetzt als	Normale Transfektions- bedingungen (37 °C)	Nach Hitzeschock	
OptiMEM-Kontrolle	Kontrolle des Transfektionsmediums	0,01 ± 0,00		
Lipofectamin [™] 2000- Kontrolle	Kontrolle des Transfektionsreagenz	0,01 ± 0,00		
1840B/20-PTO	Kontrolle der PTO- Chemie	2,35 ± 0,99	2,02 ± 0,45	
ms1-mut-PTO	Kontrolle der PTO- Chemie	1,22 ± 0,54	1,22 ± 0,35	
ms1-inv-PTO	Kontrolle der PTO- Chemie	2,08 ± 0,21		
ms1-PTO	AS-PTO	$0,46 \pm 0,24$	0,45 ± 0,18	
ms3-PTO	AS-PTO	1,22 ± 0,13	0,73 ± 0,09	
TM6-4 (2´-OMe)	Kontrolle der Gapmer- Chemie	0,03 ± 0,01		
ms1-Gapmer	AS-Gapmer	0,02 ± 0,01		
ms2-Gapmer	AS-Gapmer	0,03 ± 0,00		
si-scr3	siRNA-Kontrolle	0,06 ± 0,01	0,40 ± 0,19	
ms1-siRNA	siRNA	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,03	
ms2-siRNA	siRNA	0,06 ± 0,01	0,16 ± 0,05	

Die Transfektion von NIH3T3-Zellen mit den Kontroll-ON 1840B/20-PTO bzw. ms1mut-PTO, die keine Zielsequenz im Mausgenom haben, führte im Vergleich zur Kontrolle mit OptiMEM (Transfektionsmedium) oder der Lipofectamin[™]2000-Kontrolle (Lipofectamin[™]2000 in OptiMEM) zu einer 235- bzw. 130-fachen sequenzunspezifischen Erhöhung der *major satellite repeat*-Expression. Aus den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen geht ebenfalls hervor, dass PTO-modifizierte ON sequenzunabhängig biologische Prozesse der untersuchten Zellen beeinflussen können. Die Arbeit von Detzer *et al.* (2010, eingereicht) zeigt zum Beispiel, dass die Transfektion von PTO-ON, die keine Homologie zum humanen Genom aufweisen, einen Stresszustand in den untersuchten Zellen hervorrufen, der mit der Bildung von Stressgranula einhergeht. Andere
Diskussion

Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass G3139, ein biologisch aktives PTO-ON, neben der Reduktion der Ziel-RNA auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den untersuchten Zellen bewirkt (Lai *et al.*, 2003; Raffo *et al.*, 2004). Weiterführende Studien zu G3139 zeigten, dass es nach Transfektion eine Vielzahl anderer Proteine in den untersuchten Zellen beeinflusst (Stessl *et al.*, 2009). Diese Proteine sind in zelluläre Prozesse, wie z.B. den Proteintransport, den Glukosemetabolismus und das Redoxpotential der Zellen involviert. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass sowohl nach Transfektion von G3139 als auch einer unwirksamen PTO-Kontrolle die Zellproliferation gehemmt wurde, was mit einer erhöhten Caspaseaktivität und einer gesteigerten Anzahl apoptotischer Zellen einherging (Winkler *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurde weiterhin die biologische Wirksamkeit von Gapmer modifzierten AS-ON und siRNAs überprüft, die gegen sense major satellite repeat-Transkripte gerichtet waren. Dabei konnte für ms1-Gapmer und ms2-Gapmer keine biologische Wirksamkeit, im Sinne der Reduktion der major satellite repeat-Expression nachgewiesen werden. Nach Transfektion von ms1-siRNA konnte eine 45 %-ige Reduktion der major satellite repeat-Expression im Vergleich zur siRNA-Kontrolle si-scr3 gemessen werden, während ms2-siRNA keine biologische Wirksamkeit vermittelte. Die in der Literatur beschriebenen Daten zur Wirksamkeit von 2`O-Methyl-modifizierten Gapmer AS-ON sind kontrovers. In der Arbeitsgruppe um Freier wurde ein 2`O-Methyl-modifiziertes Gapmer entwickelt, dessen Wirksamkeit mit einem IC₅₀ von 20 nM deutlich höher war als die des sequenzhomologen PTO-ON mit einem IC₅₀ von 150 nM (Monia et al., 1993). Demgegenüber wies das in der Arbeitsgruppe um Kurreck entwickelte 2'O-Methylmodifizierte Gapmer mit einem IC₅₀ von 220 nM eine niedrigere Wirksamkeit auf als das sequenzhomologe PTO-ON, dass einen IC₅₀ von 70 nM zeigte (Grünweller *et al.*, 2003). Obwohl aus der Literatur bekannt ist, dass 2'O-Methyl-modifizierte AS-ON eine höhere Affinität zu ihrer Ziel-RNA haben als PTO-ON, sind diese nicht zwingend besser geeignet eine bestimmte Ziel-RNA zu supprimieren (Agrawal et al., 1997; Shen et al., 1998; Yoo et al., 2004). Im Vergleich zu PTO- und Gapmer-ON, die meist einen IC_{50} im nanomolaren Bereich aufweisen, konnten für siRNAs IC₅₀- Werte im picomolaren Bereich nachgewiesen werden (Grünweller et al., 2003; Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003). Da 2'O-Methyl-modifizierte Gapmer-ON, PTO-ON und siRNAs fast vollständig durch Transfektion in NIH3T3-Zellen eingebracht werden (Siehe Abschnitt: 4.2.2.1.8, 4.2.2.2.1 & 4.2.2.3.3), ist die geringe bzw. ausbleibende biologische Wirksamkeit von ms1-siRNA bzw. der Gapmer-ON nicht auf Unterschiede in der Transfektionseffizienz zurückzuführen. Ein möglicher Grund für die geringe bzw. ausgebliebene biologische

Wirksamkeit von ms1-siRNA bzw. der Gapmer ON könnte im Expressionsniveau von *major satellite repeat*-Transkripten in NIH3T3-Zellen liegen. Vergleicht man die Werte der relativen major satellite repeat-Expression nach Transfektion der Gapmer-Kontrolle TM6-4 (2'-OMe) bzw. der siRNA-Kontrolle si-scr3 mit denen der Lipofectamin[™]2000-Kontrolle oder OptiMEM-Kontrolle kann eine 3- bzw. 6-fache Erhöhung detektiert werden. Im Vergleich dazu konnte nach Transfektion der Kontroll-PTOs 1840B/20-PTO bzw. ms1mut-PTO, eine Erhöhung der relativen major satellite repeat-Expression um das 235- bzw. 130-fache, im Vergleich zur Lipofectamin[™]2000-Kontrolle bzw. OptiMEM-Kontrolle gemessen werden. Im Gegensatz zu den Kontroll-PTOs (1840B/20-PTO, ms1-mut-PTO) hat die Transfektion der Kontroll-siRNA (si-scr3) und der 2'O-Methyl-modifizierten Kontrolle TM6-4 (2'-OMe) kaum einen Einfluss auf die major satellite repeat-Expression. Nach zusätzlicher Hitzeschockbehandlung verändern sich die Werte. Stellt man die Werte der relativen major satellite repeat-Expression nach Transfektion der Kontroll-siRNA siscr3 unter normalen Transfektionsbedingungen (37 °C) und nach Hitzeschock gegenüber, kann man eine Erhöhung um fast das 7-fache messen. Vergleicht man zusätzlich die Werte der Lipofectamin[™]2000-Kontrolle bzw. der OptiMEM-Kontrolle unter normalen Transfektionsbedingungen (37 °C) mit dem der siRNA-Kontrolle si-scr3 nach Hitzeschockbehandlung, kann eine Erhöhung der relativen major satellite repeat-Expression um das 40-fache berechnet werden (siehe Tabelle 5.2). Unter Hitzeschockbedingungen konnte eine starke Suppression der major satellite repeat-Expression durch ms1-siRNA, im Bezug auf die siRNA-Kontrolle si-scr3 von 85 % ermittelt werden. Nach Induktion der major satellite repeat-Expression ist somit eine starke biologische Wirksamkeit von ms1siRNA nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die major satellite repeat-Expression in unbehandelten NIH3T3-Zellen sehr gering ist, so dass unter normalen Transfektionsbedingugen (37 °C) eine biologische Wirksamkeit von siRNAs und 2'O-Methyl-modifizierten AS-ON kaum nachweisbar ist. Unterstützt wird diese Vermutung durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe Sczakiel, die zeigen, dass ICAM1 in unbehandelten ECV304-Zellen nur sehr gering exprimiert wird (Kretschmer-Kazemi Far & Schakiel, 2003, Kretschmer-Kazemi Far et al., 2005). Unter diesen Bedingungen war sowohl nach Transfektion von AS-ON als auch siRNAs, die gegen die ICAM1-RNA gerichtet waren, kaum eine Suppression dieser im Vergleich zu den eingesetzten Kontrollen messbar. Erst nach Stimulation der ICAM1-Expression durch IL - 1ß konnte sowohl nach Transfektion der AS-ON als auch der siRNAs eine deutliche Reduktion der ICAM1-Expression gemessen werden. Anhand dieser Daten und der Ergebnisse dieser Arbeit kann man vermuten, dass die biologische Wirksamkeit der gegen major satellite repeat-Transkripte

Diskussion

gerichteten Gapmer-modifizierten AS-ON (ms1-Gapmer, ms2-Gapmer) und der siRNAs (ms1-siRNA, ms2-siRNA) nur nach Induktion der Expression, wie zum Beispiel durch Hitzeschock, näher charakterisiert werden kann. Dies wird auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt, die unter Verwendung der PTO-modifizierten AS-ON ms1-PTO und ms2-PTO erzielt wurden. Durch die Transfektion der Kontroll-PTOs, die keine Homologie zum Mausgenom aufwiesen, wurde die *major satellite repeat*-Expression induziert (siehe Tabelle 5.2). Diese Induktion konnte durch Transfektion von ms1-PTO supprimiert werden (siehe Abbildung 4.2.6).

Sowohl die Transfektion von sequenzunspezifischen PTO-Kontrollen als auch die Hitzeschockbehandlung vermitteln einen Stresszustand in eukaryotischen Zellen, der sich durch die Bildung von Stressgranula messen lässt (Detzer *et al.*, 2010, eingereicht). In dieser Arbeit konnte sowohl nach Hitzeschockbehandlung (siehe Abschnitt 4.1.3) als auch nach Transfektion von NIH3T3-Zellen mit Kontroll-PTOs, wie 1840B/20-PTO und ms1-mut-PTO (siehe Tabelle 5.2), die Induktion der relativen *major satellite repeat*-Expression nachgewiesen werden. Dabei wurde nach Hitzeschockbehandlung transient der *sense*-Strang von *major satellite repeat*-Transkripten induziert, während nach Transfektion von Kontroll-PTOs sowohl die Induktion des *sense*- als auch *antisense*-Stranges der Transkripte in NIH3T3-Zellen messbar war. Da die durch Hitzeschock und andere Stressstimuli induzierten *sense*-sat III-Transkripte als Stressmarker verwendet werden, kann man *major satellite repeat*-Transkripten ebenso eine mögliche Funktion als Stressmarker zuweisen (Rizzi *et al.*, 2003; Valgardsdottir *et al.*, 2005).

5.3 Biologische Funktion von *major satellite repeat*-Transkripten

Die Funktionsanalyse von Genen kann sowohl durch deren Überexpression als auch durch deren Suppression erfolgen. Dabei können anhand phänotypischer Unterschiede im Vergleich zum Normalzustand Informationen zur Genfunktion abgeleitet werden.

Da aus der Arbeit von Bouzinba-Segard *et al.* (2006) bekannt war, dass die plasmidkodierte Überexpression des 120 nt *minor satellite repeat*-RNA Fragments zu Segregationsdefekten und damit zur Abnahme der Prolifertion der untersuchten Zellen führte, wurde in dieser Arbeit zuerst überprüft, welchen Einfluss die Überexpression der plasmidkodierten *major satellite repeat*-RNAs (326 nt) auf die zeitliche Veränderung der Zellzahl und somit Proliferation der untersuchten NIH3T3-Zellen hatte. Anhand der Ergebnisse (siehe Abschnitt 4.3.1.1) konnte jedoch kein Einfluss der Überexpression von *sense bzw. antisense major satellite repeat*-RNAs auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen

Diskussion

festgestellt werden. Die Bestimmung der Größe von *major satellite repeat*-Transkripten mittels Northern Blot-Analyse ergab für beide Transkriptorientierungen eine heterogene Längenverteilung in unbehandelten NIH3T3-Zellen (siehe Abschnitt 4.1.1.2), wobei der Hauptanteil der nachgewiesenen RNAs, unabhängig von ihrer Orientierung, größer als 6 kb war. Die überexprimierten *major satellite repeat*-RNA Fragmente hatten eine Länge von 326 nt und waren somit deutlich kleiner als die natürlich vorkommenden Transkripte. Aus der computergestützten Analyse der RNA-Sekundärstruktur mittels mfold 2.3 ergeben sich deutliche Unterschiede, hinsichtlich offener und gepaarte Strukturbereiche, zwischen 326 nt und größeren, z.B. 936 nt langen RNAs (936 nt entsprechen vier *major satellite repeat*-RNA Wiederholungen; Daten nicht gezeigt). Somit kann die Länge und die damit einhergehende Sekundärstruktur der überexprimierten RNAs ein möglicher Grund für die ausgebliebene phänotypische Veränderungen der Zellen sein.

Weitere Untersuchungen zur Funktion von major satellite repeat-Transkripten wurden unter Verwendung des in dieser Arbeit entwickelten biologisch wirksamen ms1-PTO durchgeführt. Dabei wurde aufgrund von Beobachtungen bei der Charakterisierung der ms1-PTO vermittelten Suppression, der Einfluss der major satellite repeat-Expression auf die zeitliche Veränderung der Zellzahl untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich gesteigerte Proliferation von NIH3T3-Zellen nach Suppression der major satellite repeat-Expression durch ms1-PTO im Vergleich zur PTO-Kontrolle 1840B/20-PTO (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Dieser Effekt konnte ebenso nach einer zusätzlichen Hitzeschockbehandlung beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.3.2.2). Darüber hinaus kann man die 1840B/20-PTO vermittelte Induktion der relativen major satellite repeat-Expression um das 235-fache im Vergleich zur Lipofectamin[™]2000- bzw. OptiMEM-Kontrolle zum Zeitpunkt 24 h nachweisen (siehe Tabelle 5.2). Diese Induktion wird durch Transfektion von ms1-PTO um 73 % reduziert (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Stellt man die Werte der relativen major satellite repeat-Expression der Lipofectamin[™]2000- bzw. OptiMEM-Kontrolle dem Wert der mit ms1-PTO ermittelt wurde gegenüber, fällt auf, dass dieser 46-fach höher ist (siehe Tabelle 5.2). Das bedeutet, dass die relative major satellite repeat-Expression auch nach Transfektion von ms1-PTO über dem Expressionsniveau liegt, dass in der Lipofectamin[™]2000- bzw. OptiMEM-Kontrolle gemessen wurde. Betrachtet man die zeitliche Veränderung der Zellzahl die parallel zum major satellite repeat-Expressionsniveau bestimmt wurde, zeigt sich, dass die NIH3T3-Zellen mit einer durch 1840B/20-PTO induzierten major satellite repeat-Expression eine geringere Veränderung der Zellzahl und damit eine verminderte Proliferation aufweisen als die, deren major satellite repeat-Expression durch ms1-PTO supprimiert wurde. Aus der

Analyse der zeitlichen Veränderung der Zellzahl ging ebenfalls hervor, dass NIH3T3-Zellen die mit ms1-PTO transfiziert wurden eine verminderte Proliferation im Vergleich zu den Zellen aufwiesen, die mit Lipofectamin[™]2000- bzw. OptiMEM inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse bestand die Vermutung, dass die Verringerung der Proliferation durch Veränderungen im Zellzyklus der untersuchten Zellen hervorgerufen wird. Zur Aufklärung wurde parallel zur Bestimmung der zeitlichen Veränderung der Zellzahl und der relativen major satellite repeat-Expression die Zellzyklusverteilung der Zellen detektiert. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Zellzyklusverteilung in den mit Lipofectamin[™]2000- bzw. OptiMEM inkubierten und den mit ms1-PTO bzw. 1840B/20-PTO transfizierten Zellen gemessen werden. Da die Zellen, die in diesen Experimenten eingesetzt wurden, schon zu Beginn der Versuche eine heterogene Zellzyklusverteilung aufwiesen (Daten nicht gezeigt), bestand die Vermutung, dass mögliche zellzyklusspezifische Unterschiede überdeckt wurden. Aus diesem Grund wurden die Zellen vor der Transfektion in der G1/G0-Phase synchronisiert. Dabei ging auch in der synchronisierten Zellpopulation die Induktion des major satellite repeat-Expressionsniveau mit einer verminderten Proliferation der Zellen einher. Die Analyse der Zellzyklusverteilung zum Zeitpunkt 24 h ergab eine Veränderung der prozentualen Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen nach Transfektion von ms1-PTO (G1/G0: 57 %; S: 32 %; G2/M: 9 %) und ms1-mut-PTO (G1/G0: 55%; S: 34 %; G2/M: 9 %) im Vergleich zu 1840B/20-PTO (G1/G0: 70 %; S: 22 %; G2/M: 6 %). Die Erhöhung des prozentualen Anteils der Zellen die in der S-Phase vorliegen und die damit einhergehende Erniedrigung des prozentualen Anteils der Zellen in der G1/G0-Phase erklären die verbesserte Proliferation der ms1-PTO transfizierten Zellen im Vergleich zu 1840B/20-PTO transfizierten Zellen die in Abschnitt 4.3.2.1 und 4.3.2.3 nachgewiesen wurde. Dieses Ergebnis wird durch Daten in der Literatur unterstützt die zeigen, dass eine verbesserte Zellproliferation mit einer Erhöhung des prozentualen Anteils der Zellen in der S-Phase einhergeht (Shi et al., 2006; Jin et al., 2007; Feng et al., 2008). Obwohl die Transfektion der Kontroll-PTOs ms1-mut-PTO bzw. 1840B/20-PTO in NIH3T3-Zellen zur Induktion der major satellite repeat-Expression führt (130- bzw. 235-fach im Vergleich zur Lipofectamin[™]2000- bzw. OptiMEM-Kontrolle, siehe Tabelle 5.2) und die so behandelten Zellen eine vergleichbare verringerte Proliferation im Vergleich zu ms1-PTO transfizierten Zellen aufweisen, ist kein Unterschied in der Zellzyklusverteilung von ms1-mut-PTO bzw. ms1-PTO transfizierten Zellen detektierbar (Zeitpunkt 24 h; siehe Abschnitt 4.3.2.3). Dieses Ergebnis wird durch Daten aus der Literatur bestätigt, die zeigen, dass eine Verringerung der Zellproliferation nicht zwingen auf einer Veränderung der Zellzyklusverteilung beruht (Eichhorn *et al.*, 1993; Tschaharganeh *et al.*, 2007; O'Sullivan *et al.*, 2009). Aufgrund der eigenen Ergebnisse und der Daten aus der Literatur kann kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Zellproliferation und der Zellzyklusverteilung der Zellen hergestellt werden. Nichtsdestotrotz besteht eine Korrelation zwischen der *major satellite repeat*-Expression und Zellproliferation in NIH3T3-Zellen, die sich in der verringerten Zellproliferation von NIH3T3-Zellen nach Induktion der *major satellite repeat*-Expression durch Kontroll-PTOs (1840B/20-PTO, ms1-mut-PTO), im Vergleich zu ms1-PTO, widerspiegelt. Der Einfluss der Transfektion von PTO-ON auf die Zellproliferation wurde in der Arbeitsgruppe Noe näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Transfektion von PTO-ON sowohl zur Inhibition der Zellproliferation, als auch zur Aktivierung der Caspaseaktivität und damit zur Erhöhung der Zahl apoptotischer Zellen führt (Winkler *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Daten könnte man vermuten, dass die in dieser Arbeit gemessene Verringerung der Zellproliferation von NIH3T3-Zellen nach Transfektion von ms1-mut-PTO bzw. 1840B/20-PTO möglicherweise auf Apoptose beruht.

Da *major satellite repeat*-Transkripte sowohl unter normalen Zellkulturbedingungen als auch nach Hitzeschock und Transfektion mit PTO-ON vorrangig als hochmolekulare RNAs (> 6 kb) in dieser Arbeit nachgewiesen wurden, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass sie eine biologische Funktion vermitteln die auf ihrer Größe und der damit verbundenen Sekundärstruktur beruht. Nach der Transkription verbleiben *major satellite repeat*-RNAs im perizentromeren Heterochromatin und könnten möglicherweise, ähnlich wie die *Xist* RNA, die durch die Interaktion mit chromosomaler DNA die Stillegung des X-Chomosoms bewirkt, zur Aufrechterhaltung und Stabilisierung des Perizentromers beitragen (Lu & Gilbert, 2007; Brockdorff *et al.*, 1992; Ng *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit konnten sowohl sense- als auch antisense major satellite repeat-Transkripte nachgewiesen werden. Somit ist eine Hybridisierung beider Stränge möglich, was indirekt auch durch Daten von Martens *et al.* (2005) belegt wird. Aus der Literatur über *S. pombe* und Vertebraten geht hervor, dass zentromere satteliten-RNAs durch Bildung von kurzen doppelsträngigen siRNAs an der Stillegung des Zentromers beteiligt sind, wobei auch im murinen System ein ähnlicher Mechanismus vermutet wird (Volpe *et al.*, 2002, Fukagawa *et al.*, 2004). Nach der Depletion von Dicer, dass für die Prozessierung langer dsRNAs im Mechanismus der RNA Interferenz verantwortlich ist, konnte eine gesteigerte Expression von *major satellite repeat*-Transkripten beobachtet werden (Bernstein *et al.*, 2003; Kanellopoulou *et al.*, 2005; Murchinson *et al.*, 2005). In Maus Oozyten konnte darüber hinaus eine Vielzahl (mehr als 20.000) kleiner endogener RNAs (miRNA, siRNA, piRNA) nachgewiesen werden, die auf Retrotranspon- und Satelliten-RNA Sequenzen zurückzuführen sind (Watanabe *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2008). Da jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt keine *major satellite repeat*-spezifischen RNAs mit einer Größe von 20 nt bis 30 nt nachgewiesen werden konnten, bleibt unklar, ob diese als endogene siRNAs, wie in *S. pombe* beschrieben, eine biologische Funktion bei der Stilllegung des Zentromers vermitteln (Volpe *et al.*, 2002).

5.4 Ausblick

Die Expression von *major satellite repeat*-Transkripten wird sowohl durch Hitzeschock als auch durch die Transfektion von Kontroll-PTO-ON, die keine Homologie zum Mausgenom aufweisen, induziert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, das man *major satellite repeat*-Transkripten als Stressmarker einsetzen kann. Zur Verifizierung dieser Annahme kann der Einfluss weitere chemischer oder physikalischer Stimuli, die einen Stresszustand in eukarytischen Zellen vermitteln, auf die *major satellite repeat*-Expression, unter Verwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden (Northern Blot-Analyse, RT-qPCR), untersucht werden. Die Anwendung der Chromatinimmuno-präzipitation könnte weiterhin Aufschluss über *major satellite repeat*-DNA-bindende Proteine, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, sowohl unter normalen als auch stressinduzierenden Zellkulturbedingungen geben.

Da die hitzeschockinduzierte Expression von *major satellite repeat*-Transkripten durch ms1-siRNA supprimiert werden kann, besteht somit die Möglichkeit deren biologische Wirksamkeit näher zu charakterisieren. Weiterhin kann unter diesen Bedingungen die biologische Aktivität von ms1-Gapmer nochmals näher untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Das murine Genom besteht zu nahezu 40 % aus repetitiven DNA-Elementen. Satelliten-DNAs, zu denen auch die *major satellite repeat*-DNA gehört, stellen eine eigene Gruppe solcher repetitiven DNA-Elemente dar, die zirka 4 % des Genoms einnehmen. Die *major satellite repeat*-DNA die eine Monomerlänge von 234 bp hat, kann als ununterbrochene repetitive Sequenzeinheit eine Länge von mehr als 2400 kb aufweisen und ist im perizentromeren Bereich der akrozentrischen Mauschromosomen lokalisiert. Obwohl das Perizentromer als Teil des konstitutiven Heterochromatins während des gesamten Zellzyklus stark kondensiert vorliegt, kommt es dennoch zur Transkription der *major satellite repeat*-DNA. Die Struktur und Funktion von *major satellite repeat*-Transkripten sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden *major satellite repeat*-Transkripte der Maus näher charakterisiert. Dafür wurden Nukleinsäurewirkstoffe entwickelt, deren biologische Wirksamkeit, im Sinne der Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten, überprüft wurde. Weiterhin wurden diese Nukleinsäurewirkstoffe eingesetzt um die biologische Funktion von *major satellite repeat*-Transkripten zu untersuchen. Als Modell wurde die gut charakterisierte murine Zelllinie NIH3T3 gewählt.

Mit der Northern Blot-Analyse und der RT-qPCR wurden zwei Nachweisverfahren etabliert, die eine detaillierte Analyse von *major satellite repeat*-Transkripten ermöglichte. Die Northern Blot-Analyse erlaubte Rückschlüsse zur Strangspezifität und Länge von *major satellite repeat*-Transkripten. Die RT-qPCR diente der quantitativen Analyse der *major satellite repeat*-Expression.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in NIH3T3-Zellen erstmals sowohl sense- als auch antisense major satellite repeat-Transkripte nachgewiesen werden, wobei deren heterogene Längenverteilung auffiel. Während sense major satellite repeat-Transkripte mit Längen von 1 kb bis > 6 kb nachgewiesen wurden, wiesen antisense major satellite repeat-Transkripte Größen von 4 kb bis > 6 kb auf. In unbehandelten NIH3T3-Zellen wurde eine Anzahl von ungefähr 600 major satellite repeat-Sequenzeinheiten pro Zelle bestimmt. Nach Hitzeschockbehandlung von NIH3T3-Zellen konnte erstmals gezeigt werden, dass sense major satellite repeat-Transkripte transient induziert wurden.

Für funktionelle Analysen der *major satellite repeat*-Expression wurden Nukleinsäurewirkstoffe entwickelt, deren biologische Aktivität, basierend auf der Suppression von *major satellite repeat*-Transkripten, überprüft wurde. Nach der computergestützter Analyse der *major satellite repeat*-RNA Sequenzen und ihrer vorhergesagten Sekundärstrukturen wurden zwei Zielbereiche in der *sense*- und ein Zielbereich in der *antisense major satellite repeat*-Sequenz ausgewählt. Gegen diese Sequenzen gerichtete Antisense-Oligonukleotide wurde chemisch modifiziert und als Voll-Phosphorothioat oder als Chimäre 2'O-Methyl-Phosphorothioat eingesetzt. Zusätzlich wurden sequenzhomologe siRNAs auf ihre biologische Aktivität gegenüber *major satellite repeat* Transkripten untersucht. Eines dieser Antisense-Oligonukleotide (ms1-PTO, IC₅₀ = 48 nM) sowie die sequenzhomologe siRNA (ms1-siRNA) waren sowohl unter normalen Zellkulturbe-dingungen als auch nach Hitzeschockinduktion von *sense major satellite repeat*-Transkripten hervor.

Unabhängig davon war die Transfektion von Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotiden mit einer Induktion von *sense-* und *antisense major satellite repeat-*Transkripten verknüpft. Diese Induktion war abhängig von der Länge und der Konzentration der Oligonukleotide, jedoch unabhängig von ihrem GC-Gehalt und der Sequenz.

Bei der Analyse der Funktion von *major satellite repeat*-Transkripten konnte eine Korrelation zwischen deren Expression und der Zellproliferation festgestellt werden. Dabei wiesen NIH3T3-Zellen deren *major satellite repeat*-Expression durch ms1-PTO supprimiert wurde eine verbesserte Proliferation auf. Aus der Analyse der Zellzyklusverteilung konnte kein eindeutiger Zusammenhang zur Zellproliferation abgeleitet werden. Die plasmidkodierte transiente Überexpression von *major satellite repeat*-Transkripten hatte keinen Einfluss auf die Proliferation von NIH3T3-Zellen.

Die neue biologische Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass neben der Hitzeschockbehandlung, auch die Lipofectamin[™]2000-vermittelte Transfektion von Phosphorothioatmodifizierten Oligonukleotiden einen Stresszustand in Säugerzellen hervorruft, der mit einer Induktion der *major satellite repeat*-Transkription verbunden ist. Die Verwendung dieser chemisch modifizierten Antisense-Wirkstoffe zur Untersuchung von *major satellite repeat*-Transkripten wird daher kritisch diskutiert.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

Agrawal S., Jiang Z., Zhao Q., Shaw D., Cai Q., Roskey A., Channavajjala L., Saxinger C., Zhang R. (1997) Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: *In vitro* and *in vivo* studies. PNAS, 94, 2620-2625.

Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. (1977) Method for detection of specific RNA's in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. PNAS, 74 (12), 5350-5354.

Alwine J.C., Kemp D.J., Parker B.A., Reiser J., Renart J., Stark G.R., Wahl G.M. (1979) Detection of specific RNA's or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazolbenzyloxymethyl-paper. Methods in Enzymology, 68, 220-242.

Amantana A. & Iversen P.L. (2005) Pharmacokinetics and biodistribution of phosphoroamidate morphorlino antisense oligomers. Current Opinion in Pharmacology, 5, 550-555.

Athanikar J.N., Badge R.M., Moran J.V. (2004) A YY1-binding site is required for accurat human LINE-1 transcription initiation. Nucleic Acids Research, 32 (13), 3846-3855.

Avery O.T., Macleod C.M. & McCarty M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. Journal of Experimental Medicine, 79 (2), 137-158.

Baker B.F., Lot S.S., Condon T.P., Cheng-Flournoy S., Lesnik E.A., Sasmor H.M., Bennet C.F. (1997) 2'-O-(2-Methoxy)ethhyl-modified Anti-intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) Oligonucleotides Selectivly Increase the ICAM-1 mRNA Level and Inhibit Formation of the ICAM-1 Translation Initiation Complex in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. The Journal of Biological Chemistry, 272 (18), 11994-12000.

Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. (2001) Role of a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature, 409, 363-366.

Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchinson E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V., Hannon G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. Nature Genetic, 35 (3), 215-217.

Bhindi R., Fahmy R.G., Lowe H.C., Chesterman C.N., Dass C.R., Cairns E.G., Sun L.Q., Khachigian L.M. (2007) Brothers in arms: DNA enzymes, short interfering RNA, and the emerging wave of small-molecule nucleic acid-based gene-silencing strategies. American Journal of Pathology, 171 (4), 1079-1088.

Bilanges B. & Stokoe D. (2005) Direct comparison of the specificity of gene silencing unsing antisense oligonucleotides and RNAi. Biochemical Journal, 388, 573-583.

Bo X., Lou S., Sun D., Shu W., Yang J., Wang S. (2006) Selection of antisense oligonucleotides based on multiple predicted target mRNA structures. BMC Bioinformatics, 7: 122.

Bonapace I.M., Latella L., Papait R., Nicassio F., Sacco A., Muto M., Grescenzi M., Di Fiore P.P. (2002) NP95 is regulated by E1A during mitotic reactivation of terminally differentiated cells and is essential fo S phase entry. The Journal of Cell Biology, 157 (6), 909-914.

Boulmé F., Freund F., Moreau S., Nielsen P.E., Gryaznov S., Toulmé J.-J., Litvak S. (1998) Modified (PNA, 2'-O-methyl and phoshoroamidate) anti-TAR antisense oligonucleotides as strong and specific inhibitors of *in vitro* HIV-1 reverse transcription. Nucleic Acids Research, 26 (23), 5492-5500.

Bouzinba-Segard H., Guais A., Francastel C. (2006) Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function. PNAS, 103 (23), 8709-8714.

Britten R.J. & Kohne D.E. (1968) Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. Science, 161 (841), 529-540.

Brockdorff N., Ashworth A., Kay G.F., McCabe V.M., Norris D.P., Cooper P.J., Swift S., Rastan S. (1992) The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactiv X-specific transcript containing no conserved ORF and located in th nucleus. Cell, 71 (3), 515-526.

Brown K.M., Chu C., Rana T.M. (2005) Target accessibility dictates the potency of human RISC. Nature Structural & Molecular Biology, 12 (5), 469-470.

Bumcrot D., Manoharan M., Koteliansky V., Sah D.W.Y. (2006) RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. Nature Chemical Biology, 2 (12), 2006.

Chen R., Yang Z., Zhou Q. (2004) Phosphorylated Positive Transcription Elongation Factor b (P-TEFb) Is Tagged for Inhibition through Association with 7SK snRNA. The Journal of Biological Chemistry, 279 (6), 4153-4160.

Chan J.H.P., Lim S., Wong W.S.F. (2006) Antisense Oligonucleotides: From Design to Therapeutic Application. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 33, 533-540.

Chiodi I., Corioni M., Giordano M., Valgardsdottir R., Ghigna C., Cobianchi F., Xu R.-M., Riva S., Biamonti G. (2004) RNA recognition motiv 2 directs the recruitments of SF2/ASF to nuclear stress bodies. Nucleic Acids Research, 32 (14), 4127-4136.

Cohen Z., Bacharach E., Lavi S. (2006) Mouse major satellite DNA is prone to eccDNA formation via DNA Ligase iV-dependent pathway. Oncogene, 25, 4515-4525.

Crooke S.T. (2004) Progress in Antisense Technology. Annual Review of Medicine, 55, 61-95.

Crooke S.T., Lemonidis K.M., Neilson L., Griffey R., Lesnik E.A., Monia B.P. (1995) Kinetic characteristics of *Escherichia coli* RNAse H1: cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes. Biochemical Journal, 312, 599-608.

De Clercq E., Eckstein E., Merigan T.C. (1969) Interferon induction increased through chemical modification of a synthetic polyribonucleotide. Science, 165 (898), 1137-1139.

Denegri M., Moralli D., Rocchi M., Biggiogera M., Raimondi E., Cobianchi F., De Carli L., Riva S., Biamonti G. (2002) Human Chromosome 9, 12 and 15 Contain the Nucleation Sites of Stress-Induced Nuclear Bodies. Molecular Biology of the Cell, 13, 2069-2079.

Detzer A., Engel C., Wünsche W., Sczakiel G. (2010, eingereicht) Cell stress is related to relocalization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells.

Dias N. & Stein C.A. (2002) Antisense Oligonucleotides : Basic concepts and Mechanism. Molecular Cancer Therapeutics, 1, 347-355.

Eckstein F. (2000) Phosphorothioate oligonucleotides: What is there origin and what is unique about them? Antisense Nucleic Drug Development, 10, 117-121.

Eckstein F. (2007) The versatility of oligonucleotides as potential therapeutics. Expert Opinion on Biological Therapy, 7 (7), 1021-1034.

Eichhorn M., Prospero T., Heussler V.T., Dobbelaere A.E. (1993) Antibodies against Major Histocompatibility Complex Class II Antigens Directly Inhibit the Growth of T Cell Infected with *Theileria parva* without Affecting Their Sate of Activation. Journal of Experimental Medicine, 178, 769-776.

Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. (2001a) RNA interference is mediated by 21- and 22nucleotide RNAs. Genes & Development, 15, 188-200.

Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001b) Duplex of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 411, 494-498.

Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T. (2001c) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. The EMBO Journal, 20 (23), 6877-6888.

Fedorov Y., Anderson E.M., Birmingham A., Reynolds A., Karpilow J., Robinson K., Leake D., Marshall W.S., Khvorova A. (2006) Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. RNA, 12, 1188-1196.

Feng X.-Z., He X.-S., Zhuang Y.-Z., Luo Q., Jiang J.-H., Yang S., Tang X.-F., Liu J.-L., Chen T. (2008) Investigation of transcriptional gene silencing and mechanism induced by shRNA targeted to *RUNX3 in vitro*. World Journal of Gastroenterology, 14 (19), 3006-3014.

Feschotte C. (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. Nature Reviews/ Genetics, 9, 397-405.

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998) Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 391, 806-811.

Flores S.C., Sunnerhagen P., Moore T.K., Gaubatz J.W. (1988) Characterization of repetitive sequence families in mouse heart small polydisperse circular DNAs: age-related studies. Nucleic Acids Research, 16 (9), 3889-3906.

Fukagawa T., Nogami M., Yoshikawa M., Ikeno M., Okazaki T., Takami Y., Nakayama T., Oshimura M. (2004) Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. Nature Cell Biology, 6 (8), 784-791.

Furdon P.J., Dominski Z., Kole R. (1989) RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds. Nucleic Acids Research, 17 (22), 9193-9204.

Furuno M., Pang K.C., Ninomiya N., Fukuda S., Frith M.C., Bult C., Kai C., Kawai J., Carnici P., Hayashizaki Y., Mattick J.S., Suzuki H. (2006) Clusters of Internally Primed Transcripts Reveal Novel Long Noncoding RNAs. PloS Genetics, 2 (4), 0537-0553.

Francastel C., Schübeler D., Martin D.I.K., Groudine M. (2000) Nuclear Compartmentalization and Gene Activity. Nature Reviews/ Molecular Cell Biology, 1, 137-143.

Gaubatz J.W. & Cutler R.G. (1990) Mouse Satellite DNA Is Transcribed in Senescent Cardiac Muscle. The Journal of Biological Chemistry, 265 (29), 17753-17758.

Grimm D. & Kay M.A. (2007) Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? The Journal of Clinical Investigation, 117 (12), 3633-3641.

Grünweller A., Wyszko E., Bieber B., Jahnel R., Erdmann V.A., Kurreck J. (2003) Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2´-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. Nucleic Acids Research, 31 (12), 3185-3193.

Guenatri M., Bailly D., Maison C., Almouzni G. (2004) Mouse centric and pericentric satellite repeats from distinct functional heterochromatin. The Journal of Cell Biology, 166 (4), 493-505.

Guo S. & Kemphues K.J. (1995), par-1, a gene required for establishing polarity in *C.elegans* enbryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell, 81, 611-620.

Haley B. & Zamore P.D. (2004) Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. Nature Structural & Molecular Biology, 11 (7), 599-606.

Hamilton A.J. & Baulcombe D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science, 286, 950-952.

Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature, 404, 293-296.

Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R., Hannon G.J. (2001) Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analysis of RNAi. Science, 293, 1146-1150.

Harel J., Hanania N., Tapiero H., Harel L. (1968) RNA Replikation by Nuclear Satellite DNA in Different Mouse Cells. Biochemical and Biophysikal Research Communications, 33 (4), 696-701.

Hennig W. (1999) Heterochromatin. Chromosoma, 108, 1-9.

Hörz W. & Altenburger W. (1981) Nucleotide sequence of mouse satellite DNA. Nucleic Acids Research, 9 (3), 683-696.

Hörz W. & Zachau H.G. (1977) Characterization of Distinct Segments in Mouse Satellite DNA by Restriction Nucleases. European Journal of Biochemistry, 73, 383-392.

Huang J., Fan T., Yan Q., Zhu H., Fox S., Issaq H.J., Best L., Gangi L., Munroe D., Muegge K. (2004) Lsh, an epigenetic guardian of repetitiv elements. Nucleic Acids Research, 32 (17), 5019-5028.

Hutvágner G. & Zamore P.D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. Science, 297, 2056-2060.

Hyde-DeRuyscher R.P., Jennings E., Shenk T. (1995) DNA binding site for the transcriptional activator/repressor YY1. Nucleic Acids Research, 23 (21), 4457-4465.

Inoue H., Hayase Y., Iwai S., Ohtsuka E. (1987) Sequence-dependent hydroysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H. FEBS, 215 (2), 327-330.

Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P.S. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nature Biotechnology, 21 (6), 635-637.

Jackson A.L., Burchard J., Leake D., Reynolds A., Schelter J., Guo J., Johnson J.M., Lim.L., Karpilow J., Nichols K., Marshall W., Khvorova A., Linsley P.S. (2006) Position-specific chemical modification of siRNA reduces "off-target" transcript silencing. RNA, 12, 1197-1205.

Jarmuż M., Glotzbach C.D., Bailey K.A., Bandyopadhyay R., Schaffer L.G. (2007) The Evolution of satellite III DNA subfamilies among primates. The American Journal of Human Genetics, 80 (3), 495-501.

Jarvis C.D., Geiman T., Vila-Storm S.K., Osipovich O., Akella U., Candeias S., Nathan I., Durum S.K., Muegge K. (1996) A novel putative helicase produced in early murine lymphocytes. Gene, 169, 203-207.

Jin H., Pan Y., Zhao L., Zhai H., Li X., Sun L., He L., Chen Y., Hong L., Du Y., Fan D. (2007) p75 Neurotrophin Receptor Suppresses the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells. Neoplasia, 9 (6), 471-478.

Jolly C., Konecny L., Grady D.L., Kutskovka Y.A., Cotto J.J., Morimoto R.I., Vourc'h C. (2002) In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromation during stress. The Journal of Cell Biology, 156 (5), 775-781. Jolly C., Metz A., Govin J., Vigneron M., Turner B.M., Khochbin S., Vourc'h C. (2004) Stressinduced transcription of satellite III repeats. The Journal of Cell Biology, 164 (1), 25-33.

Jones K.W. (1973) Satellite DNA. Journal of Medical Genetics, 10, 273-281.

Juliano R.L., Dixit V.R., Kang H., Kim T.Y., Miyamoto Y., Xu D. (2005) Epigenetic manipulation of gene expression: a toolkit for cell biologists. The Journal of Cell Biology, 169 (6), 847-857.

Kanellopoulou C., Muljo S.A., Kung A.L., Ganesan S., Drapkin R., Jenuwein T., Livingston D.M., Rajewsky K. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. Genes & Development, 19, 489-501.

Kit S. (1961) Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. Journal of Molecular Biology, 3, 711-716.

Kretschmer-Kazemi Far R., Nedbal W., Sczakiel G. (2001) Concepts to automate the theoretical design of effective antisense oligonucleotides. Bioinformatics, 17 (11), 1058-1061.

Kretschmer-Kazemi Far R. & Sczakiel G. (2003) The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oliginucleotiedes. Nucleic Acids Research, 31 (15), 4417-4424.

Kretschmer-Kazemi Far R., Leppert J., Frank K., Sczakiel G. (2005) Technical improvements in the computational target search for antisense oligonucleotides. Oligonucleotides, 15 (3), 223-233.

Kurose K., Hata K., Hattori M., Sakaki Y. (1995) RNA polymerase III dependence of the human L1 promotor and possible participation of the RNA polymerase II factor YY1 in the RNA polymerase III transcription system. Nucleic Acids Research, 23 (18), 3704-3709.

Kurreck J., Wyszko E., Gillen C., Erdmann V.A. (2002) Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. Nucleic Acids Research, 30 (9), 1911-1918.

Kurreck J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. European Journal of Biochemistry, 270, 1628-1644.

Kurreck J. (2006) siRNA Efficiency: Structure or Sequence-That Is the Question. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2006, 1-7.

Kuznetsova I.S., Prusov A.N., Enukashvily N.I., Podgornaya O.I. (2005) New types of mouse centromeric satellite DNAs. Chromosome Research, 13, 9-25.

Kuznetsova I., Podogornaya O., Ferguson-Smith M.A. (2006) High-Resolution organization of mouse centromeric and pericentromeric DNA. Cytogenetic and Genome Research, 112, 248-255.

Kuznetsova I.S., Enukashvily N.I., Noniashvili E.M., Shatrova A.N., Aksenov N.D., Zenin V.V., Dyban A.P., Podgornaya O.I. (2007) Evidence for the existence of satellite DNA-containing connection between metaphase chromosomes. Journal of Cellular Biochemistry., 101 (4), 1046-1061.

Lachner M., O'Sullivan R.J., Jenuwein T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. Journal of Cell Science, 116 (11), 2117-2124.

Lai J.C., Benimetskaya L., Santella R.M., Wang Q., Miller P.S., Stein C.A. (2003) G3139 (Oblimersen) may inhibit prostate cancer cell growth in a partially bis-CpG-dependent nonantisense manner. Molecular Cancer Therapeutics, 2, 1031-1043.

Lehnertz B., Ueda Y., Derijck A.A.H.A., Braunschweig U., Perez-Burgos L., Kubicek S., Chen T., Li E., Jenuwein T., Peters A.H.F.M. (2003) Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. Current Biology, 13, 1192-1200.

Liu J., Carmell M.A., Rivas F.V., Marsden C. G., Thomson J.M., Song J.-J., Hammond S.M., Joshua-Tor L., Hannon G.J. (2004) Argonaute2 is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. Science, 305, 1437-1441.

Liu X., Szary J., Kofoed E.M., Schaufele F. (2007) Functional Sequestration of Transcription Factor Activity by Repetitiv DNA. The Journal Of Biological Chemistry, 282 (29), 20868-20876.

Lin X., Ruan X., Anderson M.G., McDowell J.A., Kroeger P.E., Fesik S.W., Shen Y. (2005) siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. Nucleic Acids Research, 33 (14), 4527-4535.

Lok C.-N., Viazovkina E., Min K.-L., Nagy E., Wilds C.J., Damha M.J., Parniak M.A. (2002) Potent Gene-Specific Inhibitory Properties of Mixed-Backbone Antisense Oligonucleotides Comprised of 2`-Deoxy-2`-fluoro-D-arabinose and 2`-Deoxyribose Nucleotides. Biochemistry, 41, 3457-3467.

Lu J. & Gilbert D.M. (2007) Proliferation-dependent and cell cycle-regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. The Journal of Cell Biology, 179 (3), 411-421.

Maison C., Bailly D., Peters A.H.F.M., Quivy J.-P., Roche D., Taddai A., Lachner M., Jenuwein T., Almouzni G. (2002) Higher-order structure in pericentric heterochroamatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. Nature Genetic, 30, 329-334.

Maison C. & Almouzni G. (2004) HP1 and the Dynamics of Heterochromatin Maintenance. Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 5, 296-304.

Martens J.H.A., O'Sullivan R.J., Braunschweig U., Opravil S., Radlof M., Steinlein P., Jenuwein T. (2005) The profile of repeat-associated histon lysine methylation states in the mouse epigenome. The EMBO Journal, 24, 800-812.

Mathews D.H., Zuker S.J., Turner D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. Journal of Molecular Biology, 288, 911-940.

McLeskey S., McDill B.W., Yang J., Rauchman M. (2002) Murine Sall1 Represses Transcription by Recruiting a Histone Deacetylase Complex. The Journal of Biological Chemistry, 277 (17), 14869-14876.

Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. (2004) Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. Molecular Cell, 15, 185-197.

Meister G. & Tuschl T. (2004) Mechanism of gene silencing by double-stranded RNA. Nature, 431, 343-349.

Metz A., Soret J., Vourc'h C., Tazi J., Jolly C. (2004) A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. Journal of Cell Science, 117 (19), 4551-4558.

Miyagishi M., Hayashi M., Taira K. (2003) Comparison of the Suppressive Effects of Antisense Oligonucleotides and siRNA Directed Against the Same Targets in Mammalian Cells. Antisense and nucleic Acid Drug Development, 13, 1-7.

Monia B.P., Lesnik E.A., Gonzales C., Lima W.F., McGee D., Guinosso C.J., Kawasaki A.M., Cook P.D., Freier S.M. (1993) Evaluation of 2'-Modified Oligonucleotides Containing 2'-Deoxygaps as Antisense Inhibitors of Gene Expression. The Journal of Biological Chemistry, 268 (19), 14514-14522.

Morita S., Horii T., Kimura M., Goto Y., Ochiya T., Hatada I. (2007) One Argonaute family member, *Eif2c2* (*Ago2*), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. Genomics, 89, 687-696.

Muchardt C., Guillemé M., Seeler J.-S., Trouche D., Dejean A., Yaniv M. (2002) Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α . EMBO reports, 3 (10), 975-981.

Murchinson E.P., Patridge J.F., Tam O.H., Cheloufi S., Hannon G.J. (2005) Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. PNAS, 102 (34), 12135-12140.

Muto M., Kanari Y., Kubo E., Takabe T., Kurihara T., Fujimori A., Tatsumi K. (2002) Targeted Disruption of *NP95* Gene Renders Murine Embryonic Stem Cells Hypersensitive to DNA Damaging Agents and DNA Replication Blocks. The Journal Of Biological Chemistry, 277 (37), 34549-34555.

Ng K., Pullirsch D., Leeb M., Wutz A. (2007) *Xist* and the order of silencing. EMBO reports, 8 (1), 34-39.

Nielsen P.E. (2004) PNA Technology. Molecular Biotechnology, 26, 233-248.

Novobrantseva T. I., Akinc A., Borodovsky A., de Fougerolles A. (2008) Delivering silence: Advancements in developing siRNA therapeutics. Current Opinion in Drug Discovery & Development, 11 (2), 217-224.

Okazaki Y., Furuno M., Kasukawa T., Adachi J., Bono H., Kondo S., Nikaido I., Osato N., Saito R., Suzuki H., Yamanaka I., Kiyosawa H., Yaqi K., Tomaru Y., Hasegawa Y., Nogami A., Schönbach C., Gojobori T., Baldarelli R., Hill D.P., Bult C., Hume D.A., Quackenbusch J., Schriml L.M., Matsuda H., Batalov S., Beisel K.W., Blake J.A., Bradt D., Brusic V., Chothia C., Corbani L.E., Cousins S., Dalla E., Dragani T.A., Fletcher C.F., Forrest A., Frazer K.S., Gaasterland T., Gariboldi M., Gissi C., Godzik A., Gough J., Grimmond S., Gustincich S., Hirokawa N., Jackson I.J., Jarvis E.D., Kanai A., Kawaji H., Kawasawa Y., Kedzierski R.M., King B.L., Konagaya A., Kurochkin I.V., Lee Y., Lenhard B., Lyons P.A., Maglott D.R., Maltais L., Marchionni L., McKenzie L., Miki H., Nagashima T., Numata K., Okido T., Pavan W.J., Pertea G., Pesole G., Petrovsky N., Pillai R., Pontius J.U., Qi D., Ramachandran S., Ravasi T., Reed J.C., Reed D.J., Reid J., Ring B.Z., Ringwald M., Sandelin A., Schneider C., Semple C.A.M., Setou M., Shimanda K., Sultana R., Takenaka Y., Taylor M.S., Teasdale R.D., Tomita M., Verardo R., Wagner L., Wahlestedt C., Wang Y., Watanabe Y., Wells C., Wilming L.G., Wynshaw-Boris A., Yanagisawa M., Ynag I., Yang L., Yuan Z., Zavolan M., Zhu Y., Zimmer A.: FANTOM Consortium: Carninci P., Hayatsu N., Hirozane-Kishikawa T., Konno H., Nakamura M., Sakazume N., Sato K., Shiraki T., Waki K.: RIKEN Genome explartion Research Group Phase I Team; Kawai J., Aizawa K., Arakawa T., Fukuda S., Hara A., Hashizume W., Imotani K., Ishii Y., Itoh M., Kagawa I., Miyazaki A., Sakai D., Shibata K., Shinagawa A., Yasunishi A., Yoshino M.: RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team; Waterston R., Lander E.S., Rogers J., Birney E.: Mouse genome Sequencing Consortium; Hayashizaki Y.: Scientific management (2002) Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. Nature, 420, 563-573.

Orban T.I. & Izaurralde E. (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. RNA, 11, 459-469.

Orr R.M. (2001) Technology evaluation: formivirsen, Isis Pharmaceuticals Inc/CIBA vision. Current Opinion in Moecular Therapy, 3 (3), 288-294.

Ostertag E.M. & Kazazian Jr H.H. (2001) Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. Annual Review in Genetic, 35, 501-538.

O'Sullivan A.W., Wang J.H., Redmond H.P. (2009) P38 MAP Kinase inhibition promotes primary tumour growth via VEGF independent mechanism. World Journal of Surgical Oncology, 7 (89).

Overhoff M., Alken M., Far R.K., Lemaitre M., Lebleu B., Sczakiel G., Robbins I. (2005) Local RNA target structure influences siRNA efficasy: a systematic global analysis. Journal of Molecular Biology, 348 (4), 871-881.

Papait R., Pistore C., Negri D., Pecoraro D., Cantarini L., Bonapace I.M. (2007) NP95 is Implicated in Pericentromeric Heterochromatin Replication and in Major Satellite Silencing. Molecular Biology of the Cell, 18, 1098-1106. Pardue M.L. & Gall J.G. (1970) Chromsomal localization of mouse satellite DNA. Science, 168 (937), 1356-1358.

Patzel V., Steidel U., Kronenwett R., Haas R., Sczakiel G. (1999) A theoretical approach to select effectice antisense oligodesoxyribonucleotides at high statistical propability. Nucleic Acids Research, 27 (22), 4328-4334.

Plohl M., Luchetti A., Meštrović N., Mantovani B. (2008) Satellite DNAs between selfishness and fucntionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. Gene, 409, 72-82.

Ponzetto-Zimmerman C. & Wolgemuth D.J. (1984) Methylation of satellite sequences in mouse spermatogenic and somatic DNAs. Nucleic Acids Research, 12 (6), 2807-2822.

Pulukuri S.M., Gondi C.S., Lakka S.S., Jutla A., Estes N., Gujrati M., Rao J.S. (2005) RNA Interference-directed Knockdown of Urokinase Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator Receptor Inhibits Prostate Cancer Cell Invasion, Survival, and Tumorigenicity in Vivo. The Journal Of Biological Chemistry, 280 (43), 36529-36540.

Quivy J.P., Roche D., Kirschner D., Tagami H., Nakatani Y., Almouzni G. (2004) A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. The EMBO Journal, 23 (17), 3516-3526.

Raffo A., Lai J.C., Stein C.A., Miller P., Scaringe S., Khvorova A., Benimetskaya L. (2004) Antisense RNA Down-Regulation of bcl-2 Expression in DU145 Prostate Cancer Cells Does Not Diminish the Cytostatic effects of G3139 (Oblimersen). Clinical Cancer Research, 10, 3195-3206.

Rana T.M. (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. Nature Reviews/ Molecular Cell Biology, 8, 23-36.

Rayburn E.R. & Zhang R. (2008) Antisense, RNAi, and Gene Silencing Strategies for Therapy: Mission Possible or Impossible? Drug Discovery Today, 13 (11-12), 513-521.

Richard G.-F., Kerrest A., Dujon B. (2008) Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eykaryotes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72 (4), 686-727.

Richards E.J. & Elgin S.C.R. (2002) Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Runding up the Usual Suspects. Cell, 108, 489-500.

Rizzi N., Denegri M., Chiodi I., Corioni M., Valgardsdottir R., Cobianchi F., Riva S., Biamonti G. (2004) Transcriptional Activation of a Constitutive Heterochromatic Domain of the Human Genome in Response to Heat Shock. Molecular Biology of the Cell, 15, 543-551.

Rudert F., Bronner S., Garnier J.-M. Dollé P. (1995) Transcripts form opposite strands of γ satellite DNA are differentially expressed during mouse development. Mammalian Genome, 6, 76-83.

Sambrook J. & Russel D.W. (2001) Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 3. Auflage.

Sanford J., Forrester L., Chapman V. (1984) Methylation patterns of repetitiv DNA sequences in germ cells of *Mus musculus*. Nucleic Acids Research, 12 (6), 2823-2836.

Schoeftner S. & Blasco M.A. (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomers by DNA-dependent RNA polymerase II. Nature Cell Biology, 10 (2), 228-236.

Schubert S., Grünweller A., Erdmann V.A., Kurreck J. (2005) Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. The Journal of Molecular Biology, 348 (4), 883-893.

Schwarz D.S., Hutvágner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D. (2003) Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. Cell, 115, 199-208.

Shao Y., Chan C.Y., Maliyekkel A., Lawrence C.E., Roninson I.B., Ding Y. (2007) Effect of target secondary structure on RNAi efficiency. RNA, 13, 1631-1640.

Shen L.X., Kandimalla E.R., Agrawal S. (1998) Impact of Mixed-backbone Oligonucleotides on Target Binding Affinity and Target Cleaving Specifity and Selectivity by *Escherichia coli* RNase H. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 6, 1695-1705.

Shestakova E.A., Mansuroglu Z., Mokrani H., Ghinea N., Bonnefoy E. (2004) Transcription factor YY1 associates with pericentromeric γ -satellite DNA in cycling but not in quiescent (G₀) cells. Nucleic Acids Research, 32 (14), 4390-4399.

Shi S.-L., Wang Y.-Y., Liang Y., Li Q.-F. (2006) Effects of tachyplesin and n-sodium butyrate on proliferation and gene expression of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823. World Journal of Gastroenterology, 12 (11), 1694-1698.

Shibahara S., Mukai S., Nishihara T., Inoue H., Ohtsuka E., Hirokazu M. (1987) Site-directed cleavage of RNA. Nucleic Acids Research, 15 (11), 4403-4415.

Sierakowska H., Sambade M.J., Agrawal S., Kole R. (1996) Repair of the thalassemic human β -globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. PNAS, 93, 12840-12844.

Smith L., Bahl K., Hovgaard L., Jaroszewski J.W. (2000) Rational selection of antisense oligonucleotide sequences. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 11, 191-198.

Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Röhl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliansky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocjer H.-P. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systematic administration of modified siRNA. Nature, 432, 173-178.

Speek M. (2001) Antisense Promotor of Human L1 Retrotransposon Drives Transcription of Adjacent Cellular Genes. Molecular and Cellular Biology, 21 (6), 1973-1985.

Stein C.A., Subasinghe C., Shinozuka K., Cohen J.S. (1988) Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Research, 16 (8), 3209-3221.

Stessl M., Marchetti-Deschmann M., Winkler J., Lachmann B., Allmaier G., Noe C.R. (2009) A proteomic study reveals unspecific apoptosis induction and reduction of glycolytic enzymes by the phosphorothioate antisense oligunucleotide oblimersen in human melanoma cells. Journal of Proteomics, 72, 1019-1030.

Tabara H., Sarkissian M., Kelly W.G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A., Mello C.C. (1999) The rde-1 Gene, RNA Interference, and Transposon Silencing in *C. elegans*. Cell, 99, 123-132.

Tam O.H., Aravin A.A., Stein P., Girard A., Murchinson E.P., Cheloufi S., Hidges E., Anger M., Sachidanandam R., Schultz R.M., Hannon G.J. (2008) Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. Nature, 453 (7194), 534-538.

Tang Q.-Q. & Lane M.D. (1999) Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancerbinding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. Genes & Development, 13, 2231-2241.

Tomilin N.V. (2008) Regulation of mammalian gene expression by retroelements an noncoding tandem repeats. BioEssays, 30, 338-348.

Tschaharganeh D., Ehemann V., Nussbaum T., Schirmacher T., Breuhahn K. (2007) Nonspecific Effects of siRNA in Tumor Cells with Implications on Therapeutic Applicability Using RNA Interference. Pathology Oncology Research, 12 (2), 84-90.

Uemura T., Kubo E., Kanari Y., Ikemura T., Tatsumi K., Muto M. (2000) Temporal and spatial localization of novel nuclear protein NP95 in mitotic and meiotic cells. Cell Structure and Function, 25 (3), 149-159.

Ugarković D. (2005) Functional elements residing within satellite DNAs. EMBO reports, 6 (11), 1035-1039.

Valgardsdottir R., Chiodi I., Giordano M., Cobianchi F., Riva S., Biamonti G. (2005) Structural and Functional Characterization of Noncoding Repetitive RNAs Transcribed in Stressed Human Cell. Molecular Biology of the Cell, 16, 2597-2604.

Valgardsdottir R., Chiodi I., Giordano M., Rossi A., Bazzini S., Ghigna C., Riva S., Biamonti G. (2007) Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells. Nucleic Acids Research, 36 (2), 423-434.

Vester B. & Wengel J. (2004) LNA (Locked Nucleic Acid): Hgh Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA. Biochemistry, 43 (42), 13233-13241.

Vickers T. A., Koo S., Bennett C.F., Crooke S.T., Dean N.M., Baker B.F. (2003) Efficient Reduction of Target RNAs by Small Interfering RNA an Rnase H-dependent Antisense Agents. The Journal Of Biological Chemistry, 278 (9), 7108-7118.

Vissel B. & Choo K.H. (1989) Mouse Major (γ) Satellite DNA is Highly Conserved and Organized into Extremly Long Tandem Arrays: Implication for Recombination between Nonhomologous Chromosomes. Genomics, 5, 407-414.

Vogelsang F. (2006) Charakterisierung von *major satellite repeat*-Transkripten im murinen Zellsystem. Bachelorarbeit, Universität zu Lübeck.

Volpe T.A., Kidner C., Hall I.M., Teng G., Grewal S.I.S., Martienssen R.A. (2002) regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi. Science, 297, 1833-1837.

Waring M. & Britten R.J. (1966) Nucleotide sequence repetition: a rapidly reassociating fraction of mouse DNA. Science, 154 (750), 791-794.

Wassarman D.A. & Steitz J.A. (1991) Structural Analyses of the 7SK Ribonucleoprotein (RNP), the Most Abundant Human Small RNP of Unknown Function. Molecular and Cellular Biology, 11 (7), 3432-3445.

Wassenegger M. & Pélissier T. (1998) A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. Plant Mol Biol., 37 (2), 349-362.

Watanabe T., Totoki Y., Toyoda A., Kaneda M., Kuramochi-Miyagawa S., Obata Y., Chiba H., Kohara Y., Kono T., Nakano T., Surani M.A., Sakaki Y., Sasaki H. (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. Nature, 453 (7194), 539-543.

Waterston R.H., Lindblad-Toh K., Birney E., Rogers J., Abril J.F., Agarwal P., Agarwala R., Ainscough R., Alexandersson M., An P., Antonarakis S.E., Attwood J., Baertsch R., Bailley J., Barlow K., Beck S., Berry E., Birren B., Bloom T., Bork P., Botcherby M., Bray N., Brent M.R., Brown D.G., Brown S.D., Bult C., Burton J., ButlEr J., Campbell R.D., Carninci P., Cawley S., Chiaromonte F., Chinwalla a.T., Church D., Clamp M., Clee C., Collins F.S., Cook L.L., Copley R.R., Coulson A., Couronne O., Cuff J., Curwen V., Cutts T., Daly M., David R., Davies J., Delehaunty K.D., Deri J., Dermitzakis E.T., Dewey C., Dickens N.J., Diekhans M., Dodge S., Dubchack I., Dunn D.M., Eddy S.R., Elnitski L., Emes R.D., Eswara P., Eyras E., Felsenfeld A., Fewell G.A., Flicek P., Foley K., Frankel W.N., Fulton L.A., Fulton R.S., Furey T.S., Gage D., Gibbs R.A., Glusman G., Gnerre S., Goldman N., Goodstadt L., Grafham D., Graves T.A., Green E.D., Gregory S., Guigó R., Guyer M., Hardison R.C., Haussler D., Hayashizaki Y., Hillier L.W., Hinrichs A., Hlavina W., Holzer T., Hsu F., Hua A., Hubbard T., Hunt A., Jackson I., Jaffe D.B., Johnson L.S., Jones M., Jones T.A., Joy A., Kamal M., Karlsson E.K., Karolchik D., Kasprzyk A., Kawai J., Keibler E., Kells W.J., Kirby A., Kolbe D.L., Korf I., Kucherlapati R.S., Kulbokas III E.J., Kulp D., Landers T., Leger J.P., Leonard S., Letunic I., Levine R., Li J., Li M., Lloyd C., Lucas S., Ma B., Maglott D.R., Mardis E.R., Matthwes L., Maucelli E., Mayer J.H., McCarthy M., McCombie W.R., McLaren S., McLay K., McPherson J.D., Meldrim J., Meredith B., Mesirov J.P., Miller W., Miner T.L., Mongin E., Montgomery K.T., Morgan M., Mott R., Mullikin J.C., Muzny D.M., Nash W.E., Nelson J.O., Nhan M.N., Nicol R., Ning Z., Nusbaum C., O'Connor M.J., Okazaki Y., Oliver K., Overton-Larty E., Pachter L., Parra G., Pepin K.H., Peterson J., Pevzner P., Plumb R., Pohl G.S., Poliakov Al., Ponce T.C., Ponting C.P., Potter S., Quail M., Reymond A., Roe B.A., Roskin K.M., Rubin E.M., Rust A.G., Santos R., Saojnikov V., Schultz B., Schultz J., Schwartz S., Scott C., Seaman S., Searle S., Sharpe T., Sheridan A., Shownkeen R., Sims S., Singer J.B., Slater G., Smit A., Smith D., Spencer B., Stabenau A., Stange-Thomann N., Sugnet C., Suyama M., Tesler G., Thompson J., Torrents D., Trevaskis E., Tromp J., Ucla C., Ureta-Vidal A., Vinson J.P., von Niederhausern A.C., Wade C.M., Wall M., Weber R.J., Weiss R.B., Wendel M.C., West A.P., Wetterstrand K., Wheeler R., Whelan S., Wierzbowski J., Willey D., Williams S., Wilson R.K., Winter E., Worley K.C., Wyman D., Yang S., Yang S.-P., Zdobnov E.M., Zody M.C., Lander E.S. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature, 420, 520-562.

Watson J.D. & Crick F.H. (1953a) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 171 (4356), 737-738.

Watson J.D. & Crick F.H. (1953b) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature, 171 (4361), 964-967.

Westerhout E.M & Berkhout B. (2007) A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference. Nucleic Acids Research, 35 (13), 4322-4330.

Wilkinson F.H., Park K., Atchinson M.L. (2006) Polycomb recruitment to DNA in vivo by YY1 REPO domain. PNAS, 103 (51), 19296-19301.

Winkler J., Stessl M., Amartey J., Noe C.R. (2010) Off-Target Effects Related to the Phosphorothioate Modification of Nucleic Acids. ChemMedChem, 5 (8), 1344-1352.

Wong A.K.C. & Rattner J.B. (1988) Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. Nucleic Acids Research, 16 (24), 11645-11661.

Yamashita K., Sato A., Asashima M., Wang P.-C., Nishinakamura R. (2007) Mouse homolog of SALL1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, binds to A/T-rich sequences in pericentric heterochromatin via its C-terminal zinc finger domains. Genes to Cells, 12, 171-182.

Yan Q., Huang J., Fan T., Zhu H., Muegge K. (2003) Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. The EMBO Journal, 22, 5154-5162.

Yoo B.H., Bochkareva E., Bochkarev A., Mou T.-C., Gray D.M. (2004) 2'-O-methyl-modified phosphorothioate antisense oligonucleotides have reduced non-specific effects *in vitro*. Nucleic Acids Research, 32 (6), 2008-2016.

Zamecnik P.C. & Stephenson M.L. (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication an cell transformation by a specific oligodeoxynucelotide. PNAS, 75 (1), 280-284.

Zamore P.D. Tuschel T., Sharp P.A., Bartel D.P. (2000) RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. Cell, 101, 25-33.

Zamore P.D. & Haley B. (2005) Ribo-gnome: The Big World of Small RNAs. Science, 309, 1519-1524.

Zhang Y., Cristofaro P., Silbermann R., Pusch O., Boden D., Konkin T., Hovanesian V., Monfils P.R., Resnick M., Moss S.F., Ramratnam B. (2006) Engineering Mucosal RNA Interference *in Vivo*. Molecular Therapy, 14, 336-342.

Zhu H., Geiman T.M., Xi S., Jiang Q., Schmidtmann A., Chen T., Li E., Muegge K. (2006) Lsh is involved in *de novo* methylation of DNA. The EMBO Journal, 25, 335-345.

Zuker M. (1989) On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. Science, 244, 48-52.

7.2 Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Patent: <u>Jahn N.</u>, Kretschmer-Kazemi Far R., Sczakiel G. Patent Nr.: 10 2007 040 718; IPC: C12Q 1/68 (2006.01):Oligonukleotide zur Hemmung und Detektion von "mouse major satellite"-Sequenzen. (2008)

Poster: Jahn N., Kretschmer-Kazemi Far R., Singh P., Sczakiel G. Characterisation of mouse major satellite Transcripts and antisense tools for their suppression. 2. Transregio 5 Symposium Chromatin: Assembly and Inheritance of Functional States, München. (2007)

Poster: <u>Jahn N.</u>, Kretschmer-Kazemi Far R., Singh P., Sczakiel G. Characterisation of mouse major satellite Transcripts and antisense tools for their suppression. EMBO Conference on Chromatin and Epigenetics, Heidelberg. (2007)

Poster: <u>Jahn N.</u>, Overhoff M., Kretschmer-Kazemi Far R., Singh P., Sczakiel G. Targeting mouse major satellite transcripts. 4. Meeting of the GBM Study Section "RNA-Biochemistry" Kassel. (2006)

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg Sczakiel für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitschaft zur Diskussion und die Unterstützung auch in schweren Zeiten.

Bei Dr. Rosel Kretschmer Kazemi-Far möchte ich mich für die Unterstützung bei der Entwicklung der Nukleinsäurewirkstoffe und ihre stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Prim Singh, Dr. Thomas Scholzen und Dr. Jörn Bullwinkel, vom Forschungszentrum Borstel, die mir die Untersuchung des Zellzyklus nähergebracht haben und mit Vorschlägen und Ideen diese Arbeit bereichert haben.

Kirsten Frank und Gabriele Kreutzfeld danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor, aber vor allem für das angenehme Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich mich bei Petra Höltig bedanken, die mir bei der Korrektur der Arbeit der Arbeit geholfen hat und mit ihrem Engagement dafür gesorgt hat, dass ich diese Arbeit beende.

Mein Dank gilt ebenso alle anderen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin, die durch ihre Hilfsbereitschaft ein angenehmes Arbeitsklima geschaffen haben.

Mein großer Dank gilt Frau Dr. Branke und Herrn Frank die mich in einer schwierigen Situation aufgefangen und aufgebaut haben und damit die Vollendung dieser Arbeit ermöglichten.

Ich möchte ich mich ebenfalls bei den Mitbewohnern meiner Wohngemeinschaft und bei meinen Freunden Merle, Tina und Martin bedanken, die mir in allen Dingen zur Seite standen und stehen.

Zuletzt möchte ich meinem besten Freund und auch größten Kritiker Carsten für seinen unerschütterlichen und unbestechlichen Humor danken.