

Die Beeinflussung von Zellen durch kommerziell vertriebene Transfektionsreagenzien und Negativkontroll-siRNAs

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jan Magnus Kleefeldt
aus Lörrach

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

in Kooperation mit dem

Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung

W.G. Kerckhoff-Institut

Gutachter: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachterin: PD Dr. Jacqueline Heger

Tag der Disputation: 18.10.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Experiment in der Wissenschaft	1
1.2 RNA-Interferenz.....	1
1.2.1 Der Mechanismus der RNA-Interferenz	1
1.2.2 Endogene kurze RNA-Sequenzen	4
1.2.3 Biologische Relevanz der RNA-Interferenz	5
1.2.4 Bedeutung der RNA-Interferenz in der Forschung	6
1.2.5 Problematiken der Methode der RNA-Interferenz.....	6
1.3 Optimierung und Entwerfen einer siRNA.....	10
1.4 Transfektion; Die Bereitstellung von Nukleotidsequenzen	11
1.5 TGF- β -Signalweg.....	14
1.5.1 Signaltransduktion vom Liganden bis zur Genregulation.....	14
1.6 Negativkontroll-siRNA im RNAi-Experiment	17
2 Hypothese und Ziel der Studie	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Zelllinien	20
3.1.2 Primäre Zellen	20
3.1.3 Materialien	20
3.1.4 Liste der verwendeten Geräte.....	26
3.1.5 Liste der verwendeten Software	28

3.2	Methoden.....	29
3.2.1	Zellkultur.....	29
3.2.2	Transfektion der siRNAs.....	33
3.2.3	RNA-Extraktion aus den Zellen.....	34
3.2.4	cDNA-Synthese.....	35
3.2.5	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR	36
3.2.6	Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	38
3.2.7	Proteinaufkonzentrierung und Proteinelektrophorese	39
3.2.8	Western-Blot-Analyse.....	40
3.2.9	Bestimmung der Zellproliferationsrate	41
3.2.10	Bestimmung der Zellviabilität.....	42
3.2.11	Statistische Analyse.....	43
4	Ergebnisse.....	44
4.1	Transfektionsreagenzien beeinflussen die mRNA-Steady-State-Level	44
4.2	Negativkontroll-siRNAs beeinflussen die mRNA-Steady-State-Level	49
4.3	Negativkontroll-siRNAs beeinflussen Protein-Level im Western Blot	59
4.4	Negativkontroll-siRNAs beeinflussen Zellproliferation und Zellviabilität	64
5	Diskussion	68
5.1	Nicht targetspezifische Effekte	69
5.2	TGF- β -Signalweg und Zelltypen	70
5.3	Transfektion; Konzentrationsfestlegung der Negativkontroll-siRNAs und Auswahl der Transfektionsreagenz	71
5.4	Effekte der Transfektionsreagenz und der Negativkontroll-siRNAs	74
5.5	Evaluation der Methoden	77
5.6	Fazit und Ausblick	78
6	Zusammenfassung	81
7	Summary.....	82

Inhaltsverzeichnis

8	Literaturverzeichnis	83
9	Anhang	99
10	Ehrenwörtliche Erklärung	105
11	Publikationsverzeichnis	106
11.1	Kongressbeiträge.....	106
11.2	Publikation	106
12	Danksagung	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: siRNA und RNAi-Mechanismus.....	3
Abbildung 2: Off-Target-Effekte	8
Abbildung 3: Lipofektion.....	12
Abbildung 4: TGF- β Signalweg	15
Abbildung 5: Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	32
Abbildung 6: Effekte der Transfektionsreagenzien auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.....	45
Abbildung 7: Effekte der Transfektionsreagenzien auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.....	47
Abbildung 8: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.....	49
Abbildung 9: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.....	51
Abbildung 10: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.....	53
Abbildung 11: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in MLE-12.....	55
Abbildung 12: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in MLE-12.....	56
Abbildung 13: Effekte der Negativkontroll-siRNA auf die Proteinmenge in Fibroblasten.....	59
Abbildung 14: Densitometrische Analyse der Effekte der Negativkontroll-siRNA auf die Proteinmenge in primären Mäuselungenfibroblasten.	61
Abbildung 15: Densitometrische Analyse der Effekte der Negativkontroll-siRNA auf die Proteinmenge in NIH/3T3-Zellen.	62
Abbildung 16: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellproliferation und Zellviabilität in Mäuselungenfibroblasten.	64
Abbildung 17: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellproliferation und Zellviabilität in NIH/3T3-Zellen.....	66
Abbildung 18: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellproliferation in primären Mäuselungenfibroblasten.....	99
Abbildung 19: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellviabilität in primären Mäuselungenfibroblasten.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellproliferation in NIH/3T3-Zellen.....	102
Abbildung 21: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellviabilität in NIH/3T3-Zellen.....	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Konditionen der Zellbehandlung.....	33
Tabelle 2:	Pipettierschema der Transfektion.....	34
Tabelle 3:	Mastermixzusammensetzung [Volumen/Probe] der Reverse- Transkriptase-PCR	35
Tabelle 4:	Thermocyclerprogramm für Reverse-Transkriptase-PCR	36
Tabelle 5:	Real Time qPCR Programm.....	37
Tabelle 6:	Pipettierschema der Real Time qPCR [Volumen/Probe].....	37
Tabelle 7:	Zusammensetzung des 10× SDS Laufpuffer für Western Blot.....	39
Tabelle 8:	Zusammensetzung des 5 % BSA-Blockierpuffer für Western Blot.....	39
Tabelle 9:	Zusammensetzung des 1 × PBS Waschpuffer für Western Blot.....	40
Tabelle 10:	Zusammensetzung des Abstreifpuffers für Western Blot	40
Tabelle 11:	Blindkontrollen und Hintergrundkontrollen zum Proliferations-Kit	41
Tabelle 12:	Blindkontrollen und Hintergrundkontrollen zum Viabilitäts-Kit.....	42
Tabelle 13:	Zusammenfassung der Einflüsse der Transfektionsreagenzien auf die mRNA-Level der untersuchten Gene der primären Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen	48
Tabelle 14:	Zusammenfassung der Einflüsse der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Level primärer Mäuselungenfibroblasten, NIH/3T3- und MLE-12-Zellen.....	58

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2'-OMe	2'-O-Methyl
7-EAA	7-Ethynyl-8-aza-7-deazaadenosin
AG	Arbeitsgruppe
Ago2	Argonatenprotein 2
ALK	<i>Activin-like kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> – Varianzanalyse
as	Antisense
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> – komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
coSMAD	<i>Common-mediator SMAD</i>
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> – doppelsträngige RNA

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ER	Endoplasmatischen Retikulums
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
h	<i>Hour(s)</i>
HAT	Histon-Acetyltransferase
INF	Interferon
I-SMAD	Inhibitorisches SMAD
JAK-STAT	<i>Januskinase-Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
LCC	<i>Large-latent complex</i>
LGP2	<i>Laboratory of genetics-physiology 2</i>
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
LTBP	Latent TGF- β -bindendes Protein
M	Molar
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
min	Minute
miRNA	MicroRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteasen
mRNA	<i>Messenger-RNA – Boten-RNA</i>

Abkürzung	Bedeutung
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nm	Nanometer
nt	Nukleotiden
P/S	Penicillin/Streptomycin
<i>PAI-1</i>	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Polymerase-Kettenreaktion
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
piRNA	Piwi-interagierende RNA
PKR	Proteinkinase R
pmol	Pikomol
<i>Polr2a</i>	<i>RNA Polymerase II Untereinheit A</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PS	Phosphorthioaten
PTGS	Post-transkriptioneller Mechanismus der Gen- Stilllegung
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLC	RISC-ladenden Komplex
RLR	RIG-I-ähnlichen-Rezeptoren
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> – Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

Abkürzung	Bedeutung
RNAse	Ribonuklease
R-SMAD	Rezeptor-regulierte SMAD
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	<i>Real time quantitative</i> Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
s	Sense
saRNA	<i>Small activating</i> RNA – kleine aktivierende RNA
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> – Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>Small hairpin</i> RNA – kleine Haarnadel RNA
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA – kleine interferierende RNA
SMAD2	<i>Mothers against decapentaplegic Isoform 2</i>
SMAD3	<i>Mothers against decapentaplegic Isoform 3</i>
SMAD4	<i>Mothers against decapentaplegic Isoform 4</i>
SMAD7	<i>Mothers against decapentaplegic Isoform 7</i>
ssRNA	<i>Single-stranded</i> RNA – einzelsträngige RNA
TAR	<i>Transactivation response element</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TGFB1	<i>Transforming growth factor-β 1</i>
TGFB2	<i>Transforming growth factor-β 2</i>
TGFB3	<i>Transforming growth factor-β 3</i>
TGFBR1	<i>Transforming growth factor-β receptor 1</i>
TGFBR2	<i>Transforming growth factor-β receptor 2</i>
TGFBR3	<i>Transforming growth factor-β receptor 3</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i> – transformierender Wachstumsfaktor beta

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TRBP	<i>Transactivation response element-</i> RNA-bindendes Protein
Tris	Trisaminomethan
U	Uracil
ü. N.	Über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
Δ	Delta, Differenz

1 Einleitung

1.1 Das Experiment in der Wissenschaft

Das Experiment ist unzweifelhaft ein zentraler Baustein der Wissenschaft im Allgemeinen und der Naturwissenschaften im Besonderen. Zuvor erfolgt die Problemerkennung und -beschreibung, sowie die Formulierung einer Hypothese, welche mittels des Experiments überprüft werden kann. Anschließend werden die erwarteten Ergebnisse notiert. Erst zu diesem Zeitpunkt wird das Experiment durchgeführt und die nun erhaltenen Ergebnisse beobachtet und vermerkt. Dabei stellen die gewonnenen Daten die Grundlage für die Schlussfolgerungen und die Beantwortung von Fragestellungen und Hypothesen dar. Die zu falsifizierenden Hypothesen sind dabei in einen wissenschaftlichen Diskurs eingebettet oder bietet den Boden für den neuen beziehungsweise weiterführenden Diskurs. Experimente, die zu einem wissenschaftlichen Mehrgewinn führen sollen, müssen hierbei sorgsam geplant sein, wobei die Positiv- und Negativkontrollen des jeweiligen Experiments von elementarer Bedeutung sind. Sie definieren die jeweilige Grundlinie, ohne welche die erhobenen Daten in einem koordinatenlosen Raum hängen und sich weder analysieren oder bewerten, geschweige denn verwenden lassen. Letztlich sind Daten ohne diese Grundlinie und die daraus erwachsenden Erkenntnisse nur vermeintliche Erkenntnisse und sind ohne wissenschaftlichen Wert.

1.2 RNA-Interferenz

1.2.1 Der Mechanismus der RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein wichtiger sequenzabhängiger post-transkriptioneller Mechanismus der Gen-Stillegung (PTGS), im Englischen „gene silencing“, in eukaryotischen Zellen. Diese sequenzspezifische Methode spielt sowohl in pflanzlichen, tierischen wie auch menschlichen Zellen eine wichtige Rolle. Erstmals wurde dieser Mechanismus in Pflanzen [1, 2] beobachtet und kurz darauf stichhaltig im Fadenwurm (Nematoden) *Caenorhabditis elegans* von Andrew Z. Fire und Craig C. Mello mittels einer doppelsträngigen RNA-Sequenz (dsRNA) beschrieben [3].

In eukaryotischen Zellen wird der RNAi-Mechanismus durch die Spaltung der langen dsRNA, die bis zu mehreren Hundert Basen umfasst, initiiert. Es wird hierbei davon

ausgegangen, dass dsRNA-Stränge natürlicherweise bei der zufälligen Integration von genetischem Fremdmaterial in der Zelle entstehen (endogener Ursprung) [4], wobei sie auch künstlich, zu Forschungszwecken wie beim Experiment von A. Fire und C. Mello, in die Zelle gebracht werden können (exogener Ursprung) [3]. Die Spaltung der dsRNA wird durch eine Endoribonuklease aus der Ribonuklease- (RNase-)III-Familie, den sogenannten Dicer, vollzogen [5, 6]. Die entstandenen kurzen doppelsträngigen RNA-Fragmente mit einer Länge von rund 21–25 Nukleotiden sind unter der Bezeichnung „kleine interferierende RNA-Fragmente“, im englischen siRNAs, bekannt. Sie haben eine Helix-Struktur, bei der jeweils an den 3'-Enden zwei Basen freiliegen und folglich keine komplementären Pendants aufweisen (Abbildung 1A). Neben dsRNA-Strängen können auch sogenannte „small hairpin RNAs“ (shRNAs), biochemisch synthetisierte haarnadelartige Strukturen, als Ursprung der siRNAs dienen [7]. Hierbei wird die shRNA zunächst im Zellkern durch die Polymerase II oder III transkribiert und mithilfe des Enzymkomplexes aus Drosha, einer RNase III, und Pasha (DGCR8), einem RNA bindenden Protein, zur prä-shRNA weiterprozessiert. Diese wird aus dem Zellkern mit Exportin-5 in das Zytoplasma ausgeschleust, in welchem die prä-shRNA, analog zur dsRNA, mittels Dicer in die siRNA gespalten wird [8, 9] (nicht in Abbildung 1B dargestellt).

Die siRNAs haben nach dem Spaltungsprozess aus der dsRNA oder shRNA eine freiliegende OH-Gruppe an den 5'-Enden. Um später in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) aufgenommen zu werden und für eine effiziente Spaltung der mRNA sorgen zu können, ist die Phosphorylierung der 5'-Enden, durchgeführt von der im Zytosol vorkommenden RNA-Kinase Clp1, zunächst essenziell [10, 11]. Die siRNAs werden im Modelorganismus *Drosophila melanogaster* anschließend mittels des Dicer 2 und des R2D2-Proteins, welches eine doppelsträngige RNA-Bindungsdomäne aufweist, an das Argonautenprotein 2 (Ago2) übergeben [12]. Dicer 2, das R2D2-Protein sowie Ago2 bilden hierbei zusammen den RISC-ladenden Komplex (RLC) [13]. Demgegenüber besteht der RLC in Säugetierzellen aus Ago2, dem Dicer und dem „trans-activation response element (TAR)“-RNA-bindenden Protein (TRBP) [14–16] (Abbildung 1B). Während dieses Schrittes – dem Übergeben der siRNA – wird die jeweilige siRNA vom RLC entwunden. Dies geschieht bei humanen Zellen allen Anschein nach unter der Zuhilfenahme der RNA-Helikase A, welche als Cofaktor beim Beladen des RISC fungiert und teilweise dem humanen RLC zugerechnet wird [17, 18].

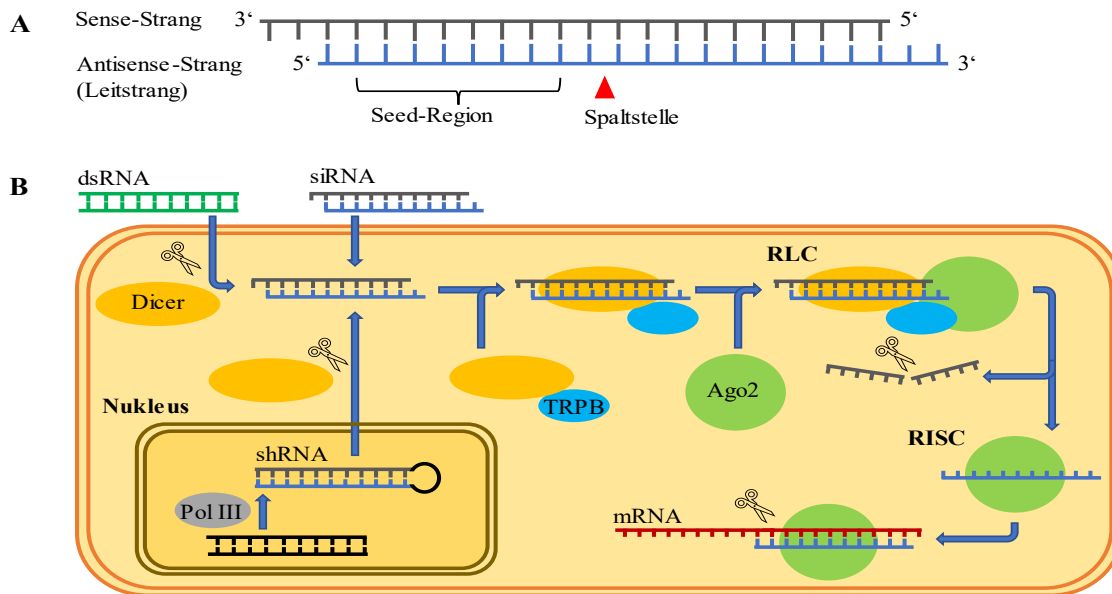


Abbildung 1: siRNA und RNAi-Mechanismus

A) Schematische Darstellung einer siRNA. siRNAs sind doppelsträngige Strukturen, welche eine 19 Nukleotide umfassende Helix bilden und an den 3'-Enden jeweils zwei freiliegende Basen aufweisen. Die Seed-Region, ausgehend vom 5'-Ende, beläuft sich von Position 2 bis Position 8 des Antisense-Strangs, an die sich die Spaltstelle, dargestellt als roter Pfeilkopf, zwischen Position 10 und 11 anschließt.

B) RNAi-Mechanismus in Säugetierzellen. Den ersten Schritt stellt die Einbringung der dsRNA oder shRNA und anschließende Prozessierung mittels Dicer oder die direkte Einbringung einer siRNA in die Zelle dar. Die siRNA wird mittels RLC, bestehend aus Dicer, TRBP und Ago2, in Ago2 gebunden. Das beladene Ago2 dissoziiert vom restlichen RLC und trennt die siRNA in Sense- und Antisense-Strang, wobei der Sense-Strang gespalten wird und der Antisense-Strang in Ago2 verbleibt. Gemeinsam bilden Ago2 und der Antisense-Strang den RISC. Der Antisense-Strang stellt nun die Bindungsstelle für die komplementäre mRNA dar, welche durch Ago2 gespalten wird. Hierbei ist die Gen-Stillegung mittels siRNA als zeitlich kürzer – im Vergleich zur Gen-Stillegung durch die in den Zellkern gebrachten shRNA – anzusehen.

Abkürzungen: dsRNA: doppelsträngige RNA, shRNA: small hairpin RNA, siRNA: small interfering RNA, RLC: RISC-ladender Komplex, TRBP: trans-activation response element- (TAR-) RNA-bindendes Protein, Ago2: Argonautenprotein 2, RISC: RNA-induced silencing Komplex, mRNA: messenger-RNA.

Daraufhin dissoziiert das beladene Ago2-Protein vom restlichen RLC [14], und der Leitstrang (Antisense-Strang) und der komplementäre Strang (Sense-Strang) werden getrennt, wobei der Sense-Strang kurz darauf durch Ago2 gespalten wird [19]. Die Spaltung des Sense-Strangs wird Ago2 durch eine Proteindomäne, die der Ribonuklease H gleicht, ermöglicht [20]. Ago2 ist hierbei eine Endonuklease und bildet nun gemeinsam mit weiteren Proteinen und dem Leitstrang der siRNA den RISC. Im sich anschließenden

Prozess dient der Leitstrang im RISC als Matrize und entscheidet über seine Sequenz, welche der komplementären messenger-RNAs (mRNA) im RISC gebunden und darauf folgend gespalten und abgebaut werden [21]. Für die Bindung der jeweiligen mRNA im RISC ist entgegen anfänglicher Annahmen nicht die gesamte Basensequenz und damit jede Nukleotidposition des Leitstrangs gleich entscheidend. Die sogenannte „seed sequence“ des Leitstranges, auch Seed-Region genannt, stellt die Schlüsselstruktur der Interaktion zwischen mRNA und RISC dar [22, 23]. Diese Seed-Region des Antisense-Stranges findet sich – ausgehend vom 5'-Ende – von Position 2 bis 7 beziehungsweise von Position 2 bis 8 [24] (Abbildung 1A). Diese Sequenz der 6 beziehungsweise 7 Nukleotide der Seed-Region des Leitstrangs werden in der Literatur als Hexa beziehungsweise Heptamer bezeichnet [25]. Die Seed-Region scheint zudem nochmals in zwei Funktionsuntereinheiten – erste Untereinheit (Nukleotidpositionen 2–5) und zweite Untereinheit (Nukleotidpositionen 6–7) – unterteilen zu sein (s. Kapitel 1.2.5.2) [26]. Über die Seed-Region des Antisense-Stranges wird die komplementäre mRNA an ihrer 3'-untranslatierten Region (UTR) erkannt und gebunden. Hierbei ist die (nahezu) perfekte Komplementarität zwischen Seed-Region und der 3'-UTR der mRNA essenziell, wodurch dem oben genannten Ago2 erst die Spaltung der mRNA ermöglicht wird [27]. Die Spaltstelle ist dabei zwischen den Positionen 10 und 11 des Leitstranges, ausgehend vom 5'-Ende, lokalisiert [4, 28]. Die mRNA steht in der Folge für die Translation nicht mehr zur Verfügung. Die kodierten Proteine werden nur noch vermindert beziehungsweise kaum exprimiert.

1.2.2 Endogene kurze RNA-Sequenzen

Neben den exogenen RNA-Molekülen dsRNA, siRNA und shRNA übernehmen endogene RNA-Moleküle, sogenannte microRNAs (miRNA), neben Piwi-interagierende RNA (piRNA) und anderen Vertreter [29], über die RNAi wichtige Funktionen der Zelle (s. Kapitel 1.2.3). Der Prozess, der in Kapitel 1.2.1. in Zusammenhang mit den shRNAs beschrieben wurde und von diesen verwendet wird, ist ursprünglich der natürliche Reifungsweg der miRNA. Die transkribierte pri-miRNA wird unter Zuhilfenahme des oben erwähnten Enzymkomplexes von Drosha und DGCR8 zur prä-miRNA prozessiert. Anschließend gelangt die prä-miRNA, analog zur prä-shRNA, mittels Exportin-5 ins Zytoplasma, in welchem sie schlussendlich Dicer-abhängig in reife miRNA gespalten [30] und mittels RLC in den RISC eingeschleust wird. Hierbei scheint dies in *Drosophila melanogaster* durch Dicer 1 und nicht wie bei siRNAs Dicer 2 vermittelt zu sein [31].

Die Gen-Stillegung erfolgt bei den miRNAs entweder, wie bei den siRNAs, über die komplementäre Bindung der mRNA an die Seed-Region des Leitstrangs der miRNA und der sich anschließenden Spaltung der mRNA, oder, bei einer weniger komplementären Bindung zwischen miRNA und mRNA, durch einer Blockierung der Translation [32]. Die oben erwähnten piRNAs sind kurze RNA-Sequenzen in Keimzellen mit einer Länge von 24 bis 31 Nukleotiden (nt), welche an Piwi-Proteine, die zu der Familie der Argonautenproteinen gehören, binden und die Integrität der Keimbahngenoms gewährleisten [33].

1.2.3 Biologische Relevanz der RNA-Interferenz

Aus evolutionärer Sicht wird davon ausgegangen, dass der Mechanismus der RNAi ein sehr alter Zellmechanismus ist. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass er in verschiedensten Spezies, in Pflanzen, Tieren und Menschen, aber auch in Fadenpilzen und Insekten, vorkommt [4, 34, 35]. Die RNAi erfüllt mehrere Funktionen für die Zelle. Erstens kommt die RNAi bei der Virusabwehr auf zellulärer Ebene als Teil des angeborenen Immunsystems zum Tragen. Dies gilt insbesondere bei Pflanzen als gesichert, wohingegen dies in humanen Zellen noch nicht abschließend geklärt ist. Die Zellen beziehungsweise deren Prozesse werden vor genetischem Fremdmaterial, dsRNAs sowie einzelsträngiger RNA (ssRNA), durch die RNAi geschützt [36]. Zweitens dient die RNAi zur Kontrolle von Transposonen, laienhaft oft als „springende Gene“ bezeichnet [37]. Beispielsweise dienen die oben erwähnten piRNAs in Zellen der Keimbahn zur Transposonenkontrolle und stellen die Integrität des Genoms sicher [33]. Als dritter Anwendungsbereich der RNAi muss die Genexpression erwähnt werden. Mittels miRNA und piRNA wird die Expression von bis zu einem Drittel der Gene in Säugetierzellen mit beeinflusst [32, 38]. Insbesondere Entwicklungsprozesse werden über genregulatorische Mechanismen der RNAi entscheidend beeinflusst [39]. Beispielshalber unterliegt der Zellzyklus verschiedener Stammzellen regulatorischen Mechanismen, vermittelt durch die RNAi [40]. Ein weiteres Beispiel wäre die Beeinflussung der Spermatogenese durch miRNAs sowie piRNAs mittels RNAi [41]. Abschließend kann zudem gesagt werden, dass der Mechanismus der RNAi bei verschiedenen Tumorentitäten eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen scheint [39].

1.2.4 Bedeutung der RNA-Interferenz in der Forschung

Die erste erfolgreiche Transfektion einer Säugetierzelle im Labor ebnete den Weg zur Etablierung der RNAi. In gewisser Weise stellt sie die Weiterentwicklung der bereits etablierten Antisense-Oligonukleotid-Technologie dar und gilt als wichtigste Alternative zu der Technologie der transgenen Modelorganismen. Letzteres ist eine sehr zeit- und ressourcenaufwendige Methode, um mittels mehrstufiger Kreuzung von Mäusen und Mausstämmen Modelltiere zu erhalten, in denen einzelne Gene ausgeschaltet sind. Um die Funktion dieser Gene zu entschlüsseln können mittels der Methode der RNAi diese einzelnen Gene jedoch schneller, kostengünstiger und dennoch spezifisch ausgeschaltet werden. Die RNAi legt die Gene, im Gegensatz zu den transgen Modelltieren, bei denen eine vollständige und dauerhafte Gen-Stillegung (Knockout) besteht, nur zeitweise und unvollständig still (Knockdown). Hierfür wird eine siRNA aufgrund des gewünschten On-Target-Effekts – gezielter Abbau einer mRNA – für den Knockdown eines Zielgens ausgewählt und verwendet. Hierbei gilt diese siRNA als „nicht inert“ und wird in der Literatur als solche bezeichnet. „Nicht inerte“, für den Knockdown verwendete, siRNAs werden im weiteren Text lediglich als siRNAs bezeichnet.

Die Methode der RNAi erfährt sowohl bei *in vitro*- als auch *in vivo*-Experimenten breite Anwendung. Insbesondere in der Tumorforschung ist dieser Ansatz weiterhin von herausragender Bedeutung. Sie führt zur effizienteren Entwicklung neuer Medikamente [42], erweitert den Anwendungsbereich bestehender Medikamente [43] und dient als Grundlage für neuartige Gentherapien [42, 44, 45]. Trotz der weiten Verbreitung und standardmäßigen Verwendung dieser Technologie ist sie, wie alle Methoden, Einschränkungen unterworfen [46].

1.2.5 Problematiken der Methode der RNA-Interferenz

1.2.5.1 Interferon-Reaktion von transfizierten Zellen

Nur drei Jahre nachdem die US-Wissenschaftler A. Z. Fire und C. C. Mello, wie eingangs erwähnt, den Mechanismus der RNAi entdeckten und beschrieben, wurde die erste synthetische siRNA in Säugetierzelllinien transfiziert [47]. Nur ein Jahr später gelang die erste erfolgreiche siRNA-Bereitstellung in Mäusen *in vivo* [48]. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die ursprünglich verwendeten dsRNAs, welche in eine Vielzahl von eukaryotischen Lebensformen, beispielsweise in die Modelorganismen *C. elegans* oder *D. melanogaster* [28], erfolgreich transfiziert werden konnten, in Abgrenzung dazu in

Säugetierzellen eine unspezifische Interferon- (INF-) Antwort hervorriefen. Die dsRNA wurden hierbei als „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) erkannt. Die Rezeptoren, die zur Erkennung dieser PAMPs, im Englischen „pattern recognition receptors“ (PRRs), dienen, sind einmal die verschiedenen Helikasen der Familie der RIG-I-ähnlichen-Rezeptoren (RLRs), zu der unter anderem das „retinoic acid-inducible gene 1“ (RIG-I), das „melanoma differentiation-associated protein 5“ (MDA5) und „laboratory of genetics-physiology 2“ (LGP2) zählen [49, 50], sowie der Toll-like-Rezeptor-3 (TLR-3) [51, 52] und der Toll-like-Rezeptor 7 (TLR-7) [53].

INF führt unter anderem auch zur Aktivierung der Proteinkinase R (PKR), welche über Phosphorylierungsprozesse die Proteinsynthese vermindert und die Zellapoptose induziert [50, 54, 55]. Die PKR kann darüber hinaus auch ohne INF über ihre inhärente dsRNA-Bindungsstelle direkt von einer dsRNA aktiviert werden [56] und mündet konsekutiv in die soeben genannten Endstrecke. Die Ursache für die zelluläre INF-Antwort liegt in der Länge der dsRNA, wobei eine Länge von über 30 Basenpaaren (bp) hierbei als kritisch angesehen wird [57]. Mit der Verwendung der kürzeren siRNAs, die 21 bp umfassen, galt das Problem der INF-Antwort aber nur für kurze Zeit als behoben, da auch die kürzeren siRNAs über den sogenannten „Januskinase–Signal Transducers and Activators of Transcription-“ (JAK-STAT-)Signalweg und die PKR eine INF- und Zytokin-Antwort hervorrufen [58]. Zudem zeigte sich in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs), vermittelt über den TLR-7, ebenfalls eine unspezifische INF-Reaktion [53]. Die Grundlage für diese Reaktion lag in der Sequenz der primär verwendeten Sequenzen der siRNAs. Diese enthielten immunmodulatorische Muster in Form von spezifischer Basensequenzen am 3'-Ende [59], welche über TLR erkannt werden. Durch Vermeidung dieser Sequenzmotive kann die INF- und Zytokin-Antwort vermieden werden. Diese INF-Antwort zählt mit zu den nicht targetspezifischen – zielspezifischen – Effekten, „Off-Target-Effekte“ genannt.

1.2.5.2 Nicht targetspezifische Effekte von siRNAs

Die nicht targetspezifischen Effekte, die Off-Target-Effekte, sind für die Einschränkungen der siRNAs verantwortlich und können in strangabhängige und sequenzabhängige Effekte unterteilt werden. Die Unterteilung ist nicht als absolut zu betrachten und dient hier lediglich als Rüstzeug, um die Problematiken zu erörtern.

Bei Ersteren, den strangabhängigen Effekten, besteht die Möglichkeit, dass nicht der Antisense-Strang der siRNA in den RISC inkorporiert wird, sondern der Sense-Strang, welcher dann folglich als „falsche“ Matrize fungiert und damit zu den Off-Target-Effekten führt (Abbildung 2A).

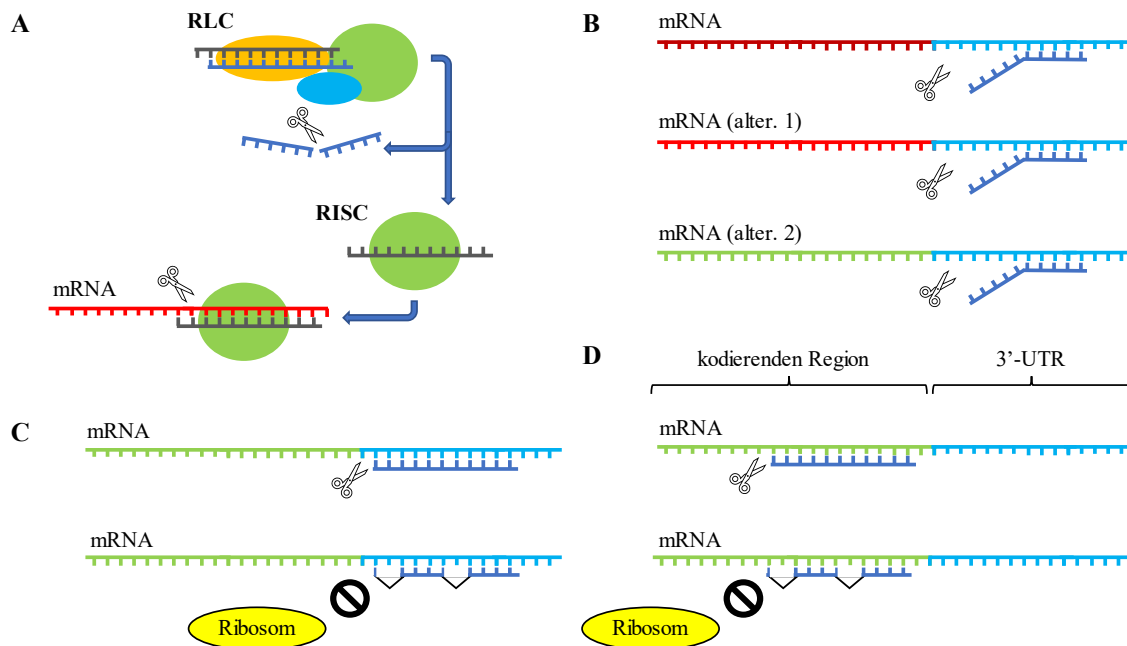


Abbildung 2: Off-Target-Effekte

A) Strangabhängiger Off-Target-Effekt. Auswahl des Sense- (in grau dargestellt) anstatt des Antisense-Stranges (in dunkelblau dargestellt) der siRNA und Inkorporation in den RISC und damit Verwendung einer falschen Matrize durch Ago2 (grüner Kreis). Damit einher geht die Spaltung einer nicht beabsichtigten mRNA. **B) Sequenzabhängiger Off-Target-Effekt.** Der Antisense-Strang (in dunkelblau dargestellt) führt wegen seiner nicht spezifischen Sequenz in seiner Seed-Region zur Bindung von, mit der gleichen Basensequenz in der 3'-UTR (in hellblau dargestellt) ausgestatteten, unterschiedlichen mRNAs und schlussendlich zu ihrem Abbau. (Ago2 nicht dargestellt.) **C) miRNA-ähnlicher Off-Target-Effekt im 3'-UTR.** Bindung der mRNA durch den Antisense-Strang. Die siRNA fungiert als miRNA und führt entweder zur Spaltung (bei vollständig komplementären Basensequenzen der mRNA) oder zur Blockierung (bei nicht vollständig komplementären Basensequenzen) der Translation. (Ago2 nicht dargestellt.) **D) miRNA-ähnlicher Off-target-Effekt in der kodierenden Region.** Bindung der mRNA durch den Antisense-Strang, bei der die siRNA als miRNA fungiert und entweder zur Spaltung der mRNA oder zur Blockierung der Translation führt. (Ago2 nicht dargestellt.) **Abkürzungen:** siRNA: small interfering RNA, RISC: RNA-induced silencing complex, Ago2: Argonautenprotein 2, mRNA: messenger-RNA, 3'-UTR: 3'-untranslatierte Region, miRNA: microRNA.

Der maßgebliche Mechanismus, der die Auswahl des Stranges bedingt, bleibt weiterhin unverstanden [60], jedoch spielt die unterschiedliche thermodynamische Stabilität der beiden Stränge eine Rolle. Hiernach wird der Strang mit der geringeren thermodynamischen Stabilität am 5'-Ende für die Internalisierung in den RISC präferiert. In Taufliegen, der Familie der *Drosophila*, konnte beobachtet werden, dass die thermodynamischen Unterschiede zwischen den Strängen von RLC-Bestandteilen, bestehend aus dem Dicer 2 und der R2D2, erkannt werden. Der Dicer 2 bindet hierbei an den instabileren und R2D2 an den stabileren Strang. [13, 61, 62]. In humanen Zellen werden unterschiedliche Möglichkeiten beobachtet. Ob das TRBP allein für die Erkennung der Asymmetrie verantwortlich ist [63], oder ob es eines komplexeren Zusammenspiels von TRBP, Dicer und Ago2 bedarf [64], ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlichen Diskurses. Für den Auswahlprozess des Stranges der siRNA scheinen neben der thermodynamischen Stabilität [65] auch ein niedriger Gehalt an den Basen Guanin (G) und Cytosin (C), wenige invertierte Wiederholungen, sogenannte „inverted repeats“, sowie das Auftreten von bestimmten Basen an den Positionen 3, 10, 13 sowie 19 am Sense-Strang von Bedeutung zu sein [66]. Bei den sequenzabhängigen Effekten sind die immunologischen Effekte (s. vorangegangenes Kapitel 1.2.5.1) zu benennen, bei der siRNAs vom angeborenen Immunsystem der Zellen als PAMPs erkannt werden [67]. Der Mechanismus, der in Kapitel 1.2.5.1 erwähnt wurde, dient der Zelle im Falle einer Virusinfektion, bei der das Virus versucht, seine genetische Information in Form einer einzel- oder doppelsträngigen Nukleotidsequenz in die Zelle einzuschleusen, zur Erkennung und zur Abwehr des Erregers.

Ein weiterer Grund für die sequenzabhängigen, nicht targetspezifischen Effekte liegt in der unterschiedlichen Häufigkeit, mit der einzelne Basensequenzen der 3'-UTR der mRNAs vorkommen, begründet. Diese gleichen Sequenzabschnitte bilden das jeweilige Pendant zu den Hexa- oder Heptameren der Seed-Region des Antisense-Strangs. Hierbei werden die häufiger vorkommenden Basensequenzen der 3'-UTR des Transkriptoms mittels der komplementären Sequenz der Seed-Region – Hexa- beziehungsweise Heptamer – des Antisense-Stranges der siRNA im RISC gebunden und mittels Ago2 gespalten. Präziser formuliert: Eine siRNA kann über ihre Seed-Region unterschiedliche mRNAs aufgrund gleicher Sequenzabschnitte in der 3'-UTR binden und zu deren Spaltung führen (Abbildung 2B). Die so unbeabsichtigterweise, neben der Target-mRNA, abgebauten nicht-Target-mRNAs entsprechen den Off-Target-Effekten. Abschließend

kann konstatiert werden, dass siRNAs, welche mittels ihrer Seed-Region eine dieser häufiger vorkommenden Basensequenzen der 3'-UTR der mRNAs binden, auch vermehrt zu Off-Target-Effekten führen [25, 68, 69].

Darüber hinaus kann es auch zu Off-Target-Effekten kommen, wenn es über die Seed-Region des Leitstrangs der siRNA hinaus zu Bindungen zwischen dem Leitstrang der siRNA und der 3'-UTR (Abbildung 2C) oder innerhalb der kodierenden Region (Abbildung 2D) [70, 71] der mRNA kommt. Dies geschieht analog zum Pfad der endogenen miRNA, der ebenfalls zur Stilllegung von Transkripten führen kann [30, 72, 73], weshalb dieser Effekt in der Fachliteratur auch als „miRNA-like off-target effect“ bezeichnet wird [74]. Hierbei können zwei verschiedenen Mechanismen unterschieden werden. Bei nicht perfekt komplementären Basenpaarsequenzen kommt es lediglich zur Hemmung der Translation [70], ohne dass die mRNA gespalten wird. Bei einer perfekten Bindung zwischen den beiden Nukleotidsequenzen, Antisense-Strang der siRNA und mRNA, kommt es als zweite Möglichkeit durch Ago2 zur Spaltung und damit zur Degradierung der gebundenen mRNA [75]. Dieser endogene Pfad der miRNAs (s. Kapitel 1.2.2) kann ebenfalls bei shRNA-Interventionen zu Off-Target-Effekten führen, wie beispielhaft beobachtet im veränderten Migrationsverhalten von Neuronen des Cortexes in Wildtyp-Mäusen [76].

1.3 Optimierung und Entwerfen einer siRNA

Die Erfahrungen, dass die in der Forschung verwendeten siRNAs nicht, wie anfangs gedacht, vollkommen spezifische Effekte, die On-Target-Effekte, aufweisen, haben zu bestimmten Modifikationen in der Struktur der synthetisierten siRNAs geführt, um die nichtspezifischen Effekte, die Off-Target-Effekte, zu reduzieren. Eine Strategie beschäftigt sich mit dem Rückgrat der siRNAs und deren möglichen Modifikationen. Mit einer 2'-O-Methyl-Gruppe (2'-OMe) an der Position 2, ausgehend vom 5'-Ende, des Leitstrangs lassen sich beispielsweise die Off-Target-Effekte reduzieren [77]. Auch ein zusätzliches Nukleotid, welches zwischen die Position eins und zwei inseriert wird und darüber zu einer blasenähnlichen Struktur führt, zieht ebenfalls eine Reduzierung der Off-Target-Effekte nach sich, ohne dass der gewollte Effekt, der On-Target-Effekt, an Effizienz einbüßt [78]. Auch chemische Modifizierungen der Seed-Region mittels 2'-OMe, Phosphorthioaten (PS) oder sogenannten „locked nucleic acids“ (LNAs) sowie mittels 7-Ethynyl-8-aza-7-deazaadenosin (7-EAA) führen zu einer Verringerung der Off-

Target-Effekte [79, 80]. Hierbei ist die Position der Modifikation, aufgrund der zwei Funktionsuntereinheiten (s. Kapitel 1.2.1) jedoch nicht trivial. Beispielsweise scheinen 2'-OMe Modifikationen in den Positionen 2 bis 5 der Seed Region wichtig für die Vermeidung der Off-Target-Effekte zu sein, während Modifikationen mittels 2'-OMe an den Positionen 6 bis 8 der Seed-Region zu einer Verstärkung sowohl der Off- als auch der On-Target-Effekten führen (s. Kapitel 1.2.1) [26].

Auch die Zusammensetzung der sich an die Seed-Region anschließenden Sequenz ist von Bedeutung. Eine Sequenz mit einem hohen Gehalt an G und C von den Positionen 8 bis 15 des Leitstranges verursacht ebenfalls weniger ausgeprägte Off-Target-Effekte [81]. In Kapitel 1.2.5.2, in dem der Auswahlprozess des in den RISC zu inkorporierenden Stranges dargelegt wird, wird bereits auf den G- und C-Gehalt eingegangen. Dort wird der Gehalt des gesamten Stranges beziffert, wohingegen hier nur der Gehalt eines Ausschnitts des Stranges benannt wird. Zusammengefasst bedeutet dies, dass es günstig ist, wenn die gesamte Sequenz des Leitstranges wenig G und C enthält, jedoch nicht auf die Positionen 8 bis 15 bezogen. Zudem führte das Vermeiden des toxischen 4-Basenpaar-Motivs UGGC zu besserer Zellverträglichkeit [82].

Verschiedene Datenbanken [83, 84] und Algorithmen [85, 86] haben sich in den letzten Jahren etabliert. Diese ermöglichen das Entwerfen neuer siRNAs mit weniger und schwächer ausgeprägten Off-Target-Effekten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Off-Target-Effekte stärker konzentrationsabhängig sind als die eigentlich beabsichtigte Gen-Stillegung. [65, 87]. Um die Off-Target-Effekte zu minimieren, sollte somit die Dosis der applizierten siRNA möglichst niedrig gewählt werden und in den Überlegungen und in der Planung der RNAi-Experimente berücksichtigt werden.

1.4 Transfektion; Die Bereitstellung von Nukleotidsequenzen

Transfektion beschreibt die Technik, bei der eine Nukleotidsequenz, zum Beispiel einer siRNA oder auch eines DNA-Stranges, in eine Zelle eingebracht und bereitgestellt wird. Die Nukleotidsequenzen sind aufgrund der Phosphatgruppen des Rückgrates der Sequenz negativ geladen [88], wodurch den Nukleotidsequenzen die Penetration von Lipiddoppelschichten, beispielsweise einer Zellwand, nur stark eingeschränkt möglich ist [89]. Daher verpacken Zellen zur interzellulären Kommunikation, bei der nicht nur Gewebshormone sondern auch Nukleotidsequenzen eine Rolle spielen,

Nukleotidsequenzen in Vesikel, wodurch diesen Sequenzen der Transit durch Lipiddoppelschichten ermöglicht wird [90].

Verschiedene Reagenzien und Methoden, bei *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten, gestatten die Einbringung – Transit durch die Zellwand – und die Bereitstellung der Nukleotidsequenzen in das Zytosol. *In vitro* werden verschiedene Ansätze verfolgt. Hier können die Methoden in nicht virale und virale (vektorbasierte) Methoden unterteilt werden. Ein Beispiel hierfür sind die oben erwähnten shRNAs, welche mittels Plasmids in einem viralen Vektor transfiziert und anschließend im Nukleus exprimiert werden. Im Gegensatz dazu werden nicht virale Bereitstellungsmethoden in physikalische Methoden, beispielsweise Elektroporation [91], und chemische Methoden, beispielsweise Lipofektion [92], unterteilt.

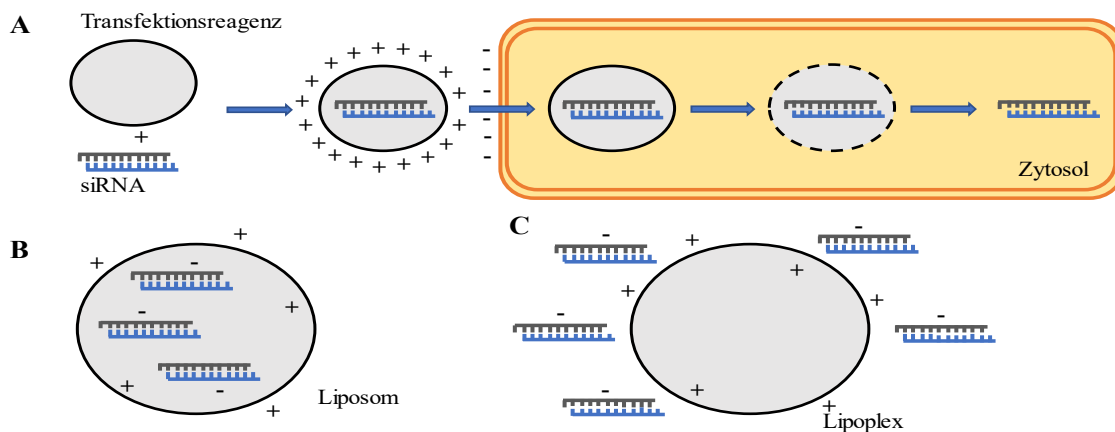


Abbildung 3: Lipofektion

A) Mechanismus der Lipofektion. Das Transfektionsreagenz umschließt die siRNA zunächst. Durch elektrische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Zellmembran und dem positiv geladenen Liposom wird die Endozytose ermöglicht. Co-Bestandteile des Liposoms führen dann nach erfolgter Endozytose zur Destabilisierung des Endosoms, wodurch die Nukleotidsequenz in das Zytosol entweichen und dort in den RISC aufgenommen werden kann. **B) Klassisches Liposom.** Ummantelung der negativ geladenen siRNAs durch die positiv geladenen Lipide, welche eine Lipiddoppelschicht bilden. **C) Lipoplex,** Gruppierung der negativ geladenen siRNAs um die Lipoplexe, welche aus kationischen Lipiden bestehen. **Abkürzungen:** siRNA: small interfering RNA, RISC: RNA-induced silencing complex.

Die Lipofektion stellt hierbei eine effektive, sichere und einfach durchzuführende Methode dar. Zusammengenommen mit der hohen Reproduzierbarkeit von Ergebnissen und den vertretbaren Kosten, die mit der Methode einhergehen, sind dies die Gründe für die weite Verbreitung dieser Methodik. Die Lipofektion dient in vielen Laboren als Goldstandard für die Transfektion.

Die ursprünglich verwendeten lipidbasierten Reagenzien bildeten artifizielle Liposome, welche die Nukleotidsequenzen ummanteln [93] (Abbildung 3B). Im jüngeren Ansatz der kationischen Lipid-Transfektion werden die Nukleotidsequenzen allerdings nicht umschlossen, sondern organisieren sich um die Liposome der Transfektionsreagenzien und bilden zusammen einen sogenannten Lipoplex (Abbildung 3C). Sowohl die Ummantelung als auch die Organisierung um das Liposom geschieht aufgrund der elektrischen Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Nukleotidsequenzen und den positiv geladenen kationischen Lipiden. Sowohl die klassischen Liposome also auch die Lipoplexe werden mittels Endozytose internalisiert (lediglich die Liposome werden in Abbildung 3A dargestellt, können aber gedanklich durch ein Lipoplex ersetzt werden). Anschließend sorgen bestimmte Co-Bestandteile der Liposome und Lipoplexe für die Destabilisierung der Endosomen, wodurch die Nukleotidsequenzen in das Zytosol entweichen können, ohne im Lysosom degradiert und abgebaut zu werden [94].

Im Zytosol können die Nukleotidsequenzen dann ihre gewünschte Wirkung entfalten. Im Falle der siRNA kommt es mittels RISC zum Knockdown der gewünschten Gens. Die Zytotoxizität der kationischen Lipide [95] und die ausgeprägte Zelltypabhängigkeit der Transfektionseffizienz [96, 97] sind als entscheidende Nachteile dieses Ansatzes zu nennen. Ein interessanter Ansatz beschäftigt sich mit fusogenen Liposomen, bei der die positiv geladenen Liposomen mit der negativ geladenen Zellmembran zunächst interagieren und dann miteinander verschmelzen, wodurch sie ihren Inhalt in das Zytosol schleusen [89]. Die Zytotoxizität dieses Ansatzes scheint hierbei sehr niedrig [98] und weniger stark Zelltypabhängig zu sein [99].

1.5 TGF- β -Signalweg

Der „transforming growth factor beta-“ (TGF- β -)Signalweg spielt eine gewichtige Rolle in diversen zellulären Prozessen. Hierbei werden sowohl Prozesse der noch jungen, sich entwickelnden Zelle, unter anderem im Sinne embryonaler Prozesse wie Zellwachstum und Differenzierung, als auch der reifen Zelle beeinflusst und gesteuert. Die Prozesse welche bei der adulten Zelle entscheidend moduliert werden sind; die Zellhämostase, die Synthetisierung der extrazellulären Matrix (EZM), die Zellmigration, der Zellarrest und die Zellapoptose sowie die inflammatorische INF-Antwort [100–103] und die angeborene Immunantwort auf zellulärer Ebene [104]. Der TGF- β -Signalweg ist ein embryonalgeschichtlich gut erhaltender Signalweg und kommt in Nematoden wie *C. elegans*, Insekten, Fischen, Vögeln, Säugetieren bis hin zum *Homo sapiens* vor [105] und hat aufgrund dessen einiges an Bedeutung in der Forschung inne.

1.5.1 Signaltransduktion vom Liganden bis zur Genregulation

Die TGF- β -Superfamilie besteht aus 33 Liganden und gehört zu der Familie der Wachstumsfaktoren. Hierbei sind die drei TGF- β -Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 und die zehn Isoformen des sogenannten „bone morphogenetic protein“ (BMP), die am häufigsten untersuchtesten und weitesten verstandenen Liganden des TGF- β -Signalwegs [106]. Die mRNAs, welche für die TGF- β -Liganden kodieren, werden von Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) transkribiert, wobei der Ligand im ER zunächst als pro-TGF- β vorliegt. Es kommt anschließend zur Dimerisierung zweier pro-TGF- β -Proteine und zur kovalenten Bindung über Disulfidbrücken an das latent TGF- β -bindende Protein (LTBP). Danach wird die eigentlich wirkende TGF- β -Einheit vom pro-Peptid, dem „latency-associated peptide“ (LAP), durch die Endoprotease Furin abgespalten [107]. Beide Untereinheiten bleiben dabei weiterhin miteinander assoziiert, ohne jedoch kovalent aneinander gebunden zu sein, und bilden zusammen den „large-latent complex“ (LLC). Diese Komplexe reichern sich, bis zur Exozytose, in Vesikeln an, und gliedert sich, nach erfolgter Sekretion, in die EZM ein. Hierdurch entsteht in der EZM ein Depot an inaktivem TGF- β . Die Aktivierung des TGF- β , bei der es zur Dissoziation von TGF- β und LAP kommt, geschieht über einen mehrstufigen Prozesse, bei der Proteasen wie Plasmin oder Matrix-Metalloproteasen (MMPs), reaktive Sauerstoffspezies und Integrine, beispielsweise $\alpha\beta$ 6 [108, 109], zusammenspielen [100] und TGF- β verfügbar machen. Das aktivierte TGF- β bindet konsekutiv an den ubiquitär vorkommenden TGF- β -Rezeptor 2 (Tgfr2), ein Homodimer

aus zwei Tgfbr2-Einheiten [100]. In humanen Organismen kommen fünf unterschiedliche Subtypen dieses Rezeptoren vor [110]. Durch die Bindung des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Tgfbr2, wodurch eine hochaffine Bindungs- und Schnittstelle zwischen Liganden, Tgfbr2 und dem TGF- β Rezeptors 1 (Tgfbr1) entsteht (Abbildung 4). Tgfbr1 ist auch als „activin-like kinase“ (ALK) bekannt und kommt ebenfalls in verschiedenen Subtypen, im humanen Organismus in sieben an der Zahl vor [110].

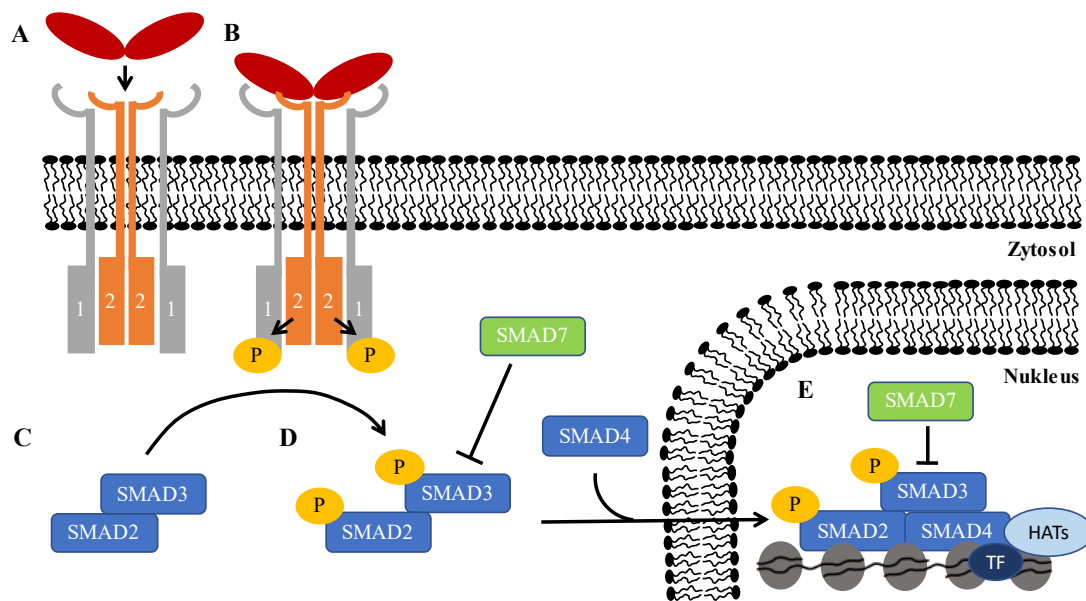


Abbildung 4: TGF- β Signalweg

A) TGF- β (in Rot dargestellt) bindet an den ubiquitär vorkommenden Tgfbr2 (in Orange dargestellt), ein Homodimer aus zwei Untereinheiten, wodurch eine Konformationsänderung des Tgfbr2 eine hochaffine Bindungsstelle zwischen Liganden, Tgfbr2 und dem Tgfbr1 (in Grau dargestellt) entstehen lässt. **B)** Tgfbr2 phosphoryliert mittels seiner Serin/Threonin-Kinasedomäne die Tgfbr1-Untereinheiten. (Phosphat als gelber Kreis dargestellt) **C)** Durch die Phosphorylierung des Tgfbr1 wird dieser aktiviert und phosphoryliert seinerseits mittels seiner Serin/Threonin-Kinase die R-SMADs 2 und 3. (in Blau dargestellt) **D)** Die phosphorylierten SMADs 2 und 3 bilden anschließend mit SMAD4 (ebenfalls in Blau dargestellt) einen Komplex, welcher im Nucleus, **E)** zusammen mit TF (in Dunkelblau dargestellt) und HATs (in Hellblau dargestellt) Gene reguliert. Zudem kann SMAD7 (in Grün dargestellt) im Zytosol und im Nucleus den Signalweg inhibieren (SMAD6 ist nicht dargestellt). **Abkürzung:** Tgfbr2: TGF- β -Rezeptor 2, Tgfbr1: TGF- β -Rezeptor 1, R-SMADS: Rezeptor-regulierte SMADs, TF: Transkriptionsfaktoren, HATs: Histon-Acetyltransferasen.

Die beiden rekrutierten und an Tgfbr2 assoziierten Tgfbr1-Einheiten werden hiernach von der Serin/Threonin-Kinasedomäne des Tgfbr2 an ihrer Serin- und Glycin-reichen Domäne phosphoryliert [111]. Diese Phosphorylierung führt zur Aktivierung des Tgfbr1, ebenfalls eine Serin/Threonin-Kinase, wodurch dieser Teile der SMAD-Superfamilie phosphoryliert und aktiviert [100].

Der TGF- β -Rezeptor 3 (Tgfbr3), besser bekannt als Betaglycan, und Endoglin stellen in dieser Signalkaskade Co-Rezeptoren dar, welche bei der Signaltransduktion unterstützend oder hemmend wirken [110] (in Abbildung 4 nicht dargestellt).

Die vom Tgfbr1 phosphorylierten Rezeptor-regulierten SMADs (R-SMAD) 2 und 3 bilden mit dem SMAD4, dem „common-mediator SMAD“ (coSMAD), einen Komplex, der in den Nukleus gelangt und Gene reguliert. Dieser Komplex hat zwar eine schwache DNA-bindende intrinsische Affinität, benötigt jedoch zur effektiven Genregulierung weitere Proteine, Transkriptionsfaktoren (TF), Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren [100]. Ein Beispiel für ein über diesen Signalweg reguliertes Gen ist *SERPINE1* („plasminogen activator inhibitor-1“ [PAI-1]), ein profibrotischer Faktor [112, 113]. Neben den DNA-bindenden TF sind die Histon-Acetyltransferasen (HATs), wie beispielsweise P300, die eine Chromatin-Remodellierung nach sich ziehen, an der Genregulierung beteiligt [114, 115]. Weitere Vertreter der Gruppe der R-SMADs in Wirbeltieren sind SMAD1, SMAD5 und SMAD8, welche jedoch hauptsächlich über BMP aktiviert werden und ihrerseits mit SMAD4 einen Komplex bilden [110] (in Abbildung 4 nicht dargestellt). In die Signalkette der TGF- β -Liganden, sowie der BMP Liganden können zudem sogenannte inhibitorische beziehungsweise antagonistische SMADs (I-SMADs), zu denen SMAD6 und SMAD7 zählen, eingreifen und zu einer Unterbrechung des Signalweges führen [116]. Die Abkürzung SMAD wurde in Anlehnung an die homologen Proteine SMA, welche in *C. elegans* vorkommen, und der MAD- („mothers against decapentaplegic“) Proteinfamilie, welche ihrerseits in *Drosophila* vorkommen, gewählt bzw. zusammengesetzt.

Abschließend kann, bezogen auf das Kapitel 1.2.5.2, konstatiert werden, dass der TGF- β -Signalweg beziehungsweise die mRNA-Level der Signalwegkomponenten TGF- β -Rezeptor 1 und 2 (*TGFBR1* und *TGFBR2*) in Screeninguntersuchungen von Off-Target-Effekten betroffen waren [74]. Auf Experimente, welche den TGF- β -Signalweg mittels siRNA erforschen, ist deshalb ein besonderes Augenmerk zu werfen.

1.6 Negativkontroll-siRNA im RNAi-Experiment

Die Negativkontroll-siRNAs werden, in Bezug auf Kapitel 1.1, benötigt, um die Effekte der siRNAs im RNAi-Experiment zu nivellieren – Bestimmung der Grundlinie – und damit den wirklichen Effekt der siRNA abschätzen zu können. Die Negativkontroll-siRNAs weisen dabei die gleiche Anzahl an Nukleotiden auf wie die siRNA, haben aber keine komplementäre Sequenz zum Transkriptom, wie in der Datenbank GenBank® nachzuprüfen [117]. In Publikationen werden die Negativkontroll-siRNAs häufig auch als „scrambled“ siRNA bezeichnet [117]. Dieser Ausdruck basiert auf der ursprünglichen Idee, die Abfolge der wirkenden Nukleotidsequenz einfach durcheinanderzuwerfen und damit eine inerte Negativkontroll-siRNA zu erhalten [117]. Daraus entstanden Bestrebungen einiger Biotechnologie-Unternehmen, generell inerte Negativkontroll-siRNAs zu entwickeln. Dies geschah aus der Hoffnung, dass diese kommerziellen Negativkontroll-siRNAs relativ kostengünstig und in die Experimente einfach zu implementieren sind. Hierdurch sollte die Qualität der Experimente erhöht werden und findet seitdem in siRNA-Experimenten weite Anwendung. Der Ausdruck „scrambled“ erfreut sich auch weiterhin großer Beliebtheit, trotz der mittlerweile deutlich komplexeren Entwicklung der Negativkontroll-siRNAs, bei der das einfache Durcheinanderwerfen der Nukleotide höchstwahrscheinlich nur noch eine kleine Rolle spielt (s. Kapitel 1.3).

2 Hypothese und Ziel der Studie

Wie oben dargelegt, stellen nicht targetspezifische Effekte, Off-Target-Effekte, von siRNAs ein wohlbekanntes Hindernis in RNAi-Experimenten dar. Die Hindernisse, welche zunächst in Bezug auf siRNAs geäußert und *in vitro* bestätigt wurden [118], werden nun auch seit über 15 Jahren in Zusammenhang mit Negativkontroll-siRNAs in der Fachwelt bei *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten diskutiert [119–121]. Neben den Kontroll-siRNAs konnte auch bei „scrambled“ miRNA-Inhibitoren, welche als Kontrollen in *in vivo*-Experimenten fungieren, die Beeinflussung der Genexpression und der Organentwicklung der Versuchstiere beobachtet werden [122]. Trotz der Fortschritte im Design und der Synthetisierung von siRNAs und Negativkontroll-siRNAs werden weiterhin Off-Target-Effekte beobachtet, exemplarisch gezeigt in einer 2019 – nach Beginn dieser Arbeit 2017 – publizierten, siRNA-basierten und -kontrollierten Intervention im Nierengewebe von Mäusen. Hierbei führte die verwendeten Negativkontroll-siRNA zu Off-Target-Effekten [123]. Die ursprüngliche Bestrebung die Qualität der RNAi basierten Experimente mit den kommerziellen Negativkontroll-siRNA zu erhöhen (s. Kapitel 1.6) wird durch Berichte der Beeinflussung der Zellen oder Organismen durch Kontroll-siRNAs (und Kontroll-miRNAs) [120, 122–124] nicht nur konterkarieren, sondern vermittelt darüber hinaus noch eine falsche und trügerische Sicherheit. Die Experimente sind nur vermeintlich kontrolliert und könnten die Grundlinie in einer Weise verzerren, dass die Ergebnisse verfälscht werden. Damit es nicht zu einer solchen Verzerrung kommt, dürfen die kommerziellen Negativkontrollen in Experimente, die zu einem wissenschaftlichen Mehrgewinn führen sollen (s. Kapitel 1.1), weder die Genexpression – und damit die Expression der Proteine – noch höhere Zellfunktionen, wie beispielsweise Proliferationsverhalten oder Viabilität, beeinflussen. Nur wenn dies der Fall ist, kann eine (kommerzielle) Negativkontroll-siRNA auch als Negativkontrolle in RNAi-Experimenten gelten, und nur dann können Ergebnisse interpretiert und analysiert werden. Nur unter dieser Prämisse führen die Experimente konsequent zu einem echten Wissenszuwachs.

Neben den Off-Target-Effekten durch siRNAs (und miRNAs) konnte außerdem beobachtet werden, dass Lipid-basierte Transfektionsreagenzien zelluläre Prozesse beeinflussen können [95]. Beispielhaft an der Störung der Cholesterols-Biosynthese zu sehen. Weshalb die Transfektionsreagenzien als wichtige Komponente der RNAi-Experimente ebenfalls kritisch betrachtet werden sollten [125].

Hypothese und Ziel der Studie

Auf Grundlage dieser Aspekte formulierten wir die vorgelagerte Hypothese, *dass die verwendeten Transfektionsreagenzien die von uns verwendeten Zelltypen nicht beeinflussen und somit keine Veränderungen im TGF- β -Signalweg bedingen*. Daneben lautet die Haupthypothese, *dass die kommerziellen Negativkontroll-siRNAs den TGF- β -Signalweg der verwendeten Zellen ebenfalls nicht beeinflussen*. Als zu beeinflussende Faktoren wurden Gen- und Proteinexpression sowie Proliferationsverhalten und Viabilität der verwendeten Zellen definiert. Die hier verwendeten Zellen beliefen sich auf primäre Mäuselungenfibroblasten, auf Zellen der Fibroblastenzelllinien NIH/3T3 und auf Endothelzellen der MLE-12-Zelllinie.

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war deshalb:

1. Die Überprüfung und Charakterisierung des Effekts von drei handelsüblichen Transfektionsreagenzien auf die Genexpression von Bestandteilen des TGF- β -Signalweges mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).
2. Die Erörterung der Effekte von fünf handelsüblichen und kommerziellen Negativkontroll-siRNAs. Die untersuchten Effekte belaufen sich hierbei auf den Gleichgewichtszustand der mRNA-Level von Bestandteilen des TGF- β -Signalweges mittels RT-qPCR, die Beeinflussung der Proteinmenge des Signalweges mittels Western Blot, die Erhebung des Proliferationsverhaltens der Zellen mithilfe des Proliferation Assay von Hoffman la Roche und die Erhebung der Zellviabilität mittels des MTT-Assay, ebenfalls von Hoffman la Roche.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Mit zwei Zelllinien der Gattung *Mus musculus* der Firma ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA wurden Experimente durchgeführt. Die embryonale Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) [126] und die Zelllinie MLE 12 (ATCC CRL-2110) [127], murine Lungenepithelzellen vom Typ 12, fanden Verwendung.

3.1.2 Primäre Zellen

Primäre Fibroblasten wurden aus Lungen von drei bis sechs Monate alten weiblichen Mäusen der Gattung *Mus musculus* des Inzucht-Mausstamms C57BL/6J isoliert. Die Mäuse kommen von der Firma Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, Massachusetts, USA. Die Tiernummern der zur Organentnahme verwendeten Tiere wurden an das zuständige *Regierungspräsidium Darmstadt* rapportiert.

3.1.3 Materialien

3.1.3.1 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Chemikalien und Verbrauchsmaterial	Hersteller	Katalog Nr.
0,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt	72.704
1,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt	72.706
10 × PCR Buffer II	Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific	4376212
2,0 ml Reagiergefäß	Sarstedt	72.695.500
4 × Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad	1610747
4–15 % Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel, 26 Well, 15 µl	Bio-Rad	5671085
6-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One™	657160

Material und Methoden

Chemikalien und Verbrauchsmaterial	Hersteller	Katalog Nr.
96-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One™	655180
Aceton > 99,7 %	Roth	5025.1
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A3059
Capillary Tips for Gel Loading, 1–200 µl	VWR	612-5008
Combitips advanced 0,5 ml	Eppendorf	0030089634
Combitips advanced 10 ml	Eppendorf	0030089677
Combitips advanced 5 ml	Eppendorf	0030089669
Complete™ Proteaseinhibitor	Roche	04693132001
Dimethylsulfoxid	SERVA	20385.01
DMEM, low glucose, GlutaMAX™ supplement, pyruvate	Gibco™ by ThermoFisher Scientific	21885025
dNTP Mix 10 mM	Promega	U151B
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (1× PBS)	Sigma-Aldrich	D8537
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (10× PBS)	Sigma-Aldrich	D1408
EASYSTRAINER 40 µm Filter	Greiner Bio-One™	542040
Ethanol > 99,8 %	Roth	9065.1
Fetales Kälberserum	Gibco™ by ThermoFisher Scientific	26140079
Filter Tips 0,1–10 µl	Greiner Bio-One™	771261
Filter Tips 20–1250 µl	Greiner Bio-One™	750260
Filter Tips 20–300 µl	Biosphere plus	70.765.210
Filter Tips 2–100 µl	Biosphere plus	70.760.212
Filter Tips 2–20 µl	Biosphere plus	70.760.213
Filter Tips 2–200 µl	Biosphere plus	70.760.211
Glycin	Roth	3187.3

Material und Methoden

Chemikalien und Verbrauchsmaterial	Hersteller	Katalog Nr.
HBSS, no calcium, no magnesium	Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific	14175-046
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen	301705
Isopropanol	Roth	AE73.1
Kollagenase von <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich	C0130
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One™	10309530
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen by ThermoFisher Scientific	11668030
Magnesiumchlorid 25 mM	Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific	R0971
MuLV Reverse Transkriptase	Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific	N8080018
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich	S6508
Nitril-Einmalhandschuhe	Roth	CPX8.1
Nukleasefreies Wasser	Ambion	AM9932
Opti-MEM™ Reduced Serum Medium, GlutaMAX™ Supplement	Gibco™ by Thermo Scientific	51985034
Penicillin-Streptomycin	Gibco™ by ThermoFisher Scientific	15140122
Petrischale 100/20 MM	Greiner Bio-One™	664160
Polyethersulfon, 0,22 µm Filter	Merck Millipore Ltd.	SLGP033RS
Protein Standard, Precision Plus Dual Color	Bio-Rad	1610374
qPCR Reaktionsplatte MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate 0,2 ml	Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific	N8010560
Quick Start™ Bradford Dye	Bio-Rad	5000205

Material und Methoden

Chemikalien und Verbrauchsmaterial	Hersteller	Katalog Nr.
Random Hexamers, 50 μ M	Invitrogen by ThermoFisher Scientific	N8080127
Recombinant Mouse TGF-beta 1 Protein	R&D Systems	7666-MB- 005
RIPA Buffer	Sigma Aldrich	R0278
RNase Inhibitor	Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific	N8080119
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt	86.1254.025
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt	86.1685.020
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt	86.1687.010
Sodium dodecyl sulfate (SDS), Lösung	Promega	V6553
SuperSignal [®] West femto maximum sensitivity substrate	ThermoFisher Scientific	34095
TC-Flasche T75	Sarstedt	83.3911.002
Teströhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One [™]	188261
Teströhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One [™]	227261
Trans-Blot Turbo Midi Nitrocellulose Transfer Packs	Bio-Rad	1704159
Tris	Roth	4855.2
Trypanblau-Lösung, 0.4%	Gibco [™] by ThermoFisher Scientific	15250061
Trypsin-EDTA (0,05%), Phenol Red	Gibco [™] by ThermoFisher Scientific	25300054
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich	P 9416
X-tremeGENE [™] siRNA Transfektionsreagenz	Roche	4476093001
Zellschaber, Steril	Sarstedt	101093-452
β -Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich	M6250

3.1.3.2 Liste der verwendeten Kits

Kits	Hersteller	Katalog Nr.
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche	11647229001
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche	11465007001
peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH	12-6834-02
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen by ThermoFisher Scientific	11733046

3.1.3.3 Liste der verwendeten small interfering RNAs (siRNAs)

Produkt	Hersteller	Katalog Nr.
AllStars Neg. Control siRNA (20 nmol)	Qiagen	1027281
Control siRNA-A	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	sc-37007
Mission siRNA Universal Negative Control #1 (10nmol)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland	SIC001
SignalSilence(R) Control siRNA (Unconjugated)	Cell Signaling Technology	6568
Silencer Negative Control siRNA	Ambion, Austin, USA	AM4611
Smad2 siRNA (m)	Santa Cruz Biotechnology	sc-38375
TGFβ RIII siRNA (m)	Santa Cruz Biotechnology	sc-40225

3.1.3.4 Liste der Sequenzen der verwendeten Primer

Die verwendeten Primerpaare wurden von Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland, synthetisiert. Sie lagen in Form der Sense- (s) und Antisense- (as) Oligonukleotide in einer Vorratskonzentration von 100 pmol/μl vor. Sie wurden vor der jeweiligen Verwendung 1:10 mit nukleasefreiem bidestilliertem Wasser (ddH₂O) auf eine

Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt und als Primerverdünnung (s. Tabelle 6) zusammengebracht.

Gen	Richtung	Art	Sequenz
<i>PAI-1</i>	s	Maus	5'- TTCAGCCCTTGCTTGCCTC -3'
<i>PAI-1</i>	as	Maus	5'- ACACTTTTACTCCGAAGTCGGT -3'
<i>Polr2a</i>	s	Maus	5'- CTAAGGGGCAGCCAAAGAAAC -3'
<i>Polr2a</i>	as	Maus	5'- CCATTCAGCATACA ACTCTAGGC -3'
<i>Smad2</i>	s	Maus	5'- AAGCCATCACC ACTCAGAATTG -3'
<i>Smad2</i>	as	Maus	5'- CACTGATCTACCGTATTTGCTGT -3'
<i>Smad3</i>	s	Maus	5'- AGGGGCTCCCTCACGTTATC -3'
<i>Smad3</i>	as	Maus	5'- CATGGCCCGTAATTCATGGTG -3'
<i>Smad4</i>	s	Maus	5'- ACACCAACAAGTAACGATGCC -3'
<i>Smad4</i>	as	Maus	5'- GCAAAGGTTTCACTTTCCCCA -3'
<i>Smad7</i>	s	Maus	5'- GGCCGGATCTCAGGCATTC -3'
<i>Smad7</i>	as	Maus	5'- TTGGGTATCTGGAGTAAGGAGG -3'
<i>Tgfb1</i>	s	Maus	5'- CAGCACGGCCCCAATGTAT -3'
<i>Tgfb1</i>	as	Maus	5'- GGGACCTTTTCATATCCAGGACA -3'
<i>Tgfb2</i>	s	Maus	5'- CGAAGAGCTCGAGGCGAGAT -3'
<i>Tgfb2</i>	as	Maus	5'- GGCTGGACTGTTGTGACTCCA -3'
<i>Tgfb3</i>	s	Maus	5'- ATTGACTTCCGGCAGGATCTA -3'
<i>Tgfb3</i>	as	Maus	5'- CCTCTGGGTT CAGGGTGTGTGTA -3'
<i>Tgfbr1</i>	s	Maus	5'- AGAGCGTTCATGGTTCCGAGAG -3'
<i>Tgfbr1</i>	as	Maus	5'- GGGGCCATGTACCTTTTAGTGC -3'
<i>Tgfbr2</i>	s	Maus	5'- CCAAGATGCCCATTTGTT CACA -3'
<i>Tgfbr2</i>	as	Maus	5'- CATCCTGGATTCTAGAACTTC -3'
<i>Tgfbr3</i>	s	Maus	5'- ATGGCAGTGACATCCCACCACAT -3'
<i>Tgfbr3</i>	as	Maus	5'- AGAACGGTGAAGCTCTCCATCA -3'

3.1.3.5 Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Primäre Antikörper

Produktname	Wirt Verdünnung	Hersteller	Katalog Nr.
Phospho-Smad2 (Ser245/250/255) Antibody	Hase 1:1000	Cell Signaling Technology	3104
Phospho-Smad2 (Ser465/467)/Smad3 (Ser423/425) (D27F4) Rabbit mAb	Hase 1:1000	Cell Signaling Technology	8828
Phospho-Smad3 (Ser423/425) (C25A9) Rabbit mAb	Hase 1:1000	Cell Signaling Technology	9520
Smad2/3 Antibody	Hase 1:1000	Cell Signaling Technology	5678
TGF- β Receptor III Antibody	Hase 1:1000	Cell Signaling Technology	2519
β -Actin Antibody	Hase 1:2500	Cell Signaling Technology	4967

Sekundäre Antikörper

Produktname	Wirt Verdünnung	Hersteller	Katalog Nr.
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Ziege 1:3000	Thermofisher Scientific	31460

3.1.4 Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Beheiztes Wasserbad	Vogel
Biorad PowerPac 3000 Electrophoresis Power Supply	Bio-Rad
CO ₂ - Inkubator, Heracell™ 150i	Thermo Scientific™
Criterion™ Cell, Elektrophoresekammer	Bio-Rad

Gerät	Hersteller
GasDocUnit TYP BL 1145	Tecniplast
InoLab® pH Meter	WTW
Leica DMi1	Leica
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific™
NanoDrop™ One Spectrophotometer	Thermo Scientific™
NanoQuant, Infinite® 200 PRO	Tecan
OP-Besteck	Fine Science Tools
PCR- Thermocycler peqSTAR	VWR
Pipetboy	Integra
Pipette automatisch 10 µl	Eppendorf
Pipette automatisch 300 µl	Eppendorf
Pipette manuell 10 µl,	Eppendorf
Pipette manuell 100 µl	Eppendorf
Pipette manuell 1000 µl	Eppendorf
Pipette manuell 20 µl	Eppendorf
Pipette manuell 200 µl	Eppendorf
Pipette Multichannel 300 µl	Eppendorf
Pipette Multipette E3x 1 µl – 50 ml	Eppendorf
Präzisionswaage	VWR
QuantStudio 3 qPCR-Cycler	Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific
Schüttelgeräte, Unimax 1010	Heidolph
Sicherheitswerkbank, Safe 2020	Thermo Scientific™
Thermo-Shaker MS-100	Universal Labortechnik
Vortexer	VWR
Western Blot Transfer System Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad
Zählkammern, Neubauer improved	Laboroptik
Zentrifuge CT 15 RE himac	Hitachi
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus

3.1.5 Liste der verwendeten Software

Software	Software-Anbieter
Adobe Illustrator	Adobe
Graphpad Prism 6.0	Graphpad Software Inc.
ImageJ Fiji	Fiji
Imager ImageQuant [®] LAS 4000	GE Health Care
Microsoft Excel 2010	Microsoft
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft
Microsoft Word 2010	Microsoft
QuantStudio [®] Design & Analysis Software	Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific
SoftMax [®] Pro Software	Molecular Devices

3.2 Methoden

Falls nicht anders angegeben, wurden die Experimente bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Isolierung primärer Fibroblasten

Die weiblichen Mäuse wurden mittels Kohlenstoffdioxid (CO₂) in der GasDocUnit von Agnieszka Pozarska tierschutzgerecht getötet. Anschließend wurde die Tiere mit 70% Ethanol, insbesondere im Bereich der Hautschnitte, desinfiziert, das Abdomen eröffnet und das Diaphragma punktiert, wodurch der Lunge das Kollabieren ermöglicht wurde. Die anschließende Eröffnung des Brustkorbs erfolgte mittels Durchtrennung des Sternums. Eine Inzision am linken Antrum führte zum Ausbluten des Tieres, woraufhin der rechte Ventrikel mit einer Nadel punktiert wurde, über welche mittels Spritze Herz und Lunge mit 1× PBS gespült wurden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Lungenflügel gänzlich weiß und damit blutleer imponierten. Herz und Lungenflügel konnten dann *en bloc* entnommen und in eine Petrischale auf Eis gebettet werden. Nach Überführung der Petrischale unter die Sterilwerkbank wurden mittels Operationsbestecks Herz und Lungenflügel voneinander, sowie das Lungengewebe von Trachea und Bronchialbaum, separiert. Herz, Trachea und Bronchialbaum wurde verworfen und das Lungengewebe so weit zerkleinert, bis ein Lungenhomogenat entstand. Das Lungenhomogenat wurde in ein zuvor auf 37 °C (Grad Celsius) erwärmtes 50-ml-Teströhrchen überführt und bei 37 °C für 45 min mittels Schüttelgerät bei 70 U/min inkubiert. Das 50-ml-Teströhrchen enthielt 50 mg Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* gelöst in 25 ml HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution). Die inkubierte Suspension wurde darauf folgend durch einen 40-µm-Filter gefiltert und bei 4 °C für 8 min bei 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Rückstand in Form eines Zellpellets in 10 ml Kulturmedium gelöst und in eine T-75-Kulturflasche übertragen. 24 h nach Übertragung in die T-75-Kulturflasche wurden die Zellen mit 10 ml 1× PBS gewaschen und mit neuem Kulturmedium versetzt und entsprechend Kapitel 3.2.1.2. passagiert. Das Kulturmedium bestand hierbei aus *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), versetzt mit 10% (v/v) Fetalem Kälberserum (FKS) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (P/S). Nach dem Waschschrift nach 24 h und während des Passagierens erfolgte die visuelle Überprüfung der Zellen mittels

Lichtmikroskopie, wobei neben der charakteristischen Morphologie der primären Fibroblasten keine anderen Zelltypen beobachtet wurden. Die Isolierung der primären Mäuselungenfibroblasten geschah analog zum bereits im Labor etablierten Protokoll [128, 129], welches seit über 20 Jahren Verwendung findet und auf der ursprünglichen Publikation von Rose et al. [130] beruht in der die Isolation von primären Fibroblasten aus Lungen optimiert wurde. Von Rose et al. wurde die primäre Fibroblastenkultur mittels Lichtmikroskop und Immunhistochemie auf ihre Reinheit überprüft. Die Fibroblasten zeigten sich stets immunreaktiv auf Vimentin, wobei die Antikörperfärbungen gegen Cytokeratin und Von-Willebrand-Faktor kein Signal zeigten. Dies wies darauf hin, dass die primäre Fibroblastenzellkultur keine signifikante Anzahl von Epithel- und Endothelzellen beinhaltet und somit als reine Fibroblastenzellkultur angesehen wird [130]. Die ausschließliche Verwendung der primären Lungenfibroblasten in der dritten Passage, bei im Vergleich schnellem Zellwachstum von Fibroblasten zu anderen Zelltypen, steht im Einklang mit dieser Beobachtung.

3.2.1.2 Passagieren der Zellen

Das Kulturmedium der beiden Zelllinien NIH/3T3 und MLE 12 beinhaltet, im Vergleich zum Kulturmedium der primären Lungenfibroblasten, anstelle von 10 % nur 2 % FKS, der P/S-Anteil war jedoch derselbe. Alle Zellen wurden in T-75-Kulturflaschen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem Gasanteil von 5 % CO₂ kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte dabei alle 2–3 Tage, wobei die Medien bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt wurden. Alle Passagierarbeiten erfolgten unter Sterilwerkbänken. Erreichten die adhärenenten Zellen eine Konfluenz von 80 %, wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde das Nährmedium entnommen, die Zellen mit 10 ml 1× PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin für 3 min im CO₂-Inkubator inkubiert. Hiernach wurden 17 ml Nährmedium auf die Zellen pipettiert, um das Trypsin zu neutralisieren. Im Anschluss wurden die suspendierten Zellen in neue Kulturflaschen in jeweils 10 ml Medium überführt oder auf Gewebekulturplatten ausgesät. Primäre Fibroblasten wurden ausschließlich in der dritten Passage verwendet. Die Zelllinien wurden, um das Auftreten von Veränderungen zu minimieren, nicht länger als 9 Wochen kultiviert und anfangs in Einfriermedium zu 2×10^6 Zellen/ml portioniert und kryokonserviert.

3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden zunächst, nach dem Auftauen (Kapitel 3.2.1.4) analog zu Kapitel 3.2.1.2 mehrmalig passagiert, um genügend Zellen für die Kryokonservierung zu generieren. Nach Erreichen einer 80 % Konfluenz in den T-75-Kulturflaschen, wurden die Zellen trypsiniert und nach Bestimmung der Zellzahl (Kapitel 3.2.1.5) in ein 50-ml-Teströhrchen transferiert und für 10 min bei 125 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, verworfen und der Rückstand in der passenden Menge Einfriermedium, DMEM, versetzt mit 5 % DMSO, resuspendiert. Kryo-Röhrchen wurden mit 1 ml Zellsuspension (1.000.000 Zellen/ml) befüllt und im Gefrierbehälter, welcher mit 2-Propanol befüllt war, über Nacht (ü. N.) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Am darauf folgenden Tag wurden die Kryo-Röhrchen in den $-168\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalten Stickstofftank zur Langzeitaufbewahrung überführt.

3.2.1.4 Auftauen und Reaktivierung der kryokonservierten Zellen

Eine T-75-Gewebekulturflasche wurde mit 10 ml Kulturmedium befüllt und für 30 min in den Inkubator gestellt. Die aufzutauenden Kryo-Röhrchen wurden dem Flüssigstickstofftank entnommen, unter Schwenkbewegungen im Wasserbad aufgetaut und in die zuvor erwärmte Gewebekulturflasche überführt. Mit dem Pipetboy wurde die Zellsuspension durchmischt. Ein Medienwechsel erfolgte hierbei bereits am folgenden Tag.

3.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl in den Zellsuspensionen ermittelt. Dies geschah, um alle Versuche mit einer vergleichbaren Zellzahl durchzuführen und die Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten. An der Sterilwerkbank wurden zunächst 200 μl der Zellsuspension entnommen und in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß mit 200 μl Trypanblau vermischt. Von dieser Zellsuspension wurden 10 μl in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Neubauer-Zählkammer wurde nach dem Protokoll des Herstellers (http://zaehlkammer.de/pdf/info_zaehlkammern.pdf) verwendet. Abbildung 5 soll zur Verdeutlichung dienen.

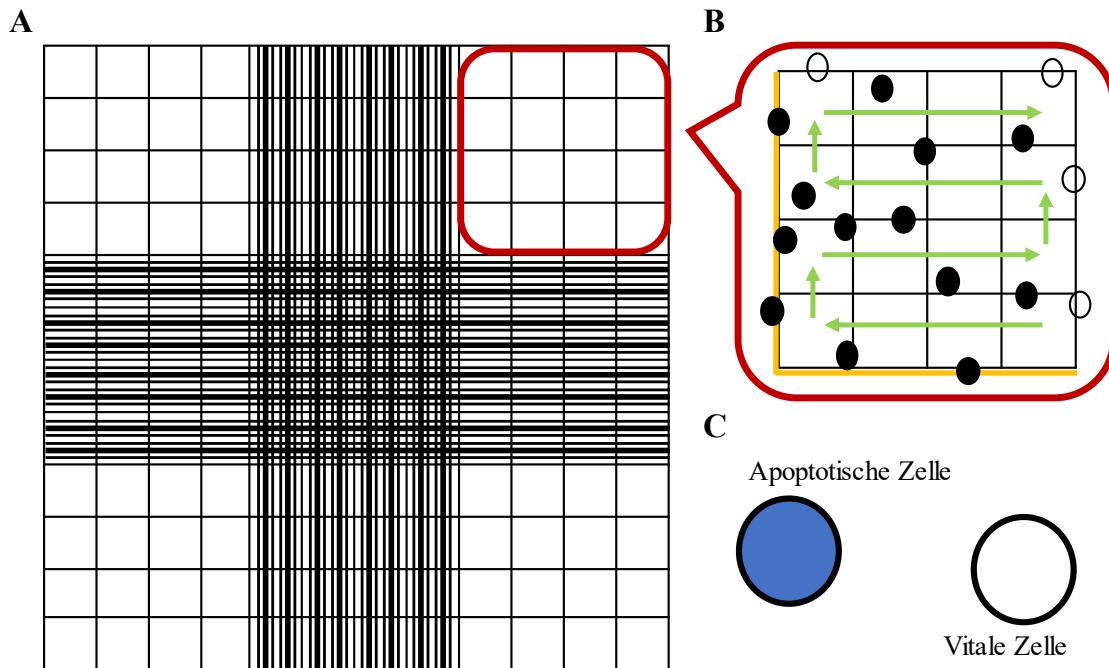


Abbildung 5: Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

A) Übersicht Neubauer-Zählkammer. In den vier Ecken der Neubauer-Zählkammer befindet sich jeweils ein Großquadrant (rot umrandet) bestehend aus 16 kleineren Quadranten. **B) Systematische Zellbestimmung in einem Großquadranten.** Es wurde in der rechten unteren Ecke eines Großquadranten mit der Zählung begonnen und sich anschließend in einer schlangelnden Bewegung (grüne Pfeile) nach oben vorgearbeitet. Zur Vermeidung einer Doppelzählung wurden nur die Zellen gezählt (als ausgefüllte Kreise dargestellt), die entweder vollständig in den kleineren Quadranten liegen oder die linke bzw. untere Begrenzung (gelbe Linien) berühren. Zellen, die in der Zählung nicht berücksichtigt wurden, werden beispielhaft als transparente Kreise dargestellt. **C) Bestimmung der Zellvitalität mittels Trypanblau.** Vitale Zellen nehmen kein Trypanblau auf (farbloser Kreis), wohingegen apoptotische Zellen diesen Farbstoff aufnehmen und angefärbt werden (blauer Kreis). Lediglich vitale Zellen wurden in der Zählung berücksichtigt.

Die Zellzahl eines Milliliters der Zellsuspension ergab sich aus der Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Ausgezählte Gesamtzellzahl} \times 10^4}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadranten} \times \text{Verdünnung}}$$

Erläuterung: Das Volumen eines Zählquadranten wird mit 0,1 µl angegeben. Um auf die Zellzahl pro ml zu gelangen, wurde deshalb zunächst mit 10⁴ multipliziert. Da stets vier Großquadranten ausgezählt wurden, betrug der Wert der Variabel „Anzahl der ausgezählten Großquadranten“ vier. Der Faktor der Verdünnung betrug fortwährend ½, da stets zu gleichen Teilen Zellsuspension mit Trypanblau gemischt wurde. Trypanblau

diente als interne Kontrolle zur qualitativen Bestimmung der Zellviabilität. Abgestorbene Zellen nahmen hierbei den Farbstoff Trypanblau auf und färben sich blau, lebende Zellen blieben dagegen farblos (s. Abbildung 5C). Lediglich vitale Zellen wurden berücksichtigt.

3.2.2 Transfektion der siRNAs

Am Vortag der Transfektion wurden jeweils 200.000 Zellen/Vertiefung (Well) in die 6-Vertiefungs-Gewebekulturplatte (6-Well-Gewebeplatte) oder jeweils 6.000 Zellen/Well in die 96-Well-Gewebeplatte gesät und bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gasanteil für 24 h kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurde das Kulturmedium entnommen, die Zellen mit 1 × PBS gewaschen und mit den vorbereiteten Transfektionsmedien für 6 h transfiziert. Die Transfektionsmedien wurden in 1,5-ml-Reagiergefäßen nach dem Pipettierschema von Tabelle 2 vorbereitet und für 30 min unter der Sterilwerkbank inkubiert. Analog hierzu erfolgte die Behandlung der Zellen mit den unterschiedlichen Transfektionsreagenzien (s. Tabelle 1). Die siRNA gegen *Tgfbr3* diente bei den primären Fibroblasten sowie bei den NIH/3T3-Zellen als Positivkontrolle der Transfektion. Dagegen fungierte die siRNA gegen *Smad2* bei den MLE-12-Zellen als Positivkontrolle. Die 6-Well-Gewebekulturplatten beinhalteten je Vertiefung die gesamten 1000 µl des vorbereiteten Transfektionsmediums, während die 96-Well-Gewebekulturplatten je Vertiefung nur 100 µl der vorbereiteten Transfektionsmedien enthielten. Nachdem die Zellen für jeweils 6 h mit dem Transfektionsmedium inkubiert wurden, wurde das Transfektionsmedium entnommen, die Zellen mit 1 × PBS gewaschen und anschließend mit frischem Kulturmedium für 42 h kultiviert.

Tabelle 1: Konditionen der Zellbehandlung

Kondition	Menge Opti-MEM [µl]	Menge Transfektionsreagenz [µl]
Untransfiziert	1000	0
X-tremeGENE™	995	5
HiPerFect	995	5
Lipofectamine™ 2000	995	5

Tabelle 2: Pipettierschema der Transfektion

Kondition	Menge Opti-MEM [μl]	Menge X- tremeGENE [μl]	Menge siRNA [μl]	Endkon- zentration [nM]
Untransfiziert	1000	0	0	0
Mock-Kontrolle	995	5	0	0
Ktr.-siRNA von Ambion	993	5	2	100
Ktr.-siRNA von Santa Cruz	985	5	10	100
Ktr.-siRNA von Qiagen	990	5	5	100
Ktr.-siRNA von Sigma	990	5	5	100
Ktr.-siRNA von Cell Signaling Technology	985	5	10	100
siRNA gegen <i>Tgfbr3</i> von Santa Cruz	985	5	10	100
siRNA gegen <i>Smad2</i> von Santa Cruz	985	5	10	100

Abkürzungen: Ktr.-siRNA: Kontroll-small interfering RNA

3.2.3 RNA-Extraktion aus den Zellen

Zur Gewinnung der RNA aus den verschiedenen Zellarten wurde das peqGOLD Total RNA Kit verwendet und das Protokoll des Herstellers angewandt. Nach Ablauf von 42 h (Kapitel 3.2.2) wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 1× PBS gewaschen und 400 μ l des mitgelieferten Lysepuffers des Kits in jedes der Vertiefungen der 6-Well-Gewebekulturplatte pipettiert und die restlichen adhärennten einschichtigen Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Anschließend wurde das Lysat auf die DNA Removing Column gegeben und für 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde in einem frischen Reagiergefäß aufgefangen und anschließend zu gleichen Teilen mit 70 % Ethanol vermischt und mittels Pipette ordentlich durchmischt. Das Gemisch wurde dann auf die PerfectBind RNA Column gegeben und mit 10.000 g für 1 min zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Auf die PerfectBind RNA Column wurden

anschließend 500 µl RNA-Waschpuffer I pipettiert und für 15 s bei 10.000 g zentrifugiert. Der gleiche Reinigungsschritt wurde mit 600 µl des RNA Wash Buffer II wiederholt. Anschließend wurde die PerfectBind RNA Column bei 10.000 g für 2 min trocken zentrifugiert. Um nun die RNA aus der PerfectBind RNA Column herauszulösen, wurde 70 µl nukleasefreies ddH₂O auf die Säule pipettiert und für 3 min inkubiert. Abschließend werden die Säulen bei 5.000 g für 1 min zentrifugiert und der Säulendurchfluss in einem frischen Reagiergefäß des Kits aufgefangen.

3.2.4 cDNA-Synthese

Die RNA-Konzentration der einzelnen RNA-Proben wurde mit dem NanoDrop bei einem Absorptionsverhältnis von A_{260/280} über 1,90 ermittelt. Die gemessenen Konzentrationen berücksichtigend, wurden, mittels nukleasefreiem ddH₂O, Proben mit jeweils 800 ng RNA in einem Endvolumen von 20 µl für die cDNA-Synthese hergestellt. Die einzelnen RNA-Proben wurden bei 70 °C für 10 min im PCR-Thermocycler peqSTAR erhitzt und damit denaturiert. Hiernach wurde der Mastermix, Tabelle 3, beigefügt. Mittels des PCR-Thermocycler wurde dann eine Reverse-Transkriptase- (RT-)PCR zur Synthese der cDNA durchgeführt. Das verwendete Programm ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die so entstandenen cDNA-Proben wurden abschließend mit 60 µl nukleasefreiem ddH₂O verdünnt und auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Sie konnten entweder direkt für weitere Experimente verwendet werden oder bei -20 °C zur Lagerung tiefgefroren werden.

Tabelle 3: Mastermixzusammensetzung [Volumen/Probe] der Reverse-Transkriptase-PCR

Reagenz	Volumen [µl]
10× PCR Buffer II	4
dNTPs (10 mM)	2
Magnesiumchlorid (25 mM)	8
MuLV Reverse Transkriptase (50 U/µl)	2
Nukleasefreies ddH ₂ O	1
RNase-Inhibitor (20U/µl)	1
Random Hexamers (50 µM)	2
Volumen/Probe	20

Tabelle 4: Thermocyclerprogramm für Reverse-Transkriptase-PCR

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Effekt
21	10	Anheftung der Hexamere
43	75	Reverse Transkription
99	5	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
4	Unbegrenzt	Zur Lagerung

3.2.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Die Genexpressionsanalyse wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR, im Englischen „Real Time quantitative PCR“ (RT-qPCR), in einem QuantStudio 3 qPCR-Cycler durchgeführt. Das verwendete Programm ist in Tabelle 5 aufgeführt und wurde bereits früher im Labor angewandt [131]. In Bezug auf das stets verwendeten qPCR-Programm (Tempertauten, Zeiten und Zyklen, siehe Tabelle 5) waren die verwendeten Primer, Kapitel 3.1.3.4, bereits im Labor etabliert und getestet worden [132]. *RNA Polymerase II Untereinheit A (Polr2a)*, aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, diente als Referenzgen. Zu den 2 µl cDNA der jeweiligen Proben wurden die weiteren Bestandteile nach dem Pipettierschema in Tabelle 6 hinzugefügt. Das Endvolumen der Proben entsprach 25 µl/Probe. Für jede der Proben wurden jeweils zwei Messwerte, „Cycle Threshold“ (CT), ermittelt. Die Δ CT-Werte kommen darüber zustande, dass die CT-Mittelwerte des jeweiligen Zielgens von den CT-Mittelwerten des entsprechenden Referenzgens, in diesem Fall *Polr2a*, subtrahiert werden: Δ CT = CT(*Polr2a*) – CT(Zielgen) [117].

Tabelle 5: Real Time qPCR Programm

Phase	Temp. [°C]	Zeit [s]	Effekt	Zyklen [Anzahl]
Initial-Phase	50	120	Aktivierung der Polymerase	1
	95	300	Initiale Denaturierung der cDNA	
PCR-Phase	95	5	Denaturierung der cDNA	40
	59	5	Anheftung der Primer	
	72	30	Elongation	
Schmelzkurven-Phase	95	15		1
	60	60		
	95	15		
	60	15		

Abkürzungen: Temp.: Temperatur

Tabelle 6: Pipettierschema der Real Time qPCR [Volumen/Probe]

Reagenz	Volumen [µl]
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (SYBR Green komplettiert mit ROX Dye)	13
Platinum SYBR Green Magnesiumchlorid (50 mM)	1
Primerverdünnung (Sense und Antisense je 10 pmol/µl)	1
Nukleasefreies ddH ₂ O	8
cDNA	2
Volumen/Probe	25

3.2.6 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Aufgrund des zugrunde liegenden TGF- β -Signalwegs wurden sowohl die primären Mauslungen-Fibroblasten als auch die NIH/3T3-Zellen mittels TGF-beta-1-Liganden vor der Western-Blot-Analyse sowie der Bestimmung der Zellviabilität und der Zellproliferation stimuliert [117]. Die Isolierung, Kultivierung und das Passagieren der Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben. Für die Western-Blot-Analyse wurde das DMEM-Kulturmedium (s. Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2) der jeweiligen Zellen jedoch 45 min vor Ablauf der 42-h-Frist entfernt und die Zellen für die verbleibende Zeit mit neuem, auf 37 °C vorgewärmten und zusätzlich mit TGF-beta 1 versetzten DMEM-Kulturmedium (2 ng/ml) inkubiert. Vor der Proteinextraktion wurden die Zellen 42 h nach Transfektion (Kapitel 3.2.2) zunächst mit 1 \times PBS gewaschen. Anschließend wurde jeweils 150 μ l des Lysepuffers in die Vertiefungen der 6-Well-Gewebekulturplatte gegeben und für 10 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Der Lysepuffer bestand hierbei aus 1000 μ l Ripa-Puffer versetzt mit 40 μ l der Vorratslösung des cOmplete™ Proteaseinhibitors (1 Tablette in 2 ml ddH₂O) und 10 μ l der 1-mM-Vorratslösung Natriumorthovanadat. Mit dem Zellschaber wurden die letzten Zellen in den Vertiefungen mechanisch gelöst. Das jeweilige Lysat wurde anschließend in 1,5-ml-Reagiergefäße überführt und die Proben bei 4 °C und 13.000 U/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde abgenommen und in ein frisches 1,5-ml-Reagiergefäß übertragen. Das Zellschrottpellet wurde verworfen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mithilfe des Bradford-Assay in einer 96-Well-Gewebekulturplatte bestimmt. Hierfür wurden die Proben zunächst 1:10 mit ddH₂O verdünnt. Zu 10 μ l dieser Verdünnung wurden 200 μ l Quick Start™ Bradford Dye hinzugegeben und für 5 min inkubiert. Zuvor wurden Proben mittels BSA mit aufsteigender Konzentration von 0,05 μ g/ μ l, 0,1 μ g/ μ l, 0,2 μ g/ μ l, 0,3 μ g/ μ l, 0,4 μ g/ μ l, und 0,5 μ g/ μ l hergestellt und ebenfalls in die 96-Well-Gewebekulturplatte pipettiert. Die BSA-Proben fungierten als Referenzkonzentrationen für die Standardkurve, welche ihrerseits zur Ermittlung der Proteinkonzentration herangezogen wurde. Mit NanoQuant Infinite® 200 PRO wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

3.2.7 Proteinaufkonzentrierung und Proteinelektrophorese

Proteinproben mit 20 ng in 50 µl ddH₂O wurden in 0,5-ml-Reagiergefäßen hergestellt und mit 200 µl –20 °C kaltem Aceton versetzt, unter Zuhilfenahme des Vortexmixers gemischt und bei –20 °C für 60 min. inkubiert. Anschließend wurde die Proben für 10 min bei 15.000 × g zentrifugiert. Der Acetonüberstand wurde entnommen und die Proben für 30 min mit geöffnetem Deckel stehen gelassen, um das restliche Aceton evaporieren zu lassen. 10 µl 4 × Laemmli Sample Puffer, versetzt mit β-Mercaptoethanol (9:1), wurden zu den Proteinpellets hinzugegeben und mit dem Vortexmixer gemischt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und mit Pipette in die Taschen des 26-Well Midi Protein Gel pipettiert. Über das Midi Gel wurde in einer Gel-Elektrophoresekammer mittels des Biorad PowerPac™ 3000 Electrophoresis Power Supply eine Spannung von 100 V im 1× SDS Laufpuffer (s. Tabelle 7) angelegt und damit die Gelelektrophorese durchgeführt und die Proteine aufgetrennt. Mit dem Western-Blot-Transfersystem Trans-Blot® Turbo wurden die aufgetrennten Proteine auf die Trans-Blot Turbo Midi Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde abschließend mit dem 5 % BSA-Blockierpuffer (s. Tabelle 8) für eine Stunde blockiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung des 10× SDS Laufpuffer für Western Blot

Bestandteile	Menge [g]
SDS	10
Tris	30
Glycin	144

Die Bestandteile wurde in und mittels ddH₂O auf ein Lagervolumen von 1000 ml gebracht. Um den fertigen 1× SDS Laufpuffer zu erhalten wurden jeweils 100ml des 10× SDS Laufpuffers mit 900 ml ddH₂O verdünnt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des 5 % BSA-Blockierpuffer für Western Blot

Bestandteile	Menge
BSA-Pulver	5 g
1× PBS	100 ml

3.2.8 Western-Blot-Analyse

Vor dem Inkubieren mit einem primären oder sekundären Antikörper wurde die Membran unter Schwenkbewegungen mit 1× PBS Waschpuffer (s. Tabelle 9) für eine halbe Stunde gewaschen, dabei wurde der Waschpuffer alle 5 min ausgetauscht. Die verdünnten Primärantikörper, Kapitel 3.1.3.1, gegen die jeweiligen Zielproteine wurden jeweils ü. N. bei 4 °C und der sekundäre Antikörper, Kapitel 3.1.3.1, anschließend für eine Stunde bei RT inkubiert. Alle Antikörper wurden in 5 % BSA in 1 × PBS verdünnt. Die Auswertung der Membran fand am Imager ImageQuant® LAS 4000 mithilfe des SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate statt. β -Aktin wurde bei allen Versuchen als Ladungskontrolle benutzt. Die Membran wurde nach jeder Auswertung mithilfe von 50 ml Abstreifpuffer (s. Tabelle 10) und 347 μ l β -Mercaptoethanol bei 52 °C für 7 min von den zuvor benutzten Antikörpern gesäubert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des 1 × PBS Waschpuffer für Western Blot

Bestandteile	Menge [ml]
Tween® 20	2
10× PBS	200
ddH ₂ O	1800

Tabelle 10: Zusammensetzung des Abstreifpuffers für Western Blot

Bestandteile	Menge [ml]
10% SDS	10
1,0 M Tris, pH 6.8	31
1× PBS	459

3.2.8.1 Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung der Protein-Steady-State-Level wurden die am Imager ImageQuant® LAS 4000 erstellten Aufnahmen des entsprechenden Western Blots eine Densitometrie unterzogen. Mittels des Programms ImageJ Fiji wurde zunächst die

Gesamtpixelzahl der einzelnen Proteinbanden bestimmt. Die Gesamtpixelzahl des Zielproteins wurde anschließend durch die entsprechende Gesamtpixelzahl des Referenzproteins, stets β -Aktin, derselben Probe dividiert und mittels des Programms GraphPad Prism 6.0 statistisch ausgewertet.

3.2.9 Bestimmung der Zellproliferationsrate

Die Zellproliferationsrate der NIH/3T3-Zelllinie sowie der primären Mäuselungenfibroblasten wurde in einer 96-Well-Gewebeplatte unter Inkorporation von Bromdesoxyuridin (BrdU) und mittels des Zellproliferations-Kits von Roche ermittelt. BrdU wird hierbei als Thymidinanalogon bei der DNA-Synthese in den DNA-Strang eingebaut und nach Denaturierung mittels Antikörperkonjugat markiert. Die Zellen wurden zuvor, wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, gesät, kultiviert und passagiert. Anschließend fand die Transfektion, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, statt. Für die Ermittlung der Zellproliferation in Bezug auf den TGF- β -Signalweg wurde die Hälfte der 96-Well-Gewebekulturplatte des jeweiligen Experiments für die gesamten 42 h, nach der Transfektion, mit dem zusätzlich mit TGF-beta 1 versetzten DMEM-Kulturmedium (2 ng/ml) inkubiert. 40 h nach der Transfektion wurden alle Zellen zusätzlich mit 10 μ l/Well des BrdU-Kennzeichnungsgemischs nach der Anleitung von Roche für 2 h inkubiert. Unter Befolgung der Anleitung von Roche wurden die nächsten Schritte durchgeführt und die Absorption abschließend mit dem NanoQuant Infinite® 200 PRO bei einer Wellenlänge von 370 nm gemessen. Es wurden Blindkontrollen und Hintergrundkontrollen, wie in Tabelle 11 angegeben, durchgeführt.

Tabelle 11: Blindkontrollen und Hintergrundkontrollen zum Proliferations-Kit

Kontrolle	Volumen [μl]	Bestandteile
Blindkontrolle	100	Kulturmedium
	100	Anti-BrdU-POD
	10	BrdU
Hintergrundkontrolle	100	Kulturmedium
	100	Anti-BrdU-POD
		Gesäte Zellen (20.000 Zellen/Well)

3.2.10 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellebensfähigkeit der NIH/3T3-Zelllinie sowie der primären Mäuselungenfibroblasten wurde in einer 96-Well-Gewebekulturplatte mit dem wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) und mittels des Viabilitäts-Kits von Roche ermittelt. Hierbei wird von vitalen Zellen gelber MTT-Farbstoff mittels mitochondrialer Succinat-Dehydrogenasen und NAD(P)H abhängig zu violetter wasserunlöslichen Formazan reduziert. Die Zellen wurden zuvor, wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, gesät, kultiviert und passagiert. Anschließend fand die Transfektion, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, statt. Für die Ermittlung der Zellviabilität in Bezug auf den TGF- β -Signalweg wurde die Hälfte der 96-Well-Gewebekulturplatte des jeweiligen Experiments analog zu der Bestimmung der Zellproliferationsrate (s. Kapitel 3.2.9) für die gesamten 42 h, nach der Transfektion, mit dem zusätzlich mit TGF-beta 1 versetzten DMEM-Kulturmedium (2 ng/ml) inkubiert. 38 h nach der Transfektion wurden alle Zellen zusätzlich mit 10 μ l/Well des MTT- Markierungsreagenzgemischs nach der Anleitung von Roche für 4 h inkubiert. Unter Befolgung der Anleitung von Roche wurden auch die nächsten Schritte durchgeführt sowie die Absorption abschließend mit dem NanoQuant Infinite® 200 PRO bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Es wurden Blindkontrollen und Hintergrundkontrollen zur Vergleichbarkeit, wie in Tabelle 12, durchgeführt.

Tabelle 12: Blindkontrollen und Hintergrundkontrollen zum Viabilitäts-Kit

Kontrolle	Volumen [μl]	Bestandteile
Blindkontrolle	100	Kulturmedium
	100	Solubilisierungslösung
	10	MTT-Markierungsreagenz
Hintergrundkontrolle	100	Kulturmedium
	100	Solubilisierungslösung
		Gesäte Zellen (20.000 Zellen/Well)

3.2.11 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen erfolgten mittels der GraphPad Prism 6.0 Software. Um mehrere Gruppen vergleichen zu können, wurde eine Varianzanalyse, eine einfache – englisch *one-way* – ANOVA („analysis of variance“), mit dem Tukey’s *post-hoc* Test durchgeführt und als Mittelwert (M) \pm SD (Standardabweichung, „standard deviation“) dargestellt. p -Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Ausreißeranalyse fand mithilfe des Grubbs-Tests statt, wobei keine Ausreißer gefunden wurden. Die Festlegung der finalen Gruppengröße in den jeweiligen Experimenten erfolgte nach zuvor durchgeführten Pilotexperimenten und anschließender Stichprobengrößenberechnung für die *one-way* ANOVA bei einer Teststärke von 0,8 und eines Signifikanzniveaus von p -Werte $\leq 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Transfektionsreagenzien beeinflussen die mRNA-Steady-State-Level

Um zu untersuchen, ob Transfektionsreagenzien die Steady-State-mRNA-Level beeinflussen, wurden primäre Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen drei verschiedenen Transfektionsreagenzien ausgesetzt. Die Transfektionsreagenzien waren X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent, HiPerFect Transfection Reagent und Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent. Hierbei wurde deutlich, dass sowohl die mRNA-Level der Rezeptoren als auch die Liganden des TGF- β -Signalwegs [100, 102] unterschiedlichen Veränderungen unterworfen sind. Die verschiedenen Transfektionsreagenzien zeigten – vom jeweiligen Gen abhängig – unterschiedliche Effekte in Form und Ausprägung [117]. Wurden die TGF- β -Rezeptoren in den primären Mäuselungenfibroblasten betrachtet, erhöhten sowohl X-tremeGENE™ und Lipofectamine 2000 die *Tgfr3*-mRNA-Steady-State-Level, verglichen mit Zellen, die lediglich Transfektionsmedium erhielten (in den Abbildungen als Untreated (Ut) beschriftet). HiPerFect hingegen hatte keinen Einfluss auf die primären Zellen (Abbildung 6) [117].

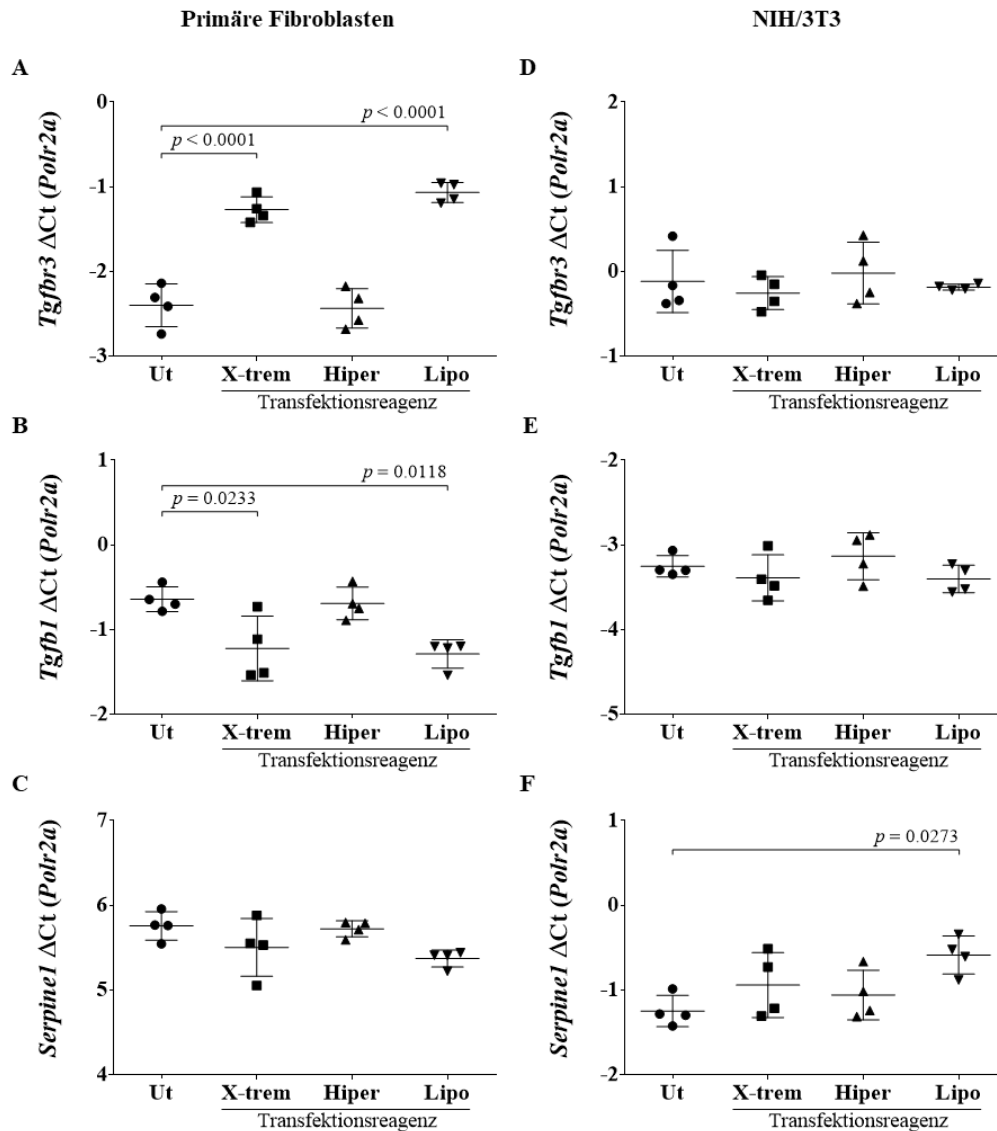


Abbildung 6: Effekte der Transfektionsreagenzien auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.

Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level der Targetgene in primären Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen (Mäusefibroblastenzelllinie). Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium) oder erhielten eine Behandlung mit einem der drei Transfektionsreagenzien (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) für 6 h. Hierbei kamen X-tremeGENE™ (X-trem), HiPerFect Transfection Reagent (Hiper) oder Lipofectamine® 2000 Transfection (Lipo) zum Einsatz. Die Steady-State-mRNA-Level von *Tgfb3* (A, D), *Tgfb1* (B, E) und *Serpine1* (C, F) wurden mittels Real Time qPCR ermittelt. Die Ergebnisse an primären Mäuselungenfibroblasten werden auf der linken Spalte (A bis C) präsentiert, die Ergebnisse an NIH/3T3-Zellen in der rechten Spalte (D bis F). Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 4$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die Trends sind repräsentativ für dieselben Trends, die in mindestens zwei weiteren unabhängigen Experimenten beobachtet wurden. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Kondition Ut und den

jeweiligen Transfektionsreagenzien zustande. Die *p*-Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und wurden nur dargestellt bei *p*-Werten von $p < 0,05$. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Auf *Tgfb1* der primären Mäuselungenfibroblasten zeigte lediglich Lipofectamine 2000 einen Effekt (Abbildung 7A), wohingegen *Tgfb2* von allen Transfektionsreagenzien vollkommen unbeeinflusst schien (Abbildung 7B). Diese Beobachtungen setzten sich auch bei den TGF- β -Liganden fort. Hierbei zeigten sowohl *Tgfb1* (Abbildung 6B) und *Tgfb2* (Abbildung 7C) eine Verringerung der mRNA-Level durch X-tremeGENE™ und Lipofectamine 2000. *Tgfb3* wurde lediglich von X-tremeGENE™ verringert (Abbildung 7D) [117]. Das Reporterogen *Serpine1* zeigte keine Veränderungen der mRNA-Level im Vergleich zu der Kontrollkondition Ut, (lediglich Transfektionsmedium) (Abbildung 6C). Abschließend kann konstatiert werden, dass HiPerFect keinen der mRNA-Steady-State-Level der untersuchten Gene der primären Mäuselungenfibroblasten beeinflusste [117].

Werden dagegen die NIH/3T3-Zellen betrachtet, wird deutlich, dass diese Zellen deutlich weniger stark von den drei Transfektionsreagenzien beeinflusst wurden als die primären Mäuselungenfibroblasten. Alle drei Transfektionsreagenzien hatten keinen Einfluss auf *Tgfb1* (Abbildung 7E), *Tgfb2* (Abbildung 7F), *Tgfb3* (Abbildung 6D), *Tgfb1* (Abbildung 6E), *Tgfb2* (Abbildung 7G), *Tgfb3* (Abbildung 7H) [117]. Lediglich der mRNA-Steady-State-Level von *Serpine1* wurde im Vergleich zu der Kontrollkondition Ut (lediglich Transfektionsmedium) erhöht (Abbildung 6F). Um einen besseren Überblick zu geben, wurden die beschriebenen Effekte in Tabelle 13 zusammengeführt [117].

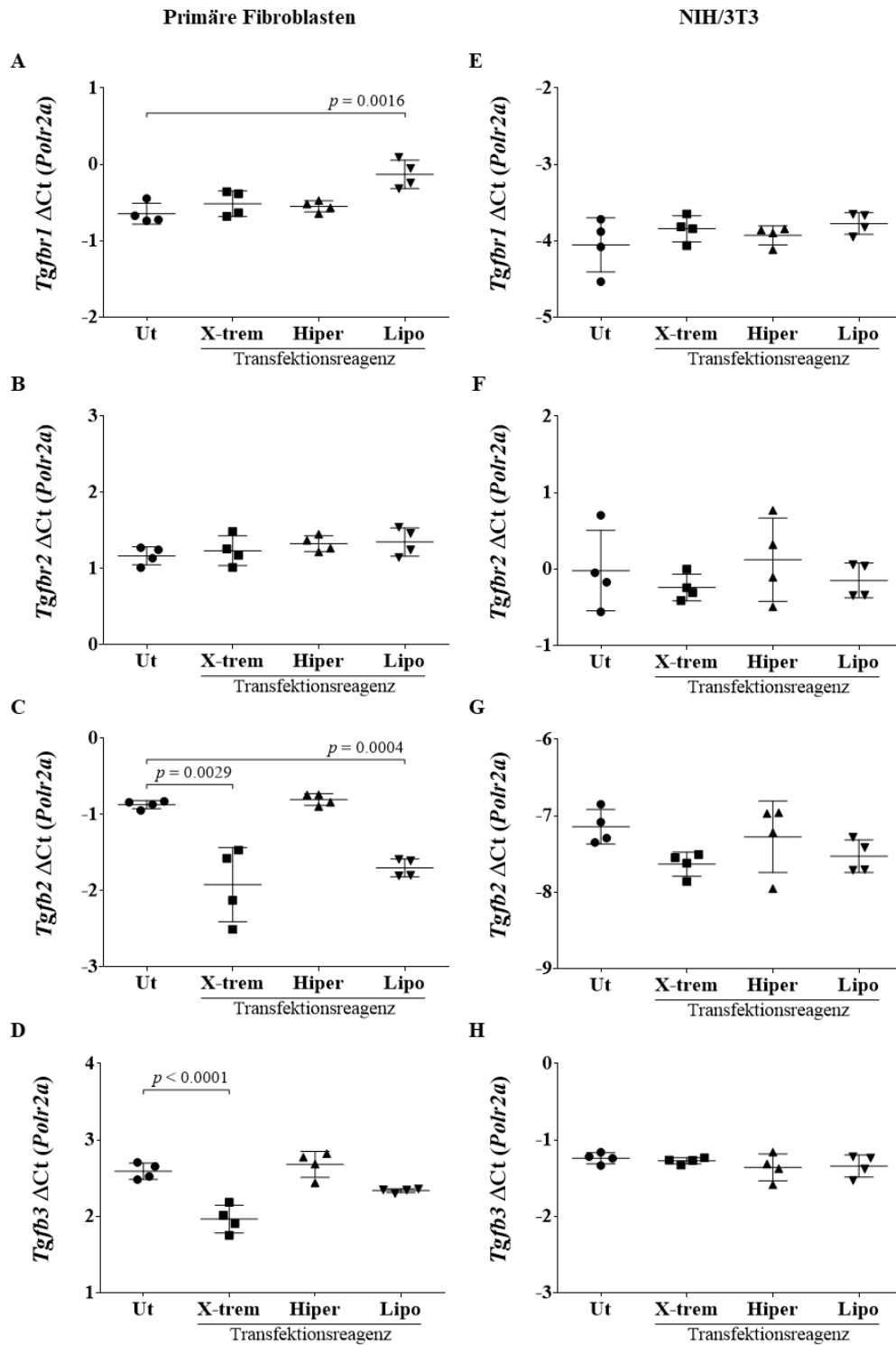


Abbildung 7: Effekte der Transfektionsreagenzien auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.

Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level der Targetgene in primären Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen (Mäusefibroblastenzelllinie). Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium) oder erhielten eine Behandlung mit einem der drei Transfektionsreagenzien (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) für 6 h. Hierbei kamen X-tremeGENE™ (X-trem),

HiPerFect Transfection Reagent (Hiper) oder Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Lipo) zum Einsatz. Die mRNA-Steady-State-Level von *Tgfr1* (A, E), *Tgfr2* (B, F), *Tgfb2* (C, G) und *Tgfb3* (D, H) wurden mittels Real Time qPCR ermittelt. Die Ergebnisse an primären Mäuselungenfibroblasten werden auf der linken Spalte (A bis D) präsentiert, die Ergebnisse an NIH/3T3-Zellen in der rechten Spalte (E bis H). Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 4$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die Trends sind repräsentativ für dieselben Trends, die in mindestens zwei weiteren unabhängigen Experimenten beobachtet wurden. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Kondition Ut und den jeweiligen Transfektionsreagenzien zustande. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werte von $p < 0,05$. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Einflüsse der Transfektionsreagenzien auf die mRNA-Level der untersuchten Gene der primären Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen

Gene	Primäre Fibroblasten			NIH/3T3		
	X-trem	Hiper	Lipo	X-trem	Hiper	Lipo
<i>Tgfr1</i>	✓	✓	✗	✓	✓	✓
<i>Tgfr2</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Tgfr3</i>	✗	✓	✗	✓	✓	✓
<i>Tgfb1</i>	✗	✓	✗	✓	✓	✓
<i>Tgfb2</i>	✗	✓	✗	✓	✓	✓
<i>Tgfb3</i>	✗	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Serpine1</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✗
Wert (%)	42,9	100	42,9	100	100	85,7

Ein Häkchen bedeutet keine Beeinflussung der Expression des jeweiligen Gens. Ein Kreuz bedeutet eine Beeinflussung der Genexpression. Der Wert in Prozent (%) beschreibt die Anzahl der Häkchen durch die Gesamtzahl der untersuchten Gene. **Abkürzungen:** X-trem: X-tremeGENE™, Hiper: HiPerFect, Lipo: Lipofectamine 2000. Die Tabelle sowie die Beschriftung wurde von Referenz [117] modifiziert.

4.2 Negativkontroll-siRNAs beeinflussen die mRNA-Steady-State-Level

Alle fünf verschiedenen Negativkontroll-siRNAs zeigten Effekte auf die mRNA-Steady-State-Level der untersuchten Gene der primären Mäuselungenfibroblasten. Hierbei waren sowohl die Rezeptoren als auch die Liganden des kanonischen TGF- β -Signalwegs [100, 102] betroffen.

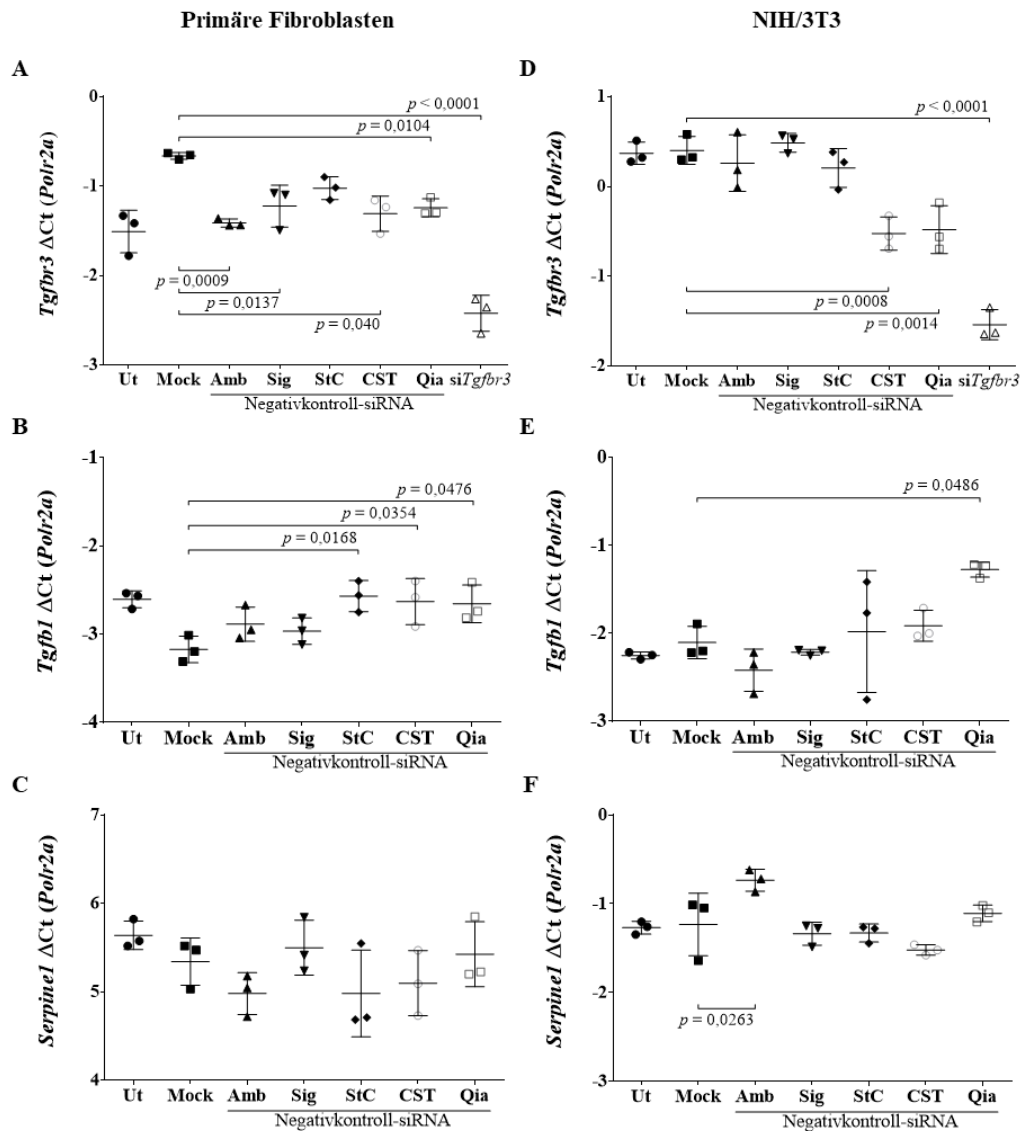


Abbildung 8: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.

Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level der Targetgene in primären Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen (Mäusefibroblastenzelllinie). Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200

Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Tgfb3*-mRNA (*siTgfb3*) für 6 h transfiziert. Die siRNA gegen die *Tgfb3*-mRNA (*siTgfb3*) diente als interne Positivkontrolle zur Kontrolle der Transfektion (A und D). Das gleichbleibende Protokoll mit cDNA des gleichen cDNA-Bestands der primären Mäuselungenfibroblasten wurde in der linken Spalte A bis C verwendet. cDNA aus dem gleichen cDNA-Bestand der NIH/3T3-Zellen wurde in der rechten Spalte D bis F verwendet. Deshalb sind durch die Positivkontrolle mittels *siTgfb3* auch die beiden Genexpressionsanalysen von *Tgfb1* und *Serpine1* kontrolliert. Die mRNA-Steady-State-Level von *Tgfb3* (A, D), *Tgfb1* (B, E) und *Serpine1* (C, F) wurden mittels Real Time qPCR ermittelt. Die Ergebnisse der primären Mäuselungenfibroblasten werden auf der linken Spalte (A bis C) präsentiert, die Ergebnisse der NIH/3T3-Zellen in der rechten Spalte (D bis F). Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 3$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die Trends sind repräsentativ für dieselben Trends, die in mindestens zwei weiteren unabhängigen Experimenten beobachtet wurden. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werten von $p < 0,05$. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Aus Gründen, die in der Diskussion behandelt werden, wurde in diesen Experimenten zur Transfektion X-tremeGENE™ als Transfektionsreagenz benutzt [117]. Als Positivkontrolle zur Validierung der Transfektion der primären Mäuselungenfibroblasten (Abbildung 8A) wie auch der NIH/3T3-Zellen (Abbildung 8D) wurde eine siRNA gegen *Tgfb3* verwendet, wonach die jeweiligen mRNA-Steady-State-Level bestimmt wurden [117]. In den primären Mäuselungenfibroblasten zeigten vier der Negativkontroll-siRNAs – bis auf die Negativkontroll-siRNA von Santa Cruz (StC) – eine Reduktion der *Tgfb3*-mRNA-Steady-State-Level im Vergleich zur Mock-Kondition (Abbildung 8A). Werden die *Tgfb3*-mRNA-Steady-State-Level jedoch mit der unbehandelten Kondition (Ut) (lediglich Transfektionsmedium) verglichen, können bis auf die Negativkontroll-siRNA von Santa Cruz und die siRNA gegen *Tgfb3* keine Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 8A) [117]. Die Beeinflussung von *Tgfb1* stellte sich sehr ähnlich dar, hierbei zeigten sowohl die Negativkontroll-siRNA von Santa Cruz wie auch Qiagen keinen Unterschied im Vergleich zur Mock-Kondition (Abbildung 9A). *Tgfb2* wurde dagegen von keiner der Negativkontroll-siRNAs auf der Ebene der mRNA-Steady-State-Level beeinflusst (Abbildung 9B).

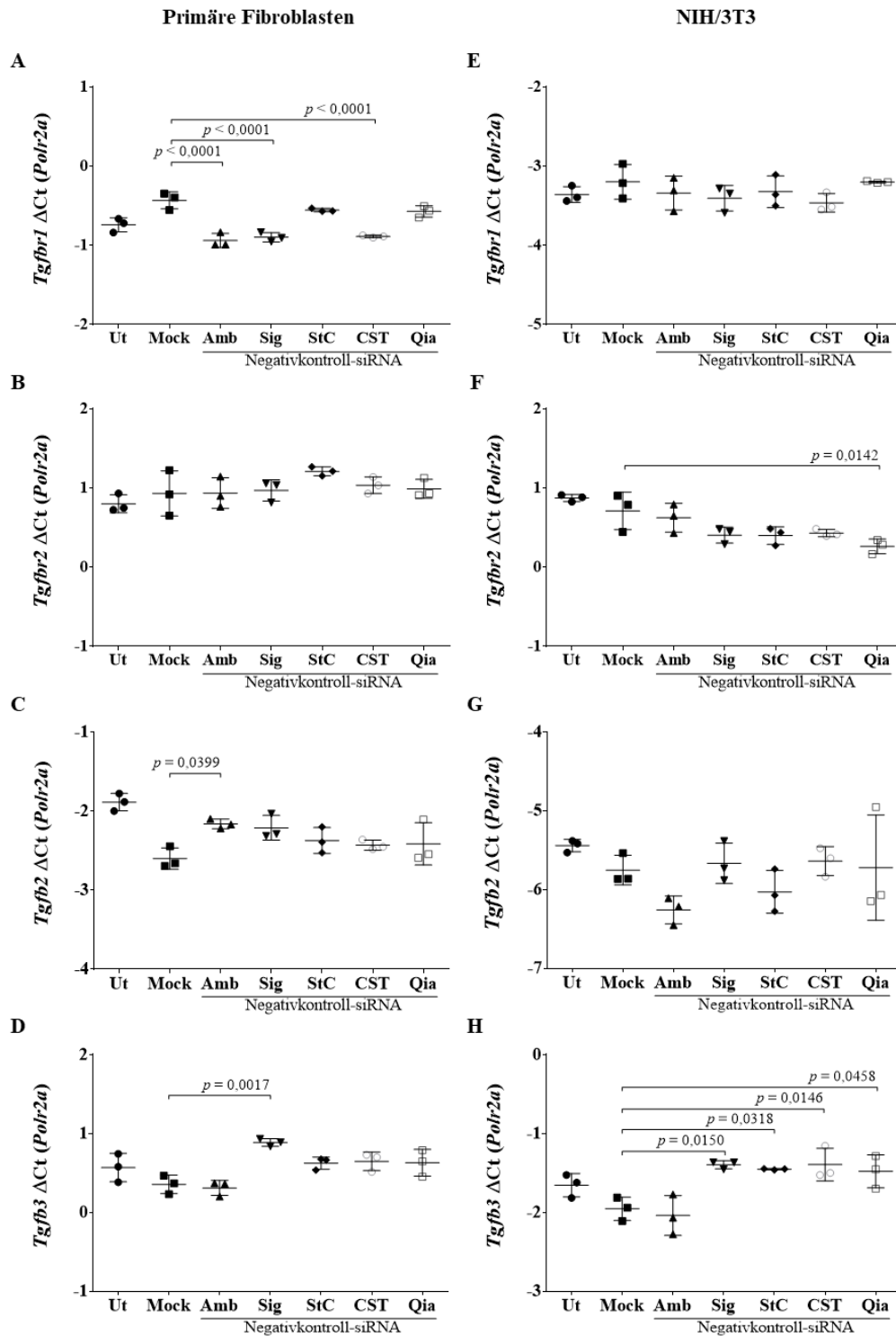


Abbildung 9: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.

Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level der Targetgene in primären Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen (Mäusefibroblastenzelllinie). Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100

nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Tgfb3*-mRNA (*siTgfb3*) für 6 h transfiziert. Die siRNA gegen die *Tgfb3*-mRNA (*siTgfb3*) diente als interne Positivkontrolle zur Kontrolle der Transfektion (Abbildung 8A und 8D). Das gleichbleibende Protokoll mit cDNA des gleichen cDNA-Bestands der primären Mäuselungenfibroblasten wurde in der linken Spalte A bis D verwendet. cDNA aus dem gleichen cDNA-Bestand der NIH/3T3-Zellen wurde in der rechten Spalte E bis H verwendet. Durch die Positivkontrolle mittels *siTgfb3* wurde die Genexpressionsanalysen dieser Abbildung 9 kontrolliert. Die mRNA-Steady-State-Level von *Tgfb1* (A, E), *Tgfb2* (B, F), *Tgfb2* (C, G) und *Tgfb3* (D, H) wurden mittels Real Time qPCR ermittelt. Die Ergebnisse der primären Mäuselungenfibroblasten werden in der linken Spalte (A bis D) präsentiert, die Ergebnisse der NIH/3T3-Zellen in der rechten Spalte (E bis H). Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 3$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die Trends sind repräsentativ für dieselben Trends, die in mindestens zwei weiteren unabhängigen Experimenten beobachtet wurden. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werte von $p < 0,05$. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Bei den TGF- β -Liganden zeigte insbesondere der *Tgfb1*-mRNA-Steady-State-Level eine Beeinflussung durch die Negativkontroll-siRNAs von Santa Cruz, Cell Signaling Technology und Qiagen, wobei hier der *Tgfb1*-mRNA-Steady-State-Level wieder dem Niveau der unbehandelten Zellen (Kondition Ut) entsprach (Abbildung 8B). Sowohl *Tgfb2*- und *Tgfb3*-mRNA-Steady-State-Level wurden lediglich durch eine Negativkontroll-siRNA beeinflusst (Abbildung 9C und 9D) [117]. Die *Tgfb2*-mRNA-Steady-State-Level zeigten eine Erhöhung unter der Negativkontroll-siRNA von Ambion (Abbildung 9C), wohingegen die Negativkontroll-siRNA von Sigma die *Tgfb3*-mRNA-Steady-State-Level erhöhte (Abbildung 9D) [117]. Wie bereits zuvor in den Experimenten beobachtet, in denen die Konditionen lediglich Transfektionsmedium und die verschiedenen Transfektionsreagenzien enthielten (Abbildung 6 und Abbildung 7), zeigten sich die *Serpine1*-mRNA-Steady-State-Level auch unbeeinflusst von den Negativkontroll-siRNAs (Abbildung 8C).

Bei der Untersuchung der NIH/3T3-Zellen zeigte sich, dass die mRNA-Level insgesamt weniger stark durch die Negativkontroll-siRNA beeinflusst wurden als die primären Mäuselungenfibroblasten [117].

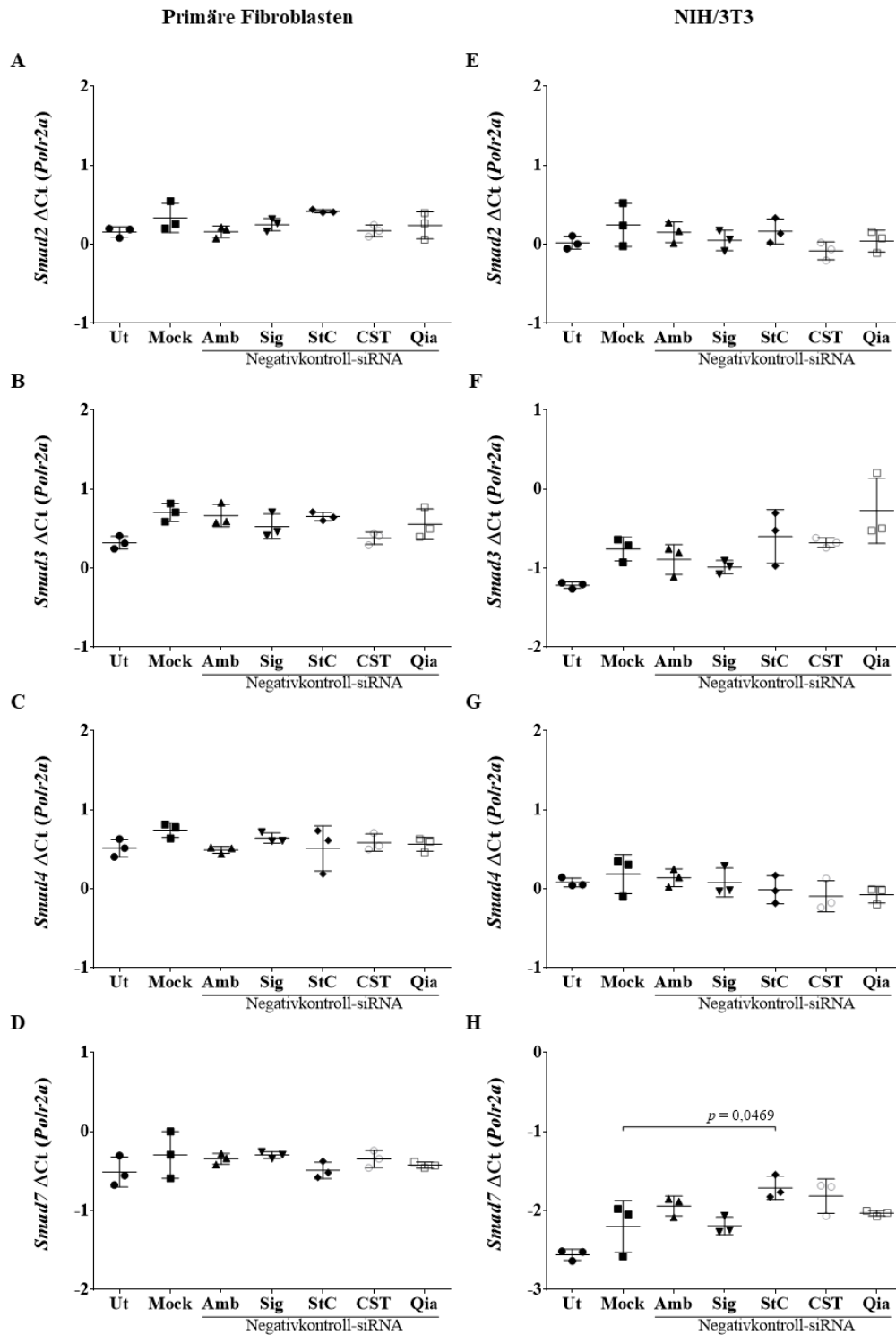


Abbildung 10: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in Fibroblasten.

Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level der Targetgene in primären Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen (Mäusefibroblastenzelllinie). Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200

Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Tgfb3*-mRNA (*siTgfb3*) für 6 h transfiziert. Die siRNA gegen die *Tgfb3*-mRNA (*siTgfb3*) diente als interne Positivkontrolle zur Kontrolle der Transfektion (Abbildung 8A und 8D). Das gleichbleibende Protokoll mit cDNA des gleichen cDNA-Bestands der primären Mäuselungenfibroblasten wurde in der linken Spalte A bis D verwendet. cDNA aus dem gleichen cDNA-Bestand der NIH/3T3-Zellen wurde in der rechten Spalte E bis H verwendet. Durch die Positivkontrolle mittels *siTgfb3* wurden die Genexpressionsanalysen dieser Abbildung 10 kontrolliert. Die mRNA-Steady-State-Level von *Smad2* (A, E), *Smad3* (B, F), *Smad4* (C, G) und *Smad7* (D, H) wurden mittels Real Time qPCR ermittelt. Die Ergebnisse der primären Mäuselungenfibroblasten werden auf der linken Spalte (A bis D) präsentiert, die Ergebnisse der NIH/3T3-Zellen in der rechten Spalte (E bis H). Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 3$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die Trends sind repräsentativ für dieselben Trends, die in mindestens zwei weiteren unabhängigen Experimenten beobachtet wurden. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werten von $p < 0,05$. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Die *Tgfb3*-mRNA-Steady-State-Level (Abbildung 8D) gemeinsam mit den *Tgfb3*-mRNA-Steady-State-Leveln (Abbildung 9H) der NIH/3T3-Zellen wurden am stärksten beeinflusst. Die Negativkontroll-siRNAs von Cell Signaling Technology und Qiagen zogen die Reduktion der *Tgfb3*-mRNA-Steady-State-Level um nahezu die Hälfte des Effekts der siRNA gegen *Tgfb3*-mRNA nach sich (Abbildung 8D) [117]. Die *Tgfb3*-mRNA-Level wurden von vier der fünf Negativkontroll-siRNAs erhöht, wobei lediglich die Negativkontroll-siRNA von Ambion keine Beeinflussung zeigte (Abbildung 9H) [117]. Sowohl *Tgfb2* (Abbildung 9F) als auch *Tgfb1* (Abbildung 8E) zeigten nur eine Beeinflussung durch die Negativkontroll-siRNA von Qiagen, wohingegen sowohl *Tgfb1*-mRNA-Level (Abbildung 9E) als auch *Tgfb2*-mRNA-Level (Abbildung 9G) der NIH/3T3-Zellen von allen fünf Negativkontroll-siRNAs unbeeinflusst vorlagen. Die mRNA-Steady-State-Level der NIH/3T3-Zellen von *Serpine1* erfuhren eine Erhöhung durch die Negativkontroll-siRNA von Ambion (Abbildung 8F) [117].

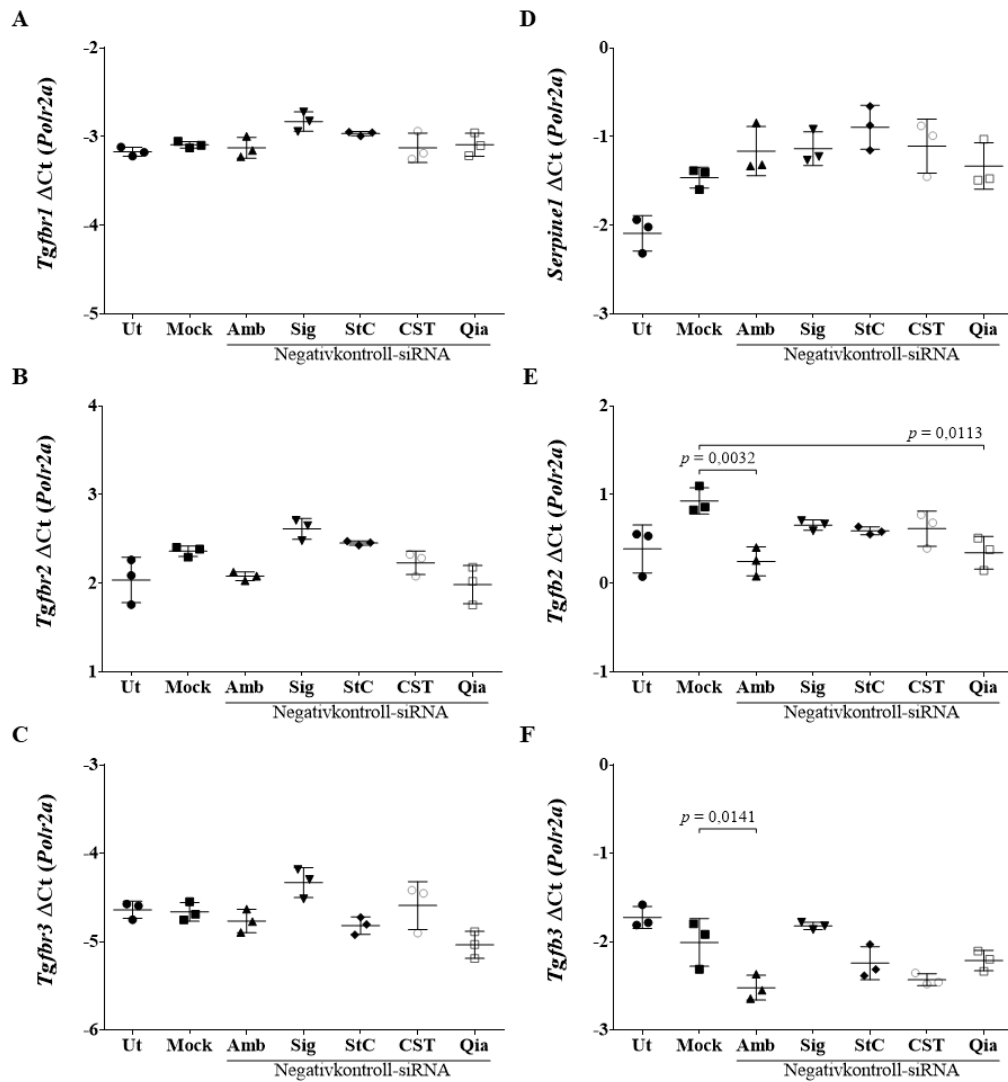


Abbildung 11: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in MLE-12.

Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level der Targetgene in MLE-12 (Epithelzelllinie der Mäuseleunge). Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit XtremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels XtremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Smad2*-mRNA (*siSmad2*) für 6 h transfiziert. Die siRNA gegen die *Smad2*-mRNA (*siSmad2*) diente als interne Positivkontrolle zur Kontrolle der Transfektion (Abbildung 12A). Das gleichbleibende Protokoll mit cDNA des gleichen cDNA-Bestands der MLE-12-Zellen wurde verwendet. Durch die Positivkontrolle mittels *siSmad2* (Abbildung 12A) wurden die Genexpressionsanalysen dieser Abbildung 11 kontrolliert. Die mRNA-Steady-State-Level von *Tgfb1* (A), *Tgfb2* (B), *Tgfb3* (C), *Serpine1* (D), *Tgfb2* (E) und *Tgfb3* (F) wurden mittels Real Time qPCR ermittelt. *Tgfb1* konnte nicht detektiert werden. Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 3$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus

derselben Kulturflasche dar. Die Trends sind repräsentativ für dieselben Trends, die in mindestens zwei weiteren unabhängigen Experimenten beobachtet wurden. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werten von $p < 0,05$. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Die mRNA-Steady-State-Level der *Smad*-Familie, welche als sogenannte „second messenger“ im TGF- β -Signalweg fungieren, zeigten keine Effekte in den primären Mäuselungenfibroblasten. Sowohl *Smad2* (Abbildung 10A), *Smad3* (Abbildung 10B), *Smad4* (Abbildung 10C) wie auch *Smad7* (Abbildung 10D) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Mock-Kondition [117].

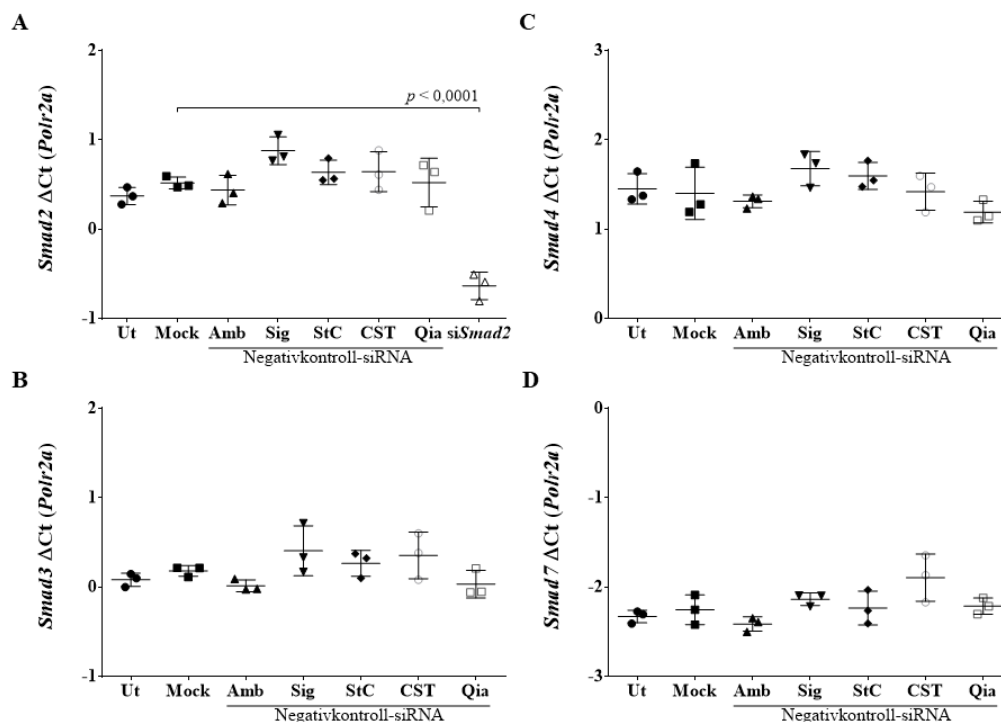


Abbildung 12: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level in MLE-12.

Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level der Targetgene in MLE-12 (Epithelzelllinie der Mäuselunge). Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit XtremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels XtremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der

siRNA gegen die *Smad2*-mRNA (si*Smad2*) für 6 h transfiziert. Die siRNA gegen die *Smad2*-mRNA (si*Smad2*) diente als interne Positivkontrolle zur Kontrolle der Transfektion (A). Das gleichbleibende Protokoll mit cDNA des gleichen cDNA-Bestands der MLE-12-Zellen wurde verwendet. Durch die Positivkontrolle mittels si*Smad2* wurden die Genexpressionsanalysen dieser Abbildung 12 kontrolliert. Die mRNA-Steady-State-Level von *Smad2* (A), *Smad3* (B), *Smad4* (C) und *Smad7* (D) wurden mittels Real Time qPCR ermittelt. Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 3$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die Trends sind repräsentativ für dieselben Trends, die in mindestens zwei weiteren unabhängigen Experimenten beobachtet wurden. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werten von $p < 0,05$. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Auch die NIH/3T3-Zellen zeigten bis auf die mRNA-Level-Erhöhung von *Smad7* durch die Negativkontroll-siRNA von Santa Cruz (Abbildung 10H) keine Effekte. *Smad2* (Abbildung 10E), *Smad3* (Abbildung 10F) und *Smad4* (Abbildung 10G) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Mock-Kondition [117].

Im Gegensatz zu den primären Mäuselungenfibroblasten und vergleichbar mit den NIH/3T3-Zellen zeigten die Zellen der MLE-12-Zelllinie, einer Epithelzelllinie aus Mäuselungen, nahezu keine Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level durch die Negativkontroll-siRNAs. Hierbei blieben die mRNA-Level der TGF- β -Rezeptoren *Tgfbr1* (Abbildung 11A), *Tgfbr2* (Abbildung 11B), *Tgfbr3* (Abbildung 11C) und *Serpine1* (Abbildung 11D) sowie die mRNA-Steady-State-Level der *Smad*-Proteine *Smad2* (Abbildung 12A), *Smad3* (Abbildung 12B), *Smad4* (Abbildung 12C) und *Smad7* (Abbildung 12D) unbeeinflusst [117]. Die Negativkontroll-siRNAs von Ambion und Qiagen reduzierten die mRNA-Steady-State-Level des TGF- β -Liganden *Tgfb2* (Abbildung 11E), wobei lediglich die Negativkontroll-siRNA von Ambion die *Tgfb3*-mRNA-Level der MLE-12-Zellen reduzierte (Abbildung 11F) [117]. Die mRNA des Liganden *Tgfb1* konnte in den MLE-12-Zellen nicht detektiert werden [117]

Die Effekte der fünf Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Steady-State-Level der untersuchten Transkripte wird in Tabelle 14 zusammengefasst. Diese zeichnet ein Gesamtergebnis der jeweiligen Negativkontroll-siRNAs in den drei unterschiedlichen Zelltypen in Form eines Prozentwertes nach [117].

Tabelle 14: Zusammenfassung der Einflüsse der Negativkontroll-siRNAs auf die mRNA-Level primärer Mäuselungenfibroblasten, NIH/3T3- und MLE-12-Zellen

Gene	Primäre Fibroblasten					NIH/3T3					MLE-12				
	Amb	Sig	StC	CST	Qia	Amb	Sig	StC	CST	Qia	Amb	Sig	StC	CST	Qia
<i>Tgfb1</i>	✗	✗	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Tgfb2</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Tgfb3</i>	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Tgfb1</i>	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✗	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tgfb2</i>	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✗
<i>Tgfb3</i>	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓
<i>Serpine1</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Smad2</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Smad3</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Smad4</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Smad7</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Score (%)	72,7	72,7	90,9	72,7	81,8	90,9	90,9	81,8	81,8	63,6	80	100	100	100	90

Ein Häkchen bedeutet keine Beeinflussung der Genexpression. Ein Kreuz bedeutet eine Beeinflussung der Genexpression. Der Wert in Prozent (%) beschreibt die Anzahl der Häkchen durch die Gesamtzahl der untersuchten Gene. **Abkürzungen:** Amb: Ambion, Sig: Sigma, StC: Santa Cruz, CST: Cell Signaling Technology, Qia: Qiagen, ND: nicht detektiert. Die Tabelle sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

4.3 Negativkontroll-siRNAs beeinflussen Protein-Level im Western Blot

Der Einfluss der Negativkontroll-siRNAs wurde, wie oben beschrieben, auch mittels Western Blot (Immunoblot) untersucht. Zur internen Positivkontrolle fand die siRNA gegen *Tgfb β 3*-mRNA zur Validierung der Transfektion sowohl bei den primären Mäuselungenfibroblasten als auch bei den NIH/3T3-Zellen Verwendung. Die Proteinmenge der primären Mäuselungenfibroblasten wie auch der NIH/3T3-Zellen konnte wirkungsvoll reduziert werden (Abbildung 13A und B) [117].

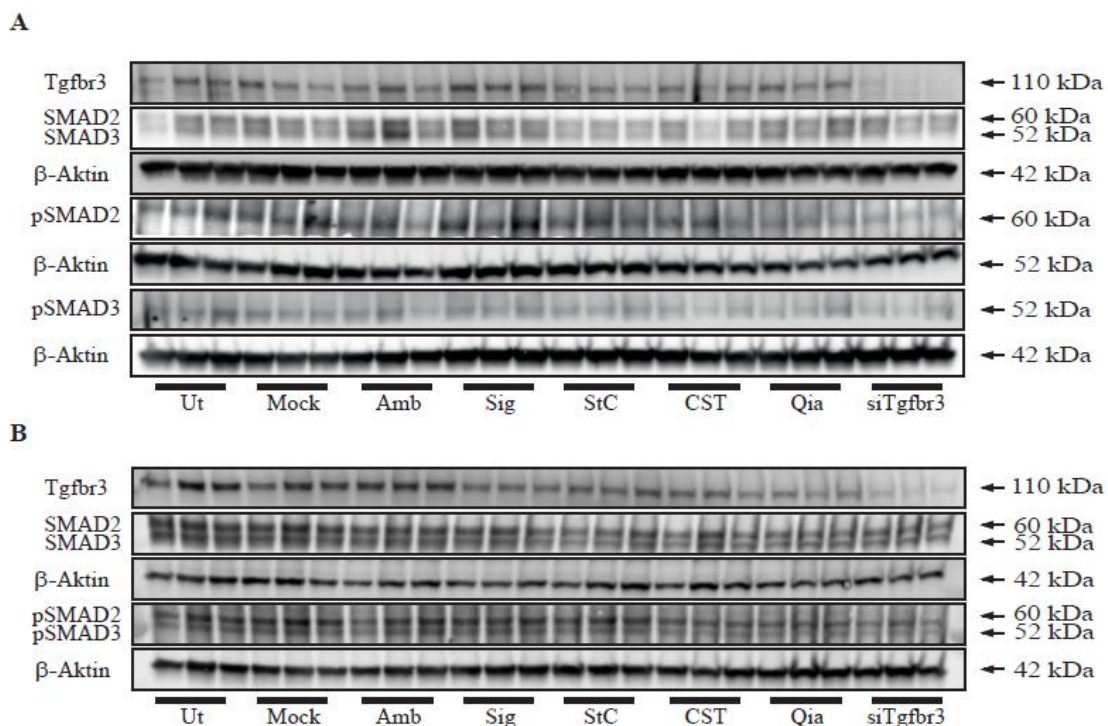


Abbildung 13: Effekte der Negativkontroll-siRNA auf die Proteinmenge in Fibroblasten.

Beeinflussung der Protein-Steady-State-Level in primären Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen (Mäusefibroblastenzelllinie). Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Tgfb β 3*-mRNA (*siTgfb β 3*) für 6 h transfiziert. Die siRNA gegen die *Tgfb β 3*-mRNA (*siTgfb β 3*) diente als interne Positivkontrolle zur Kontrolle der Transfektion (A und B). Anschließend wurden die Proteine extrahiert und die Western Blot durchgeführt. In (A) werden die Protein-Steady-State-Level der primären Mäuselungenfibroblasten und in (B) die der NIH/3T3-Zellen dargestellt. Protein-Steady-State-Level von Tgfb β 3, SMAD2, SMAD3, phospho-SMAD2 und phospho-SMAD3 wurden

ermittelt. Zur Ladungskontrolle fand β -Aktin Verwendung. Jede Bande stellt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar, wobei drei Banden zusammen immer eine Gruppe darstellen. Die Trends sind repräsentativ für dieselben Trends, die in mindestens zwei weiteren unabhängigen Experimenten beobachtet wurden. Die Abbildungen sowie die Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Bei den primären Mäuselungenfibroblasten konnte, im Gegensatz zu deren starker Beeinflussung der *Tgfb β 3*-mRNA-Steady-State-Level (Abbildung 8A), auf Ebene der Protein-Level keine wirkliche Beeinflussung beobachtet werden (Abbildung 13A, Abbildung 14) [117]. Veränderungen der Proteinmenge von SMAD2 und SMAD3 konnten nicht beobachtet werden (Abbildung 13A, Abbildung 14A und 14B). Die phosphorylierten SMAD2- und SMAD3-Proteine (pSMAD2 und pSMAD3) wurden durch keine der Negativkontroll-siRNAs in der Proteinmenge beeinflusst und wiesen somit im Vergleich zu den Konditionen Unbehandelt (Ut) und Mock keine Unterschiede auf (Abbildung 13A, Abbildung 14D und 14E). Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass keine der Negativkontroll-siRNAs die mRNA-Level der SMAD-Proteine in den primären Mäuselungenfibroblasten beeinflusste (Abbildung 10A und 10B) [117].

Die NIH/3T3-Zellen zeigten für die *Tgfb β 3*-Protein-Steady-State-Level keine Beeinflussung durch die Negativkontroll-siRNA von Ambion (Abbildung 15C), jedoch wurden die *Tgfb β 3*-Protein-Level durch die jeweilige Negativkontroll-siRNA von Sigma, Santa Cruz, Cell Signaling Technology und Qiagen im Vergleich zu den Konditionen Unbehandelt (Ut) und Mock reduziert (Abbildung 13B, Abbildung 15C) [117]. Damit zeigte sich insbesondere in Bezug auf die siRNA gegen *Tgfb β 3*-mRNA (Positivkontrolle) und die Negativkontroll-siRNAs von Ambion, Cell Signaling Technology sowie Qiagen der gleiche Effekt wie auf der mRNA-Ebene (Abbildung 8D) [117]. Darüber hinaus scheinen die Negativkontroll-siRNAs von Sigma und Santa Cruz die Proteinmengen der NIH/3T3-Zellen zu beeinflussen (Abbildung 13B, Abbildung 15C), ohne jedoch einen Effekt auf die dazugehörigen mRNA-Steady-State-Level gehabt zu haben (Abbildung 8D). In den NIH/3T3-Zellen konnte ebenfalls kein Effekt auf die Proteinmenge von SMAD2 und SMAD3 oder pSMAD2 und pSMAD3 durch die Negativkontroll-siRNAs beobachtet werden (Abbildung 13B, Abbildung 15). Dies ist deckungsgleich mit den Ergebnissen aus den Bestimmungen der mRNA-Steady-State-Level (Abbildung 10E und 10F).

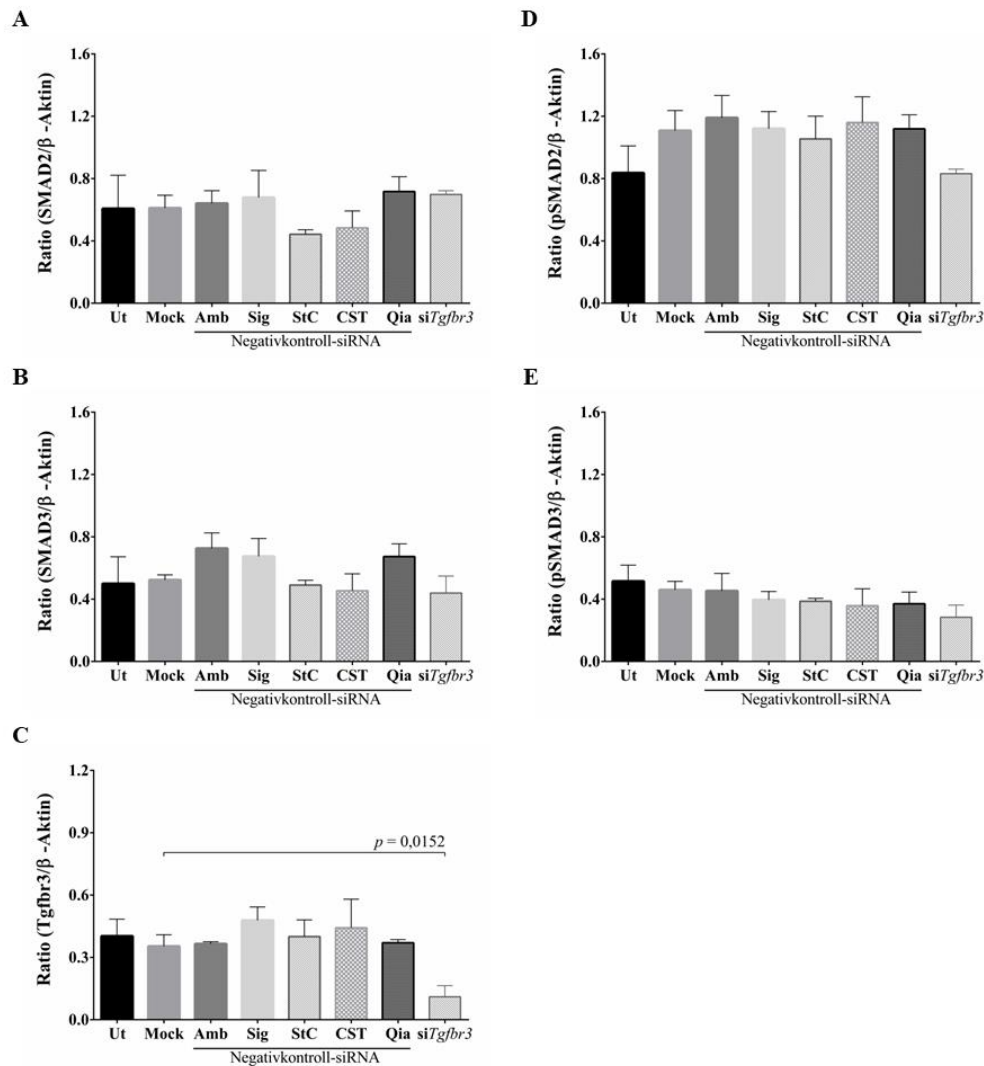


Abbildung 14: Densitometrische Analyse der Effekte der Negativkontroll-siRNA auf die Proteinmenge in primären Mäuselungenfibroblasten.

Densitometrische Auswertung der Beeinflussung der Protein-Steady-State-Level in primären Mäuselungenfibroblasten mittels ImageJ Fiji. Bandenintensität von SMAD2 (A), SMAD3 (B), Tgfr3 (C), phospho-SMAD2 (D) und phospho-SMAD3 (E) wurden bestimmt und gegen die entsprechende Bandenintensität von β -Aktin normalisiert, welches im Western Blot als Ladungskontrolle diente. Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Tgfr3*-mRNA (*siTgfr3*) für 6 h transfiziert. Die siRNA gegen die *Tgfr3*-mRNA (*siTgfr3*) diente als interne Positivkontrolle zur Kontrolle der Transfektion (C). Die Höhe der Balken zeigen den Mittelwert (M), wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 3$ angegeben. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande. Die p -

Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werten von $p < 0,05$.

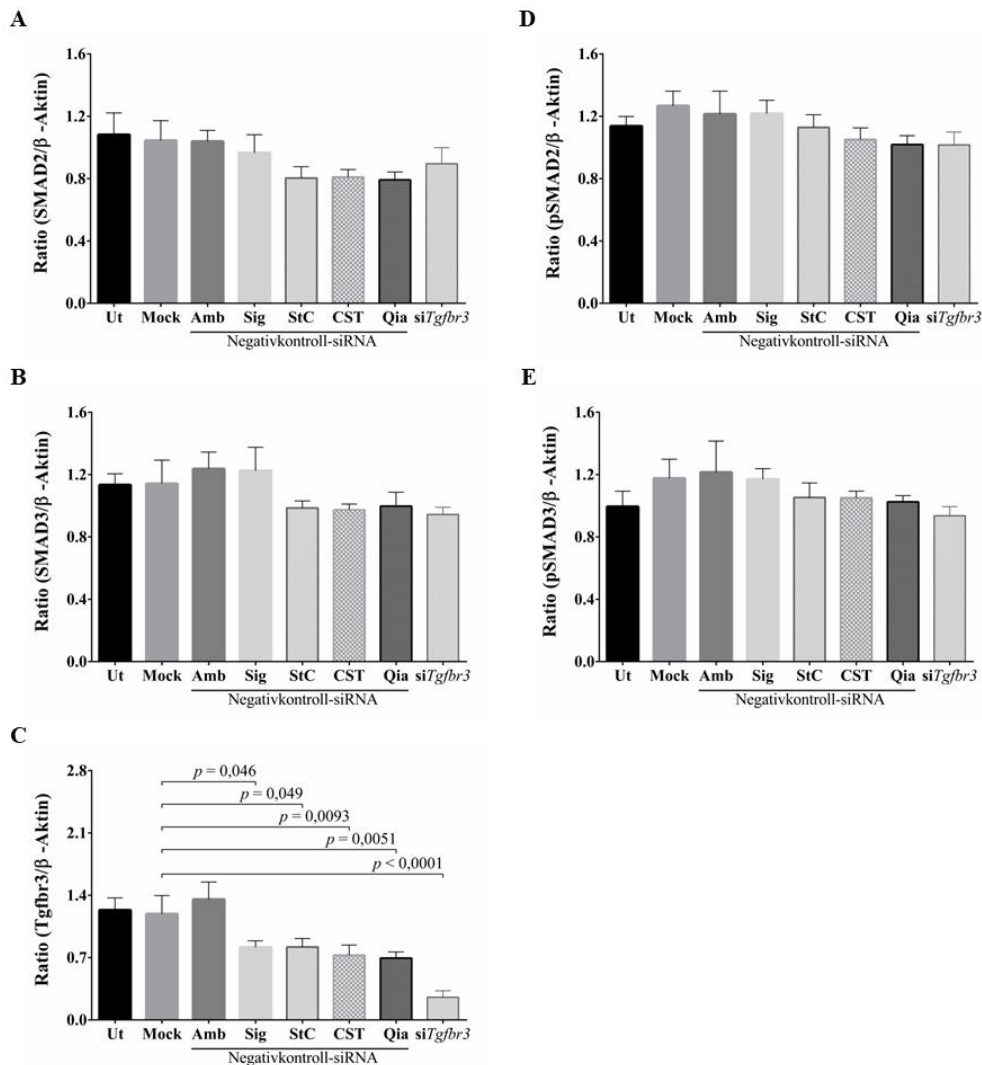


Abbildung 15: Densitometrische Analyse der Effekte der Negativkontroll-siRNA auf die Proteinmenge in NIH/3T3-Zellen.

Densitometrische Auswertung der Beeinflussung der Protein-Steady-State-Level in und NIH/3T3-Zellen (Mäusefibroblastenzelllinie) mittels ImageJ Fiji. Bandenintensität von SMAD2 (A), SMAD3 (B), Tgfr3 (C), phospho-SMAD2 (D) und phospho-SMAD3 (E) wurden bestimmt und gegen die entsprechende Bandenintensität von β-Aktin normalisiert, welches im Western Blot als Ladungskontrolle diente. Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Tgfr3*-mRNA (*siTgfr3*)

für 6 h transfiziert. Die siRNA gegen die *Tgfb β 3*-mRNA (*siTgfb β 3*) diene als interne Positivkontrolle zur Kontrolle der Transfektion (C). Die Höhe der Balken zeigen den Mittelwert (M), wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 3$ angegeben. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werten von $p < 0,05$.

4.4 Negativkontroll-siRNAs beeinflussen Zellproliferation und Zellviabilität

Die Behandlung der primären Mäuselungenfibroblasten mit dem Transfektionsreagenz X-tremeGENE™ ließ die Zellproliferation, ermittelt mit dem Proliferations-Kit auf Basis von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), unbeeinflusst. Dem gegenüber erfuhr die Zellproliferationsrate durch alle fünf kommerziellen Negativkontroll-siRNAs eine vergleichbare Reduzierung wie die siRNA gegen *Tgfbr3* (Abbildung 16A) [117].

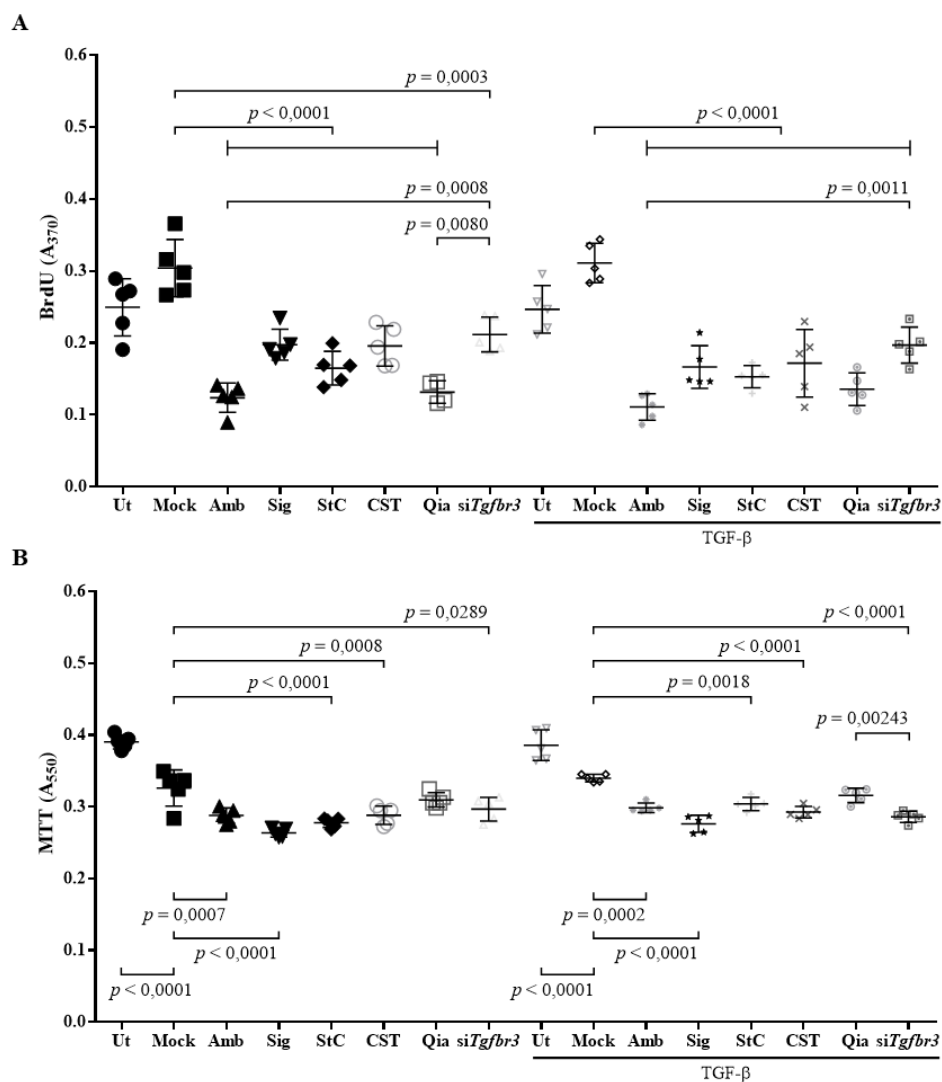


Abbildung 16: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellproliferation und Zellviabilität in Mäuselungenfibroblasten.

Beeinflussung der Zellproliferation und Zellviabilität in primären Mäuselungenfibroblasten. Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection

Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Tgfb3*-mRNA (*siTgfb3*) für 6 h transfiziert. *SiTgfb3* diente als Transfektionskontrolle. Das gleiche Protokoll der Transfektion wie bereits bei der Bestimmung der mRNA-Steady-State-Level und der Protein-Steady-State-Level wurde verwendet. Die Zellproliferation der primären Mäuselungenfibroblasten wurde mittels Kit auf Basis von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) ermittelt (A). Die Zellviabilität wurde mittels Kit auf Basis von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ermittelt (B). Die Zellen wurden zuvor zur Hälfte mit „transforming growth factor“ TGF- β behandelt. Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 5$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die jeweiligen Wiederholungsexperimente werden im Anhang aufgeführt (Abbildung 18 für BrdU und Abbildung 19 für MTT). Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande, hierbei werden die mit TGF- β behandelten Gruppen von den unbehandelten Gruppen unterschieden. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werten von $p < 0,05$. Die Klammer —|— fasst einzelne Negativkontroll-siRNA-Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit für die statistische Auswertung gegenüber der Mock-Kondition zusammen. Die Abbildungen sowie die Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Die Daten der Wiederholungsexperimente befinden sich im Anhang (Abbildung 18A und 18B). Die Zellviabilität der primären Mäuselungenfibroblasten, welche mittels des Assay auf Basis von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ermittelt wurde, erfuhr bei der alleinigen Behandlung mit X-tremeGENE™ eine Reduzierung, welche zusätzlich durch vier der fünf Negativkontroll-siRNAs negativ beeinflusste wurde. Lediglich die Negativkontroll-siRNA von Qiagen zeigte keinen Effekt (Abbildung 16B). Die Daten der Wiederholungsexperimente befinden sich im Anhang (Abbildung 19A und 19B) [117]. Die Beeinflussung der Zellproliferation und auch der Zellviabilität durch die Negativkontroll-siRNAs der primären Mäuselungenfibroblasten waren unabhängig von TGF- β (Abbildung 16, Abbildung 18, Abbildung 19) [117].

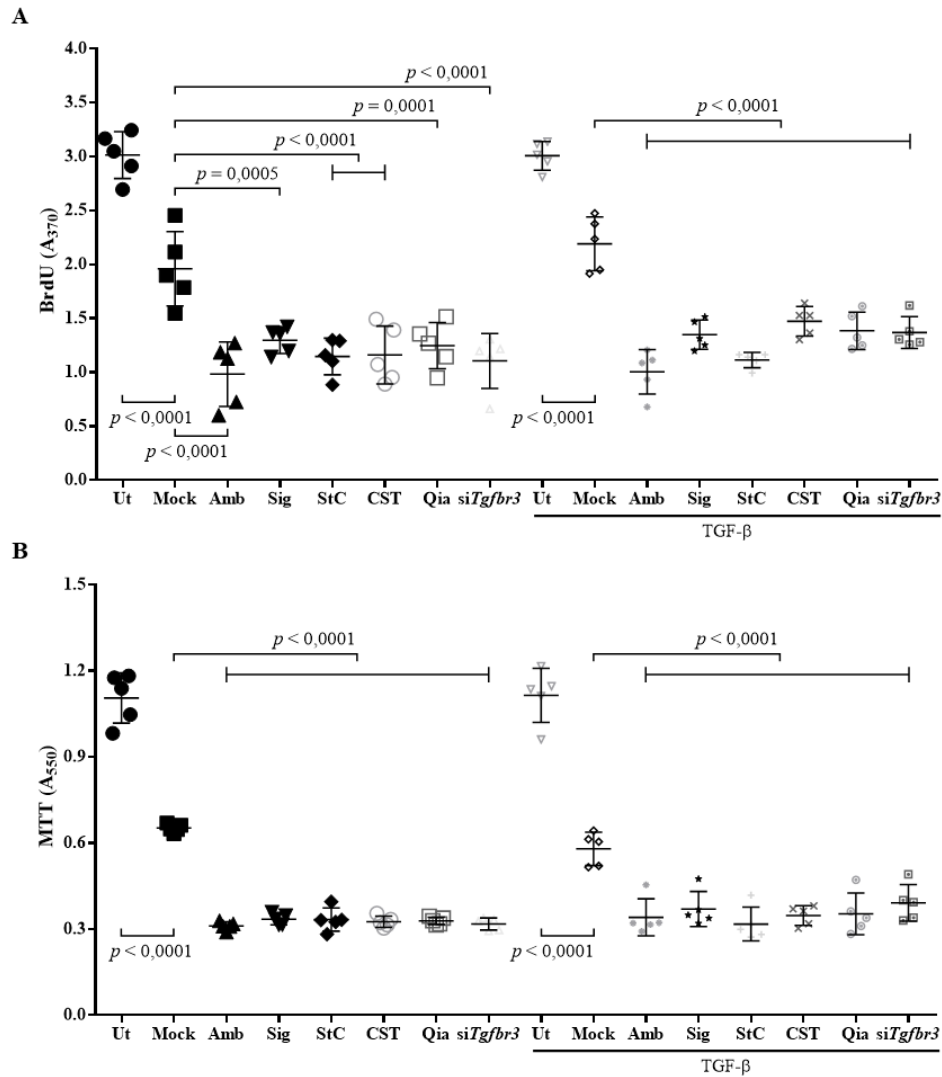


Abbildung 17: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellproliferation und Zellviabilität in NIH/3T3-Zellen.

Beeinflussung der Zellproliferation und Zellviabilität in NIH/3T3-Zellen. Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen *Tgfr3*-mRNA (*siTgfr3*) (jeweils 100 nM) für 6 h transfiziert. *SiTgfr3* diente als Transfektionskontrolle. Das gleiche Protokoll der Transfektion wie bereits bei der Bestimmung der mRNA-Steady-State-Level und der Protein-Steady-State-Level wurde verwendet. Die Zellproliferation der NIH/3T3-Zellen wurde mittels Kit auf Basis von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) ermittelt (A). Die Zellviabilität wurde mittels Kit auf Basis von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ermittelt (B). Die Zellen wurden zuvor zur Hälfte mit „transforming growth factor“ TGF-β behandelt. Die Werte sind als Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 5$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine

eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die jeweiligen Wiederholungsexperimente werden im Anhang aufgeführt (Abbildung 20 für BrdU und Abbildung 21 für MTT). Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande, hierbei werden die mit TGF- β behandelten Gruppen von den unbehandelten Gruppen unterschieden. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werten von $p < 0,05$. Die Klammer —|— fasst einzelne Negativkontroll-siRNA-Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit für die statistische Auswertung gegenüber der Mock-Kondition zusammen. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

Die NIH/3T3-Zellen reagierten im Vergleich zu den primären Mäuselungenfibroblasten sensitiver in Bezug auf die Zellproliferation und Zellviabilität. Bereits die alleinige Gabe von X-tremeGENE™, aber auch die Kombination mit den Negativkontroll-siRNAs zeigte deutliche Reduktionen (Abbildung 17A und 17B). Die NIH/3T3-Zellen, welche mit X-tremeGENE™ behandelt wurden (Mock-Kondition), zeigten eine 30%ige Reduktion der Zellproliferation, mittels des BrdU Assays ermittelt, im Vergleich zu lediglich mit Transfektionsmedium behandelten Zellen (Ut-Kondition) (Abbildung 17A). Die Daten der Wiederholungsexperimente befinden sich im Anhang (Abbildung 20A und 20B) [117]. Verglichen mit der Mock-Kondition zeigten alle fünf Negativkontroll-siRNAs der verschiedenen Unternehmen eine zusätzliche Reduktion der Zellproliferation um 50 % (Abbildung 17A) [117].

Die Zellviabilität der NIH/3T3-Zellen, mittels MTT Assay bestimmt, erfuhr auch durch die alleinige Gabe von X-tremeGENE™ eine Reduktion um fast 50 % (Abbildung 17B). Die Daten der Wiederholungsexperimente befinden sich im Anhang (Abbildung 21A und 21B) [117]. Die zusätzliche Applikation der Negativkontroll-siRNAs hatte für alle fünf Negativkontroll-siRNAs, im Vergleich zu der Kondition Mock, eine 50%ige Reduktion der Zellviabilität zur Folge (Abbildung 17B). Dabei waren, wie zuvor bereits bei den primären Mäuselungenfibroblasten beobachtet, die Effekte auf die Zellproliferation und Zellviabilität der NIH/3T3-Zellen unabhängig von der TGF- β -Gabe (Abbildung 17, Abbildung 20, Abbildung 21) [117].

5 Diskussion

Wie in der Einleitung dargelegt, stellen die Off-Target-Effekte der siRNA eine ernstzunehmende Einschränkung der Verwendung der siRNA auf Basis der RNAi zur Erforschung der Genexpression dar. Die vorliegende Arbeit sollte die kommerziellen Negativkontroll-siRNAs darauf untersuchen, ob und inwieweit sich diese Negativkontroll-siRNAs in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten inert verhalten. Hierbei dürfen Off-Target-Effekte bei inerten Negativkontroll-siRNAs nicht auftreten. Der Negativkontroll-siRNA inhärent, spielen die On-Target-Effekte keine Berücksichtigung, da die Negativkontroll-siRNA andernfalls in erster Instanz nicht als Negativkontroll-siRNA gelten würden. Die Inertheit einer Negativkontroll-siRNA ist für die Kontrolle von siRNA-Experimenten fundamental. Als weitestgehend inert beziehungsweise nicht zelltoxisch, sollten zudem auch die Transfektionsreagenzien als wichtige Komponenten der Transfektion gelten, da die Transfektionsreagenzien die Effektivität der Methode bedeutend beeinflussen [133, 134]. Die Off-Target-Effekte, welche bereits bei siRNAs registriert und berichtet wurden, konnten nun auch bei den in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Negativkontroll-siRNAs in den verwendeten Zelltypen beobachtet und charakterisiert werden. Die Experimente zeigen, dass die verwendeten kommerziellen Negativkontroll-siRNAs die mit dem TGF- β -Signalweg assoziierten mRNA-Level und die daraus translatierten Proteine, sowie das Proliferationsverhalten und die Viabilität von primären Mäuselungenfibroblasten und von NIH/3T3-Zellen beeinflussen [117]. Die ebenfalls verwendeten MLE-12-Zellen – aber nur auf Ebene der Genexpression untersucht – zeigten im Vergleich mit den beiden anderen fibroblastischen Zelltypen deutlich weniger Effekte auf die mRNA-Level [117]. Hierdurch wird nochmals, wie in der Literatur bereits beschrieben [135], unterstrichen, dass die Off-Target-Effekte einzelner siRNAs nicht zelltyp- beziehungsweise speziesunabhängig sind. Die Off-Target-Effekte können somit nicht übergreifend angesehen werden und dürfen nicht verallgemeinert werden, sondern müssen stets im individuellen Kontext – Art des Experiments, Zelltyp etc. – untersucht und erörtert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit reihen sich zudem in die Untersuchungen von Baum et al. [119] ein. Dort riefen kommerzielle Negativkontroll-siRNAs in humanen Zellen der HaCaT- (Keratinocyten) und HT1080- (Fibrosarkom-Zellen) Zelllinie sowie in Zellen der NIH/3T3-Zelllinie in Microarray-Analysen des jeweiligen Transkriptom Unterschiede im Zytokinprofil und der inflammatorischen Zellantwort hervor. Unter

anderem zeigte hierbei die in dieser Arbeit ebenfalls verwendete Allstar Neg. Control siRNA von Qiagen eine Beeinflussung der Zellen [117].

5.1 Nicht targetspezifische Effekte

Die Off-Target-Effekte können generell, wie in der Einleitung beschrieben, in strangabhängige und sequenzabhängige Off-Target-Effekte unterteilt werden. Den sequenzabhängigen Effekten werden die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems auf zellulärer Ebene zugerechnet, bei denen die siRNAs durch einzelne TLR als PAMPs erkannt werden und eine Abwehrreaktion in Form einer INF-Antwort hervorrufen [67] (s. Kapitel 1.2.5.1). Ein weiterer Grund für die Off-Target-Effekte liegt darin begründet, dass bestimmte Basensequenzen in der 3'-UTR der mRNAs, welche den komplementären Bindungssequenzabschnitt zu der Seed-Region der siRNA bilden, unterschiedlich häufig vorkommen (Abbildung 2B). Eine siRNA, welche mit ihrem Hexa- oder Heptamer – Seed-Region – eine dieser häufiger vorkommenden Basensequenz in der 3'-UTR bedient, bindet nicht nur die Target-mRNA (On-Target-Effekt) sondern auch weitere nicht-Target-mRNAs des Transkriptoms (Off-Target-Effekt) [68] (s. Kapitel 1.2.5.2). Auch durch die perfekte oder imperfekte komplementäre Bindung zwischen siRNA und mRNA über die gesamte Länge des 21 nt langen Antisense-Strangs der siRNA – nicht nur auf die 7 oder 8 nt lange Seed-Region begrenzt – kann es zu Off-Target-Effekten, dem sogenannten „miRNA-like off-target effect“ (s. Kapitel 1.2.5.2), kommen. Hierbei werden die mRNAs vom komplementären Antisense-Strang vorrangig in der 3'-UTR gebunden. Theoretisch ist jedoch auch eine Bindung im kodierenden Abschnitt der mRNA möglich [70–72] (s. Kapitel 1.2.5.2).

Die strangabhängigen Off-Target-Effekte beruhen maßgeblich auf der Insertion des falschen Stranges (Sense-Strangs) in den RISC. Hierbei stellt der Sense-Strang der siRNA eine inkorrekte Matrize zur mRNA-Erkennung dar, wodurch nicht-Target-mRNAs gebunden und abgebaut werden [69] (Abbildung 2A).

Off-Target-Effekte schränken die Spezifität der synthetischen siRNAs und shRNAs in Bezug auf die Target-mRNAs ein. Die Bedenken, die aus der Beobachtung der Off-Target-Effekte erwachsen, wurden in dieser Arbeit aufgegriffen und auf die als inert vorausgesetzten, kommerziell vertriebenen Negativkontroll-siRNAs, welche zur Kontrolle von Transfektionsexperimenten dienen, übertragen und untersucht. Der primäre Grund für die Verwendung der kommerziellen Negativkontroll-siRNAs liegt,

wie bereits in der Einleitung (s. Kapitel 1.6 und Kapitel 2). dargelegt, in der ursprünglichen Idee, universelle, kostengünstige und einfach zu implementierende Negativkontroll-siRNAs zur Hand zu haben, um RNAi-Experimente kontrollieren zu können, begründet. Informationen zur Entwicklung oder über die genaue Zusammensetzung der Produkte der Negativkontroll-siRNAs – aber auch der Transfektionsreagenzien – der jeweiligen Biotechnologie-Unternehmen konnten hierbei jedoch nicht gefunden werden.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die gleichen strangabhängigen oder sequenzabhängigen Off-Target-Effekte der siRNAs und Kontroll-siRNAs, welche bereits seit einigen Jahren artikuliert werden [118–121] auch bei den hier untersuchten kommerziellen Negativkontroll-siRNAs auftreten können, wenn die Negativkontroll-siRNAs mit den Kontrollkonditionen (Ut und Mock) verglichen werden. Durch die Veränderung der Genexpression oder der detektierten Proteinmenge durch die Negativkontroll-siRNA wird die Interpretation und Einordnung von Daten aus RNAi-Experimenten deutlich schwieriger oder gar unmöglich.

5.2 TGF- β -Signalweg und Zelltypen

Auf Basis der formulierten Hypothese wurden die Effekte der fünf kommerziell vertriebenen Negativkontroll-siRNAs auf mRNA-Steady-State-Level und Steady-State-Proteinmengen des TGF- β -Signalwegs charakterisiert. Hierbei wurden verschiedene Bestandteile des kanonischen TGF- β -Signalwegs untersucht. Darunter waren die drei TGF- β -Liganden (Tgfb1, Tgfb2 und Tgfb3), der drei TGF- β -Rezeptoren der unterschiedlichen Subtypen I, II und III (Tgfbr1, Tgfbr2, Tgfbr3) sowie die Second Messenger SMAD-Proteine (Smad2, Smad3, Smad4 und Smad7) und das vom TGF- β -Signalweg rekrutierte Gen *Serpine1* [117]. Da der TGF- β -Signalweg als Hintergrund für die Experimente herangezogen wurde, beinhalteten die Immunoblot-, Zellproliferations- und Zellviabilitäts-Assays eine Stimulierung mittels TGF- β [117]. Der TGF- β -Signalweg wurde als bedeutender Signalweg ausgewählt, da er neben der in Kapitel 1.5 aufgeführten allgemeinen Bedeutung für die Forschung, insbesondere in der Lungenforschung aufgrund der Vielzahl an möglichen Einflussnahmen auf zelluläre Prozesse einen Forschungsschwerpunkt bildet [132, 136–140]. Die Aktivität von TGF- β in der Lunge ist sowohl bei der Lungenentwicklung, der Zellhomöostase als auch bei verschiedenen chronischen Lungenerkrankungen und der unter anderen daran beteiligten angeborenen

Immunantwort in der Lunge von Bedeutung [136, 138–140]. In Experimenten finden hierbei häufig siRNAs eine Anwendung, weshalb wiederum auch Negativkontroll-siRNAs häufig verwendet werden. Fibroblasten, als vorherrschender Zelltyp in den Experimenten dieser Arbeit, wurden, neben der verwendeten Epithelzelllinie, ausgewählt, da Fibroblasten sowohl TGF- β -Signale generieren [141] als auch wahrnehmen können [142] und zudem häufig in *in vitro*-Experimenten Verwendung finden. Darüber hinaus spielt TGF- β eine Rolle bei der Zellkommunikation zwischen Fibroblasten und Epithelzellen [143], weshalb zu den primären Mäuselungenfibroblasten und der Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 die Lungenepithelzelllinie MLE-12 [127] für Experimente ausgewählt wurde. Primäre Lungenepithelzellen fanden demgegenüber keine Verwendung, da primäre Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) Typ II schwierig zu transfizieren sind [144]. Allem Anschein nach enden die siRNAs, welche mittels Transfektionsreagenz in die Zellen internalisiert werden, in Phospholipid-Recycling-Vesikeln und können dadurch im Zytosol nicht wirksam werden.

5.3 Transfektion; Konzentrationsfestlegung der Negativkontroll-siRNAs und Auswahl der Transfektionsreagenz

Die verwendete Konzentration der Negativkontroll-siRNAs und der siRNAs (si*Tgfb3* und si*Smad2*) von 100 nM wurde gewählt, da in publizierten Abhandlungen zur Thematik des TGF- β -Signalwegs aus der Pubmed-Datenbank zum Knockdown siRNA-Konzentrationen von 50 bis 200 nM verwendet wurden [129, 137, 145]. 100 nM stellt dabei einen definierten Mittelwert dar, welcher niedriger ist als der arithmetische Mittelwert, da höhere siRNA-Konzentrationen tendenziell zu mehr Off-Target-Effekten führen (s. Kapitel 1.3). Die Wahl einer niedrigeren Konzentration als 100 nM könnte für einzelne Negativkontroll-siRNAs günstiger sein, da Off-Target-Effekte bei höherer siRNA-Konzentration auch vermehrt auftauchen [65, 87] Jedoch muss konstatiert werden, dass die Konzentrationswahl der Negativkontroll-siRNA immer abhängig von der Konzentrationshöhe der zu kontrollierenden siRNA ist. Diese benötigt eine ausreichend hohe Konzentration, damit sie das jeweilige Gen zuverlässig stilllegen kann. Diese Konzentration wird häufig mit 100 nM, wie auch bei den in dieser Arbeit verwendeten siRNAs – si*Tgfb3* und si*Smad2* – angegeben [146, 147]. Die gewählte Konzentration von 100 nM wird darüber hinaus auch im Produktdatenblatt („product sheet“) der Negativkontroll-siRNA von Cell Signaling Technology als zu verwendende Konzentration angegeben [117, 148]. Außerdem wurde zum Zeitpunkt der

Projektplanung, November 2017, auf der Produktseite der Negativkontroll-siRNA von Sigma [149] nur eine einzige Publikation unter dem Reiter „PEER-REVIEWED-ARTIKEL“ aufgeführt. In dieser Publikation wurde die Negativkontroll-siRNA mit einer Konzentration von 100 nM verwendet [150]. Aus diesen genannten Gründen erschien uns die Konzentration von 100 nM als geeigneter Kompromiss, um die Inertheit zu bestätigen oder den möglichen Effekt der Negativkontroll-siRNA zu charakterisieren, ohne einen Effekt durch eine hohe Konzentration künstlich hervorzurufen [117].

Die zunächst erhobenen Daten (s. Kapitel 4.1) zeigen, dass die Transfektionsreagenzien per se die mRNA-Steady-State-Level beeinflussen können, ohne jedoch einen generellen Trend zu bedingen [117] und reihen sich damit in die in der Literatur geäußerten Bedenken der Beeinflussung von zellulären Prozessen durch die Transfektionsreagenzien ein [95, 125]. Beispielsweise wurden in primären Mäuselungenfibroblasten die mRNA-Steady-State-Level von *Tgfbr3* durch X-tremeGENE™ und Lipofectamine erhöht, wohingegen die Level von *Tgfbr2* unbeeinflusst und die mRNA-Steady-State-Level von *Tgfb1* demgegenüber durch die beiden Transfektionsreagenzien erniedrigt wurden [117]. Auch ein genereller Trend in der Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level zwischen den primären Mäuselungenfibroblasten und der NIH/3T3-Mäusefibroblastenzelllinie konnte nicht abgeleitet werden [117]. Bis auf die mRNA-Steady-State-Level von *Serpine1* der NIH/3T3-Zellen, die durch Lipofectamine beeinflusst wurden, zeigten die NIH/3T3-Zellen im Vergleich zu den primären Mäuselungenfibroblasten keinerlei Beeinflussung, wodurch die Divergenz der beiden Fibroblastentypen deutlich wird [117] (s. Tabelle 13). Dies, bezogen auf die unterschiedlichen Zellphysiologien der primären Mäuselungenfibroblasten, welche physiologische Zellen repräsentieren, und der NIH/3T3-Zellen, welche einer Tumorzelllinie entspringen und damit eine Tumorphysiologie aufweisen, lässt sich leicht nachvollziehen. Tumorzellen, im Vergleich zu physiologisch gesunden Zellen, zeichnen sich unter anderem durch eine höhere Resilienz gegenüber äußeren Einflüssen, wie beispielsweise Wachstums- oder Apoptosesignalen aus [151]. Die weniger starke Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level der NIH/3T3-Zellen durch die Transfektionsreagenzien erscheint unter diesem Gesichtspunkt plausibel. Die mRNA-Level der primären Mäuselungenfibroblasten werden durch X-tremeGENE und Lipofectamine 2000 beeinflusst, wohingegen das dritte Transfektionsreagenz HiPerFect im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Kondition UT) keinen Einfluss auf die Δ CT-Werte hatte [117]. Der Grund für diese Unterschiede

ist höchstwahrscheinlich in der Zusammensetzung der Transfektionsreagenzien zu finden. Über die Komponenten oder deren Zusammensetzung von X-tremeGENE™, HiPerFect oder Lipofectamine 2000 waren jedoch, wie bereits erwähnt, keine Informationen erhältlich, weshalb über den spezifischen Grund für die Inertheit von HiPerFect in diesen beiden Zelltypen aktuell keine Aussage getroffen werden kann [117]. Lediglich kann beobachtet werden, dass HiPerFect weniger Effekte auf die mRNA-Menge im Vergleich zu X-tremeGENE™ oder Lipofectamine 2000 aufweist [117].

Im Gegensatz zu dieser Beobachtung wurde jedoch für die weiteren Experimente zur Charakterisierung der Negativkontroll-siRNAs als Transfektionsreagenz X-tremeGENE™ ausgewählt. Die Entscheidung lässt sich auf folgende Gründe zurückzuführen: Als erster Grund ist der Preis zu nennen. Bis zum heutigen Tag, 15. Juni 2022, kostete X-tremeGENE™, mit leichten Preisschwankungen, mit US\$ 306/ml (von Roche) gegenüber HiPerFect mit US\$ 431/ml (von Qiagen) und Lipofectamine 2000 mit US\$ 685/ml (von ThermoFisher) mit Abstand am wenigsten. Der zweite Grund ist, dass die Effekte und Trends hinsichtlich der mRNA-Steady-State-Level von X-tremeGENE™ und Lipofectamine 2000 durchaus vergleichbar waren, wobei jedoch Lipofectamine 2000 im Vergleich zu X-tremeGENE™ ebenfalls die mRNA-Menge von *Serpine1* in NIH/3T3-Zellen und *Tgfb1* in den primären Mäuselungenfibroblasten veränderte, während X-tremeGENE™ zusätzlich nur die mRNA-Steady-State-Level von *Tgfb3* in primären Mäuselungenfibroblasten beeinflusste. Dementsprechend beeinflusst X-tremeGENE™ die Zellen geringfügig weniger stark, und wurde deshalb ausgewählt. Zugleich gingen und gehen wir wegen der ähnlichen Trends jedoch davon aus, dass die beobachteten Effekte von X-tremeGENE™ – zwar sicherlich mit Einschränkungen, aber auch in Verbindung mit den Negativkontroll-siRNAs – bis zu einem gewissen Grad bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen auf Lipofectamine 2000 übertragbar sind [117] und wir mit der Wahl von X-tremeGENE™ einen breiteren Teil der möglichen Effekte der in der Literatur verwendeten Transfektionsreagenzien abbilden können, als mit HiPerFect.

5.4 Effekte der Transfektionsreagenz und der Negativkontroll-siRNAs

Zur Rekapitulation, in den primären Mäuselungenfibroblasten hatten alle fünf Negativkontroll-siRNAs einen Einfluss auf die mRNA-Steady-State-Level im Vergleich zu der Mock-Kontrollkondition, d. h. lediglich Transfektionsreagenz plus Kulturmedium. Den Effekten liegt kein genereller Trend zugrunde, da die Menge an mRNA der Liganden oder Rezeptoren in primären Mäuselungenfibroblasten, wie bereits bei der alleinigen Behandlung mit den Transfektionsreagenzien, erhöht oder erniedrigt wurden, beziehungsweise keinem Einfluss unterlagen. Ein Einfluss auf die Second Messenger SMAD-Proteine konnte nicht beobachtet werden. Beispielsweise wurden in primären Mäuselungenfibroblasten die mRNA-Steady-State-Level von *Tgfb3* durch die Negativkontroll-siRNAs erniedrigt, wohingegen die von *Tgfb2* unbeeinflusst blieben [117]. Hier kann zudem konstatiert werden, dass es so scheint, als seien bestimmte mRNAs einfacher zu beeinflussen als andere. Dies ist beim Vergleich zwischen den mRNA-Steady-State-Leveln der SMAD-Proteine auf der einen Seite, welche nur geringfügig beeinflusst wurden, und den mRNA-Leveln der TGF- β -Liganden und TGF- β -Rezeptoren auf der anderen Seite, welche stärkeren Beeinflussungen unterlagen, deutlich zu sehen. Die Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level in NIH/3T3-Zellen durch die fünf Negativkontroll-siRNAs unterlag ebenfalls keinem generellen Trend [117]. Beispielsweise wurden die mRNA-Steady-State-Level des Liganden *Tgfb3* hauptsächlich erhöht, wohingegen die mRNA-Level des Rezeptors *Tgfb1* unbeeinflusst blieben [117]. Die mRNA-Steady-State-Level der Mäuselungenepithelzellen der MLE-12-Zelllinie sind durch die fünf Negativkontroll-siRNAs im Vergleich zu den Fibroblasten (primär und Zelllinie) bis auf drei Ausnahmen nicht signifikant beeinflusst worden und heben sich, wie eingangs erwähnt, deutlich von den Fibroblasten ab.

Die Erniedrigung der mRNA-Steady-State-Level ist höchstwahrscheinlich auf einen oder mehreren der Off-Target-Effekte, welche in Kapitel 1.2.5 aufgeführt werden, zurückzuführen. Um welchen Off-Target-Effekt oder um welche Kombination von Off-Target-Effekten es sich handelt, kann durch diese Arbeit jedoch nicht gesagt werden. Für die ebenfalls beobachteten Erhöhungen einzelner mRNA-Steady-State-Level, wie beispielsweise des Liganden *Tgfb1*, durch die Negativkontroll-siRNA von Qiagen, sowohl in primären Mäuselungenfibroblasten als auch in Fibroblasten der NIH/3T3-Zelllinie, könnte ein Effekt, der bereits bei siRNAs beobachtet wurde, ursächlich sein.

Hierbei können siRNAs, ebenso wie miRNAs, als sogenannte saRNAs („small activating RNAs“) im Zellkern als Promotor wirken und zur Erhöhung der mRNA-Steady-State-Level führen [152–154].

Im Western Blot konnten deutliche Einflüsse der Negativkontroll-siRNAs auf die Steady-State-Level des Proteins Tgfbr3 in NIH/3T3-Zellen beobachtet werden. Die Proteinmenge von Tgfbr3 in primären Mäuselungenfibroblasten zeigte demgegenüber keine wirkliche Beeinflussung und spiegelte die Veränderungen der mRNA-Steady-State-Level von *Tgfbr3* nicht wider (s. Kapitel 4.3). Werden in NIH/3T3-Zellen die Effekte der verschiedenen Negativkontroll-siRNAs mit dem mRNA-Steady-State-Level und dem Protein-Steady-State-Level von Tgfbr3 verglichen, zeigten sich in Teilen jedoch gleiche Trends [117]. Die beiden Negativkontroll-siRNAs von Sigma und Santa Cruz hatten zwar keinen Einfluss auf die mRNA-Level von *Tgfbr3*, jedoch reduzierten sie die Protein-Steady-State-Level von Tgfbr3. Die Negativkontroll-siRNAs von Ambion, Cell Signaling Technology und Qiagen zeigten dagegen gleiche Effekte auf den unterschiedlichen Ebenen. Ambion beeinflusste sowohl die mRNA- als auch die Protein-Level von Tgfbr3 nicht, wohingegen die Negativkontroll-siRNAs von Cell Signaling Technology und Qiagen sowohl die mRNA- als auch die Protein-Level von Tgfbr3 gleichermaßen um ungefähr 50 % reduzierten [117]. Dies stellt ungefähr die Hälfte des Effekts der Reduzierung der mRNA- und Proteinmenge von Tgfbr3 durch *siTgfbr3* dar [117].

Über die Beeinflussung der mRNA-Steady-State- und Protein-Steady-State-Level hinaus, beeinflusste sowohl die alleinige Gabe von X-tremeGENE™ als auch in Kombination mit den fünf verschiedenen Negativkontroll-siRNAs die Zellproliferation und Zellviabilität der primären Mäuselungenfibroblasten und der NIH/3T3-Zellen. Sowohl die primären Mäuselungenfibroblasten als auch die NIH/3T3-Zellen zeigten durch alle Negativkontroll-siRNAs eine verminderte Proliferation. Dies könnte durch eine INF-Antwort des angeborenen Immunsystems, die das Zellwachstum hemmt und Zellapoptose hervorrufen kann, zu erklären sein [50, 54, 55]. Auch die Herabsetzung der Proliferationsrate der NIH/3T3-Zellen alleine durch die Transfektionsreagenzien könnte ebenfalls in einer inflammatorischen Zellantwort, welche in der Zellapoptose gipfelt, begründet sein [95].

Zu unserer Überraschung zeigten sich primäre Mäuselungenfibroblasten in Bezug auf die Zellproliferation deutlich weniger sensibel gegenüber den Negativkontroll-siRNAs als NIH/3T3-Zellen [117]. NIH/3T3-Zellen stellen, wie oben bereits erwähnt, eine immortalisierte Tumorzelllinie dar und zeichnen sich im Vergleich zu primären Mäuselungenfibroblasten zudem durch eine Dedifferenzierung – dem Verlust oder Veränderung von Zelltyp-spezifischen Funktionen – aus [155]. Ein solcher Verlust könnte zu einem veränderten beziehungsweise zentralistischeren Steuerungsmechanismus der Proliferation der NIH/3T3-Zellen im Vergleich zu primären Mäuselungenfibroblasten führen. Sollte in den NIH/3T3-Zellen eine kritische und zugleich zentrale Schaltstelle in der veränderten Proliferationssteuerung, welche eigentlich zum stärkeren Zellwachstum führt, von Transfektionsreagenz oder Negativkontroll-siRNA beeinflusst werden, könnte der Ausfall dieser Schaltstelle eine stärkere Hemmung der Proliferation im Vergleich zu den primären Mäuselungenfibroblasten nach sich ziehen. Es würde zu einer Art „Single Point of Failure“ [156] kommen, wohingegen es den physiologischen, differenzierten Mäuselungenfibroblasten weiterhin möglich wäre, auch bei der Kompromittierung einer zentralen und wichtigen Schaltstelle, über andere Schaltstellen ihr Zellwachstum zu steuern beziehungsweise anzuregen, während NIH/3T3-Zellen dieser Möglichkeiten beraubt wurden. Daten zur Klärung des dafür verantwortlichen Mechanismus konnten leider nicht gefunden werden, weshalb sich dieser Erklärungsversuch als reine Überlegung darstellt.

Die nicht signifikante Zytotoxizität von drei unterschiedlichen Transfektionsreagenzien in Zellen aus *Acipenser baerii* [133] und die fehlende Zytotoxizität der Transfektionsreagenzien in humanen Huh-7-Zellen (Tumorzelllinie aus hepatozellulärem Karzinom) [125] sind mit der beeinträchtigten Zellviabilität, gemessen mittels MTT Assay, der primären Mäuselungenfibroblasten und NIH/3T3-Zellen dieser Arbeit insoweit konsistent, dass die Beeinflussung der Zellviabilität durch die Transfektionsreagenzien, parallel zu der zelltypabhängigen Beeinflussung durch die siRNAs [119, 135], stark zelltypabhängig ist. Werden die Daten der primären Mäuselungenfibroblasten und der NIH/3T3-Zellen darüber hinaus nochmals betrachtet, wird deutlich, dass die Kompromittierung der Zellproliferation (primären Mäuselungenfibroblasten ausgenommen) und Zellviabilität bereits in der Gabe von XtremeGENE™ begründet ist, die verschiedenen siRNAs (sowohl siRNAs als auch

Negativkontroll-siRNAs) diese jedoch nochmals verstärken. Die Beobachtung, dass die Zellviabilität verschiedener humaner Zelllinien durch unterschiedliche siRNAs beeinträchtigt wird [82], passt hierbei in das Bild unserer Daten. Sollten sich die Hinweise darauf, dass die angeborene zelluläre Immunantwort zur Kompromittierung der Zellproliferation und Zellviabilität führt, weiter verdichten, könnten möglicherweise weitere Fortschritte in der siRNA-Konzipierung und -Synthetisierung (s. Kapitel 1.3) sowie in der Weiterentwicklung der Transfektionsreagenzien (s. Kapitel 1.4) zur Abschwächung dieser unerwünschten Effekte führen [99, 117, 157, 158].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Transfektionsreagenzien allein als auch in Kombination mit den Negativkontroll-siRNAs Effekte auf die Expression der Gene und Proteine wie auch auf die Zellproliferation und Zellviabilität in primären Mäuselungenfibroblasten und Fibroblasten der NIH/3T3-Zelllinie aufweisen [117]. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass weitere Zelltypen betroffen sind, jedoch ohne die Ergebnisse dieser Arbeit verallgemeinern oder einen generellen zelltypunabhängigen Trend formulieren zu können, wie bereits an den MLE-12-Epithelzellen zu sehen.

5.5 Evaluation der Methoden

Um die Methoden der Arbeit zu kritisieren und zu evaluieren, muss zuerst darauf hingewiesen werden, dass diese Studie lediglich einen deskriptiven Charakter aufweist. Zur weiteren Darstellung der Effekte der Negativkontroll-siRNAs könnte beispielsweise eine Durchflusszytometrie verwendet werden, um die Anzahl der vitalen und abgestorbenen Zellen quantitativ zu bestimmen. Diese würde den semiquantitativen Ansatz des MTT Assay weiter Gewicht verleihen. Außerdem könnte ein Migration Assay die Aussagekraft des verwendeten Proliferation Assay zusätzlich erhöhen.

Ergänzende funktionelle Experimente, wie ein Dual-Luciferase® Reporter Assay könnte darüber hinaus genutzt werden, um festzustellen, ob die Negativkontroll-siRNAs, neben den RNAi-vermittelten Effekten, auch direkt Promoter-Regionen einzelner Gene des TGF- β -Signalweges beeinflussen. Zusätzlich könnte die Regulation einzelner miRNAs mittels Dual-Luciferase® Reporter Assay beleuchtet werden, um den Einfluss der Negativkontroll-siRNA auf den Steuerungsmechanismus der Genexpression zu ergründen. Den deskriptiven Experimenten würden damit kausale, Mechanismen-erklärende Experimente an die Seite gestellt, wodurch die Off-Target-Effekte noch

tiefgreifender untersucht würden. Demgegenüber muss jedoch betont werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Methoden in Form der Transfektion, der RT-qPCR, des Western Blot sowie des Proliferations- und MTT Assay, bereits seit Jahren in der Arbeitsgruppe (AG) von Dr. med. Rory E. Morty etabliert sind [122, 128, 129, 131, 132, 137, 159] und die beiden Fragestellungen hiermit hinreichend deskriptiv erörtert und beantwortet werden konnten.

5.6 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führen zur Verwerfung der beiden Ausgangshypothesen. Sowohl die Haupthypothese, *dass die kommerziellen Negativkontroll-siRNAs den TGF- β -Signalweg der verwendeten Zellen nicht beeinflussen*, noch die vorgelagerte Nebenhypothese, *dass die verwendeten Transfektionsreagenzien die von uns verwendeten Zelltypen nicht beeinflussen und somit keine Veränderungen im TGF- β -Signalweg bedingen*, müssen verworfen werden. Dies ist dem geschuldet, dass neben den Negativkontroll-siRNAs auch die Transfektionsreagenzien die mRNA-Steady-State-Level der untersuchten Gene und der enkodierten Proteine der primären Mäuselungenfibroblasten und der Zelllinien NIH/3T3 beeinflussen können [117]. Zusätzlich wurden sowohl Zellproliferation als auch Zellviabilität – höhere Zellfunktionen – der Fibroblasten kompromittiert [117]. Neben den Fibroblasten zeigten zwar auch die MLE-12 Zellen, als Vertreter der Epithelzellen, eine Beeinflussung der mRNA-Steady-State-Level der untersuchten Gene durch die Negativkontroll-siRNAs [117], welche jedoch insgesamt deutlich schwächer ausfiel. Insbesondere die Inertheit der hier untersuchten kommerziell vertriebenen Negativkontroll-siRNAs ist damit nicht vollumfänglich gegeben. Dies fügt sich in die Beobachtungen der vorangegangenen Untersuchungen von Kontroll-siRNAs [119, 120, 123] und Kontrollen von miRNA-Experimenten [122] ein.

Durch die Arbeit von Buehler et al. [120] wurde zwar bereits 2015 der Gebrauch von universell nutzbaren Negativkontroll-siRNAs in RNAi-Experimenten infrage gestellt [117] jedoch ohne auf breite wissenschaftliche Resonanz zu stoßen. Die zuvor von Bryan Cullen artikulierte Idee, im Zentrum der siRNA eine falsch gepaarte Basensequenz mit einer Länge von mehr als 3 nt einzusetzen [160], wurde mit der von Buehler et al. verwendeten “C911”-Basenfehlpaarung zur Detektion von Off-Target-Effekten etabliert [120] und schlussendlich auch evaluiert [121]. Neben diesem Ansatz stellten Zagalak et

al. [124] individuelle Negativkontroll-siRNAs her, indem durch Zufall Basen in RNA-Stränge eingefügt wurden. Eine dieser synthetisierten Kontroll-siRNAs zeigte im Vergleich mit einer kommerziellen Negativkontroll-siRNA von Ambion (Silencer Negative Control No. 5, Katalog Nr. AM4642, in dieser Arbeit nicht verwendet) deutlich weniger Erniedrigungen bestimmter mRNA-Steady-State-Level [124]. Die vorliegende Arbeit schlägt in dieselbe Kerbe der Kritik und zeigt die ungebrochene Aktualität dieser Überlegungen auf. Die beiden Ansätze von Buehler et al. [120] und Zagalak et al. [124] könnten in Zukunft dazu genutzt werden, verschiedene individuelle Negativkontroll-siRNAs zu generieren, welche schlussendlich nebeneinander in ein und demselben Experiment verwendet würden. Sie wären dabei an die jeweiligen siRNAs und den verwendeten Zelltypen angepasst, hätten deutlich minimierte Off-Target-Effekte oder könnten zur Erkennung der Off-Target-Effekte dienen. Vorversuche zur Bestimmung der minimal benötigten Konzentration der siRNA und damit der Negativkontroll-siRNAs in den jeweils verwendeten Zelltypen sollten zudem bei zukünftig durchgeführten RNAi-Experimenten standardisiert durchgeführt werden, um konzentrationsbedingten Off-Target-Effekte zu vermeiden.

Weiter wird, wie bereits erwähnt, durch diese Arbeit unterstrichen, dass die zuvor erwähnte Mock-Kontrollkondition ebenfalls kritisch hinterfragt werden sollte, da die kationischen Lipide der Transfektionsreagenzien neben der Veränderung der mRNA-Steady-State-Level [117] und der Beeinflussung der Cholesterolsynthese [125] auch das Lipidom, die Gesamtheit aller Lipide einer Zelle, beeinflussen und damit bereits zu einer Verzerrung von Ergebnissen führen können [161]. Özbalci et al. schlagen deshalb, analog zu den siRNA-Kontrollen, vor, unterschiedliche Transfektionsreagenzien in Mock-Kontrollkonditionen zu verwenden, um die jeweiligen Experimente besser zu kontrollieren [161]. Hierbei könnte beispielsweise HiPerFekt in Folgeexperimenten Verwendung finden, wohingegen Lipofectamin 2000 in diesen Experimenten eher ungeeignet scheint (s. Kapitel 4.1).

Weitere Optimierungen der siRNAs und zukünftige Modifikationen der Transfektionsreagenzien (s. Kapitel 1.3 und Kapitel 1.4) bergen das Potenzial höherer Qualität von RNAi-Experimenten. Diese Fortschritte und weitere Überlegungen, welche zu einer besseren Kontrolle von RNAi-Experimenten führen sollen, werden durch die Verwendung von bioinformatischen Werkzeugen wie gespeR, welche zur Eingrenzung von Off-Target-Effekten führen [162], flankiert. Diese bioinformatischen Werkzeuge

werden in Zukunft aufgrund des Fortschrittes im Bereich der Künstlichen Intelligenz (KI) weiter an Bedeutung gewinnen [163].

Die Ergebnisse betonen ein weiteres Mal, dass die Interpretation von RNAi-Experimenten auf Basis einer Lipofektion, und nur mittels Mock-Kontrollkondition sowie kommerzieller Negativkontroll-siRNA kontrolliert, nicht leichtfertig geschehen darf beziehungsweise die Kontrolle auch weitverbreiteter Experimente nicht trivial ist. Die erhobenen Daten dieser Arbeit, die zur Verwerfung der beiden Hypothesen geführt haben, machen zudem deutlich, dass Forschende die jeweiligen Kontrollkonditionen, wie Mock-Kondition, oder die vermeintlich universell einsetzbaren kommerziellen Negativkontroll-siRNAs der zu planenden Experimente nicht nur kritisch betrachten müssen, sondern deren mögliche Beeinflussung der mRNA- oder Protein-Level sowie der höheren Zellfunktionen zuvor ausschließen sollten. Außerdem müssten die Forschenden stets multiple, auf den Zelltyp und das jeweilige Experiment angepasste Kontrollen etablieren. Die Tabelle 13 und Tabelle 14 können lediglich in Bezug auf den TGF- β -Signalweg in den in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen als Hilfestellung dienen, das passende Transfektionsreagenz oder, falls eine kommerzielle Negativkontroll-siRNA verwendet werden soll, eine geeignete Negativkontroll-siRNA auszuwählen [117]. Durch diese Arbeit wird die Wichtigkeit der kritischen und vorsichtigen Abwägung dieser Produkte in Form der Transfektionsreagenzien und Negativkontroll-siRNAs bei der Planung und Durchführung von RNAi-Experimenten unterstrichen. Hierbei ist die Angabe der verwendeten Transfektionsreagenzien und der kommerziellen Negativkontroll-siRNAs in Publikationen fundamental und als Mindestanforderung anzusehen. In Hinblick auf Kapitel 1.1 muss abschließend konstatiert werden, dass ohne diese Angaben Ergebnisse nicht vernünftig interpretiert werden können und es folglich zu keinem echten Wissenszuwachs kommt.

6 Zusammenfassung

Die Transfektion synthetischer kleiner interferierender (si)RNA in kultivierte Zellen bildet die Grundlage für Studien, die die RNA-Interferenz (allgemein als „Gen-Knockdown“ bezeichnet) benutzen, um die Auswirkungen des Verlusts der Gen- oder Proteinexpression auf einen biologischen Signalweg oder Prozess zu untersuchen [117]. In diesen Studien sind die Mock-Transfektionen (mit Transfektionsreagenzien allein) und die Verwendung synthetischer, kommerziell vertriebenen Negativkontroll-siRNAs (vermeindlich inert) als wesentliche Negativkontrollen zu betrachten [117]. Negativkontrollen sind für jedes Experiment ein wesentlicher Bestandteil, da sie die Basislinie markieren, mit der die Ergebnisse verglichen werden müssen. Ohne diese Grundlinie sind Daten aus Experimenten nur Punkte in einer Abbildung, ohne Koordinatensystem, und die Daten können nicht richtig interpretiert werden. Diese Arbeit zeigt, dass drei weitverbreitete Transfektionsreagenzien (X-tremeGENE™, HiPerFect und Lipofectamine® 2000) und fünf kommerziell vertriebene Kontroll-siRNAs (von den Biotechnologie-Unternehmen: Ambion, Sigma, Santa Cruz, Cell Signaling Technology und Qiagen) nicht als generell inert in Zellkulturstudien anzusehen sind [117]. Sowohl die Transfektionsreagenzien als auch die Negativkontroll-siRNA störten mRNA- und Protein-Steady-State-Level von Komponenten des kanonischen transformierenden Wachstumsfaktors TGF- β -Signalwegs, der als Modellsystem verwendet wurde, in primären Mäuselungenfibroblasten und in NIH/3T3-Zellen (einer weit verbreiteten embryonalen Mäusefibroblastenzelllinie), wohingegen in MLE-12-Zellen, einer häufig verwendete Epithelzelllinie, die Steady-State-Level nahezu vollständig unbeeinflusst blieben. Darüber hinaus reduzierten Transfektionsreagenzien und Negativkontroll-siRNAs die Lebensfähigkeit und Proliferationsrate sowohl von Lungenfibroblasten als auch von NIH/3T3-Zellen [117]. Diese Daten stellen für Forschende einen Warnhinweis dar, der sie dazu veranlassen sollte, die Auswirkungen der Kontrollinterventionen in RNA-Interferenzstudien, wie der Mock-Kontrolle und der Negativkontroll-siRNA, sorgfältig zu berücksichtigen [117]. Folglich sollten Forschende erwägen, mehr als nur eine kommerziell erhältliche Negativkontroll-siRNA zu verwenden und sich darüber im Klaren sein, dass es wahrscheinlich notwendig ist, individuell synthetisierte Negativkontroll-siRNAs zu verwenden, die an den Zelltyp und das Experiment angepasst wurden.

7 Summary

“The transfection of synthetic small interfering (si)RNA into cultured cells forms the basis of studies that use RNA interference (commonly referred to as “gene knockdown”) to study the impact of loss of gene or protein expression on a biological pathway or process” [117]. “In these studies, mock transfections (with transfection reagents alone), and the use of synthetic commercially distributed negative control (apparently inert) siRNA are both essential negative controls” [117]. Negative controls are essential for each experiment key because they mark the baseline, which is needed to compare the findings with. Without this baseline data from experiments are just dots in a graph without the system of coordinates and the data cannot be interpreted properly. “This report reveals that three widely-used transfection reagents (X-tremeGENE™, HiPerFect, and Lipofectamine® 2000) and five commercially-available control siRNA (from Ambion, Sigma, Santa Cruz, Cell Signaling Technology, and Qiagen) cannot be seen as generally inert in cell-culture studies” [117]. “Both transfection reagents and [negative] control siRNA perturbed steady-state mRNA and protein levels in primary mouse lung fibroblasts and in NIH/3T3 cells (a widely-used mouse embryonic fibroblast cell-line), using components of the canonical transforming growth factor- β signaling machinery as a model system” [117], whereas in MLE-12 cells, a commonly used epithelial cell-line, the steady-state levels were nearly completely unaffected. “Furthermore, transfection reagents and control siRNA reduced the viability and proliferation of both lung fibroblasts and NIH/3T3 cells” [117]. “These data collectively provide a cautionary note to investigators to carefully consider the impact of control interventions, such as mock transfections and control siRNA, in RNA interference studies with synthetic siRNA” [117]. Consequently, investigators should consider to use more than just one commercially-available negative control siRNA and should also be aware, that it is probably necessary to tailor individual negative control siRNAs depending on the cell-type and experiment [117].

8 Literaturverzeichnis

- [1] Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science (New York, N.Y.)* 286, 5441, 950–952.
- [2] Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell* 2, 4, 279–289.
- [3] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 6669, 806–811.
- [4] Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* 15, 2, 188–200.
- [5] Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 6818, 363–366.
- [6] Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. 2000. RNAi. *Cell* 101, 1, 25–33.
- [7] Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.-L., and Iggo, R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genetics* 34, 3, 263–264.
- [8] Bofill-De Ros, X. and Gu, S. 2016. Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods (San Diego, Calif.)* 103, 157–166.
- [9] Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P. S., Paddison, P. J., Hannon, G. J., and Cleary, M. A. 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nature Biotechnology* 23, 2, 227–231.
- [10] Weitzer, S. and Martinez, J. 2007. hC1p1: a novel kinase revitalizes RNA metabolism. *Cell Cycle* 6, 17, 2133–2137.
- [11] Fujinami, H., Shiraishi, H., Hada, K., Inoue, M., Morisaki, I., Higa, R., Shin, T., Kobayashi, T., Hanada, R., Penninger, J. M., Mimata, H., and Hanada, T. 2020. CLP1 acts as the main RNA kinase in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

- [12] Liu, Q., Rand, T. A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.-E., Smith, D. P., and Wang, X. 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science (New York, N.Y.)* 301, 5641, 1921–1925.
- [13] Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P. D. 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science (New York, N.Y.)* 306, 5700, 1377–1380.
- [14] MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., and Doudna, J. A. 2008. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2, 512–517.
- [15] Daniels, S. M., Melendez-Peña, C. E., Scarborough, R. J., Daher, A., Christensen, H. S., El Far, M., Purcell, D. F. J., Lainé, S., and Gatignol, A. 2009. Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference. *BMC Molecular Biology* 10, 38.
- [16] Wang, H.-W., Noland, C., Siridechadilok, B., Taylor, D. W., Ma, E., Felderer, K., Doudna, J. A., and Nogales, E. 2009. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 11, 1148–1153.
- [17] Fu, Q. and Yuan, Y. A. 2013. Structural insights into RISC assembly facilitated by dsRNA-binding domains of human RNA helicase A (DHX9). *Nucleic Acids Research* 41, 5, 3457–3470.
- [18] Robb, G. B. and Rana, T. M. 2007. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Molecular Cell* 26, 4, 523–537.
- [19] Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., and Zamore, P. D. 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 4, 607–620.
- [20] Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science (New York, N.Y.)* 305, 5689, 1434–1437.
- [21] Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 6775, 293–296.
- [22] Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. 2003. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 115, 7, 787–798.

- [23] Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 1, 15–20.
- [24] Birmingham, A., Anderson, E. M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W. S., and Khvorova, A. 2006. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nature Methods* 3, 3, 199–204.
- [25] Anderson, E. M., Birmingham, A., Baskerville, S., Reynolds, A., Maksimova, E., Leake, D., Fedorov, Y., Karpilow, J., and Khvorova, A. 2008. Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA* 14, 5, 853–861.
- [26] Kobayashi, Y., Fukuhara, D., Akase, D., Aida, M., and Ui-Tei, K. 2022. siRNA Seed Region Is Divided into Two Functionally Different Domains in RNA Interference in Response to 2'-OMe Modifications. *ACS Omega* 7, 2, 2398–2410.
- [27] Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J.-J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (New York, N.Y.)* 305, 5689, 1437–1441.
- [28] Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO Journal* 20, 23, 6877–6888.
- [29] Pratt, A. J. and MacRae, I. J. 2009. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 27, 17897–17901.
- [30] Macfarlane, L.-A. and Murphy, P. R. 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics* 11, 7, 537–561.
- [31] Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., and Carthew, R. W. 2004. Distinct Roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA Silencing Pathways. *Cell* 117, 1, 69–81.
- [32] Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., and Sonenberg, N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* 9, 2, 102–114.
- [33] Iwasaki, Y. W., Siomi, M. C., and Siomi, H. 2015. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annual Review of Biochemistry* 84, 405–433.

- [34] Fire, A. 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics : TIG* 15, 9, 358–363.
- [35] Cogoni, C. and Macino, G. 2000. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current Opinion in Genetics & Development* 10, 6, 638–643.
- [36] Haasnoot, J., Westerhout, E. M., and Berkhout, B. 2007. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nature Biotechnology* 25, 12, 1435–1443.
- [37] Waterhouse, P. M., Wang, M. B., and Lough, T. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 6839, 834–842.
- [38] Wienholds, E. and Plasterk, R. H. A. 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters* 579, 26, 5911–5922.
- [39] Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., and Hannon, G. J. 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & Development* 16, 21, 2733–2742.
- [40] Mens, M. M. J. and Ghanbari, M. 2018. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Reviews and Reports* 14, 3, 309–322.
- [41] Rajender, S., Meador, C., and Agarwal, A. 2012. Small RNA in spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in Bioscience (Scholar edition)* 4, 4, 1266–1274.
- [42] Sundara Rajan, S., Ludwig, K. R., Hall, K. L., Jones, T. L., and Caplen, N. J. 2020. Cancer biology functional genomics: From small RNAs to big dreams. *Molecular Carcinogenesis* 59, 12, 1343–1361.
- [43] Oosterkamp, H. M., Neering, H., Nijman, S. M. B., Dirac, A. M. G., Mooi, W. J., Bernards, R., and Brummelkamp, T. R. 2006. An evaluation of the efficacy of topical application of salicylic acid for the treatment of familial cylindromatosis. *The British Journal of Dermatology* 155, 1, 182–185.
- [44] Dorsett, Y. and Tuschl, T. 2004. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 4, 318–329.
- [45] Meng, Z. and Lu, M. 2017. RNA Interference-Induced Innate Immunity, Off-Target Effect, or Immune Adjuvant? *Frontiers in Immunology* 8, 331.
- [46] Echeverri, C. J. and Perrimon, N. 2006. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nature Reviews Genetics* 7, 5, 373–384.
- [47] Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 6836, 494–498.

- [48] McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T.-T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J., and Kay, M. A. 2002. RNA interference in adult mice. *Nature* 418, 6893, 38–39.
- [49] Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K. A., and Hornung, V. 2009. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nature Immunology* 10, 10, 1065–1072.
- [50] Loo, Y.-M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M. A., García-Sastre, A., Katze, M. G., and Gale, M. 2008. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *Journal of Virology* 82, 1, 335–345.
- [51] Tatematsu, M., Seya, T., and Matsumoto, M. 2014. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *The Biochemical Journal* 458, 2, 195–201.
- [52] Pirher, N., Pohar, J., Manček-Keber, M., Benčina, M., and Jerala, R. 2017. Activation of cell membrane-localized Toll-like receptor 3 by siRNA. *Immunology Letters* 189, 55–63.
- [53] Hornung, V., Guenthner-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., Fougères, A. de, Endres, S., and Hartmann, G. 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature Medicine* 11, 3, 263–270.
- [54] Clemens, M. J. and Elia, A. 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 17, 9, 503–524.
- [55] Le Page, C., Génin, P., Baines, M. G., and Hiscott, J. 2000. Interferon activation and innate immunity. *Reviews in Immunogenetics* 2, 3, 374–386.
- [56] Barber, G. N., Tomita, J., Garfinkel, M. S., Meurs, E., Hovanessian, A., and Katze, M. G. 1992. Detection of protein kinase homologues and viral RNA-binding domains utilizing polyclonal antiserum prepared against a baculovirus-expressed ds RNA-activated 68,000-Da protein kinase. *Virology* 191, 2, 670–679.
- [57] Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C., and Mathews, M. B. 1992. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Molecular and Cellular Biology* 12, 11, 5238–5248.

- [58] Sledz, C. A., Holko, M., Veer, M. J. de, Silverman, R. H., and Williams, B. R. G. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology* 5, 9, 834–839.
- [59] Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature Biotechnology* 23, 4, 457–462.
- [60] Masliah, G., Maris, C., König, S. L., Yulikov, M., Aeschmann, F., Malinowska, A. L., Mabile, J., Weiler, J., Holla, A., Hunziker, J., Meisner-Kober, N., Schuler, B., Jeschke, G., and Allain, F. H.-T. 2018. Structural basis of siRNA recognition by TRBP double-stranded RNA binding domains. *The EMBO Journal* 37, 6.
- [61] Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. 2003. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 115, 2, 209–216.
- [62] Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. 2003. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 115, 2, 199–208.
- [63] Gredell, J. A., Dittmer, M. J., Wu, M., Chan, C., and Walton, S. P. 2010. Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry* 49, 14, 3148–3155.
- [64] Noland, C. L. and Doudna, J. A. 2013. Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA* 19, 5, 639–648.
- [65] Ui-Tei, K., Naito, Y., Nishi, K., Juni, A., and Saigo, K. 2008. Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Research* 36, 22, 7100–7109.
- [66] Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., and Khvorova, A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22, 3, 326–330.
- [67] Olejniczak, M., Polak, K., Galka-Marciniak, P., and Krzyzosiak, W. J. 2011. Recent advances in understanding of the immunological off-target effects of siRNA. *Current Gene Therapy* 11, 6, 532–543.
- [68] Jackson, A. L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B. N., Cleary, M., Lim, L., and Linsley, P. S. 2006. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA (New York, N.Y.)* 12, 7, 1179–1187.

- [69] Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P. S. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology* 21, 6, 635–637.
- [70] Saxena, S., Jónsson, Z. O., and Dutta, A. 2003. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 45, 44312–44319.
- [71] Hausser, J., Syed, A. P., Bilen, B., and Zavolan, M. 2013. Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation. *Genome Research* 23, 4, 604–615.
- [72] Echeverri, C. J., Beachy, P. A., Baum, B., Boutros, M., Buchholz, F., Chanda, S. K., Downward, J., Ellenberg, J., Fraser, A. G., Hacohen, N., Hahn, W. C., Jackson, A. L., Kiger, A., Linsley, P. S., Lum, L., Ma, Y., Mathey-Prévôt, B., Root, D. E., Sabatini, D. M., Taipale, J., Perrimon, N., and Bernards, R. 2006. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nature Methods* 3, 10, 777–779.
- [73] Doench, J. G., Petersen, C. P., and Sharp, P. A. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Development* 17, 4, 438–442.
- [74] Schultz, N., Marenstein, D. R., Angelis, D. A. de, Wang, W.-Q., Nelander, S., Jacobsen, A., Marks, D. S., Massagué, J., and Sander, C. 2011. Off-target effects dominate a large-scale RNAi screen for modulators of the TGF- β pathway and reveal microRNA regulation of TGFBR2. *Silence* 2, 3.
- [75] Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., and Bartel, D. P. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 7308, 835–840.
- [76] Baek, S. T., Kerjan, G., Bielas, S. L., Lee, J. E., Fenstermaker, A. G., Novarino, G., and Gleeson, J. G. 2014. Off-target effect of doublecortin family shRNA on neuronal migration associated with endogenous microRNA dysregulation. *Neuron* 82, 6, 1255–1262.
- [77] 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., and Linsley, P. S. 2006. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12, 7, 1197–1205.

- [78] Dua, P., Yoo, J. W., Kim, S., and Lee, D. 2011. Modified siRNA structure with a single nucleotide bulge overcomes conventional siRNA-mediated off-target silencing. *Molecular Therapy* 19, 9, 1676–1687.
- [79] Iribe, H., Miyamoto, K., Takahashi, T., Kobayashi, Y., Leo, J., Aida, M., and Ui-Tei, K. 2017. Chemical Modification of the siRNA Seed Region Suppresses Off-Target Effects by Steric Hindrance to Base-Pairing with Targets. *ACS Omega* 2, 5, 2055–2064.
- [80] Suter, S. R., Ball-Jones, A., Mumbleau, M. M., Valenzuela, R., Ibarra-Soza, J., Owens, H., Fisher, A. J., and Beal, P. A. 2017. Controlling miRNA-like off-target effects of an siRNA with nucleobase modifications. *Organic & Biomolecular Chemistry* 15, 47, 10029–10036.
- [81] Kamola, P. J., Nakano, Y., Takahashi, T., Wilson, P. A., and Ui-Tei, K. 2015. The siRNA Non-seed Region and Its Target Sequences Are Auxiliary Determinants of Off-Target Effects. *PLoS Computational Biology* 11, 12, e1004656.
- [82] Fedorov, Y., Anderson, E. M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W. S., and Khvorova, A. 2006. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* 12, 7, 1188–1196.
- [83] Park, J., Ahn, S. H., Cho, K. M., Gu, D., Jang, E.-S., and Chi, S. W. 2018. siAbasic: a comprehensive database for potent siRNA-6 \emptyset sequences without off-target effects. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation* 2018.
- [84] Yilmazel, B., Hu, Y., Sigoillot, F., Smith, J. A., Shamu, C. E., Perrimon, N., and Mohr, S. E. 2014. Online GESS: prediction of miRNA-like off-target effects in large-scale RNAi screen data by seed region analysis. *BMC Bioinformatics* 15, 192.
- [85] Wang, X., Wang, X., Varma, R. K., Beauchamp, L., Magdaleno, S., and Sendera, T. J. 2009. Selection of hyperfunctional siRNAs with improved potency and specificity. *Nucleic Acids Research* 37, 22, e152.
- [86] Rasmussen, S. H., Jacobsen, A., and Krogh, A. 2013. cWords - systematic microRNA regulatory motif discovery from mRNA expression data. *Silence* 4, 1, 2.
- [87] Caffrey, D. R., Zhao, J., Song, Z., Schaffer, M. E., Haney, S. A., Subramanian, R. R., Seymour, A. B., and Hughes, J. D. 2011. siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency. *PLoS One* 6, 7, e21503.

- [88] Watson, J. D. and Crick, F. H. 1974. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. J.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in *Nature*, number 4356 April 25, 1953. *Nature* 248, 5451, 765.
- [89] Hoffmann, M., Hersch, N., Gerlach, S., Dreissen, G., Springer, R., Merkel, R., Csiszár, A., and Hoffmann, B. 2020. Complex Size and Surface Charge Determine Nucleic Acid Transfer by Fusogenic Liposomes. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 6.
- [90] Abels, E. R. and Breakefield, X. O. 2016. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36, 3, 301–312.
- [91] Shi, J., Ma, Y., Zhu, J., Chen, Y., Sun, Y., Yao, Y., Yang, Z., and Xie, J. 2018. A Review on Electroporation-Based Intracellular Delivery. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23, 11.
- [92] Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 21, 7413–7417.
- [93] Fraley, R., Subramani, S., Berg, P., and Papahadjopoulos, D. 1980. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 21, 10431–10435.
- [94] Cardarelli, F., Digiaco, L., Marchini, C., Amici, A., Salomone, F., Fiume, G., Rossetta, A., Gratton, E., Pozzi, D., and Caracciolo, G. 2016. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Scientific Reports* 6, 25879.
- [95] Lonez, C., Vandenbranden, M., and Ruyschaert, J.-M. 2012. Cationic lipids activate intracellular signaling pathways. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 15, 1749–1758.
- [96] Kim, B.-K., Hwang, G.-B., Seu, Y.-B., Choi, J.-S., Jin, K. S., and Doh, K.-O. 2015. DOTAP/DOPE ratio and cell type determine transfection efficiency with DOTAP-liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848, 10 Pt A, 1996–2001.
- [97] Grayson, A. C. R., Ma, J., and Putnam, D. 2006. Kinetic and efficacy analysis of RNA interference in stably and transiently expressing cell lines. *Molecular Pharmaceutics* 3, 5, 601–613.

- [98] Kleusch, C., Hersch, N., Hoffmann, B., Merkel, R., and Csiszár, A. 2012. Fluorescent lipids: functional parts of fusogenic liposomes and tools for cell membrane labeling and visualization. *Molecules (Basel, Switzerland)* 17, 1, 1055–1073.
- [99] Hoffmann, M., Hersch, N., Merkel, R., Csiszar, A., and Hoffmann, B. 2019. Changing the Way of Entrance: Highly Efficient Transfer of mRNA and siRNA via Fusogenic Nano-Carriers. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 15, 1, 170–183.
- [100] Tzavlaki, K. and Moustakas, A. 2020. TGF- β Signaling. *Biomolecules* 10, 3.
- [101] Kim, H.-J., Park, J.-H., Shin, J.-M., Yang, H.-W., Lee, H.-M., and Park, I.-H. 2019. TGF- β 1-induced HSP47 regulates extracellular matrix accumulation via Smad2/3 signaling pathways in nasal fibroblasts. *Scientific Reports* 9, 1, 15563.
- [102] Derynck, R. and Budi, E. H. 2019. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Science Signaling* 12, 570.
- [103] Reynisdóttir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massagué, J. 1995. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes & Development* 9, 15, 1831–1845.
- [104] Batlle, E. and Massagué, J. 2019. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 50, 4, 924–940.
- [105] Huminiecki, L., Goldovsky, L., Freilich, S., Moustakas, A., Ouzounis, C., and Heldin, C.-H. 2009. Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evolutionary Biology* 9, 28.
- [106] Horbelt, D., Denkis, A., and Knaus, P. 2012. A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 3, 469–474.
- [107] Munger, J. S. and Sheppard, D. 2011. Cross talk among TGF- β signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, 11, a005017.
- [108] Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J.-F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., Rifkin, D. B., and Sheppard, D. 1999. A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin α v β 6 Binds and Activates Latent TGF β 1. *Cell* 96, 3, 319–328.
- [109] Robertson, I. B. and Rifkin, D. B. 2016. Regulation of the Bioavailability of TGF- β and TGF- β -Related Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8, 6.

- [110] Kim, S. K., Henen, M. A., and Hinck, A. P. 2019. Structural biology of betaglycan and endoglin, membrane-bound co-receptors of the TGF-beta family. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 244, 17, 1547–1558.
- [111] Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 6488, 341–347.
- [112] Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., Dijke, P. ten, Huet, S., and Gauthier, J. M. 1998. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *The EMBO Journal* 17, 11, 3091–3100.
- [113] Samarakoon, R., Overstreet, J. M., and Higgins, P. J. 2013. TGF-β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cellular Signalling* 25, 1, 264–268.
- [114] Ross, S., Cheung, E., Petrakis, T. G., Howell, M., Kraus, W. L., and Hill, C. S. 2006. Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *The EMBO Journal* 25, 19, 4490–4502.
- [115] Feng, X. H., Zhang, Y., Wu, R. Y., and Derynck, R. 1998. The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes & Development* 12, 14, 2153–2163.
- [116] Miyazawa, K. and Miyazono, K. 2017. Regulation of TGF-β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9, 3.
- [117] Kleefeldt, J. M., Pozarska, A., Nardiello, C., Pfeffer, T., Vadász, I., Herold, S., Seeger, W., and Morty, R. E. 2020. Commercially available transfection reagents and negative control siRNA are not inert. *Analytical Biochemistry* 606, 113828.
- [118] Tschuch, C., Schulz, A., Pscherer, A., Werft, W., Benner, A., Hotz-Wagenblatt, A., Barrionuevo, L. S., Lichter, P., and Mertens, D. 2008. Off-target effects of siRNA specific for GFP. *BMC Molecular Biology* 9, 60.
- [119] Baum, P., Fundel-Clemens, K., Kreuz, S., Kontermann, R. E., Weith, A., Mennerich, D., and Rippmann, J. F. 2010. Off-target analysis of control siRNA molecules reveals important differences in the cytokine profile and inflammation response of human fibroblasts. *Oligonucleotides* 20, 1, 17–26.
- [120] Buehler, E., Chen, Y.-C., and Martin, S. 2012. C911: A bench-level control for sequence specific siRNA off-target effects. *PloS One* 7, 12, e51942.

- [121] Heestermans, M., Jong, A. de, van Tilburg, S., Reitsma, P. H., Versteeg, H. H., Spronk, H. M., and van Vlijmen, B. J. M. 2019. Use of "C9/11 Mismatch" Control siRNA Reveals Sequence-Related Off-Target Effect on Coagulation of an siRNA Targeting Mouse Coagulation Factor XII. *Nucleic Acid Therapeutics* 29, 4, 218–223.
- [122] Fehl, J., Pozarska, A., Nardiello, C., Rath, P., Surate Solaligue, D. E., Vadász, I., Mayer, K., Herold, S., Seeger, W., and Morty, R. E. 2019. Control Interventions Can Impact Alveolarization and the Transcriptome in Developing Mouse Lungs. *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)* 302, 2, 346–363.
- [123] Hueso, M., Casas, A., Mallén, A., Ramón, L. de, Bolaños, N., Varela, C., Cruzado, J. M., Torras, J., and Navarro, E. 2019. The double edge of anti-CD40 siRNA therapy: It increases renal microcapillar density but favours the generation of an inflammatory milieu in the kidneys of ApoE $-/-$ mice. *Journal of Inflammation (London, England)* 16, 25.
- [124] Zagalak, J. A., Menzi, M., Schmich, F., Jahns, H., Dogar, A. M., Wullschleger, F., Towbin, H., and Hall, J. 2015. Properties of short double-stranded RNAs carrying randomized base pairs: toward better controls for RNAi experiments. *RNA* 21, 12, 2132–2142.
- [125] Danielli, M. and Marinelli, R. A. 2016. Lipid-based transfection reagents can interfere with cholesterol biosynthesis. *Analytical Biochemistry* 495, 1–2.
- [126] Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., and Todaro, G. J. 1969. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *Journal of Virology* 4, 5, 549–553.
- [127] Wikenheiser, K. A., Vorbroker, D. K., Rice, W. R., Clark, J. C., Bachurski, C. J., Oie, H. K., and Whitsett, J. A. 1993. Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 23, 11029–11033.
- [128] Ruiz-Camp, J., Quantius, J., Lignelli, E., Arndt, P. F., Palumbo, F., Nardiello, C., Surate Solaligue, D. E., Sakkas, E., Mižíková, I., Rodríguez-Castillo, J. A., Vadász, I., Richardson, W. D., Ahlbrecht, K., Herold, S., Seeger, W., and Morty, R. E. 2019. Targeting miR-34a/Pdgfra interactions partially corrects alveologenesis in experimental bronchopulmonary dysplasia. *EMBO Molecular Medicine* 11, 3.

- [129] Mižíková, I., Palumbo, F., Tábi, T., Herold, S., Vadász, I., Mayer, K., Seeger, W., and Morty, R. E. 2017. Perturbations to lysyl oxidase expression broadly influence the transcriptome of lung fibroblasts. *Physiological Genomics* 49, 8, 416–429.
- [130] Rose, F., Grimminger, F., Appel, J., Heller, M., Pies, V., Weissmann, N., Fink, L., Schmidt, S., Krick, S., Camenisch, G., Gassmann, M., Seeger, W., and Hänze, J. 2002. Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 12, 1660–1661.
- [131] Hönig, J., Mižíková, I., Nardiello, C., Surate Solaligue, D. E., Daume, M. J., Vadász, I., Mayer, K., Herold, S., Günther, S., Seeger, W., and Morty, R. E. 2018. Transmission of microRNA antimirs to mouse offspring via the maternal-placental-fetal unit. *RNA* 24, 6, 865–879.
- [132] Rath, P., Nardiello, C., Surate Solaligue, D. E., Agius, R., Mižíková, I., Hühn, S., Mayer, K., Vadász, I., Herold, S., Runkel, F., Seeger, W., and Morty, R. E. 2017. Caffeine administration modulates TGF- β signaling but does not attenuate blunted alveolarization in a hyperoxia-based mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Research* 81, 5, 795–805.
- [133] Lee, J. H., Lee, S. T., Nam, Y. K., and Gong, S. P. 2019. Gene delivery into Siberian sturgeon cell lines by commercial transfection reagents. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 55, 2, 76–81.
- [134] Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Price, P. J., and Ciccarone, V. C. 2004. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods (San Diego, Calif.)* 33, 2, 95–103.
- [135] Burchard, J., Jackson, A. L., Malkov, V., Needham, R. H. V., Tan, Y., Bartz, S. R., Dai, H., Sachs, A. B., and Linsley, P. S. 2009. MicroRNA-like off-target transcript regulation by siRNAs is species specific. *RNA* 15, 2, 308–315.
- [136] Morty, R. E., Königshoff, M., and Eickelberg, O. 2009. Transforming growth factor-beta signaling across ages: from distorted lung development to chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 6, 7, 607–613.

- [137] Schwartze, J. T., Becker, S., Sakkas, E., Wujak, Ł. A., Niess, G., Usemann, J., Reichenberger, F., Herold, S., Vadász, I., Mayer, K., Seeger, W., and Morty, R. E. 2014. Glucocorticoids recruit Tgfbr3 and Smad1 to shift transforming growth factor- β signaling from the Tgfbr1/Smad2/3 axis to the Acvrl1/Smad1 axis in lung fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 6, 3262–3275.
- [138] Eickelberg, O. and Morty, R. E. 2007. Transforming growth factor beta/bone morphogenic protein signaling in pulmonary arterial hypertension: remodeling revisited. *Trends in Cardiovascular Medicine* 17, 8, 263–269.
- [139] Lignelli, E., Palumbo, F., Myti, D., and Morty, R. E. 2019. Recent advances in our understanding of the mechanisms of lung alveolarization and bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 317, 6, L832-L887.
- [140] Riches, D. W. H. and Martin, T. R. 2018. Overview of Innate Lung Immunity and Inflammation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1809, 17–30.
- [141] Wells, R. G., Kruglov, E., and Dranoff, J. A. 2004. Autocrine release of TGF- β by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Letters* 559, 1-3, 107–110.
- [142] Mailhot, J. M., Schuster, G. S., Garnick, J. J., Hanes, P. J., Lapp, C. A., and Lewis, J. B. 1995. Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF-beta 1 stimulation. *Journal of Clinical Periodontology* 22, 9, 679–685.
- [143] David, C. J. and Massagué, J. 2018. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 7, 419–435.
- [144] Grzesik, B. A., Vohwinkel, C. U., Morty, R. E., Mayer, K., Herold, S., Seeger, W., and Vadász, I. 2013. Efficient gene delivery to primary alveolar epithelial cells by nucleofection. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 305, 11, L786-94.
- [145] Peters, D. M., Vadász, I., Wujak, L., Wygrecka, M., Olschewski, A., Becker, C., Herold, S., Papp, R., Mayer, K., Rummel, S., Brandes, R. P., Günther, A., Waldegger, S., Eickelberg, O., Seeger, W., and Morty, R. E. 2014. TGF- β directs trafficking of the epithelial sodium channel ENaC which has implications for ion and fluid transport in acute lung injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 3, E374-83.
- [146] Santa Cruz Biotechnology, Inc. 2022. *TGF beta RIII siRNA (m), shRNA und Lentivirale Partikel Gen Silencer Reagenzien*. <https://www.scbt.com/p/tgfbeta->

- riii-sirna-m-shrna-and-lentiviral-particle-gene-silencers. Accessed 20 November 2022.
- [147] Santa Cruz Biotechnology, Inc. 2022. *Smad2 siRNA (m), shRNA und Lentivirale Partikel Gen Silencer Reagenzien*. <https://www.scbt.com/p/smad2-sirna-m-shrna-and-lentiviral-particle-gene-silencers>. Accessed 20 November 2022.
- [148] Cell Signaling Technology. 2022. *SignalSilence® Control siRNA (Unconjugated)*. <https://www.cellsignal.de/products/sirna/control-sirna-unconjugated/6568>. Accessed 14 June 2022.
- [149] Sigma Aldrich. 2022. *Mission siRNA Universal Negative Control #1*. <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/sic001>. Accessed 14 June 2022.
- [150] Jiwani, S., Wang, Y., Dowd, G. C., Gianfelice, A., Pichestapong, P., Gavicherla, B., Vanbennekorn, N., and Ireton, K. 2012. Identification of components of the host type IA phosphoinositide 3-kinase pathway that promote internalization of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 80, 3, 1252–1266.
- [151] Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., and Deutzmann, R. 2016. *Biochemie*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart.
- [152] Janowski, B. A., Younger, S. T., Hardy, D. B., Ram, R., Huffman, K. E., and Corey, D. R. 2007. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nature Chemical Biology* 3, 3, 166–173.
- [153] Ni, W.-J. and Leng, X.-M. 2015. Dynamic miRNA-mRNA paradigms: New faces of miRNAs. *Biochemistry and Biophysics Reports* 4, 337–341.
- [154] Kwok, A., Raulf, N., and Habib, N. 2019. Developing small activating RNA as a therapeutic: current challenges and promises. *Therapeutic Delivery* 10, 3, 151–164.
- [155] Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics* 24, 4, 372–376.
- [156] Wikipedia. 2022. *Single Point of Failure*. https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Single_Point_of_Failure&oldid=227781084. Accessed 21 December 2022.
- [157] Sioud, M. 2015. Overcoming the challenges of siRNA activation of innate immunity: design better therapeutic siRNAs. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1218, 301–319.

- [158] Judge, A. and MacLachlan, I. 2008. Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. *Human Gene Therapy* 19, 2, 111–124.
- [159] Wujak, Ł. A., Blume, A., Baloğlu, E., Wygrecka, M., Wygowski, J., Herold, S., Mayer, K., Vadász, I., Besuch, P., Mairbürl, H., Seeger, W., and Morty, R. E. 2016. FXYP1 negatively regulates Na(+)/K(+)-ATPase activity in lung alveolar epithelial cells. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 220, 54–61.
- [160] Cullen, B. R. 2006. Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nature Methods* 3, 9, 677–681.
- [161] Özbalci, C., Storck, E. M., and Eggert, U. S. 2019. RNAi Transfection Results in Lipidome Changes. *Proteomics* 19, 13, e1800298.
- [162] Schmich, F., Szczurek, E., Kreibich, S., Dilling, S., Andritschke, D., Casanova, A., Low, S. H., Eicher, S., Muntwiler, S., Emmenlauer, M., Rämö, P., Conde-Alvarez, R., Mering, C. von, Hardt, W.-D., Dehio, C., and Beerenwinkel, N. 2015. gespeR: a statistical model for deconvoluting off-target-confounded RNA interference screens. *Genome Biology* 16, 220.
- [163] Chubb, J., Cowling, P., and Reed, D. 2021. Speeding up to keep up: exploring the use of AI in the research process. *AI & SOCIETY*, 1–19.

9 Anhang

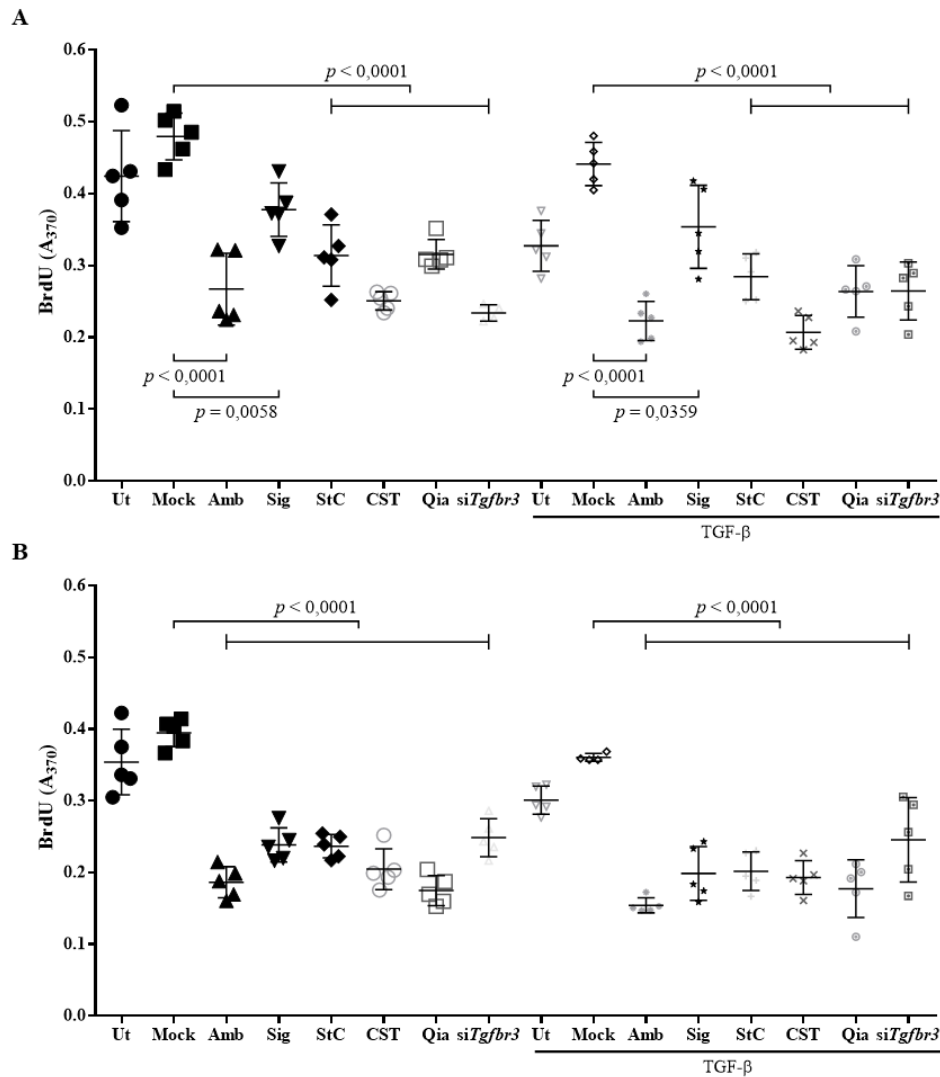


Abbildung 18: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellproliferation in primären Mäuselungenfibroblasten.

Beeinflussung der Zellproliferation in primären Mäuselungenfibroblasten. Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Tgfr3*-mRNA (*siTgfr3*) für 6 h transfiziert. *siTgfr3* diente als Transfektionskontrolle. Das gleiche Protokoll der Transfektion wie bereits bei der Bestimmung der mRNA-Steady-State-Level und der Steady-State-Protein-Level wurde verwendet. Die Zellproliferation der primären Mäuselungenfibroblasten wurde mittels Kit auf Basis von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) ermittelt. Die Zellen wurden zuvor zur Hälfte mit „transforming growth factor“ TGF- β behandelt. Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße n

= 5 angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande, hierbei werden die mit TGF- β behandelten Gruppen von den unbehandelten Gruppen unterschieden. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werten von $p < 0,05$. Die Klammer --- fasst einzelne Negativkontroll-siRNA-Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit für die statistische Auswertung gegenüber der Mock-Kondition zusammen. Die Abbildungen sowie die Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

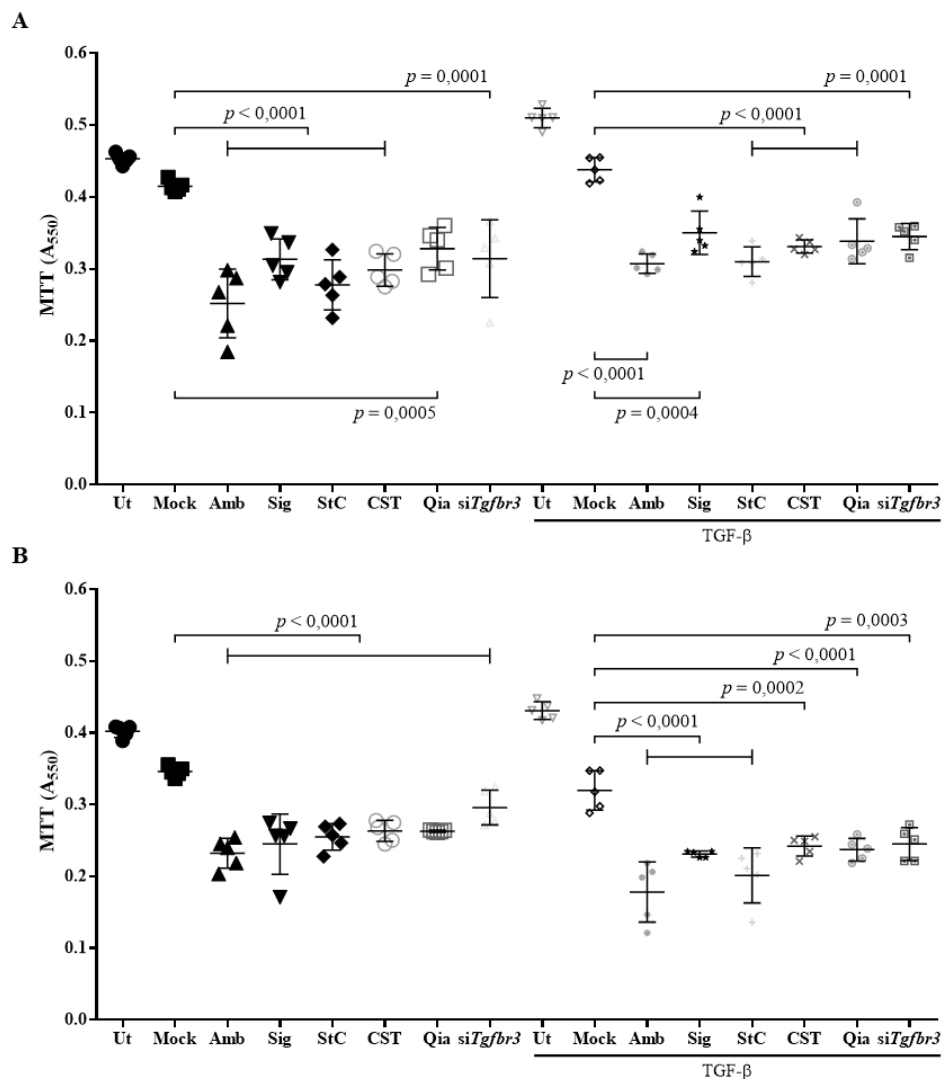


Abbildung 19: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellviabilität in primären Mäuselungenfibroblasten.

Beeinflussung der Zellviabilität in primären Mäuselungenfibroblasten. Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-

tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST) oder Qiagen (Qia) sowie der siRNA gegen die *Tgfb3*-mRNA (*siTgfb3*) für 6 h transfiziert. *SiTgfb3* diente als Transfektionskontrolle. Das gleiche Protokoll der Transfektion wie bereits bei der Bestimmung der mRNA-Steady-State-Level und der Steady-State-Protein-Level wurde verwendet. Die Zellviabilität der primären Mäuselungenfibroblasten wurde mittels Kit auf Basis von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ermittelt. Die Zellen wurden zuvor zur Hälfte mit „transforming growth factor“ TGF- β behandelt. Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 5$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNA zustande, hierbei werden die mit TGF- β behandelten Gruppen von den unbehandelten Gruppen unterschieden. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werte von $p < 0,05$. Die Klammer —|— fasst einzelne Negativkontroll-siRNA-Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit für die statistische Auswertung gegenüber der Mock-Kondition zusammen. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

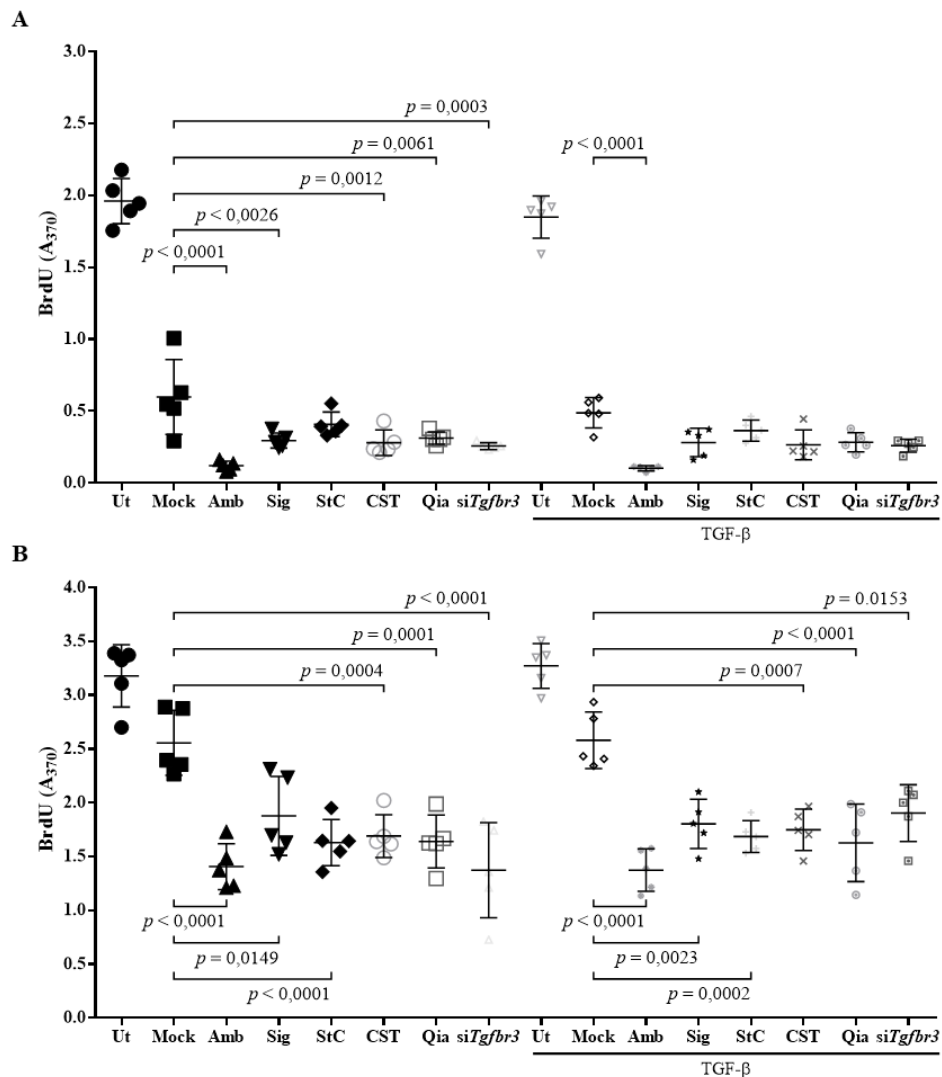


Abbildung 20: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellproliferation in NIH/3T3-Zellen.

Beeinflussung der Zellproliferation in NIH/3T3-Zellen. Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST), Qiagen (Qia) oder der siRNA gegen *Tgfr3*-mRNA (*siTgfr3*) für 6 h transfiziert. *siTgfr3* diente als Transfektionskontrolle. Das gleiche Protokoll der Transfektion wie bereits bei der Bestimmung der mRNA-Steady-State-Level und der Steady-State-Protein-Level wurde verwendet. Die Zellproliferation der NIH/3T3-Zellen wurde mittels Kit auf Basis von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) ermittelt. Die Zellen wurden zuvor zur Hälfte mit „transforming growth factor“ TGF-β behandelt. Die Werte werden als Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 5$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande, hierbei werden die mit TGF-β behandelten Gruppen von den unbehandelten Gruppen unterschieden. Die

p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werte von $p < 0,05$. Die Klammer --- fasst einzelne Negativkontroll-siRNA-Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit für die statistische Auswertung gegenüber der Mock-Kondition zusammen. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

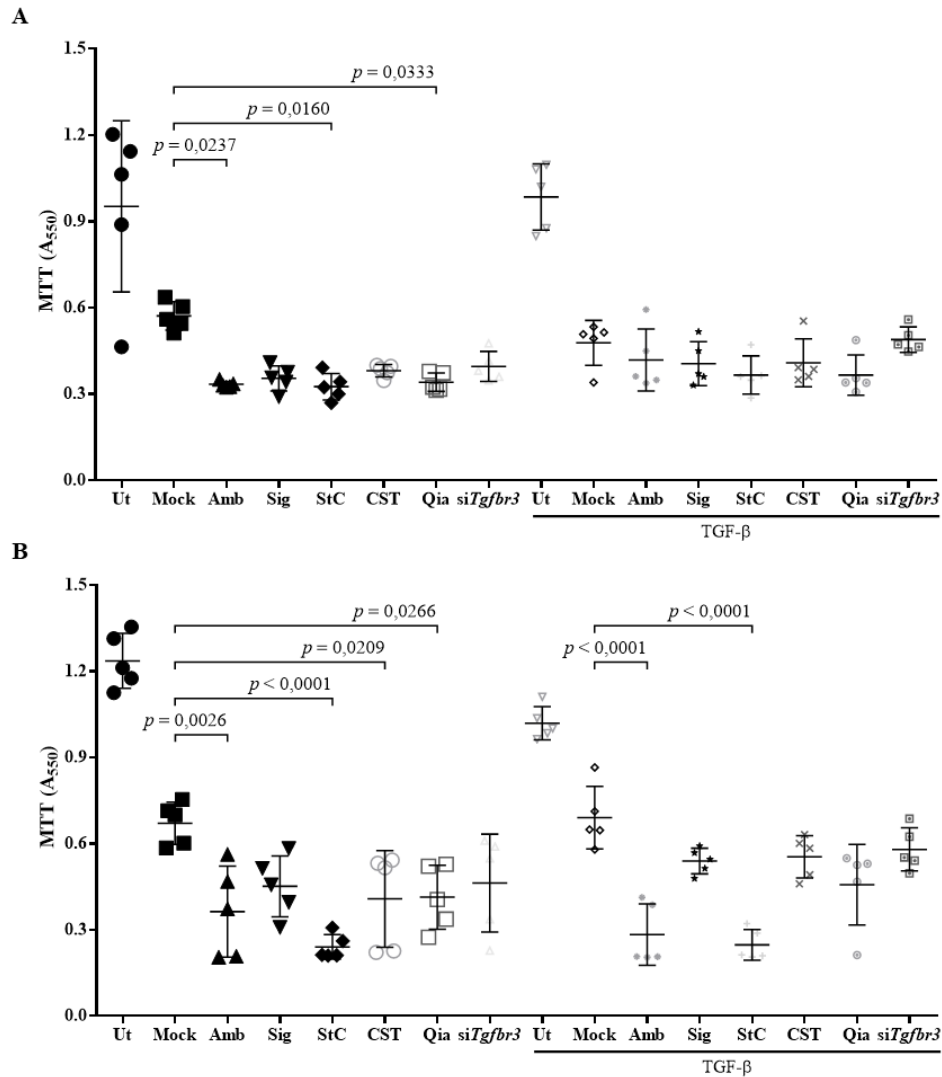


Abbildung 21: Effekte der Negativkontroll-siRNAs auf die Zellviabilität in NIH/3T3-Zellen.

Beeinflussung der Zellviabilität in NIH/3T3-Zellen. Die Zellen erhielten keine Behandlung (Ut, Transfektionsmedium), wurden mit X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent behandelt (Mock, 1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) oder wurden mittels X-tremeGENE™ (1:200 Transfektionsreagenz in Transfektionsmedium) mit einer der fünf Negativkontroll-siRNAs (jeweils 100 nM) entweder von Ambion (Amb), Sigma (Sig), Santa Cruz (StC), Cell Signaling Technology (CST), Qiagen (Qia) oder der siRNA gegen *Tgfr3*-mRNA (*siTgfr3*) für 6 h transfiziert. *siTgfr3* diente als Transfektionskontrolle. Das gleiche Protokoll der Transfektion wie bereits bei der Bestimmung der mRNA-Steady-State-Level und der Steady-State-Protein-Level wurde verwendet. Die Zellviabilität der NIH/3T3-

Zellen wurde mittels Kit auf Basis von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ermittelt. Die Zellen wurden zuvor zur Hälfte mit „transforming growth factor“ TGF- β behandelt. Die Werte werden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) bei einer Gruppengröße $n = 5$ angegeben. Dabei stellt jeder Datenpunkt eine eigenständige Zellkulturkondition aus derselben Kulturflasche dar. Die p -Werte kommen durch den Vergleich zwischen der Mock-Kondition und den jeweiligen Negativkontroll-siRNAs zustande, hierbei werden die mit TGF- β behandelten Gruppen von den unbehandelten Gruppen unterschieden. Die p -Werte wurden mittels *one-way* ANOVA mit dem Tukey's *post-hoc* Test bestimmt und werden nur dargestellt bei p -Werte von $p < 0,05$. Die Klammer —| fasst einzelne Negativkontroll-siRNA-Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit für die statistische Auswertung gegenüber der Mock Kondition zusammen. Die Abbildungen sowie Beschriftung wurden von Referenz [117] modifiziert.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

11 Publikationsverzeichnis

Bestandteile der Dissertation wurden auf Kongressen präsentiert und publiziert.

11.1 Kongressbeiträge

2019:

Poster-Präsentation: **Impact of control siRNA interventions on lung fibroblast behaviour**, Science Day 2019 des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen

2020:

Poster-Präsentation: **Impact of Control Sirna Interventions on Lung Fibroblast Viability, Proliferation, and Gene Expression**, American Thoracic Society (ATS) 2020 International Conference in Philadelphia, Vereinigte Staaten von Amerika (USA) (Abgesagt aufgrund der Sars-CoV-2 Pandemie)

11.2 Publikation

2020:

Kleefeldt, J. M., Pozarska, A., Nardiello, C., Pfeffer, T., Vadász, I., Herold, S., Seeger, W., and Morty, R. E. 2020. Commercially available transfection reagents and negative control siRNA are not inert. *Analytical biochemistry* 606, 113828.

12 Danksagung

An dieser Stelle meiner Arbeit möchte ich meiner tiefen Dankbarkeit Ausdruck verleihen. Diese gilt allen denjenigen die mich unterstützt haben. Vielen Dank für die wissenschaftlichen Ratschläge, für den aufbauenden duftenden Kaffee, die aufmunternden Worte und der kindlichen Freude, wenn ein Experiment nach Wochen des Bangens und Tüftelns funktionierte.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger für die Zurverfügungstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Abteilung am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung und für die gewährte Möglichkeit, in dieser einzigartigen Umgebung mit all diesen klugen Menschen mein Dissertationsvorhaben umzusetzen.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Rory E. Morty für die Betreuung in seiner Arbeitsgruppe, für die Planung des Projekts, seine stets offenen Ohren und seinen Anregungen im Projektverlauf sowie für die Korrektur dieser Arbeit herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt zudem Claudio Nardiello, Ph.D.. Seine unzähligen Ratschläge, sein scharfer Verstand und die Liebe zum Detail sowie sein Witz haben den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten zu einer kostbaren Erfahrung werden lassen, an die ich mich immer erinnern werde.

Allen Mitgliedern der AG Morty möchte ich für die herzliche Aufnahme und die familiäre Atmosphäre, für den gelungenen Start in den Laboralltag, für den guten Zuspruch sowie der Hilfe bei sich abzeichnenden Problemen bedanken. Thanks guys, it was really a pleasure!

Angela Simeon möchte ich an dieser Stelle für ihre Geduld beim Lesen und Korrigieren meiner Arbeit ebenfalls danken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester dafür danken, dass sie immer für mich da sind und an mich glauben. Meinen Freunden danke ich fürs Zuhören und die vielen schönen Momente, nach denen man sich immer wieder mit neuem Elan an das Projekt setzen konnte. Ohne Euch alle wäre diese Reise eine andere gewesen oder wäre nie zu Stande gekommen. Tausend Dank!