

Aus dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen
Abteilung Zelluläre Biochemie
Direktor: Prof. Dr. Reinhard Lührmann

**Funktionelle Analysen von Ribonukleoprotein-Partikeln in
humanen Zellkulturen durch siRNA vermittelte Unterdrückung
der Genexpression**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
vorgelegt von

Markus Hoßbach

aus
Giessen-Lützellinden

Kulmbach 2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2001 bis Oktober 2006 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Abteilung Zelluläre Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhard Lührmann durchgeführt.

Dekan: Prof. Dr. Peter R. Schreiner
Institut für Organische Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Albrecht Bindereif
Institut für Biochemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Lührmann
Abteilung Zelluläre Biochemie
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,
Göttingen

Meiner Familie

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	INHALTSVERZEICHNIS	I
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
III.	TABELLENVERZEICHNIS	IX
1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	3
2.1	RNA-Interferenz	3
2.1.1	Doppelsträngige RNA ist der Trigger der RNA-Interferenz	3
2.1.2	RNA-Interferenz bei Säugern	4
2.1.3	Anwendung zur funktionellen Genomanalyse	6
2.1.4	Design funktioneller siRNAs	6
2.1.5	siRNA-Design zur Vermeidung von Off-Target-Effekten	8
2.1.5.1	Spezifische Off-Target-Effekte	9
2.1.5.1.1	Sequenzhomologien	9
2.1.5.1.2	Duplex Asymmetrie	10
2.1.5.1.3	Toxisches Sequenzmotiv und TLR Sequenz	10
2.1.5.2	Unspezifische Off-Target-Effekte	11
2.2	Chemische RNA-Synthese	11
2.2.1	Der Synthesezylus	11
2.2.2	Die TBDMS-Methode	12
2.2.3	Die ACE-Methode	13
2.3	Prä-mRNA Spleißen	14
2.3.1	Das majore Spleißosom	14
2.3.1.1	Zelluläre Biosynthese spleißosomaler U snRNPs	16
2.3.1.2	Die spezifischen Proteine der snRNPs U5, U4/U6 und U4/U6.U5	17
2.3.1.3	Assemblierung des di-snRNPs und des tri-snRNPs	18
2.3.1.4	Prp19-CDC5-Komplex und verwandte Proteine	20
2.3.2	Das minore oder U12-abhängige Spleißosom	23
2.3.2.1	Die minoren U snRNAs	23
2.3.2.2	Die Assemblierung des minoren Spleißosoms	24

2.3.2.3	Proteinzusammensetzung der minoren U snRNPs	24
2.4	snoRNPs	26
2.4.1	C/D-Typ snoRNP	27
2.4.2	Expression der snoRNAs	27
2.4.3	Biogenese der U3 und U8 C/D-Box snoRNPs	27
2.5	Zielsetzung	29
3.	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Material	31
3.1.1	Feinchemikalien, Chemikalien und Medien	31
3.1.2	Antisera und monoklonale Antikörper	32
3.1.3	Enzyme und Enzyminhibitoren	33
3.1.4	Nukleotide	34
3.1.5	siRNA-Oligonukleotide	34
3.1.6	DNA-Oligonukleotide	36
3.1.6.1	Primer für die Einschnitt-Echtzeit-RT-PCR und Standard-PCR	36
3.1.6.2	Sonden für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	38
3.1.6.3	Sonden für den branched DNA Assay	38
3.1.7	Plasmide	38
3.1.8	Zelllinien	39
3.1.9	Allgemeine Puffer	39
3.1.10	Käufliche Reaktions-Sets (Kits)	39
3.1.11	Arbeitsmaterialien	39
3.1.12	Geräte	41
3.1.13	Software	42
3.2	Methoden	43
3.2.1	Proteinbiochemische Standardmethoden	43
3.2.1.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	43
3.2.1.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.2.1.3	Immunoblot (Western Blot) und ECL-Detektion	44

3.2.2	Molekularbiologische Standardmethoden	45
3.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	45
3.2.2.2	Phenol-Chloroform-Isoamylextraktion	46
3.2.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden	46
3.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	47
3.2.2.5	Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
3.2.2.6	UV-Shadowing zum Nachweis von Nukleinsäuren	48
3.2.2.7	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	48
3.2.2.8	Northern Blot Analyse	49
3.2.2.9	Southern Blot Analyse	50
3.2.2.10	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	50
3.2.3	Zellkultur	51
3.2.3.1	Kultivierung von HeLa-Zellen	51
3.2.3.1.1	Auftauen von Zellen	52
3.2.3.1.2	Einfrieren von Zellen	52
3.2.3.1.3	Ausplattieren von Hela SS6 Zellen	53
3.2.4	Mikroskopische Methoden	54
3.2.4.1	Fluoreszenzmikroskopie	54
3.2.4.2	Vorbereitung einer 24 Kavitäten Platte mit Deckgläschen für die Mikroskopie	54
3.2.4.3	Immunfluoreszenzfärbung	55
3.2.4.4	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	56
3.2.5	Spezielle Methoden	57
3.2.5.1	Synthese von siRNAs	57
3.2.5.2	RNA-Synthese nach der 2'-TBDMS-Methode	58
3.2.5.3	RNA- Synthese nach der 2'ACE-Methode	59
3.2.5.3.1	5-(Ethyl-thio)-1H-tetrazol-Lösung (Aktivator)	59
3.2.5.3.2	DCA-Lösung	59
3.2.5.3.3	Methylimidazol-Lösung (Cap A)	60
3.2.5.3.4	Essigsäureanhydrid Lösung (Cap B)	60
3.2.5.3.5	TEAHF-Lösung	60
3.2.5.3.6	Tert-Butyl-hydroperoxid-Lösung (15% in Toluol; etwa 1,5 M)	60

3.2.5.3.7	Phosphoramidite	61
3.2.5.3.8	Entschützungslösung A	61
3.2.5.3.9	Entschützungslösung B (2' Deprotection buffer)	61
3.2.5.4	Durchführung der siRNA-Synthese nach der 2'-ACE-Methode	62
3.2.6	RNA-Interferenz	64
3.2.6.1	siRNA-Transfektion in Säugerzellen	64
3.2.6.2	Einbringen von siRNAs in HeLa Zellen durch Elektroporation	65
3.2.6.3	Präparation von HeLa „Mini“-Zellkernextrakten	66
3.2.6.4	Analyse des Zellwachstums nach RNAi-vermittelter Protein-Depletion	66
3.2.6.4.1	CASYcounter TT	67
3.2.6.4.2	MTS Assay (CellTiter96AQueousOne Lösung)	68
3.2.6.4.3	CellScreen	68
3.2.6.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa SS6 Zellen	69
3.2.7	Quantitative Einschritt-Echtzeit RT-PCR mit SYBR-Green	70
3.2.7.1	Auswahl und Charakterisierung von DNA-Primern für One-Step Real-time RT-PCR	71
3.2.7.2	Validierung der PCR-Primer	72
3.2.7.3	Reaktionsmix	74
3.2.7.4	Relative Quantifizierung des Genexpressionniveaus	75
3.2.8	Der branched DNA Assay zur Quantifizierung von mRNA	76
4.	ERGEBNISSE	78
4.1	siRNA-Design und siRNA-Synthese	78
4.1.1	Einleitung	78
4.1.2	siRNA-Selektions-Server: ein automatisierter Server zur Auswahl von siRNA-Oligonukleotiden	79
4.1.3	Ein alternativer Ansatz zum siRNA-Design mit “nur Leit-Strang siRNA”- Duplices	83
4.1.3.1	“Nur Leit-Strang siRNA”-Selektions-Server	85
4.1.3.2	siRNA-Design und Machbarkeitsstudie	87
4.1.3.3	Knockdown von Lamin A/C durch partiell selbst-komplementäre “nur Leit-Strang siRNA”-Sequenzen	89

4.1.3.4	Knockdown von Lamin A/C durch duale siRNA-Duplices aus zwei unterschiedlichen partiell komplementären “nur Leit-Strang” siRNA-Sequenzen	92
4.1.3.5	Gleichzeitiger Knockdown zweier unterschiedlicher Gene durch duale siRNA-Duplices, die sich aus zwei unterschiedlichen partiell komplementären Leit-siRNA Sequenzen zusammensetzen	93
4.1.4	Chemische Synthese von siRNAs	96
4.1.5	Organisation der Sequenzaufbereitung und des siRNA-Synthese-Prozesses	98
4.2	siRNA-Validierung und funktionelle Genanalyse mittels RNA-Interferenz	100
4.2.1	Etablierung des Zellproliferations-Assays mit HeLa SS6 Zellen nach Depletion zellulärer Proteine mittels RNA-Interferenz	102
4.2.2	Auswirkungen auf das Wachstum von HeLa SS6 Zellen nach Depletion RNA-prozessierender Faktoren mittels RNA-Interferenz	105
4.2.3	Validierung des siRNA vermittelten Knockdown mittels quantitativer Einschritt-Echtzeit-RT-PCR am Beispiel des Prp19-CDC5-Komplexes und der damit verwandten Proteine	112
4.2.4	Subzelluläre Lokalisierung des SC35 (SFRS2) Proteins, von Poly(A)+-mRNA und U2, U4 und U5 snRNA als Indikatoren für Spleißdefekte nach siRNA vermitteltem Knockdown von Faktoren des Prp19/CDC5-Protein Komplexes und damit verwandter Proteine	114
4.2.4.1	Untersuchung der Verteilung des Spleißfaktors SC35 (SFRS2)	116
4.2.4.2	Untersuchung der Verteilung der U2, U4 und U5 snRNAs	118
4.2.4.3	Untersuchung der Verteilung der Poly(A)+-mRNA	119
4.2.4.4	Gesamtanalyse der Verteilungsmuster	121
4.2.5	RNAi vermittelter Knockdown von hPrp31 (PRPF31) führt zu einer Akkumulation des U4/U6 di-snRNPs in den Cajal Bodies	122
4.2.5.1	RNAi-Experimente bestätigen eine essentielle zelluläre Funktion der Proteine hPrp31 (PRPF31) und hPrp6 (PRPF6)	122
4.2.5.2	In der Abwesenheit von hPrp31 und hPrp6 akkumuliert U4/U6 di-snRNP in Cajal Bodies	124
4.2.6	RNAi-Experimente verdeutlichen die essentielle zelluläre Funktion einiger U11/U12-Proteine	127

4.2.7	RNAi-Experimente in HeLa Zellen verdeutlichen essentielle zelluläre Funktionen von nukleolären U3 snoRNA-assoziierten Proteinen	129
5	DISKUSSION	132
5.1	siRNA-Design und siRNA-Synthese	132
5.1.1	siRNA-Selektions-Server	132
5.1.2	“Nur Leit-Strang siRNAs”	134
5.1.3	Chemische Synthese von siRNAs und Pozeßmanagment	136
5.2	siRNA-Validierung und funktionelle Genanalyse mittels RNA-Interferenz	138
5.2.1	Identifizierung essentieller RNA-prozessierender Faktoren in HeLa SS6 Zellen	138
5.2.2	Bestimmung effektiver siRNAs gegen Faktoren des Prp19-CDC5-Komplexes und damit verwandter Proteine	141
5.2.3	Subzelluläre Lokalisierung von Indikatoren für Spleißdefekte nach siRNA vermitteltem Knockdown von Faktoren des Prp19-CDC5-Protein Komplexes und damit verwandter Proteine	142
5.3	RNAi vermittelter Knockdown von hPrp31 (PRPF31) führt zu einer Akkumulation des U4/U6 di-snRNPs in den Cajal Bodies	144
5.4	RNAi-Experimente verdeutlichen die essentielle zelluläre Funktion einiger U11/U12-Proteine	146
5.5	RNAi-Experimente in HeLa Zellen verdeutlichen essentielle zelluläre Funktionen von nukleolären U3 snoRNA-assoziierten Proteinen	147
5.6	Ausblick	149
6.	LITERATURVERZEICHNIS	150
7.	ANHANG	170

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Lange doppelsträngige RNA oder Haarnadel RNA Substrate werden durch Dicer zu siRNAs (small interfering RNAs) prozessiert.	5
Abbildung 2.	Eigenschaften von siRNAs.	8
Abbildung 3.	Strukturvergleich der Phosphoramidite für TBDMS- und ACE-Methode.	13
Abbildung 4.	Die Assemblierung des Spleißosoms erfolgt schrittweise.	15
Abbildung 5.	Struktur und Funktion von snoRNAs.	26
Abbildung 6.	Biogenese und Funktion von snoRNPs.	28
Abbildung 7.	Auswahl der Primerbindestellen zur Amplifikation von mRNA und Prä-mRNA/mRNA.	71
Abbildung 8.	Beispiel einer Standardkurve zur Berechnung der Steigung und des Bestimmtheitsmaßes.	73
Abbildung 9.	Flußdiagramm zur Validierung von Primern für die Einschritt-Echtzeit RT-PCR.	74
Abbildung 10.	Startseite - Formular zur Eingabe der siRNA-Ziel-Sequenz und der Parameter für das siRNA-Design.	80
Abbildung 11.	Formular zur Vorauswahl von siRNA-Oligos für weitergehende Analysen.	81
Abbildung 12.	Ergebnisseite nach beendeter BLAST Analyse mit ausgewählten siRNA-Sequenzen.	82
Abbildung 13.	Detaillierte Ausgabe der BLAST Ergebnisse zu einem ausgewählten siRNA-Duplex.	83
Abbildung 14.	Startseite des "nur Leit-Strang siRNA"-Selektions-Servers – Einstellungen der Filteroptionen und Eingabe der Ziel-Sequenz(en).	85
Abbildung 15.	Ausgabe mit Darstellung der Duplices mit Basen-Paarungen.	85
Abbildung 16.	Ausgabe als Liste im CVS-Format zum Import in Tabellenkalkulation.	85
Abbildung 17.	Analyse der Häufigkeit von "nur Leit-Strang siRNA" Ziel-Sequenzen innerhalb einer Zusammenstellung von 100 verschiedenen mRNAs.	88

Abbildung 18.	Knockdown von Lamin A/C mit partiell selbst-komplementären "nur Leit-Strang siRNAs".	90
Abbildung 19.	Knockdown von Lamin A/C durch siRNA-Duplices, welche aus zwei unterschiedlichen, partiell komplementären Leit siRNA Sequenzen bestehen.	93
Abbildung 20.	Simultaner Knockdown von Lamin A/C und Emerin durch duale "nur Leit-Strang siRNA"-Duplices.	95
Abbildung 21.	Flussdiagramm zur siRNA-Sequenz-Prozessierung und Verfolgung des Syntheseprozesses.	99
Abbildung 22.	Kontrollen und Normalisierung der Proliferations-experimente.	103
Abbildung 23.	Validierung der Effizienz von siRNAs mit Einschritt-Echtzeit-RT-PCR.	113
Abbildung 24.	Muster der zellulären Lokalisation des SC35 Proteins nach Depletion von Komponenten des Prp19/CDC5-Komplexes und damit assoziierter Faktoren.	117
Abbildung 25.	Muster der zellulären Lokalisation der U2 snRNA nach Depletion von Komponenten des Prp19/CDC5-Komplexes und damit assoziierter Faktoren.	119
Abbildung 26.	Muster der zellulären Lokalisation der Poly(A)+-mRNA nach Depletion von Komponenten des Prp19/CDC5-Komplexes und damit assoziierter Faktoren.	120
Abbildung 27.	RNAi Knockdown Experimente bestätigen eine essentielle zelluläre Funktion der Proteine hPrp31 und hPrp6.	123
Abbildung 28.	Knockdown von spleißosomalen Proteinen durch siRNAs.	124
Abbildung 29.	Inhibition der tri-snRNP Bildung führt zur Akkumulation der U4/U6 spezifischen Komponenten in Cajal Bodies.	125
Abbildung 30.	RNAi Knockdown Experimente bestätigen eine essentielle zelluläre Funktion der U11/U12-Proteine.	128
Abbildung 31.	RNAi Knockdowns belegen essentielle Funktionen für nukleoplasmatische U3 snRNA assoziierte Proteine bei der C/D-Box-snoRNP Akkumulation in HeLa Zellen.	130

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.	Proteinzusammensetzung der humanen U snRNPs des majoren Spleißosoms in HeLa Zellen.	19
Tabelle 2.	Die spleißosomale Proteinkomposition ist dynamisch.	22
Tabelle 3.	Proteinzusammensetzung der humanen 18S U11/U12 und 12S U11 snRNP Partikel im Vergleich zu den majoren snRNPs U1 und U2.	25
Tabelle 4.	Reaktionskomponenten eines Standard-PCR-Ansatzes.	51
Tabelle 5.	Standard-PCR-Programm.	51
Tabelle 6.	Leitfaden zur Menge der eingesetzten HeLa SS6 Zellen.	54
Tabelle 7.	Ablauf eines einzelnen Synthesezykluses nach der 2'-ACE-Methode.	62
Tabelle 8.	Beispieldaten eines Experimentes zur Erzeugung einer Standardkurve.	73
Tabelle 9.	20 µl und 10 µl RT-PCR Reaktionsansätze.	75
Tabelle 10.	PCR-Programm für Einschritt-Echtzeit RT-PCR mit „MJ Opticon1 DNA Engine“.	75
Tabelle 11.	Vergleichende Darstellung des Zeitaufwandes für die TBDMS- und ACE-Methode zur RNA-Synthese.	97
Tabelle 12.	Klassifizierung des negativen Einflusses auf das Zellwachstum durch siRNA vermittelte Protein-Depletion.	104
Tabelle 13-A	Identifizierung von Faktoren, die essentiell für die Zellproliferation sind.	105
Tabelle 13-B	siRNAs, welche die Zellzahl mittelstark oder schwach beeinflussten.	107
Tabelle 13-C	siRNAs ohne Einfluss auf Zellproliferation.	110
Tabelle 14.	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Nachweis von subzellulären Markern der Spleißinhibition.	121
Tabelle A-1	mRNA Sequenzen eingesetzt zur statistischen Analyse des Vorkommens von "nur Leit-Strang siRNA" Ziel-Regionen.	173
Tabelle A-2	siRNA-Sequenzen zum RNAi-Screening.	175

1 Zusammenfassung

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein regulatorischer Mechanismus der meisten eukaryotischen Zellen, der kurze doppelsträngige RNA (dsRNA) Moleküle als Trigger zur Sequenzhomologie-abhängigen Kontrolle der Genaktivität nutzt. Diese kleinen dsRNA Moleküle werden als *small interfering RNAs* (siRNAs) bezeichnet, sind ~21-22 nt lang und besitzen charakteristische 2 nt 3'-Überhänge. Zu Beginn dieser Arbeit wurde in unserem Labor gezeigt, dass in Säugerzellen durch Einschleusen von chemisch synthetisierten siRNAs die Expression einzelner Gene spezifisch unterdrückt werden kann. Diese Methode eröffnete neue Möglichkeiten zur funktionellen Genanalyse.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine siRNA-Selektionssoftware entwickelt, um damit siRNA-Sequenzen für eine siRNA-Bibliothek gegen RNA-prozessierende Faktoren auszuwählen. Zur Auswahl von siRNAs nach einem alternativen Design-Ansatz wurde eine weitere siRNA-Selektionssoftware entwickelt. Diese siRNAs zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus zwei partiell komplementären Leit-Strängen mit definierten Ziel-mRNAs bestehen. Die Anwendbarkeit dieser siRNAs wurde experimentell bestätigt. Zur Herstellung der siRNAs für diese Arbeit wurde die chemische RNA-Synthese nach der ACE-Methode in unserem Labor etabliert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Methoden für einen RNAi-Screen mittleren Durchsatzes zur funktionellen Analyse von RNA-prozessierenden Faktoren entwickelt. Dazu wurden die Auswirkungen des Gen Knockdowns auf die Zellproliferation nach Transfektion von 378 individuellen siRNAs gegen 154 RNA-prozessierende Proteine untersucht. 80 siRNAs gegen 44 Faktoren führten 72 Stunden nach der Transfektion im Vergleich zur Kontrolle zu einer starken Reduktion der Zellzahl um mehr als 60%. Der Prp 19/CDC5-Komplex gehört zu den nicht-snRNP Komponenten des Spleißosoms und spielt vermutlich eine bedeutende Rolle bei der katalytischen Aktivierung. Einige Proteine dieses Komplexes wurden in weitergehenden Analysen mittels RNAi untersucht. Zunächst wurde die Stärke des erzielten Knockdowns auf mRNA-Ebene validiert. Danach wurde die Anwendbarkeit einer Methode zur Identifizierung von Spleißdefekten untersucht. Als zelluläre Indikatoren für einen Spleißdefekt wurde mit fluoreszenz-mikroskopischen Methoden die

Lokalisierung des Proteins SC35, das als Markerprotein für Spleißosomen enthaltende nukleäre Domänen (sog. Speckles) gilt, der polyA-mRNA und der snRNAs U2, U4 und U5 analysiert. Der Knockdown einiger Gene führte zu deutlichen Phänotypen, die auf einen Spleißdefekt hindeuten.

Im dritten Teil der Arbeit wurden in drei Pilotstudien chemisch synthetisierte siRNAs zur funktionellen Analyse von Ribonukleoprotein-Partikeln eingesetzt: (i) Der U4/U6.U5-tri-snRNP ist eine zentrale Einheit des Spleißosoms und muss nach Abschluß eines Spleißzyklus aus seinen Komponenten neu gebildet werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, wo die U4/U6.U5 tri-snRNP Assemblierung im Kern erfolgt und welche Proteine daran beteiligt sind. Durch Kombination von RNAi und Fluoreszenzmikroskopie konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass nach Knockdown des U5-spezifischen Proteins hPrp6 oder des U4/U6-spezifischen Proteins hPrp31 der U4/U6 Recycling-Faktor p110 und Komponenten des U4/U6 di-snRNPs in den Cajal Bodies akkumulieren. Diese Daten zeigten u.a. dass hPrp31 und hPrp6 zwischen U4/U6 und U5 snRNPs auch *in vivo* eine Brückenfunktion ausbilden, weiterhin bestätigten Zellproliferationsanalysen eine essentielle zelluläre Funktion für diese Proteine. (ii) Neben dem U2-abhängigen Spleißosom existiert ein zweites, das sogenannte U12-abhängige Spleißosom. Dieses ist für das Spleißen von U12-Typ Introns verantwortlich. Zu Beginn dieser Arbeit wurden in unserem Labor neue Komponenten des U12-abhängigen Spleißosom identifiziert. Durch RNAi vermittelten Knockdown und anschließender Proliferationsanalyse konnte für vier dieser U11/U12- bzw. U11-assoziierten Proteine eine essentielle zelluläre Funktion nachgewiesen werden. (iii) snoRNPs (*small nucleolar RNPs*) bestehen wie snRNPs aus einer RNA-Komponente, der sogenannten snoRNA, und einem Multi-Protein-Komplex. C/D-Box snRNPs sind essentielle Faktoren für die Biogenese von Ribosomen. Die Assemblierung und Reifung der C/D-Box snRNPs erfolgt vermutlich in zwei Phasen, die im Nukleoplasma bzw. in den Cajal-Bodies ablaufen. Der nukleoplasmatische U3 snoRNP enthält neben den Haupt C/D-Box Proteinen weitere nicht-snoRNP Faktoren. Durch RNAi konnte für die meisten dieser Faktoren eine essentielle Funktion für die C/B-Box snoRNP Bildung gezeigt werden. Zellproliferationsanalysen machten deutlich, dass jedes der untersuchten Proteine essentiell für die Aufrechterhaltung des Zellwachstums ist.

2 EINLEITUNG

2.1 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein evolutionär konservierter regulatorischer Mechanismus der Genexpression. Dieser Mechanismus wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA) aktiviert und bewirkt den Abbau von mRNA, deren Sequenz identisch zu einem Strang der dsRNA ist. Schon bald nach der Entdeckung wurde, auf diesem Mechanismus basierend, eine Methode zur funktionellen Genanalyse entwickelt (Elbashir et al., 2002; McManus und Sharp, 2002; Paddison und Hannon, 2002).

2.1.1 Doppelsträngige RNA ist der Trigger der RNA-Interferenz

Die Unterdrückung der Genexpression durch dsRNA ist für verschiedene Organismen gut dokumentiert. Das Phänomen RNAi wurde zum ersten Mal bei Pflanzen beobachtet (Napoli et al., 1990). Durch Überexpression der Chalkon Synthetase (CHS), eines wichtigen Enzyms der Anthocyanbiosynthese, sollten violette Petunien erzeugt werden. Die Überexpression resultierte hingegen in weißen Petunien und in einer stark reduzierten mRNA-Menge der CHS. Die Autoren folgerten daraus, dass das eingeführte Transgen die endogene CHS co-unterdrückte und bezeichneten das Phänomen deshalb als Co-Unterdrückung. Ein ähnliches Phänomen wurde 1992 für den Pilz *Neurospora crassa* beschrieben und als „quelling“ (engl. unterdrücken) bezeichnet (Romano und Macino G, 1992). In Tieren wurde RNA Silencing erstmals beobachtet als Guo und Kemphues (Guo und Kemphues, 1995) einzelsträngige Sinn- oder Gegensinn-mRNA, homolog bzw. komplementär zur par-1 mRNA, in den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* injizierten. Überraschenderweise führten sowohl einzelsträngige Gegensinn- als auch Sinn-mRNA zu einem Abbau der par-1 mRNA. Fire und Mello (Fire et al., 1998) wiederholten die Experimente indem sie intensiv aufgereinigte einzelsträngige Sinn- und Gegensinn-mRNA, und dsRNA in die Würmer einbrachten und dann die mRNA-Menge des Ziel-Gens untersuchten. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass doppelsträngige RNA der Auslöser der spezifischen mRNA-Reduktion ist. Es wurde gefolgert, dass Guo und Kemphues in ihren Experimenten vermutlich mit Gegensinn-RNA verunreinigte Sinn-RNA

verwendet hatten.

2.1.2 RNA-Interferenz bei Säugern

Frühe Versuche, lange dsRNA (>30 bp) als Trigger für Gen-Silencing in Säugerzellen zu nutzen, schlugen fehl, da eine Kaskade von antiviralen Interferon-stimulierten Genen aktiviert wurde, die für PKR und 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase kodieren (Minks et al., 1979; Stark et al., 1998). Die Interferon Antwort führt zu globalem post-transkriptionalem Gen-Silencing und führt in den meisten Zellen zum Zelltod (Dorsett und Tuschl, 2004). Der Durchbruch gelang mit der Entdeckung, dass kleine dsRNAs den sequenz-spezifischen Abbau der Ziel-mRNA vermitteln und RNAi in Säugerzellen auslösen, ohne dabei eine Interferon-Antwort zu initiieren (Elbashir et al., 2001a). Diese kleinen dsRNA Moleküle werden als siRNAs (engl. *small interfering RNAs*) bezeichnet, sind 21-23 bp lang und besitzen an den 3'-Enden jeweils einen Überhang von zwei Nukleotiden mit einer 3'-OH-Gruppe und einer Phosphat-Gruppe am 5'-Ende (Elbashir et al., 2001b; Hannon und Rossi, 2004; Meister und Tuschl, 2004).

siRNA-Duplices werden durch das zytoplasmatische RNase III Enzym Dicer erzeugt (Abbildung 1), welches lange dsRNA-Moleküle oder artifizielle, ektopisch exprimierte Haarnadel-RNAs prozessiert (Amarzguioui et al., 2005; Brummelkamp et al., 2002; McManus et al., 2002; Paddison et al., 2002; Zeng et al., 2002).

Chemisch synthetisierte (Elbashir et al., 2001a) oder durch enzymatische Methoden erzeugte siRNA-Duplices (Amarzguioui et al., 2005; Buchholz et al., 2006; Kittler und Buchholz, 2005) können auch direkt durch Transfektion in Zellen eingeführt werden.

Ein siRNA-Duplex besteht, relativ zur Ziel-mRNA, aus einem Sinn- und einem Gegensinn-Strang (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2). Der Gegensinn-Strang wird auch als Leit-Strang bezeichnet, da dieser als Vorlage für das sequenz-spezifische Gen-Silencing durch die RNAi-Maschinerie dient. Der Sinn-Strang wird als Passagier-Strang bezeichnet (Rana, 2007).

Im Zytoplasma wird ein Strang eines siRNA-Duplex in den als RISC (engl. *RNA induced silencing complex*) bezeichneten Komplex eingebaut

(Hammond et al., 2000). Bekannte Komponenten des humanen RISC sind Dicer, Argonaut Proteine, TRBP (*HIV-1 transactiv responsive element* (TAR) RNA-binding protein) und das dsRNA-bindende Protein PACT (Filipowicz et al., 2005; Rana, 2007).

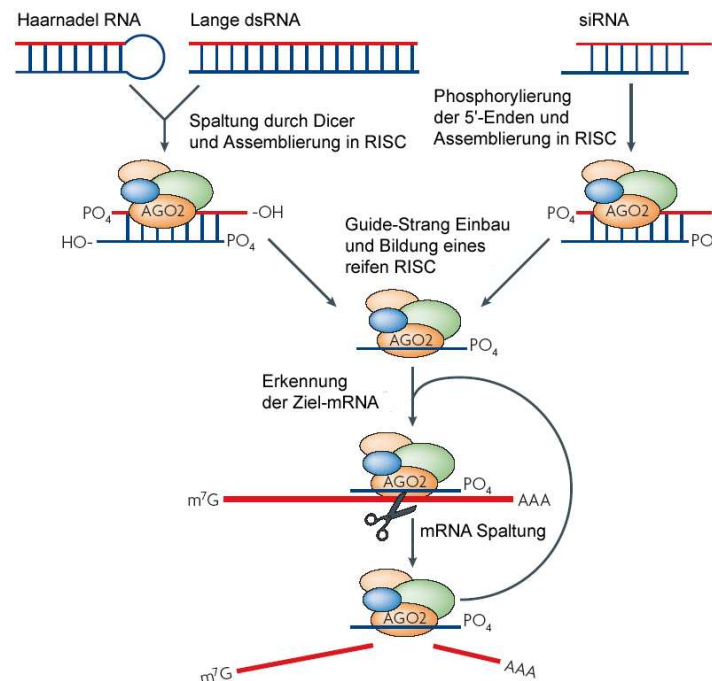


Abbildung 1. Lange doppelsträngige RNA oder Haarnadel RNA Substrate werden durch Dicer zu siRNAs (small interfering RNAs) prozessiert. siRNA-Duplices können auch direkt in Zellen eingebracht werden, wo die 5'-Enden durch zelluläre Kinasen phosphoryliert werden. Die siRNAs assemblieren mit der Endonuklease Argonaut 2 (AGO2), Dicer und anderen zellulären Faktoren zum RNA-induzierten Silencing Komplex (RISC). Ein siRNA-Strang, der sogenannte Leit-Strang, wird in den RISC eingebaut, während der sogenannte Passagier-Strang aus dem Komplex freigesetzt und abgebaut wird. Der aktivierte RISC findet und spaltet die Ziel-mRNA unter Leitung des eingebauten siRNA-Einzelstranges. RISC unterliegt einem Recycling und kann eine Vielzahl an Spaltungen durchführen (Abbildung nach Rana, 2007 verändert).

Lange Zeit war unklar, welche Eigenschaften festlegen, welcher der beiden Einzelstränge eines siRNA-Duplex zum Leit-Strang wird. Bioinformatische und biochemische Analysen von siRNA-Duplex-Sequenzen zeigten, dass die thermodynamische Stabilität der beiden RNA Enden bestimmt, welcher der beiden Stränge in RISC eingebaut wird (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Ein siRNA-Duplex, der am 5'-Ende des Leit-Stranges eine geringere thermodynamische Stabilität aufweist als am 3'-Ende, initiiert effizient die gerichtete Entwindungsaktivität des RISC vom 5'-Ende her.

Der Leit-Strang wird in einen funktionellen RISC eingebaut, während der Passagier-Strang aus dem Komplex freigesetzt und abgebaut wird (Leuschner et al., 2006; Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005).

Hat der Leit-Strang den RISC durch seine Sequenz programmiert, dirigiert diese siRNA den Proteinkomplex zur Ziel-mRNA, die eine hochkomplementäre Sequenz trägt (Martinez et al., 2002; Nykanen et al., 2001). Die Ziel-mRNA wird dann durch eine RISC-Komponente, die Endonuklease Argonaut 2, exakt 10 Nukleotide vom 5'-Ende der eingebauten siRNA entfernt, gespalten. Die mRNA Fragmente werden in der Folge durch zelluläre Endonukleasen gespalten und die Expression der betreffenden Gene wird somit unterdrückt (Elbashir et al., 2001c; Liu et al., 2004; Rand et al., 2004; Rivas et al., 2005).

2.1.3 Anwendung zur funktionellen Genomanalyse

Führt man siRNA-Duplices, die gegen zelluläre mRNAs gerichtet sind, durch Transfektion in Humanzellen ein, kann die Expression eines Ziel-Gens über mehrere Tage drastisch reduziert werden. Damit bieten siRNAs die Möglichkeit zur schnellen funktionellen Genomanalyse in somatischen Zellen, indem Knockdown Phänotypen der Ziel-Gene in Zellkultur erzeugt und untersucht werden.

2.1.4 Design funktioneller siRNAs

Zu Beginn dieser Arbeit gab es kaum experimentelle Daten für ein rationales siRNA Design. Die sogenannten Tuschl-Regeln (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>) waren die Richtlinie für das Design, das auch als konventionelles Design bezeichnet wird. Eine konventionelle siRNA besteht aus zwei 21-nt siRNAs, die einen 19 bp Duplex mit 2-nt 3'-Überhängen bilden, ist gegen das Sequenzmotiv AA(N₁₉)UU oder NA(21) gerichtet (A - Adenin, U - Uracil, N – jedes Nukleobase) und hat einen Gehalt an Cytosin und Guanin (GC-Gehalt) zwischen 30% und 70% (Elbashir et al., 2002).

In den letzten Jahren wurden durch verschiedene Sequenzanalyse-Studien eine Vielzahl von Charakteristika funktioneller siRNAs identifiziert (Patzel, 2007; Pei und Tuschl, 2006).

Am bedeutendsten ist die thermodynamische Asymmetrie der siRNAs. Aktive siRNAs besitzen die Nukleobasen Uracil oder Adenin in Position 1 und eine Uracil- und Adenosin-reiche Sequenz im Bereich von Position 1 bis 7 relativ zum 5'-Ende des Leit-Stranges (Abbildung 2-A). Entsprechend ist in Position 19 am 3'-Ende des Leit-Stranges häufig eine Cytosin- oder Guanin-Nukleobase zu finden. Des Weiteren sind bei aktiven siRNAs in Position 10 - der Spaltungsstelle - Adenin oder Uracil überrepräsentiert. Möglicherweise unterstützen die Nukleotide in dieser Position die RISC vermittelte Spaltung des Passagier-Stranges und der Ziel-mRNA.

Andere Analysen funktioneller siRNAs zeigten, dass diese meist einen GC-Gehalt zwischen 30% und 52% besitzen (Chalk et al., 2004; Reynolds et al., 2004). Vermutlich destabilisiert ein zu geringer GC-Gehalt siRNA-Duplices, während ein hoher GC-Gehalt die Beladung des RISC und/oder die Freisetzung des Spaltungsproduktes behindert (Pei und Tuschl, 2006).

Auch die Sekundärstrukturen der mRNA-Ziel-Sequenzen und der siRNA Leit-Stränge wurden untersucht. Prinzipiell sind unstrukturierte Sequenzabschnitte besser zugänglich für die Hybridisierung mit komplementären Sequenzen als basengepaarte Abschnitte. Verschiedene Studien zeigten, dass der Ausschluss unzugänglicher mRNA-Abschnitte die Auswahl funktioneller siRNAs deutlich verbesserte (Ding et al., 2004; Luo und Chang, 2004; Yiu et al., 2005). In anderen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Struktur der Ziel-mRNA und der siRNA-Aktivität jedoch nur teilweise bestätigt (Heale et al., 2005; Holen et al., 2002; Schubert et al., 2005; Vickers et al., 2003; Xu et al., 2003). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass unstrukturierte Leit-Stränge, die keine interne Basenpaarungen ausbilden, vermutlich generell stärkeres Silencing zeigen als siRNA Leit-Stränge, die interne Strukturen ausbildenden (Patzel et al., 2005).

Zu Beginn dieser Arbeit gab es keine Programme zur Auswahl von siRNAs. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Algorithmen zur Auswahl von siRNA-Sequenzen entwickelt, die die beschriebenen und weitere Kriterien zur Selektion nutzen (Boden et al., 2004; Chalk et al., 2004; Ding et al., 2004; Holen et al., 2003; Huesken et al., 2005; Patzel et al., 2005; Reynolds et al., 2004; Santoyo et al., 2005; Yiu et al., 2005; Yuan et al., 2004). Wenngleich große Fortschritte erzielt wurden nicht-aktive siRNAs herauszufiltern, sind diese

Algorithmen noch weit von einer verlässlichen *in-silico* Vorhersage hocheffektiver (weniger als 5% der Ziel-mRNA 24 Stunden nach der siRNA Transfektion) siRNAs entfernt. Um hocheffektive siRNAs zu identifizieren, ist es immer noch nötig, eine Anzahl potentieller siRNA-Kandidaten experimentell zu untersuchen.

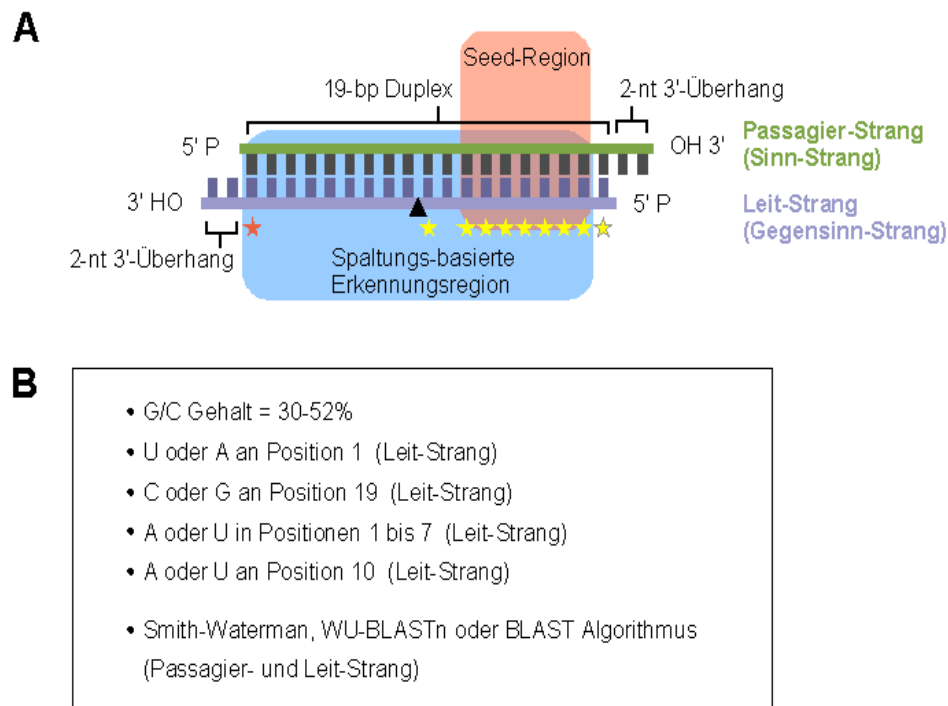


Abbildung 2. Eigenschaften von siRNAs. (A) Struktur, Spezifität und Aktivität. Es ist ein Standard-siRNA-Duplex dargestellt. Die siRNA vermittelte Spaltung benötigt eine hoch-komplementäre Region (blau hinterlegt) in der Umgebung der Spaltungsstelle. Das schwarze Dreieck markiert die Position an welcher die komplementäre Ziel-mRNA (nicht gezeigt) gespalten wird. Sterne repräsentieren wichtige Nucleotide im Leit-Strang aktiver siRNAs. Gelbe Sterne markieren Adenin- oder Uracil-Reste. Der rote Stern markiert einen Cytosin- oder Guanin-Rest. Die zu Off-Target-Effekten führende microRNA-ähnliche Destabilisierung von mRNAs benötigt eine Paarung mit dem Analog der microRNA Seed-Region (hellrot hinterlegt). (B) Design-Regeln zur Auswahl aktiver und spezifischer siRNAs (Abb. verändert nach Pei&Tuschl, 2006).

2.1.5 siRNA-Design zur Vermeidung von Off-Target-Effekten

Unter Off-Target-Effekten wird die Beeinflussung der Expression von Genen verstanden, die in nichtspezifischer Beziehung zum Ziel-Gen steht. Untersuchungen verschiedener Gruppen machten deutlich, dass das siRNA vermittelte Gen-Silencing weniger spezifisch ist als zunächst angenommen

wurde. Es wurde beobachtet, dass siRNAs unter bestimmten experimentellen Bedingungen indirekt oder direkt die Expressionsprofile von nicht-Ziel-mRNAs beeinflussen (Jackson et al., 2003; Persengiev et al., 2004; Saxena et al., 2003; Scacheri et al., 2004; Sledz et al., 2003). Darum wird empfohlen, mehrere unabhängige siRNAs gegen ein Ziel-Gen einzusetzen. Ein reproduzierbarer Phänotyp gilt als Bestätigung einer ausreichenden Spezifität der ausgewählten siRNA-Sequenzen für ex vivo Experimente (Editors, 2003).

Off-Target-Effekte können vom Leit- oder Passagier-Strang sequenzabhängig oder sequenz-unabhängig ausgelöst werden. Sequenz-abhängige Effekte können durch geeignetes Design signifikant reduziert bzw. vermieden werden.

2.1.5.1 Spezifische Off-Target-Effekte

2.1.5.1.1 Sequenzhomologien

Sequenzhomologien von nur 11 bp zwischen siRNA und einer nicht Ziel-mRNA können bereits zu einem Knockdown dieser mRNA führen (Jackson et al., 2003). Darum ist es besonders wichtig, die Spezifität der siRNAs zu gewährleisten. Dies erfolgt durch Analyse von Homologien zum untersuchten Transkriptom auf der Basis von Sequenz-Alignments (Patzel, 2007). Typischerweise werden zwischen Position 2 und 19 des Leit-Stranges mindestens drei Basenfehlpaarungen zu allen nicht Ziel-mRNAs empfohlen. Dabei sind die zentrale Positionen und das 5'-Ende von besonderer Bedeutung (Pei und Tuschl, 2006), denn die Nukleotide 2-7 oder 2-8 am 5'-Ende des Leit-Stranges können eine bedeutende Ursache für Off-Target-Effekte darstellen. Diese Hexamer oder Heptamer Region entspricht der sogenannten Seed-Region am 5'-Ende von microRNAs. microRNAs sind wichtig für die Genregulation, die sie durch Inhibition der Translation und/oder durch mRNA-Abbau beeinflussen (Bagga et al., 2005; Lai, 2002; Lewis et al., 2003; Stark et al., 2003; Yekta et al., 2004). Es wurde nachgewiesen, dass Seed-Region-Analoga von siRNAs in der 3'-UTR von nicht Ziel-mRNAs hybridisieren und diese regulieren können (Birmingham et al., 2006; Jackson et al., 2006). Durch eine 2'-O-Methyl Modifikation der Base an Position 2 des Leit-Stranges konnten diese Off-Target-Effekte signifikant reduziert werden

(Jackson et al., 2006).

In der Regel wird für die transkriptomweite Homologie-Analyse NCBI BLAST (Altschul et al., 1990) eingesetzt. Dieser Algorithmus verzichtet jedoch zugunsten der Geschwindigkeit auf Sensitivität. Für die Analyse von siRNA-Sequenzen sind wegen der höheren Sensitivität WU-BLASTn (Lopez et al., 2003) und der Smith-Waterman Algorithmus (Smith und Waterman, 1981) geeignete Alternativen.

2.1.5.1.2 Duplex Asymmetrie

Off-Target-Effekte können auch dadurch ausgelöst werden, dass der Sinn-Strang in RISC eingebaut wird und als Leit-Strang fungiert. Darum ist es wichtig, siRNA-Duplices nach thermodynamischen Prinzipien auszuwählen (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Das thermodynamische Profil nicht-aktiver siRNAs kann durch Modifikationen im Sinn-Strang in ein thermodynamisches Profil aktiver siRNAs umgewandelt werden. Dies kann durch Basenaustausch am 3'-Ende des Sinn-Stranges erfolgen, so dass Basenfehlpaarungen in den Duplex eingebracht und der Duplex am 5'-Ende des Leit-Stranges destabilisiert wird. Durch chemische Modifikationen am 5'-Ende des Sinn-Stranges kann der Einbau dieses Stranges blockiert werden (Dorsett und Tuschl, 2004; Rana, 2007).

2.1.5.1.3 Toxisches Sequenzmotiv und TLR Sequenz

siRNAs mit den spezifischen Sequenzmotiven 5'-UGUGU-3' und 5'-GUCCUCAA-3' im Leit-Strang können in Zellen einen toxischen Effekt hervorrufen (Fedorov et al., 2006). Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht bekannt. Durch sequenzabhängige Interaktion von siRNA-Duplices mit Toll-ähnlichen-Rezeptoren (engl. *toll like receptors* - TLR) auf der Zelloberfläche von Endosomen kann die immanente Immunantwort aktiviert werden. Obwohl dieses Phänomen bisher nur bei primären Leukozyten in peripherem Blut und plasmazytoid-dendritischen Zellen beobachtet wurde (Hornung et al., 2005; Judge et al., 2005a; Judge et al., 2005b), sollten die betreffenden Sequenzmuster bei der siRNA Auswahl ausgeschlossen werden.

2.1.5.2 Unspezifische Off-Target-Effekte

Neben sequenzabhängigen Off-Target-Effekten wurden charakteristische Veränderungen des Genexpressionsprofils von nicht Ziel-mRNAs auch in Abhängigkeit vom verwendeten Transfektionsreagenz beobachtet (Fedorov et al., 2005). Hohe siRNA-Konzentrationen führen ebenfalls zu Off-Target-Effekten (Persengiev et al., 2004; Semizarov et al., 2003; Sledz et al., 2003), die durch Reduktion der siRNA-Konzentration vollständig vermieden werden können (Fedorov et al., 2006).

2.2 Chemische RNA-Synthese

Die chemische RNA-Synthese spielte gegenüber der DNA-Synthese (Khorana, 1971) eine lange Zeit eine untergeordnete Bedeutung. Die Kosten für die chemische RNA-Synthese waren im Vergleich zur DNA-Synthese hoch und die Länge der RNA-Oligonukleotide auf maximal etwa 40 Basen limitiert. Darum wurde RNA in den meisten Laboratorien enzymatisch mittels *in-vitro* Transkription durch RNA-Polymerasen hergestellt (Losick, 1972; Milligan et al., 1987). Das Interesse an synthetischer RNA nahm erstmals mit der Entdeckung katalytisch aktiver RNAs zu und stieg mit der Entdeckung der siRNAs sprunghaft an.

Zur chemischen Synthese einer RNA-Polymerkette beliebiger Sequenz werden in einem zyklischen Prozess schrittweise monomere Nukleotidbausteine an eine wachsenden Polymerkette gekoppelt. Als erster Baustein wird ein Träger mit einem immobilisierten Start-Nukleotid verwendet, der in einer Synthesäule eingeschlossen ist. Verschiedene RNA-Synthesemethoden finden heute Anwendung. Diese werden anhand der reaktiven Spezies unterschieden, welche an der Kopplung der Einzelbausteine beteiligt ist. Am häufigsten verarbeitet ist die Synthese nach der Phosphoramidit-Methode (Beaucage und Caruthers, 1981).

2.2.1 Der Synthesezyklus

Im ersten Schritt eines Synthesezykluses wird eine freie reaktive

Hydroxylschutzgruppe zur Kopplung eines chemisch aktivierten Monomerbausteins zur Verfügung gestellt. Dies erfolgt durch Entfernen der 5'-Hydroxylgruppe am immobilisierten Monomer/Oligomer. Im nachfolgenden Schritt wird der zu koppelnde Baustein in Form eines Phosphoramidits zusammen mit dem Aktivator auf das Trägermaterial gegeben. Nach der Kopplungsreaktion wird nicht-reagiertes Phosphoramidit aus der Säule ausgewaschen. Im darauffolgenden Schritt werden alle 5'-Hydroxylgruppen blockiert, die nicht abreagiert sind, da diese sonst im nächsten Zyklus reagieren könnten, und so zu verkürzten Polymeren führen. Im letzten Schritt wird das nach der Phosphoramiditkopplung vorliegende Phosphit zum Phosphat oxidiert. Ein neuer Zyklus beginnt durch Entfernung der 5'-Hydroxylschutzgruppe am neu angekoppelten Nukleotid.

2.2.2 Die TBDMS-Methode

Während der gesamten Synthese muss die 2'-Hydroxylgruppe geschützt sein, um unerwünschte Nebenreaktionen zu unterbinden. Die Phosphoramidit-Methode wird mit u.a. mit der TBDMS-Methode zum Schutz der 2'- bzw. 5'-Hydroxylfunktion eingesetzt. Der Name der TBDMS-Methode leitet sich von der zum Schutz der 2'-Hydroxylgruppe verwendeten *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe (TBDMS) (Ogilvie et al., 1988) ab. Diese Schutzgruppe ist sowohl unter sauren als auch unter basischen Bedingungen stabil und wird im Anschluss an den Syntheseprozess durch eine Reaktion mit wasserfreien Fluoridionen entfernt. Die 5'-Hydroxylgruppe wird durch eine säurelabile Dimethoxytritylgruppe (DMT) geschützt (Smith et al., 1962), die in jedem Zyklus bei sauren Bedingungen, z.B. 2-3%-ige Dichloressigsäure (DCA) in Methylenchlorid, entfernt wird.

Weitere basenlabile Schutzgruppen werden für die exozyklischen Aminofunktionen und den Phosphorsauerstoff der Amidite benötigt. Zum Schutz der exozyklischen Aminofunktionen werden oft Phenoxyacetyl-Derivate verwendet. Diese lassen sich bereits unter leicht basischen Bedingungen entfernen, wodurch die Abspaltung der 2'-O-Silylether und die basische Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen unterbunden wird. Eine Cyanoethylschutzgruppe hindert den Phosphorsauerstoff an der Reaktion.

Zum Abschluss des Syntheseprozesses werden diese Schutzgruppen alle gleichzeitig unter leicht basischen Bedingungen entfernt und vom Festphasenträger gelöst.

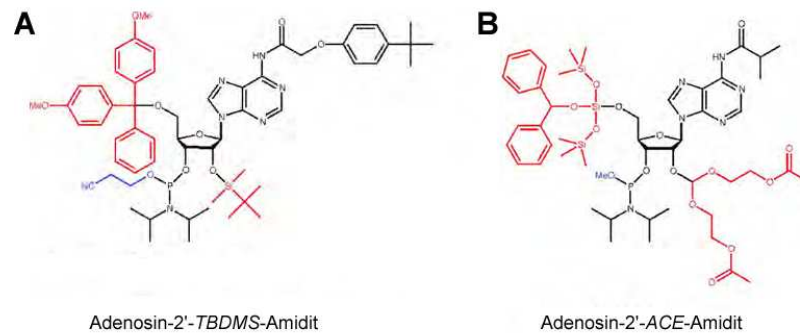


Abbildung 3. Strukturvergleich der Phosphoramidite für TBDMS- und ACE-Methode. Beispielhaft sind die Strukturen der Adenosin-Amidite dargestellt. (A) Die exozyklische Aminofunktionen des 2'-TBDMS-Amidits ist mit einer tert-Butyl-phenoxyacetyl-schutzgruppe blockiert, (B) während bei dem 2'-ACE-Amidit eine Isobutyryl-schutzgruppe die Schutzfunktion übernimmt. Die 2'- bzw. 5'-Schutzgruppen sind in rot, die Schutzgruppe am Phosphat in blau dargestellt.

2.2.3 Die ACE-Methode

Eine Methode mit völlig anderer Schutzgruppenstrategie als die TBDMS-Methode stellt die ACE-Methode dar. Diese wird so bezeichnet, da sie einen säurelabilen Orthoester, bis(2-acetoxyethoxy)-methylorthoester zum Schutz der 2'-Hydroxylgruppen nutzt (Scaringe et al., 1998; Scaringe, 2001). Der Orthoester ist unter den Reaktionsbedingungen der RNA-Synthese stabil. Die 5'-Hydroxylgruppen werden hier durch eine silylbasierte Schutzgruppe, dem Bis-(trimethylsiloxy)-benzhydroxysilylether, geschützt. Diese fluoridlabile Schutzgruppe wird am Beginn eines jeden Synthesesyklus durch Flusssäure entfernt.

Bei der ACE-Methode werden die basenlabilen Schutzgruppen an den Nucleobasen beim Ablösen vom Trägermaterial unter Verwendung von Methylamin sehr schnell abgespalten. Eine O-Methylschutzgruppe hindert den Phosphorsauerstoff an der Reaktion. Diese wird im Unterschied zu der bei TBDMS-Methode dafür verwendeten Cyanoethylschutzgruppe nicht beim Entfernen der Basenschutzgruppen hydrolysiert. Die Entfernung erfolgt deshalb in einem späteren Schritt durch Behandlung der 2'-geschützten RNA-

Oligonukleotide mit einer Lösung aus Disodium-2-carbamoyl-2-cyano-ethylen-1,1-dithiolate-trihydrate in einem DMF/Wasser-Gemisch.

2.3 Prä-mRNA Spleißen

2.3.1 Das majore Spleißosom

Bevor eukaryotische Prä-mRNA als funktionelle mRNA ins Zytoplasma exportiert werden kann, muss diese eine Anzahl posttranskriptioneller Modifizierungen durchlaufen. Die meisten Prä-mRNAs enthalten intervenierende Sequenzen (Introns), die entfernt werden müssen, damit die kodierenden Sequenzen (Exons) korrekt im offenen Leserahmen positioniert sind. Die Entfernung von Introns und die Verknüpfung der Exons wird durch einen dynamischen, mehrere Megadalton großen Multienzym-Komplex, das Spleißosom, katalysiert und als Prä-mRNA Spleißen bezeichnet (Brow, 2002; Will und Luhrmann, 2006). Die meisten Introns besitzen nahe den 5'- und 3'-Enden Konsensus-Sequenzen, die durch spleißosomale Komponenten erkannt werden, und die für die Bildung des Spleißosoms benötigt werden. Das Spleißosom wird auf jeder Prä-mRNA in einem geordneten Prozess neu assembliert (Abbildung 4). Dies erfolgt unter Beteiligung der fünf kleinen Uridinreichen kernlokalisierten Ribonukleoprotein-Partikel (uridin rich small nuclear ribonucleoprotein particles, U snRNPs). Die U snRNPs bestehen jeweils aus einer (U1, U2 und U5) oder zwei (U4/U6) RNA-Komponenten (snRNA), gemeinsamen Proteinen, partikel-spezifischen Proteinen und weiteren Proteinen, die nicht fest mit dem Partikel assoziiert sind (Burge et al., 1999; Reed und Palandjian, 1997; Will und Lührmann, 2001; Will und Luhrmann, 2006). Das Spleißosom nutzt vielfältige RNA-RNA-, RNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen, um die Introns präzise herauszuschneiden und die Exons in korrekter Abfolge präzise zu verknüpfen.

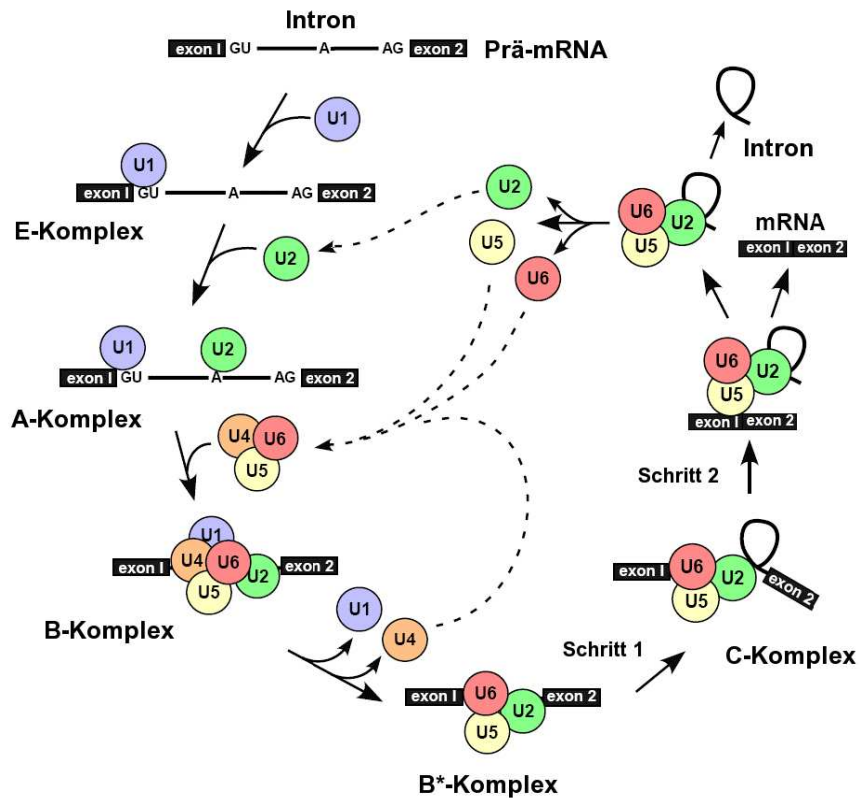


Abbildung 4. Die Assemblierung des Spleißosoms erfolgt schrittweise. Die Assemblierung des Spleißosoms verläuft über verschiedene Schritte die als unterschiedliche Intermediate, genannt E-, A-, B-, und B*-Komplex, *in-vitro*detektiert werden können (Will und Luhrmann, 2006). Die Assemblierung beginnt mit einer Energie-unabhängigen Interaktion des U1 snRNPs mit der konservierten 5'-Spleißstelle der Prä-mRNA, was zur Bildung des E-Komplexes führt. In dieser Phase ist der U2 snRNP locker mit der Prä-mRNA assoziiert (Das et al., 2000). In dem nachfolgenden ATP-abhängigen Schritt interagiert der U2 snRNP stabil mit dem Verzweigungspunkt der Prä-mRNA und resultiert in der Bildung des A-Komplexes. Aus diesem geht, durch Integration des vorgeformten U4/U5/U6 tri-snRNP Partikels, der B-Komplex hervor. Der B-Komplex enthält einen kompletten Satz an U snRNAs im prä-katalytischen Zustand. Nachfolgend erfährt der B-Komplex eine tiefgreifende Umstrukturierung, welche die Destabilisierung und Freisetzung der U1 und U4 snRNPs, und die Bindung des Prp19/CDC5-Komplexes (Chan et al., 2003) einschließt. Dies führt schließlich zur katalytischen Aktivierung und Bildung des sogenannten aktivierten Spleißosoms (B*-Komplex). Nach dem ersten Spleißschritt erfolgen weitere Umlagerungsreaktionen, die die Annäherung der 5'- und 3'-Spleißstelle bewirken. Dabei kommt es zur Bindung weiterer Proteinfaktoren und zur Katalyse des zweiten Spleißschrittes. Nach dem zweiten katalytischen Schritt wird die gespleißte mRNA vom post-katalytischen Spleißosom abgelöst (Company et al., 1991; Ohno und Shimura, 1996) und es verbleibt ein post-spleißosomales Intron-Komplex. Aus diesem wird das Intron-Lariat freigesetzt (Gee et al., 1997; Martin et al., 2002; Ruskin und Green, 1985). Die verbleibenden U2, U6 und U5 snRNPs werden zusammen mit den zuvor freigesetzten U1 und U4 snRNPs regeneriert und können in einen neuen Spleißosomenzyklus eintreten (Abb. aus Will&Luhrmann, 2006).

2.3.1.1 Zelluläre Biosynthese spleißosomaler U snRNPs

Die fünf RNA-Komponenten des majoren Spleißosoms sind kleine, nukleäre, Uridin-reiche RNAs, kurz U snRNAs (engl. uridine-rich-small-nuclear RNAs). Diese sind durch metabolische Stabilität und hohe phylogenetische Konservierung der Primär- und Sekundärstruktur gekennzeichnet. Die Strukturen dienen einerseits als Bindestellen für Proteine, andererseits assoziieren snRNAs, während der Assemblierung des Spleißosoms und dem katalytischen Spleißen, dynamisch miteinander und mit dem Prä-mRNA Substrat (Nilsen, 1994). Alle U snRNAs weisen posttranskriptionell modifizierte Nukleotide auf wie: 6-Methyladenosine, 2'-O-Ribose-Methylierungen und Pseudouridine (ψ) (Massenet und Branlant, 1999).

U1, U2, U4 und U5 snRNAs besitzen eine konservierte Oligo(U)reiche Sm-Bindestelle, welche die Bindung der diesen snRNPs gemeinsamen Sm-Core Proteine (B/B', D1, D2, D3, E, F und G) erlaubt (Branlant et al., 1982; Liutard et al., 1982). Die snRNAs U1, U2, U4 und U5 werden im Zellkern durch RNA Polymerase II transkribiert und zur anschließenden Reifung ins Zytoplasma exportiert. Dort erfolgt - in Wechselwirkung mit dem SMN-Komplex - die Ausbildung der Haupt-RNP-Struktur (engl. core) durch Oligomerisierung der Sm-Proteine auf der Sm-Bindestelle (Fischer et al., 1997; Liutard et al., 1982; Pellizzoni, 2007). Der SMN-Komplex besteht aus mindestens 17 Proteinen und katalysiert die Zusammenlagerung der spleißosomalen U-snRNPs. Nach dem Export ins Zytoplasma wird das 5'-Ende zur charakteristischen m₃G-Kappe umgewandelt (Mattaj, 1986) und das 3'-Ende verkürzt (Reddy und Busch, 1983).

Die reifen U snRNP-Partikel werden in den Zellkern reimportiert und akkumulieren dann zunächst in den Cajal Bodies (CBs) (Ferreira et al., 1994; Ogg und Lamond, 2002; Sleeman et al., 2001). Es wird angenommen, dass sie dort basenmodifiziert werden. CBs sind evolutionär konservierte Subdomänen des Zellkerns, die eine Funktion als Zentrum der Ribonukleoprotein-Assemblierung, Umstrukturierung und Umverteilung ausüben (Matera et al., 2007). CBs können anhand des Markerproteins p80-Coilin identifiziert werden (Raska et al., 1991) und enthalten alle spleißosomalen snRNAs. Es fehlen

jedoch essentielle nicht-snRNP Spleißfaktoren, wie z.B. die SR-Proteine. Dies deutet daraufhin, dass CBs wahrscheinlich nicht Orte des aktiven Spleißens sind (Gall, 2003; Ogg und Lamond, 2002).

Aus den CBs gelangen die reifen U snRNPs zum Abschluß der U snRNP Biosynthese ins Nukleoplasma und in die sogenannten Speckles. Speckles sind granulös erscheinende nukleäre Domänen, die durch die Lokalisierung essentieller Spleißfaktoren, wie z.B. SC35 definiert sind, und als Speicherorte von snRNPs gelten (Misteli et al., 1997). Nach Inhibition des Spleißens oder nach Inhibition der Transkription verändert sich die Lokalisierung charakteristisch. Das Markerprotein SC35 akkumuliert unter diesen Bedingungen in einer verringerten Anzahl von abgerundeten Regionen (Carmo-Fonseca et al., 1992; O'Keefe et al., 1994). Aus den Speckles werden die snRNPs zu den Orten mit hoher Transkriptionsaktivität rekrutiert (Misteli et al., 1997).

Im Gegensatz zu den U1, U2, U4 und U5 snRNAs verläuft die Reifung der RNA-Polymerase III transkribierten **U6 snRNA** ausschließlich im Zellkern. U6 snRNA trägt ein γ -Monomethyl-triphosphat am 5'-Ende (Kunkel et al., 1986); (Reddy et al., 1987; Singh und Reddy, 1989). Während des Reifungsprozesses bilden die sieben LSm-Proteine (engl. *like-Sm*) einen heteroheptameren Ring an der Uridin-reichen LSm-Bindestelle am 3'-Ende der U6 snRNA (Achsel et al., 1999; Ingelfinger et al., 2002; Singh und Reddy, 1989). Anschließend wird die U6 snRNA im Nukleolus durch snoRNAs basenmodifiziert (Ganot et al., 1999), und das reife U6 snRNP Partikel passiert auf seinem Weg in die Speckles die CBs.

2.3.1.2 Die spezifischen Proteine der snRNPs U5, U4/U6 und U4/U6.U5

Für jedes snRNP-Partikel existieren spezifische Proteine, die zusammen mit der RNA für die jeweilige Funktion entscheidend sind (Kambach et al., 1999; Will und Lührmann, 2001). So besteht das **12S U1 snRNP**-Partikel neben den Sm-Core Proteinen aus den drei partikel-spezifischen Proteinen U1 70K, U1 A und U1 C. Dagegen besitzt das **17S U2 snRNP**-Partikel eine komplexere Proteinkomposition aus 19 partikel-spezifischen Proteinen (Will et al., 2002), darunter die zwei heteromeren Subkomplexe SF3a und SF3b (Brosi et al., 1993)

und aus den zwei stabil assoziierten Polypeptiden U2-A' und U2-B'' (Caspary und Seraphin, 1998; Lührmann et al., 1990; Tang et al., 1996).

Auch das **20S U5 snRNP**-Partikel besitzt eine komplexe Proteinzusammensetzung (Bach et al., 1989). Viele der Proteine übernehmen zentrale Funktionen im Spleißosom (zusammengefasst in (Will und Luhrmann, 1997). Neben den Sm-Proteinen enthält das U5 snRNP acht zusätzliche partikel-spezifische Proteine 15K (TXNL4A), 40K (WDR57), 52K (CD2BP2), 100K (DDX23), hPrp6 (PRPF6) - auch als 102K bezeichnet -, 116K (EFTUD2), 200K (ASCC3L1) und 220K (Bach et al., 1989; Will et al., 1993; Will und Luhrmann, 1997).

U4 and U6 snRNAs enthalten komplementäre Sequenzabschnitte, die miteinander interagieren und so zur Bildung des **U4/U6 di-snRNP-Partikel** führen. Zusätzlich zu den U4 snRNA assoziierten Sm-Proteinen und den U6 snRNA assoziierten LSm2-8 Proteinen enthält das 13S U4/U6 di-snRNP fünf partikel-spezifische Proteine mit den Molekulargewichten 90K (PRPF3), 60K (PRPF4), 20K (PPIH), hPrp31 (PRPF31) - auch als 61K bezeichnet -, und 15.5K (NHPX) (Will und Lührmann, 2001). Die Proteine 20K, 60K und 90K formen einen biochemisch stabilen heteromeren Komplex (Horowitz et al., 1997; Teigelkamp et al., 1998). Das 15.5K Protein bindet direkt an die U4 snRNA (Notrott 1999). Die Bildung des U4/U6 di-snRNPs verläuft vermutlich in einer hierarchisch geordneten Abfolge von Assemblierungsschritten.

Der **U4/U6.U5 tri-snRNP** stellt die größte funktionelle Einheit des Spleißosoms dar und setzt sich aus allen im U5 snRNP und im U4/U6 di-snRNP enthaltenen Proteinen zusammen, mit Ausnahme des U5 52K Proteins. Des Weiteren sind die drei tri-snRNP spezifischen Proteine 27K (RY1), 65K (USP39), 110K (SART1) enthalten.

2.3.1.3 Assemblierung des di-snRNPs und des tri-snRNPs

Die snRNPs U4/U6 und U5 integrieren als vorgefertigter U4/U6.U5-tri-snRNP in das Spleißosom. Nach einem abgeschlossenen Spleißzyklus zerfällt das Spleißosom in seine Einzelkomponenten (Abbildung 4). Die freigesetzten U4 und U6 snRNPs assemblieren wieder zu einem neuen di-snRNP, und anschließend mit U5 snRNP zum tri-snRNP, bevor sie in den nächsten Spleißzyklus eintreten.

Tabelle 1. Proteinzusammensetzung der humanen U snRNPs des majoren Spleißosoms aufgereinigt aus HeLa Zellen. Die Farben verdeutlichen die Zuordnung der Proteine zu den verschiedenen U snRNPs bzw. zur Gruppe der gemeinsamen Sm-Core Proteine (Schneider, 2004).

U snRNP Proteine		app. M _r kDa	12S U1	17S U2	20S U5	13S U4/U6	25S U4/U6.U5	
gemeinsame Proteine	B/B'	28/29	●	●	●	● ●	● ●	
	D1	15	●	●	●	● ●	● ●	
	D2	16	●	●	●	● ●	● ●	
	D3	17	●	●	●	● ●	● ●	
	E	10	●	●	●	● ●	● ●	
	F	9	●	●	●	● ●	● ●	
	G	8	●	●	●	● ●	● ●	
spezifische Proteine	U1 snRNP	70K	●					
		A	●					
		C	●					
	U2 snRNP	A'	30		●			
		B''	29		●			
		SF3a120	120		●			
		SF3a66	66		●			
		SF3a60	60		●			
		SF3b155	160		●			
		SF3b145	150		●			
		SF3b130	120		●			
		SFb49	50		●			
		SF3b14b	15		●			
		p14	15		●			
		SF3b10	9		●			
		hPrp5	140		●			
		SR140	140		●			
	CHERP	130		●				
	hPrp43	90		●				
	SPF45	50		●				
SPF31	33		●					
SPF30	31		●					
U5 snRNP		220			●		●	
		200			●		●	
		116			●		●	
		102			●		●	
		100			●		●	
		52			●		●	
	40			●		●		
	15			●		●		
U4/U6 snRNP		90				●	●	
		61				●	●	
		60				●	●	
		20				●	●	
	15.5				●	●		
U4/U6.U5 tri-snRNP		110					●	
		65					●	
		27					●	

Das Recycling des tri-snRNPs ist essentiell für das Spleißen. Über den Mechanismus dieses Prozesses und über den Ort der tri-snRNP Assemblierung im Zellkern war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt.

Eingeleitet wird die **Assemblierung des di-snRNPs** durch Bindung des 15.5K

Proteins an die 5'-Haarnadelschleife der U4 snRNA. Dieser Schritt ist essentiell für die nachfolgenden Wechselwirkungen des hPrp31 Proteins und des heteromeren 20K•60K•90K Protein-Komplexes mit dem intakten U4/U6 snRNA Duplex (Nottrott et al., 1999; Nottrott et al., 2002). Nach jedem Spleißzyklus werden die U4 und U6 snRNAs einzeln freigesetzt und anschließend daraus wieder ein funktioneller U4/U6 di-snRNP gebildet. Für die Bildung des U4/U6 di-snRNP aus den einzelnen U4 und U6 snRNPs wird ein zusätzlicher Faktor, das p110 (SART3) Protein, benötigt (Bell et al., 2002; Rader und Guthrie, 2002). p110 bindet spezifisch an U6 snRNA, assoziiert jedoch nur transient mit U6 und U4/U6 snRNPs und verlässt den tri-snRNP vermutlich in einer späten Phase der Assemblierung; eventuell während des Einbaus des 20S U5 snRNPs.

Eine sehr wichtige Rolle für die U4/U6 di-snRNP und U5 snRNP Interaktion spielt das U4/U6-spezifische Protein hPrp31, für welches *in-vitro* gezeigt wurde, dass es notwendig für die **tri-snRNP Assemblierung** und für das Prä-mRNA Spleißen ist (Makarova et al., 2002). hPrp31 bindet spezifisch an das U5 spezifische Protein hPrp6 und bildet so vermutlich eine Brücke im tri-snRNP (Makarov et al., 2000; Makarova et al., 2002). Die zelluläre Lokalisierung des tri-snRNP Recyclings war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Einige Fakten deuteten darauf hin, dass die Cajal Bodies (CBs) diese Orte repräsentieren könnten (Lamond und Spector, 2003) (siehe dazu auch Abschnitt 2.3.1.1). Damit übereinstimmend wurde der Recyclingfaktor p110 auch in den CBs vorgefunden, der eine Rolle bei der Lokalisierung von U6 snRNPs in die Cajal Bodies spielt (Stanek et al., 2003).

2.3.1.4 Prp19-CDC5-Komplex und verwandte Proteine

Insgesamt werden vom Spleißosom mehr als 50 einzelne Proteine als stabile Komponenten der snRNPs rekrutiert (siehe Tabelle 1). Zusätzlich assoziiert noch eine große - bis zu Beginn dieser Arbeit unbekannte - Anzahl nicht-snRNP Proteine mit dem Spleißosom. Um die Frage nach dem Vorkommen dieser Proteine zu beantworten, wurden Studien zur Erfassung der gesamten Proteinkomposition des Spleißosoms durchgeführt.

Dazu wurden Spleißosomen affinitätsgereinigt und die Proteinzusammensetzung massenspektroskopisch bestimmt. Diese Studien wurden mit einer

Mischung verschiedener spleißosomaler Komplexe (einschließlich des mRNP) durchgeführt. Diese ersten Ergebnisse zeigten, dass die Zahl, der mit dem Spleißosom assoziierten Proteine, zwischen ~170 und ~300 liegt (Zhou et al., 2002). Während diese Befunde einerseits die komplexe Natur der Proteinkomposition des Spleißosoms widerspiegeln, überraschte andererseits die auffällig große Varianz in der Gesamtzahl assoziierter Proteine. Es wurde angenommen, dass eine Ursache darin liegen könnte, dass Mischungen unterschiedlicher spleißosomaler Komplexe untersucht worden waren.

Aus diesem Grunde wurde eine Reihe von Methoden zur Isolierung von Spleißosomen in definierten Stadien entwickelt. Mittels dieser Methoden konnten individuelle Spleißkomplexe aufgereinigt und massenspektroskopisch analysiert werden: A-Komplex, B Δ U1-Komplex – dies ist ein B-ähnlicher Komplex, dem das U1 snRNP fehlt –, B*-Komplex und C-Komplex (Hartmuth et al., 2002; Jurica et al., 2002; Makarov et al., 2002; Makarova et al., 2004). Der Vergleich des Proteoms der einzelnen Komplexe offenbarte die dynamische Eigenart der spleißosomalen Proteinkomposition (siehe Tabelle 2). Der Vergleich verdeutlichte außerdem die Stabilisierungs- und Destabilisierungsereignisse, die während der katalytischen Aktivierung des Spleißosoms erfolgen, und gab Hinweise auf mögliche Funktionen einzelner Proteine beim Prä-mRNA Spleißen.

Eine Anzahl aktueller Studien hat das Verständnis, der bei der katalytischen Aktivierung beteiligten Proteine und ihrer Rolle dabei, umfassend erweitert. Als sogenannter Prp19-CDC5-Komplex wurde eine Anzahl von Proteinen identifiziert, die mit dem Prp19 Protein einen stabilen Komplex bilden. Die 7 bis 9 Proteine des Prp19-CDC5-Komplexes (siehe Tabelle 2) spielen eine Schlüsselrolle bei der katalytischen Aktivierung des Spleißosoms (Chan et al., 2003; Deckert et al., 2006; Makarova et al., 2004; Tarn et al., 1993a; Tarn et al., 1993b).

Die Proteine des Prp19-CDC5-Komplexes und der assoziierten Faktoren wurden sowohl in aufgereinigten B-Komplexen als auch in A-Komplexen, aber nicht in H-Komplexen, nachgewiesen. (Behzadnia et al., 2006; Deckert et al., 2006). Dies zeigt, dass (i) der Komplex unabhängig vom U4/U6.U5 tri-snRNP mit Prä-mRNA interagiert, und dass (ii) die Assoziierung des Prp19/CDC5-Komplexes mit Prä-mRNA vom Spleißen abhängig ist (Behzadnia et al., 2006).

Tabelle 2. Die spleißosomale Proteinkomposition ist dynamisch. Vergleich des Proteoms spleißosomaler Komplexe. Das Vorkommen von Proteinen in den Komplexen A, B, BΔU1, B* und C ist durch farbige Rechtecke gekennzeichnet. Die hier dargestellten Komplexe wurden mit unterschiedlichen Methoden aufgereinigt. Sie wurden dennoch zusammengefasst, um einen Eindruck der dynamischen Struktur zu vermitteln (Bessonov et al., 2008).

Gen-Name	A	B	BΔU1	B*	C
Sm Proteine					
B	SNRPB				
D1	SNRPD1				
D2	SNRPD2				
D3	SNRPD3				
E	SNRPE				
F	SNRPF				
G	SNRPG				
U1 snRNP					
U1-70K	SNRP70				
U1-A	SNRPA				
U1-C	SNRPC				
U1 snRNP verwandt					
FBP11	FNBP3				
S164 (fSAP94)	RBM25				
17S U2 snRNP					
U2A'	SNRPA1				
U2B''	SNRPB2				
SF3a120	SF3A1				
SF3a66	SF3A2				
SF3a60	SF3A3				
SF3b195	SF3B1				
SF3b145	SF3B2				
SF3b130	SF3B3				
SF3b49	SF3B4				
SF3b14b/p14	SF3B14				
SF3b14b	PHF5A				
SF3b10	SF3B5				
17S U2 verwandt					
hPRP43	DHX15				
SPH45	RBM17				
SPF30	SMNDC1				
U2AF65	U2AF2				
U2AF35	U2AF1				
SPF31	DNAJ38				
hPRP5	DDX46				
SR140 (fSAPa)	SR140				
CHERP	CHERP				
PUR70	SJAHBP1				
SF3b125	DDX42				
A Proteine					
BUB3	BUB3				
MGC2803 (fSAP18)	MGC2803				
FLJ10839	CGAR1				
RBM10	RBM10				
SF1	SF1				
CDC2L2	CDC2L2				
RBM5/LUCA15	RBM5				
lat SF1	HTA15F1				
ZNF207	ZNF207				
SF4 (F23858)	SF4				
A/B Proteine					
RNPC2 (CAPER, fSAP59)	RNPC2				
TCERG1 (CA150)	TCERG1				
ILF3/FUS	FUS				
ELAV1 (HuR)	ELAVL1				
NRIP2	NRIP2				
PPP1CA	PPP1CA				
NIPP1	PPP1R8				
p72/DDX17	DDX17				
HCGN2	HCGN2				
DNAJ homolog (DNAJc6)	DNAJc6				
DDX9	DDX9				
INFAR	ILF3				
INF5	ILF2				
LOC124245 (hNHN1)	NHN1				
YB-1	YBX1				
ASR2B	ARS2				
p68 (DDX5)	DDX5				
SR Proteine					
SF2/ASF	SFRS1				
9GB	SFRS7				
SRp20	SFRS3				
SRp30c	SFRS9				
SRp38	FUSIP1				
SRp40	SFRS5				
SRp55	SFRS6				
SRp75	SFRS4				
SC35 (SFRS2)	SFRS2				
hTra-2 alpha	TRA2A				
hTra-2 beta/SFRS10	SFRS10				
SR verwandte Proteine					
FLJ10154	FLJ10154				
SRm160	SRRM1				
SRm300	SRRM2				
hnRNP					
hnRNP A0	HNRPA0				
hnRNP A1	HNRPA1				
hnRNP A3	HNRPA3				
hnRNP A8	HNRPAB				
hnRNP A2/B1	HNRPAB1				
hnRNP C	HNRPC				
hnRNP F	HNRPFF				
hnRNP G	RBMX				
hnRNP H2	HNRPB				
hnRNP L	HNRL				
hnRNP M	HNRM				
hnRNP Q	SYNCRIP				
hnRNP R	HNRR				
hnRNP U	HNRRU				
PCBP1	PCBP1				
RALY	RALY				
cap-binding-Komplex					
CBP20	NCBP2				
CBP80	NCBP1				
U5					
220K	PRPF8				
200K	ASCC3L1				
116K	EFTUD2				
40K	WDR57				
100K	C20orf14				
15K	TXNLA				
100K	DDX23				
92K	CDZBP2				
LSm Proteine					
LSm2	LSM2				
LSm3	LSM3				
LSm4	LSM4				
LSm6	LSM6				
LSm7	LSM7				
LSm8	LSM8				
U4/U6					
90K	PRPF3				
60K	PRPF4				
20K	PIH1				
61K	PRPF31				
15.5K	NHP2L1				
U4/U6.U5					
110K	SART1				
65K	USP39				
27K	RY1				
hSnu23					
ZMAT2	ZMAT2				
hPRP38					
PRPF38A	PRPF38A				
TFP11					
TFP11	TFP11				
hPRP19/CDC5L Komplex					
hPRP19	PRPF19				
CDC5L	CDC5L				
SPF27	BCAS2				
PRL1	PLRG1				
CCAP1 (hsp73)	HSPAB				
CCAP1 (hsp149, AD-002)	HSPC148				
catenin, beta-like 1 (CTNBL1)	CTNBL1				
Npw38BP	WBP11				
Npw38	PQB1				
hPRP19/CDC5L verwandt					
PRCC	PRCC				
RBM21 (fSAP47)	RBM22				
hSVF1 (XAB2)	XAB2				
CRNKL1/hSVF3	CRNKL1				
hIsy1 (fSAP133)	KIAA1160				
SKP1	SKIWI				
Cyp-E	PIE				
PP1ase-like 1 (PPL1)	PPL1				
KIAA0360 (fSAP164)	AQR				
G10 (fSAP17)	G10				
RES Komplex					
SNIP1	SNIP1				
MGC13125 (fSAP71)	MGC13125				
CGI-79	RBMX2				
B/B* Proteine					
FBP21	WBP4				
matrin 3	MATR3				
MGC20398	CCDC16				
MTA1	MTRAP1				
RED	IK				
hSmu-1 (fSAP57)	SMU1				
PP1L2/Cyp-60	PP1L2				
hSp27	HSPB1				
UBL5	UBL5				
MGC23918	CCDC12				
LOC84081/DKFZp434k1421	DKFZp434k1421				
hPRP2	DHX16				
hPRP4-Kinase	PRPF4B				
C Proteine					
Abstrakt	DDX41				
DBPA	CSDA				
HSP70	HSPA1A				
KIAA0073 (Cyp64)	PPWD1				
KIAA1604 (fSAP7b)	KIAA1604				
PP1ase-like 3b	PPL3				
GCI p29 (fSAP29)	SYF2				
DDX35	DHX35				
cactin	C19orf29				
NOSIP	NOSIP				
FRG1	FRG1				
MGC4238	MORG1				
GPKOW	GPKOW				
C16orf55	C16orf55				
RACK1	GNB2L1				
TIP-49	RUVBL1				
DKFZP586G0120	FAM32A				
Q9BRR8	GPATC1				
hPRP22	DRX8				
hPRP17	CDC40				
hPRP16	DHX38				
hSLU7	SLU7				
EJC/mRNP					
eIF4A3	DDX48				
Misoh	MAGOH				
Y14	RBM8A				
Pinh	PINH				
RNPS1	RNPS1				
Acinus (fSAP152)	ACIN1				
Aly/REF	THOC3				
ELG	HSA277841				
DDX3	DDX3X				
THOC					
THOC1	THOC1				
THOC2	THOC2				
THOC3	THOC3				
Methylosom					
MEP50	WDR77				
PRMT5 (SKB1)	SKB1				
PP1L4	PP1L4				

Es wurden außerdem 10 weitere Proteine identifiziert, die physikalisch mit dem Prp19-CDC5-Komplex assoziieren (Makarova et al., 2004). Diese werden als Prp19-CDC5-verwandte Proteine bezeichnet (Deckert et al., 2006).

Welche Rolle die einzelnen Komponenten des Prp19-CDC5 -Komplexes und verwandten Proteine bei der Aktivierung des Spleißosoms spielen, und welche Proteine des A-Komplexes eine Bindeplattform für diese Komponenten darstellen, war zu Beginn dieser Arbeit noch weitgehend unbekannt.

2.3.2 Das minore oder U12-abhängige Spleißosom

In den Prä-mRNAs höherer Eukaryonten existiert neben den abundanten U2-abhängigen Introns eine zweite, sehr seltene Klasse von Introns, welche in weniger als 0,5% aller humanen Transkripte vorkommt (Patel und Steitz, 2003), und sich insbesondere durch hoch konservierte Konsensussequenzen auszeichnen (Burge et al., 1998). Diese U12-abhängigen Introns werden von dem minoren oder U12-abhängigen Spleißosom herausgeschnitten. Dieses setzt sich aus den snRNPs U11, U12, U4atac/U6atac und U5, sowie aus nicht-snRNP-assoziierten Spleißfaktoren zusammen (Patel und Steitz, 2003). Mit Ausnahme von U5 unterscheiden sich somit alle snRNPs des minoren Spleißosoms von jenen des U2-abhängigen Komplexes. In zahlreichen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die minoren U11, U12 und U4atac/U6atac snRNPs die funktionellen Gegenstücke der majoren U1, U2 und U4/U6 snRNPs sind (Hall und Padgett, 1996; Incorvaia und Padgett, 1998; Kolossova und Padgett, 1997; Tarn und Steitz, 1996a; Tarn und Steitz, 1996b; Yu und Steitz, 1997) und ebenfalls aus einer, beziehungsweise zwei U snRNAs und zahlreichen Proteinen bestehen (Will und Lührmann, 2001).

2.3.2.1 Die minoren U snRNAs

Die RNA-Komponenten des U12-abhängigen Spleißosoms liegen im Vergleich zu den majoren snRNAs in HeLa Zellen in etwa 100- bis 500-fach geringerer Konzentration vor (Burge et al., 1999).

Die minoren U11, U12 und U4atac/U6atac snRNAs besitzen, wie ihre funktionellen Gegenstücke im majoren Spleißosom, die gleichen

Eigenschaften bezüglich 5'-Kappenstruktur, Sm- bzw. LSm-Bindungsstelle und Typ der transkribierenden RNA Polymerase (Tarn und Steitz, 1996a; Yu et al., 1999). Jedoch werden die minoren snRNAs nur in geringem Maße posttranskriptionell modifiziert (Massenet und Branlant, 1999). Die Konservierung der Primärstruktur der minoren snRNAs ist im Vergleich zu ihren Gegenstücken des majoren Spleißosoms gering (Tarn und Steitz, 1996a). Dennoch lassen sich die einander entsprechenden RNAs in sehr ähnliche Sekundärstrukturen falten (Montzka und Steitz, 1988; Tarn und Steitz, 1996a).

2.3.2.2 Die Assemblierung des minoren Spleißosoms

Die Assemblierung des U12-abhängigen Spleißosoms verläuft prinzipiell analog jener des U2-abhängigen Spleißosoms (Tarn und Steitz, 1996a). Die Hauptunterschiede im Vergleich zur Assemblierung des U2-abhängigen Spleißosoms liegen in den frühen Stadien der Assemblierung (Patel und Steitz, 2003). U11 und U12 snRNPs binden an U12 Prä-mRNA als vorgefertigter di-snRNP Komplex, der gleichzeitig die 5'-Spleißstelle und die Sequenz um den Verzweigungspunkt erkennt. Folglich bilden U11/U12-Komponenten eine molekulare Brücke innerhalb des U12-abhängigen Prä-Spleißosoms, die beide Enden eines Introns verbinden (Will et al., 2004).

2.3.2.3 Proteinzusammensetzung der minoren U snRNPs

Analog zu den Bestandteilen des U2-abhängigen Spleißosoms kommen auch die humanen U11, U12 und U4atac/U6atac snRNAs in RNA-Protein-Partikel vor, die durch charakteristische Sedimentationskoeffizienten gekennzeichnet sind. Dabei bilden die U11 und U12 snRNPs in HeLa Kernextrakt einen di-snRNP-Komplex, der in Glyzeringradienten im 18S Bereich sedimentiert (Montzka und Steitz, 1988). Daneben kann eine signifikante Menge 12S U11 Monopartikel und ein geringerer Anteil an 15S U12 Monopartikel detektiert werden (Montzka und Steitz, 1988). Die U4atac und U6atac snRNAs kommen miteinander basengepaart in einem 13S di-snRNP-Komplex vor (Tarn und Steitz, 1996b) und treten dem Prä-Spleißosom zur selben Zeit bei wie U5 (Tarn und Steitz, 1996b). Dies lässt vermuten, dass der

13S U4atac/U6atac di-snRNP, in Analogie zu U4/U6, mit U5 zu einem trimeren Komplex assoziiert.

Tabelle 3. Proteinzusammensetzung der humanen 18S U11/U12 und 12S U11 snRNP Partikel im Vergleich zu den majoren snRNPs U1 und U2. Die Farben verdeutlichen die Zuordnung der Proteine zu den verschiedenen U snRNPs bzw. zur Gruppe der gemeinsamen Sm-Core Proteine (Schneider, 2004).

U snRNP Proteine		app. M _r kDa	12S U1	17S U2	18S U11/U12	12S U11	
gemeinsame Proteine	B/B'	28/29	●	●	●●	●	
	D1	15	●	●	●●	●	
	D2	16	●	●	●●	●	
	D3	17	●	●	●●	●	
	E	10	●	●	●●	●	
	F	9	●	●	●●	●	
	G	8	●	●	●●	●	
spezifische Proteine	U1 snRNP	70K	70	●			
		A	34	●			
		C	22	●			
	U2 snRNP	A'	30		●		
		B''	29		●		
		SF3a120	120		●		
		SF3a66	66		●		
		SF3a60	60		●		
		SF3b155	160		●	●	
		SF3b145	150		●	●	
		SF3b130	120		●	●	
		SFb49	50		●	●	
		SF3b14b	15		●	●	
		p14	15		●	●	
		SF3b 10	9		●	●	
		hPrp5	140		●		
		SR140	140		●		
	CHERP	130		●			
	hPrp43	90		●	●		
	SPF45	50		●			
	SPF31	33		●			
	SPF30	31		●			
	U11/U12 snRNP	65K	65			●	
		59K	59			●	●
		48K	48			●	●
		35K	35			●	●
		MADP-1	31			●	
25K		25			●	●	
20K	20			●			

Eine Anzahl von Proteinen kommt sowohl im U2- als auch im U12-abhängigen Spleißosomen vor, einschließlich der U4/U6.U5 tri-snRNP Proteine (Luo et al., 1999; Nottrott et al., 2002; Schneider et al., 2002), den Proteinen des U2-assoziierten SF3b-Komplex (Will et al., 1999) und der SR-Proteine (Hastings und Krainer, 2001).

Zu Beginn dieser Arbeit war in unserem Labor die Proteinzusammen-

setzung der minoren Partikel gerade aufgeklärt worden. Neben den gemeinsamen Proteinen wurden sieben neue U11/U12 snRNP spezifische Komponenten identifiziert, von denen vier mit U11 assoziiert sind (Will et al., 2004). Über die Funktion dieser Proteine beim Prä-mRNA Spleißen war jedoch nichts bekannt.

2.4 snoRNPs

Der Nukleolus einer eukaryotischen Zelle enthält als Ort der Ribosomen-Biogenese hunderte kleine nukleoläre Ribonukleoprotein Partikel (snoRNP, engl. *small nucleolar ribonucleoprotein*). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Modifizierung und Prozessierung von Prä-ribosomalen RNAs (Prä-rRNAs) und der spleißosomalen U6 snRNA (Bachellerie et al., 2002; Decatur und Fournier, 2003; Kiss, 2002). Die meisten dieser Partikel werden entweder als C/D- oder H/ACA-Typ klassifiziert.

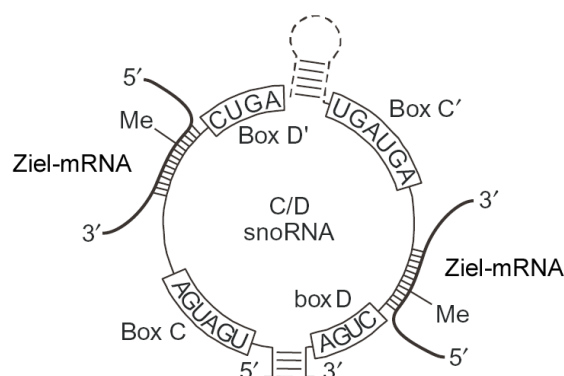


Abbildung 5. Struktur und Funktion von snoRNAs. Schematische Darstellung der C/D-Typ snoRNA Struktur. Die RNA-Komponente des Partikels spielt eine zentrale Rolle für die RNP-Bildung, den intra-zellulären Transport und die Funktion. Die RNA trägt Bindestellen für spezifische Proteine und beinhaltet eine oder mehrere Sequenzabschnitte, die mit Substrat RNA(s) über Watson-Crick-Basen-Paarungen interagieren können. In zentralen Bereichen vieler snoRNAs finden sich weitere C- und D-ähnliche Motive, sogenannte C'- und D'-, Motive (Kiss-Laszlo et al., 1998). Für die kanonischen C-Box- und D-Box-Sequenzen wird eine Faltung in ein sogenanntes „kink“ oder K-Turn Motif vorausgesagt (Henras et al., 2004). Dieses Element findet sich u.a. in der 5'-Haarnadelschleife der U4 snRNA, an die das 15.5K Protein bindet (Nottrott et al., 1999; Vidovic et al., 2000). ‚Me‘ kennzeichnet die zur Methylierung ausgewählten Nukleotide der Ziel-mRNA (Abb. nach Filipowicz, 2002).

Die C/D-Typ snoRNAs enthalten die konservierten C-Box (RUGAUGA, R=Purin) und D-Box (CUGA) Sequenzmotive und vermitteln die 2'-O-Methylierung innerhalb großer Ziel-RNA Moleküle (Cavaille et al., 1996; Kiss-

Laszlo et al., 1996; Kiss-Laszlo et al., 1998; Tycowski et al., 1996).

snoRNPs zeigen einige Homologien zu snRNPs: Beide Partikel bestehen aus einer RNA-Komponente und einem Multiprotein-Komplex. Die RNA-Komponente durchläuft nach der Transkription durch Pol II verschiedene Prozessierungsschritte, die Protein-Komponenten assemblieren auf der RNA, und die Reifungsschritte erfolgen im Zytoplasma und in den Cajal Bodies.

2.4.1 C/D-Typ snoRNP

Die C/D-Typ snoRNPs besitzen vier gemeinsame Haupt-Proteine: Fibrillarin (eine Methyltransferase), die nukleolaren Proteine NOP56 und NOP5/NOP58, und 15.5K (NHPX oder NHP2L1 - non-histone chromosome protein 2-like 1). Die Haupt-C/D-Box Proteine binden an das C/D-Box-Motiv, welches essentiell für die Biogenese und Funktion der C/D-Box snoRNPs ist (Tran et al., 2003).

2.4.2 Expression der snoRNAs

Die meisten snoRNA Gene der Säuger, z.B. U14, lokalisieren in Introns Protein-kodierender Gene. Zur Erzeugung funktioneller snoRNAs werden diese aus entzweigten Intron-Lariaten herausgeschnitten und durch exonukleolytischen Abbau der nicht-snoRNA Sequenzen prozessiert. In einem zweiten vom Spleißen unabhängigen Reaktionsweg werden snoRNAs aus den Introns durch Endonukleasen herausgeschnitten und die reifen Enden exonukleolytisch erzeugt (Filipowicz und Pogacic, 2002). Einige snoRNAs, z.B. U3, U8 und U13, werden als unabhängige Einheit durch Polymerase II transkribiert. Diese tragen eine kurze Extension am 3'-Ende und 5' eine m⁷G - Kappenstruktur, die während der Reifung hypermethyliert wird (Filipowicz und Pogacic, 2002).

2.4.3 Biogenese der U3 und U8 C/D-Box snoRNPs

Die U3 und U8 snoRNAs sind essentiell für die Prozessierung von rRNAs (Terns und Terns, 2002). Die U3 snoRNA ist mit einer Anzahl weiterer U3-spezifischen Proteine assoziiert (Granneman und Baserga, 2004). Das U3 snoRNP Monomer enthält jedoch nur die vier Haupt-Proteine und das hU3-55K Protein (Watkins et al., 2000). Es wird angenommen, dass die restlichen U3-

spezifischen Proteine mit dem U3 snoRNP als Teil des rRNP-Prozessierungskomplex assoziieren (Granneman et al., 2002).

Die snoRNP-Biogenese erfolgt vermutlich in zwei Phasen: In der ersten Phase wird das Haupt-snoRNP assembliert und die snoRNA im Nukleoplasma prozessiert. Im Verlauf der Prozessierung wird die m⁷G-Kappe zu einer m³G-Kappe hypermetyliert und das verlängerte 3'-Ende entfernt (Terns und Terns, 2002). Vermutlich erfolgen diese Schritte der Reifung in den Cajal Bodies. Dies wird angenommen, da sowohl U3 und U8 snoRNA, als auch die Haupt-snoRNP Proteine Fibrillarin, Nop56 und Nop58, der snoRNP Reifungsfaktor Nopp140 und die vermutete Cap-Methyltransferase hTGS1 partiell in den Cajal Bodies angereichert sind (Boulon et al., 2004; Verheggen et al., 2002).

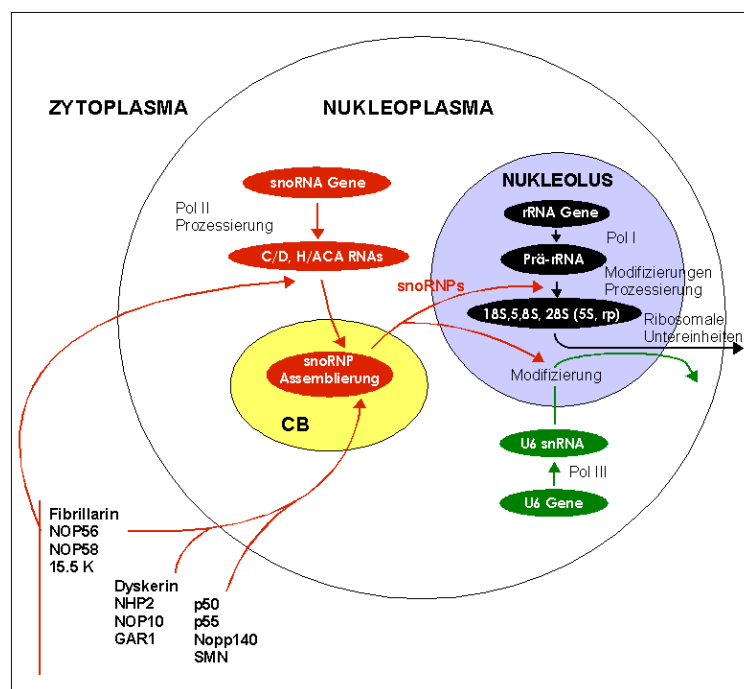


Abbildung 6. Biogenese und Funktion von snoRNPs. snoRNA Gene werden durch RNA Polymerase II transkribiert. Frühe snoRNA Prozessierungsschritte erfolgen vermutlich im Nukleoplasma. Die abschließende Prozessierung und die Assemblierung laufen vermutlich in den Cajal Bodies ab. snoRNAs akkumulieren im Nukleolus (Rot) und vermitteln die 2'-O-Methylierung und Pseudouridylierung der 18S, 5.8S und 28S rRNAs (Schwarz), der U6 snRNA (Grün) und anderer zellulärer RNAs. Im Nukleolus tragen prozessierende C/D- und H/ACA-Box snoRNPs zur Spaltung von Prä-rRNA bei. Biogenese und Transport durch verschiedene zelluläre Kompartimente wird möglicherweise durch die Proteine p50, p55, SMN und Nop140 unterstützt. (Abbildung nach Filipowicz, 2002 verändert).

In der zweiten Biogenese-Phase wird der zusammengelagerte snoRNP-

Komplex in den Nukleolus transportiert (Narayanan et al., 1999a; Narayanan et al., 1999b; Verheggen et al., 2002).

Die Haupt-Proteine binden an das C/D-Box Motiv. Die Bindung des 15.5K an das K-Turn Motiv (Kuhn et al., 2002; Szewczak et al., 2002; Szewczak et al., 2005; Watkins et al., 2000; Watkins et al., 2002) ist essentiell für die Rekrutierung weiterer C/D-Typ snoRNP Proteine (Watkins et al., 2002). Die Bildung des Haupt-C/D-Box-Komplexes wird für die nukleolare Lokalisierung benötigt (Verheggen et al., 2001; Watkins et al., 2002).

Des Weiteren werden in Hefe NOP58 und 15.5K (in Hefe Snu13p) für die Akkumulation und Stabilität von allen C/D-Box snoRNAs benötigt (Lafontaine und Tollervey, 1999; Watkins et al., 2000). Folglich spielen die Haupt-Proteine eine essentielle Rolle bei der Biogenese und Akkumulation der C/D-Box snoRNPs. Es ist jedoch unklar, ob der Assemblierungsprozess spontan abläuft oder ob er *in vivo* Hilfsfaktoren benötigt, wie dies bei spleißosomalen snRNPs der Fall ist (Yong et al., 2004).

In Hefe wurde für eine Reihe von Proteinen eine Verbindung zur Prozessierung der unreifen snoRNA nachgewiesen. Darunter die Proteine TGS1 (Verheggen et al., 2002), La, LSM und das Exosom, Faktoren, die an der Entfernung der 3' Extension beteiligt sind (Kufel et al., 2003). Weiter wird für die Proteine SMN, Nopp140, TIP48 und TIP49 eine Rolle bei der snoRNP Assemblierung und/oder Lokalisierung angenommen (Jones et al., 2001; King et al., 2001; Newman et al., 2000; Pellizzoni et al., 2001; Verheggen et al., 2001; Watkins et al., 2002; Yang et al., 2000).

Zu Beginn dieser Arbeit war in vielen Fällen nicht geklärt, ob und wann diese Proteine *in vivo* an den snoRNP binden und welche Aufgabe sie ausüben.

2.5 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde in unserem Labor gezeigt, dass durch Einschleußen von siRNAs in Säugerzellen ein sequenzspezifischer Abbau der Ziel-mRNA erreicht werden kann, deren Sequenz der siRNA-Sequenz entspricht. Zeitgleich wurden neue Erkenntnisse zur Proteinkomposition des Spleißosoms gewonnen. So zeigten massenspektroskopische Analysen

isolierter spleißosomaler Komplexe aus HeLa zeigten, dass die Zahl der Proteine, die mit dem humanen Spleißosom assoziieren, bei mehr als 180 liegt. Die Mehrzahl dieser Proteine sind keine Komponenten der U snRNPs (uridin rich small nuclear ribonucleoprotein particles). Über die Funktionen der nicht snRNP-Komponenten und ihre Bedeutung für das Spleißen war in den meisten Fällen nichts bekannt.

Hier bot die RNAi Methode einen interessanten Ansatz, durch funktionelle Studien ex vivo Hinweise auf die mögliche Rolle dieser Proteine beim Prä-mRNA Spleißen zu erhalten. Ziel dieser Arbeit war deshalb das Potenzial von RNAi zur funktionellen Genanalyse in Säugerzellen und ihre Anwendbarkeit in Kombination mit molekularbiologischen und fluoreszenz-mikroskopischen Methoden zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Teile:

i) Im ersten Teil der Arbeit sollten die Grundlagen für die Bereitstellung einer größeren Anzahl von siRNAs gelegt werden. Um dies zu erreichen sollten zunächst Algorithmen für die siRNA-Auswahl entwickelt werden. Danach war beabsichtigt die chemische Synthese von siRNAs im Labor zu etablieren.

ii) Im zweiten Teil der Arbeit sollten Methoden für einen RNAi-Screen mittleren Durchsatzes zur funktionellen Analyse von RNA-prozessierenden Proteinen entwickelt werden. Die Methoden sollten erste Hinweise auf die Bedeutung der Proteine für die Zelle geben und Indizien für eine mögliche Rolle der Proteine beim Prä-mRNA Spleißen liefern.

iii) Im letzten Teil der Arbeit sollten exemplarisch unterschiedliche RNA-Proteinkomplexe untersucht werden. Hier sollte RNAi genutzt werden, um Hinweise auf mögliche Funktionen einiger Proteine bei der U4/U6.U5 tri-snRNP Assemblierung, der U3 snoRNA Biogenese und beim U12-abhängigen Spleißen zu erhalten. Auch die Frage nach der zellulären Lokalisierung der tri-snRNP Assemblierung sollte untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Feinchemikalien, Chemikalien und Medien

2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
3,3'-Dihexaoxacarbocyanine iodide DiOC6(3)	Invitrogen, Karlsruhe
5-(Ethyl-thio)-1H-tetrazol	American International Chemical, USA
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acetonitril (<i>Amidite-Diluent</i>)	Proligo, Hamburg
Acrylamidlösung (gebrauchsfertig, Sequa Gel Kit)	National Diagnostics, USA
Agarose (electrophoresis grade)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Agarose (NuSieve GTG)	BMA / Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bradford-Farbstofflösung	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CASYton (isotonische Kochsalzlösung)	Schärfe System, Reutlingen
Dimethyldichlorsilan	Applichem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DMF (Dimethylformamid)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
DNA-Molekulargewichtsmarker	Promega, Mannheim
DNA-Molekulargewichtsmarker	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol; 100 mM)	Promega, Mannheim
Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
EDTA (Dinatriumsalz Dihydrat)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Boehringer, Mannheim
Fötale Rinderserum (FBS)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Glykogen	Roche, Mannheim
Lachsspermien-DNA (10 mg/ml), sonifiziert	Stratagene, Amsterdam, NL
LB-Agar	BIO101, USA
LB-Flüssigmedium	BIO101, USA
Magermilchpulver, instant	Heirler, Radolfzell
Markerproteine für Elektrophorese	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe

Methylamin	Merck, Darmstadt
Molekularsieb 4Å	Applichem, Darmstadt
Mowiol 4-88	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Narrow Mouth PassPort IP2 Flaschen aus HDPE	Nunc Nalgene,
OptiMEM 1 (serum-freies Medium)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Penicilin / Strptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphoramidite dT (A-1000-dT-10)	Dharmacon Research, USA
Phosphoramidite rA,rU,rG,rC 1,0 mmole(A-2000-rX-10)	Dharmacon Research, USA
Poncaeu S	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), acetyliert	Sigma, Taufkirchen
Roti-Load 1 (4x)	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol-Chloroform	Roth, Karlsruhe
S ₂ Na ₂ (Disodium-2-carbamoyl-2-cyanoethylen-1,1-dithiolate trihydrat)	Dharmacon Research, USA
Säule dT 0,2 µmol (C-1020-dT-02)	Dharmacon Research, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine)	Sigma-Aldrich, Seelze
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
tRNA <i>E.coli</i>	Boehringer, Mannheim
Trypsin-EDTA	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Wasserbadkonservierer	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Fluka, Seelze

Alle hier nicht aufgeführten Standardchemikalien, organischen Substanzen und Lösungsmittel (Reinheitsgrad p.a.) wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) oder Fluka (Seelze) bezogen.

3.1.2 Antiseren und monoklonale Antikörper

monoklonaler Lamin A/C-Antikörper (636.23)	(Osborn)
monoklonaler Vimentin-Antikörper (V9)	(Osborn et al, 1984)
monoklonaler Emerin-Antikörper (4G9)	Novocastra/Germany
monoklonaler Coilin-Antikörper (5P10π)	M. Carmo-Fonseca, (Almeida et al., 1998)
monoklonaler SC35-Antikörper	Sigma, Taufkirchen/Germany
anti-SF3b14a Kaninchenserum („Bill“, Pep24.1)	AG Lührmann (Will et al., 2001)
anti-hPrp3 Kaninchenserum („Berti“)	AG Lührmann (Laubert et al., 1997)

anti-hPrp4 Kaninchenserum („Roy“)	AG Lührmann (Lauber <i>et al.</i> , 1997)
anti-hPrp31 Kaninchenserum („4825“)	AG Lührmann (Makarova <i>et al.</i> , 2002)
anti-hPrp6 Kaninchenserum („Josy“)	AG Lührmann (Makarov <i>et al.</i> , 2000)
anti-p110 Kaninchenserum („SART3-C“)	AG Lührmann (Schaffert <i>et al.</i> , 2004)
anti-TIP 49 Kaninchenserum	Stuart Maxwell (Newman <i>et al.</i> , 2000).
anti-fibrillarin (ab5821)	AbCam, Cambridge/United Kingdom
anti-La Kaninchenserum	Ger Pruijn (Prujin <i>et al.</i> , 1995)
anti-hRrp46 Kaninchenserum	Ger Pruijn (Brouwer <i>et al.</i> , 2001)
anti-SMN Kaninchenserum	Utz Fischer (Liu und Dreyfuss, 1996)
anti-Nopp 140 Kaninchenserum	Tom Meier (Meier und Blobel, 1992)
anti-Phax Kaninchenserum	Iain Mattaj (Ohno <i>et al.</i> , 2000)
anti-TGS1 Kaninchenserum	Remy Bordonne (Verheggen <i>et al.</i> , 2002)
anti-Nop58 Kaninchenserum	AG Lührmann (Lyman <i>et al.</i> , 1999)
anti-NOP56 Kaninchenserum	AG Lührmann (Watkins <i>et al.</i> , 2002)
anti-TIP48 Kaninchenserum	AG Lührmann (Watkins <i>et al.</i> , 2002)
anti-LSm1 Kaninchenserum	AG Lührmann (Ingelfinger <i>et al.</i> , 2002)
anti-LSm4 Kaninchenserum	AG Lührmann (Ingelfinger <i>et al.</i> , 2002)
anti-LSm8 Kaninchenserum	AG Lührmann (Achsel <i>et al.</i> , 1999)
Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, Peroxidase-gekoppelt	Jackson Immunoresearch, USA
Schwein-anti-Maus Antikörper, Peroxidase-gekoppelt	Dako, Copenhagen/Denmark
Ziege-anti-Maus Antikörper, Alexa 488-gekoppelt	Molecular Probes, USA
Ziege-anti-Maus Antikörper, Alexa 647-gekoppelt	Molecular Probes, USA
Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, Texas Red-gekoppelt	Molecular Probes, USA
Ziege-anti-Maus Antikörper, FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg/Germany
Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, Rhodamine-gekoppelt	Dianova, Hamburg/Germany

Die Referenzen zu o.g. Antikörpern finden sich in folgenden Veröffentlichungen: (Harborth *et al.*, 2001; Schaffert *et al.*, 2004; Watkins *et al.*, 2004).

3.1.3 Enzyme und Enzyminhibitoren

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNasin (40 U/μl)	Promega, Mannheim
RQ1 DNase (1 U/μl)	Promega, Mannheim
SP6 RNA Polymerase (20 U/μl)	Promega, Mannheim
T7 RNA Polymerase (20 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt
T7 RNA Polymerase (20 U/μl)	eigene Herstellung
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	eigene Herstellung
Superscript, Reverse Transkriptase	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Cloned Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	Stratagene, Amsterdam, NL

T4 DNA-Ligase

New England Biolabs, Frankfurt

3.1.4 Nukleotide

Desoxynukleosid-5'-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dUTP; je 100 mM)

Radionukleotide: [α - 32 P] dATP, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml

Alle Nukleotide wurden von Amersham Pharmacia, Freiburg bezogen

3.1.5 siRNA-Oligonukleotide

siRNA-Oligonukleotide wurden entweder im Hause synthetisiert, oder von Qiagen (Hilden) und von Ambion (Houston, USA) bezogen (Details siehe 3.2.5.1). Hier sind nur siRNA-Oligonukleotide gegen Faktoren des Prp19/CDC5-Komplexes und der damit verwandten Komponenten, und siRNAs aus den Arbeiten Watkins (2004), Schaffert (2004) und Will (2004) aufgelistet. Die siRNAs aus der Arbeit Hossbach (2006) sind den Abbildungen im Abschnitt 4.1.3 zu entnehmen. Eine Zusammenstellung aller für die Proliferationsanalyse eingesetzten siRNA-Oligonukleotide befindet sich im Anhang (Tab. A-2).

Ziel-Protein/Ziel-Gen	siRNA	23mer mRNA-Ziel-Sequenz (5'-3')	Ziel-region
hPRP19 / PRPF19	JW1	GGGCACGGATGTCCAGATCTACA	ORF
hPRP19 / PRPF19	JW2	TGGGACATTCACATCATTCTCACT	3'UTR
CDC5L	KK1	AAGGAACTTCAACATAGATATGC	ORF
CDC5L	KK2	AAGGCTGAAACTGATGTTTATCT	3'UTR
SPF27 / BCAS2	KN1	TCGCAGATACCGACCTACTAAGA	ORF
SPF27 / BCAS2	KN2	AAGACAGTGACTGTACAGTTATC	3'UTR
PRL1 / PLRG1	KR1	TGGAGAAGACAAAACAAGTAAAAT	ORF
PRL1 / PLRG1	KR2	CAGTCTGAAAGTCGATTACTAAC	ORF
hsp73 / HSPA8	NF1	AAGCGAGCGTGCCATGACAAAAG	ORF
hsp73 / HSPA8	NF2	AAGGACCTAAAATTCGTAGCAAAT	3'UTR
AD-002 / HSPC148	NC1	AGGGATCGTCCAACCCGAGAACA	ORF
AD-002 / HSPC148	NC2	TTGATAATGGACTTGGGAATAGG	3'UTR
CTNBL1	ND1	CGGCCGCTATCGGGAAGAAGAAA	ORF
CTNBL1	ND2	AGGATCAGTTTCTACACAACCTCT	3'UTR
Npw38BP / WBP11	JS1	TGGGACGGAGATCTACATCATCC	ORF
Npw38BP / WBP11	JS2	TCCCACTGACCTAAACTTTCAGT	3'UTR
Npw38 / PQBP1	JT1	GCCGAGGACTATGACGATGATCC	ORF
Npw38 / PQBP1	JT2	TAAAAGCTTCTCTGGTGATCCTGC	3'UTR
PRCC	q147-1	CTGGTGCTTATTATCAGTTTAAAG	ORF
PRCC	q147-2	AGGGATGTCTGTTGAAATAAAAAC	3'UTR
RBM22	KA1	GAGGAGAGGAATGTCCATACAGA	ORF
RBM22	KA1	ATGGAGCTGTGTACCATCGAAGA	3'UTR
hSYF1 / XAB2	KS1	GCGGAACCAATTCCTGTCAAAT	ORF
hSYF1 / XAB2	KS2	CAGCTACGTTTGTACATCAAAAA	3'UTR
hSYF3 / CRNKL1	JX1	AAGAAGGAAGTTTGACTAAATGC	ORF

Ziel-Protein/Ziel-Gen	siRNA	23mer mRNA-Ziel-Sequenz (5'-3')	Ziel-region
hSYF3 / CRNKL1	JX2	CTCCAGAGTGGTTGAGTTTGTAA	3'UTR
hlsy1 / KIAA1160	KT1	CTGCAGGCCCAAAGTGAAGAAGC	ORF
hlsy1 / KIAA1160	KT2	AGGGGAGAAGAATCAATTAGTGG	3'UTR
SKIP / SNW1	KU1	AAAGACAAGAGTAGCCTTAGAAA	ORF
SKIP / SNW1	KU2	AGGCACAGGTCTCTCCAAAGTGA	3'UTR
Cyp-E / PPIE	KD1	CGGGACCAGGTCTACTATCCATG	ORF
Cyp-E / PPIE	KD2	AAGCAGCATTGGGATATGTGCC	3'UTR
PPIL1	KE1	ATGAACCATAATGTGTCTTCTTG	3'UTR
PPIL1	KE2	TGTGAGCCCTCTTAACTCTGTGC	3'UTR
KIAA0560 / AQR	KC1	TTCAATCAGAAGAGCAAATAACC	3'UTR
KIAA0560 / AQR	KC2	AAGAAGAGGACAGAATATACTGG	3'UTR
KIAA0560 / AQR	q110-1	CTGAGTGTGTCTGTAATCATACC	3'UTR
KIAA0560 / AQR	q110-2	AAGGAGCATGGCAGTCAAAAA	3'UTR
G10 / BUD31	NA1	CAGCAGAGAACTCTATGAATATT	ORF
G10 / BUD31	NA2	GAGCCAACACTGGATGAATTAGA	ORF
20K / ZMAT5	BN3	AAGCCCGGTTCTGCTACGCCCC	3'UTR
20K / ZMAT5	BN4	GAGGCTCCGAGACCATCTGCCCA	3'UTR
25K / C16orf33	CC2	GAATCATCGTGCCTCTTTCACAG	ORF
25K / C16orf33	CC4	AAAGGACGTTGTGGTGGCCTCAC	ORF
35K / U1SNRNPBP	BS1	AAGGGTGGATCCCTCGGCGACTT	ORF
35K / U1SNRNPBP	BS2	GAGGCCCAACAGCAGAACCCTCAA	3'UTR
59K / PDCD7	BX1	AAGCAGCCGCTGATGGCGTACTA	ORF
59K / PDCD7	BX3	TAGGTGAACCTGAGGTTTTTACCA	3'UTR
Prp8 / PRPF8	CT1/q138-1	AAGCCCATCAACGGAGCCATCTT	ORF
Luciferase	BB1	CACGTACGCGGAATACTTCGAAA	ORF
TIP49 / RUVBL1	DE3	AAGGAACCAACAGTTGAAACTG	ORF
TIP49 / RUVBL1	DE4	GAGTCTTCTATCGCTCCCATCGT	ORF
TIP48 / RUVBL2	DD3	GAGACCATCTACGACCTGGGCAC	ORF
TIP48 / RUVBL2	DD4	GAGAGTGACATGGCGCCTGTCTT	ORF
NOP56 / NOL5A	EJ2	CAATATGATCATCCAGTCCATTA	ORF
NOP58 / NOP5	EK1	CAAGCATGCAGCTTCTACCGTTC	ORF
Fib1 / FBL	EN2	CAGTCGAGTTCTCCACCGCTCT	ORF
La / LARP3 / SSB	ER2	GAATTAGGTCCACTTCAATGTCC	3'UTR
La / LARP3 / SSB	ER3	AAGATTCTTCCATTAAATTCCTT	3'UTR
TGS1 / NCOA6IP	FR1	AAGATTGCCCTTGCTCGCAATAA	ORF
TGS1 / NCOA6IP	FR2	TATCACCGTATGAAATGGAAACT	3'UTR
PHAX / RNUXA	FS1	TAGTATCAGCGAGGAACAAATTA	ORF
PHAX / RNUXA	FS2	AAGAGTATATAGCACAGGATTTA	3'UTR
SMN1	AA2	AAGTGGAAATGGGTAACCTCTCTT	3'UTR
LSm8 / LSM8	BE2	AAGAAACAGATTCTGCGCTTGAT	ORF
LSm4 / LSM4	BD6	AACGGCCGTCCCAAAGCTGGCTG	3'UTR
Nopp140 / NOLC1	LJ1	AAATGAGGTGGATTCACGAGTT	ORF
61K / PRPF31	EA1	AAGCCAAAGCTTCAGAAGTGATG	ORF
61K / PRPF31	EA2	CAGTATGGGCTAGAGCAGGTCTT	3'UTR
61K / PRPF31	EA3	AAGGGACACAGAGGTCCAGTCTT	3'UTR
hPrp6 / PRPF6	AL5	AAGCTACAAGTAGCTCGGAACCT	ORF
hPrp6 / PRPF6	AL6	GAGCGGTTGCCATGGCCGGTCTC	3'UTR
hPrp6 / PRPF6	AL8	CAGGGTTGGGCCGATGTGGAAG	3'UTR
SF3b14a / SF3B14	AS1	AAGAAATGCATGTGATCACCTATC	ORF
SF3b14a / SF3B14	AS2	TAAATCCCACGAATGACAACCTAC	3'UTR
SF3b14a / SF3B14	AS4	AATCCACGAATGACAACCTACCA	3'UTR

3.1.6 DNA-Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und HPSF (hochrein und salzfrei) aufgereinigt.

3.1.6.1 Primer für die Einschrift-Echtzeit-RT-PCR und Standard-PCR

Ziel-Protein/Ziel-Protein	Accession	Primer	Sequenz (5'-3')
PRP19 / PRPF19	NM_014502	PP0053_F	ATGTCCTAATCTGCTCCATCT
		PP0053_R	ATTCTCCGCAATGACTTCTCG
		PP0074_F	TCTCTAACGAAGTGCCGGAGCA
		PP0074_R	CGGAGAGAGGCTGGTTGTTGAT
CDC5 / CDC5L	NM_001253	PP0057_F	TGCAAAGCCAGATGGTATGAAT
		PP0057_R	Gcaatggctcctccactgagtt
		PP0058_F	GGCTGGATCCAAGCATTAAAGA
		PP0058_R	Gagcaatggctcctccactgag
SPF27 / BCAS2	NM_005872	PP0102_F	AATTCTATGGCCAGTTAGAGCA
		PP0102_R	CCTTCTGTGCGTGTCAATCA
		PP0103_F	ACATTACTGCATGGCAAGAATGTG
		PP0103_R	GCATTACATCCATGCTGTGACATTA
PRL1 / PLRG1	NM_002669	PP0104_F	AGATGAAGAGAGTCACAAACGAAA
		PP0104_R	CATATGAATCCGTTGCATTCTG
		PP0105_F	AAATGGCAATCAAGCTTCGTAA
		PP0105_R	TGATTGGCAGGTTACTGTTTATG
hsp 73 / HSPA8	NM_006597 NM_153201	PP0116_F	GCTTAGACAAAAAGGTTGGAGCA
		PP0116_R	GACCTCAAAGATTCCATCTCAA
		PP0117_F	CCCAGGCCAGTATTGAGATCGA
		PP0117_R	CACGGAACAGGTCAGCATTCA
AD-002 / HSPC148	NM_016403	PP0082_F	GGAGAAGGTGATTTGAGCCAAC
		PP0082_R	CTTCAGGGGCATCCTGAGTAG
		PP0083_F	CTGAAGAGGTTTCGTAACCGTGA
		PP0083_R	GTATGTTCTCGGTTGGACGA
β-catenin like1 / CTNBL1	NM_030877	PP0112_F	CATCGACAATGACACCGAGGA
		PP0112_R	GCAGATCTCGGCATGATGTA
		PP0113_F	GGAGAGATCATCGACAATGACA
		PP0113_R	GCGAATCTGGGGACATT
Npw38BP / WBP11	NM_016312	PP0120_F	GGTCTGAGTGTACGGTTTCGAGA
		PP0120_R	GGATTTCTTGACCTGCCATACGA
		PP0121_F	TCAGAGGACGATGATGAAGATGA
		PP0121_R	CTGCTGTGAAGAAGCAGTGGAT
		PP0278_F	GGTCTGAGTGTACGGTTTCGAGA
		PP0278_R	TTGACCTGCCATACGAAGCAT
Npw38 / PQBP1	NM_005710 NM_001032381 NM_001032382 NM_001032383 NM_001032384 NM_001032385	PP0090_F	AAGAGATCATTGCCGAGGACTA
		PP0090_R	AGGAAGGGTCGAACACCTTGTA
		PP0091_F	AGGCATCCTCAAACATCTGGA
		PP0091_R	AGGAAGGGTCGAACACCTTGTA
PRCC	NM_005973 NM_199416	PP0314_F	AAGAGGAAAAGAGCCCGTGAAGA
		PP0314_R	CCTCACTGGATCCCTGAAGGAT
		PP0315_F	TGAATTCAAGATGGCAGCAGG
		PP0315_R	TGGCATCGCCATATGTGGA

Ziel-Protein/Ziel-Protein	Accession	Primer	Sequenz (5'-3')
FKJ10290 / RBM22	NM_018047	PP0094_F	GTGGCTGCTGAGAAGTCCTTTA
		PP0094_R	TGATCCCAGAGTCTGTAGTTCCA
		PP0095_F	CTGTTGTGCAGAGACAGCAGTG
		PP0095_R	GGGATCTTCCCCATTTACAT
hSYF1 / XAB2	NM_020196	PP0079_F	GCTGTTCAAGTGGCCCAAC
		PP0079_R	CCGTCCAGAGCCTGTTCAA
hCLF1 / CRNKL1	NM_016652	PP0075_F	CAGATGCCGGAAGCTTTATGA
		PP0075_R	ATTGCCCGTGCTCTGTCAA
		PP0286_F	CCAGAGGTGCTTTGGAAATCATA
		PP0286_R	CAAACCTGAGCAAAGCTGATCCA
hISY1 / KIAA1160	NM_020701	PP0086_F	TCGAATTCGTGACCTGAATGA
		PP0086_R	TCCAGCATTTTAGGGCCAACT
		PP0087_F	GGCCCTAAAATGCTGGATCA
		PP0087_R	CAGCTCTCTAACACCAGGCAAA
SKIP / SNW1	NM_012245	PP0119_F	CAGAAAAGACAAGAGTAGCCTTAGAA
		PP0119_R	GGATATACTGAGCAGGAGCCAAT
Cyp-E / PPIE	NM_006112 NM_203456 NM_203457	PP0098_F	GCTGCCTGTGCACTCATGAA
		PP0098_R	CAGTGCCATTGTGGTTTGTGA
		PP0099_F	CGGTGATTTACAAAACCACAAT
		PP0099_R	TAGTAGACCTGGTCCCCTATGC
PPlase-like1 / PPIL1	NM_016059	PP0051_F	GCGGCAATTCCCCAGATT
		PP0051_R	ACTCAGCAAAGTTCTTACAGGTC
		PP0052_F	TGGGAATCATTGTGCTGGAG
		PP0052_R	TGTGGAATTTTGTGCCATG
KIAA0560 / AQR	NM_014691	PP0096_F	CGCTTGGTAGTGCCATGTCTA
		PP0096_R	CGAGCTGTGAGCTGACTGAAAG
		PP0097_F	TTTGAACCTGACTCCAGCTTTCA
		PP0097_R	TTTATGAGATGGTCTCTCTCCA
G10 / BUD31	NM_003910	PP0110_F	TGCAGATTATCCTGTGGAAGGA
		PP0110_R	CATCCAGTGTGGCTCAATCA
		PP0111_F	CCTGTGGAAGGAAAATGCCTAA
		PP0111_R	CGTTTCTGTTTCAGCTTCTCTCA
GLUD2	NM_012084	PP0008_F	TCGTGGAGGACAAGTTGGTG
		PP0008_R	TTGCAGGGCTTGATGATCCG
U11/U12-20K / ZMAT5	NM_019103 NM_001003692	20Kfor	CTTCCAGGACAACCTCCACAA
		20Krev	CTCGGAACATGTGCTACCAGAC
U11/U12-25kD / C16orf33	NM_024571	25Kfor	GCAAGAGGAAGATGAGGACGA
		25Krev	CTGCACCACCATAGCCAGAC
U11/U12-35K / U1SNRNPBP	NM_180703 NM_180699 NM_007020 NM_022717	35Kfor	GCTACGCCTTCATCGAATACAA
		35Krev	AATAACCAGGCCATCAGCATC
U11/U12-59K / PDCD7	NM_005707	59Kfor	CGCTGATGGCGTACTATCTGAA
		59Krev	AAGCCCGTAGAATGTCCACCA
H3F3B	NM_005324	His3Bfor	GCTTCGAGAGATTGCTCGTT
		His3Brev	GAAACCTCAGGTCGGTTTTG

3.1.6.2 Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Oligo	Beschreibung	Sequenz (5'-3')
U2-Alexa 488 und U2-Alexa 647	am 5'-Ende mit fluoreszierendem Alexa-488 oder Alexa-647 markiert	GAACAGATACTACACTTGATCTTAGCCAAAAGGCCGAGAAGC
U4-Alexa 488 und U4-Alexa 647	am 5'-Ende mit fluoreszierendem Alexa-488 oder Alexa-647 markiert	TCACGGCGGGGTATTGGGAAAAGTTTCAATTAGCAATAATCGCGCCTC
U5-Alexa 488 und U5-Alexa 647	am 5'-Ende mit fluoreszierendem Alexa-488 oder Alexa-647 markiert	CTCTCCACGGAAATCTTAGTAAAAGGCGAAAGATTATACGATTGAAGAG
Oligo (dT)	jedes zehnte Nukleotid mit Rhodamin markiert	5'-(dT) ₅₀ -3'

3.1.6.3 Sonden für den branched DNA Assay

Die Sonden zum Nachweis der Emerin, Lamin A/C und β -Aktin mRNA im branched DNA Assay wurden von Panomics/BioCat (Heidelberg) entworfen und synthetisiert. Die Sequenz der Oligonukleotide ist nur dem Hersteller bekannt.

3.1.7 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pSPUTK-tRNA ^{Arg}	pSPUTK-Vektor mit Sequenz des humanen tRNA Gen für das Arginin Anticodon UCG unter der Kontrolle eines T7- (5'-3') und eines SP6-Promotors (3'-5'); linearisiert mit EcoRV; Amp ^R	Lemm und Ross, 2002
pHU1	pGEM-1-Vektor mit Sequenz der humanen U1 snRNA unter Kontrolle des SP6-Promotors; linearisiert mit PstI; Amp ^R	Patton <i>et al.</i> , 1987
pSP64/WT U8	pSP64-Vektor mit Sequenz der U8 snoRNA; Amp ^R	Lange <i>et al.</i> , 1998
pSP64T7/U14hsc70	pSP64-Vektor mit Sequenz der murinen U14 snoRNA unter der Kontrolle eines SP6- (5'-3') und eines T7-Promotors (3'-5'); linearisiert mit ; Amp ^R	Lange <i>et al.</i> , 1998

3.1.8 Zelllinien

HeLa SS6 (menschliche Cervixkarzinomzellen)

Shooter und Gey, 1952

3.1.9 Allgemeine Puffer

10x PBS (phosphate buffered saline) [in H₂O]

Lösung A (basisch):

0,2 M Di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)

1,3 M Natriumchlorid (NaCl)

Lösung B (sauer):

0,2 M Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)

1,3 M Natriumchlorid (NaCl)

Lösung A vorlegen und mit Lösung B auf pH von 7,4 einstellen.

10x TBE-Puffer (7 l)

450 mM Tris Base (377,3 g)

450 mM Borsäure (H₃BO₃) (192,61 g)

10 mM EDTA (pH 8.0) (140 ml, 0,5 M in Lösung oder 26,04 g EDTA fest)

Zugabe ca. 3,5 l (auf Magnetrührer)

Zugabe auf 7 l im Kanister

3.1.10 Käufliche Reaktions-Sets (Kits)

Branched DNA Kit	Panomics/BioCat, Heidelberg
CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent	Promega, Mannheim
ECL Western Blot Detection Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
QuantiTect SYBR Green RT-PCR	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript II Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim

3.1.11 Arbeitsmaterialien

CASYcups	Schärfe System, Reutlingen
Cellstar, Micro-Platte, mit Deckel	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Deckgläser, rund (12 mm)	Schütt, Göttingen; Menz- Gläser, Marienfeld
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Glasflaschen für siRNA-Synthese	Proligo, Hamburg
Magnetrührstäbchen	Schütt, Göttingen
Nesco-/ Parafilm	Roth, Karlsruhe
Nylonmembran Hybond XL	Amersham Pharmacia, Freiburg
Objektträger	Menzel-Gläser, Marienfeld
ProbeQuant™ G-50 Säulen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Protran Nitrozellulose Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
PTFE-Filter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
qPCR Hard-Shell 96 Well Plates (bl. shell / wh. Well)	MJ Reseach / Bio-Rad, München
qPCR Low Profile Multiplate 96, white, unskirted	MJ Reseach / Bio-Rad, München
qPCR optical clear flat cap strips (8)	MJ Reseach / Bio-Rad, München
Reaktionsgefäße (5 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (Safe-lock, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme BioMax MR	Kodak, USA
Schraubdeckelröhrchen (2 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Spinocan Luer Lock Kanülen	Braun, Melsungen
Spritzen (verschieden Größen)	Braun, Melsungen
Sterican Kanülen	Braun, Melsungen
Vorsatzfilter Minisart SRP25 - 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Whatman 3MM Papier	Whatman Paper, UK
Zellkulturflaschen/-platten (verschiedene Größen)	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturplatten (verschiedene Ausführungen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber (Rubberpoliceman)	Sarstedt, Nürnberg

3.1.12 Geräte

µQuant (Microplate Spectrophotometer)	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
ABI 394B DNA/RNA-Synthesizer	Dharmacon Research, USA
ABI PRISM 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems
Autoklav	Tecnomara, Schweiz
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
CASYcounter TT	Schärfe System, Reutlingen
Cellscreen	Innovatis, Bielefeld
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Dampfsterilisatoren, Varioklav	H+P Labortechnik; Oberschleißheim
DNA Engine Opticon1 System (Real time PCR)	MJ Reseach / Bio-Rad, München
Edelstahl-Druckfiltrationsgerät	Satorius, Göttingen
Eppendorf-Konzentrator 5301 (SpeedVac)	Eppendorf, Hamburg
Expedite DNA/RNA-Synthesizer	Applied Biosystems
Gene Pulser XCell mit CE-Modul	Bio-Rad, München
Geltrockner Modell 583	Bio-Rad, München
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad, München
Gelelektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
Gelelektrophoreseapparaturen	MPIBPC Werkstätten, Göttingen
Hochspannungstransformator EPS 2A 2000	Hoefler Pharmacia Biotech, USA
Hochspannungstransformator EPS 3501 /XL	Amersham Pharmacia, Freiburg
Hybridisierungsofen	Hybaid Biometra, UK
IKA-vibrax Schüttler	IKA-Werke-Staufen
Inkubationsschüttler, Multitron	Infors, Schweiz
Inkubator für humane Zellkultur, BBD 6220	Heraeus, Hanau
Lumilmager	Boehringer/Roche
Luminometer Victor Light	Perkin Elmer, USA
MicroFuge	Roth, Karlsruhe
Mikroskop, inverses Axiophot	Zeiss, Göttingen
Mikroskop, inverses Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Mikroskop, inverses Laser Scanning LSM 510 META	Zeiss, Göttingen
Nanodrop ND-1000 (Spectrophotometer)	NanoDrop, USA

pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Phosphorimager, Typhoon 8600	Molecular Dynamics / Amersham
Pipetten (verstellbar)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe „pipettus-akku“	Hirschmann, Eberstadt
Powerpac 3000 (Netzgerät für Elektrophorese)	Bio-Rad, München
Programmable Thermal Controller PTC-100 (PCR)	MJ Reseach / Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage, Milli-Q	Millipore, USA
Röntgenfilmentwickler X-Omat 2000	Kodak, USA
Rotor, Sorvall SLA-1500	Kendro /Techno, USA
Rotor, Sorvall SS-34	Kendro /Techno, USA
Sterilbank, HERASafe	Heraeus, Hanau
Stickstofftank (Zellkulturlager)	Taylor-Wharton
Szintillationszähler LS1701	Beckmann / Packard, USA
TRANS-BLOT Cell	Bio-Rad, München
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, USA
Utrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia biotech / GE Healthcare, München
UV-Handlampe 254 nm	Benda, Wiesloch
Vortex-Genie2	Scientific Industries
Wasserbad, HBR4 digital	Janke & Kunkel, Staufen, i. Br.
Wasserbad, Typ 1012	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zellkultureinfrierhilfe (Mr. Frosty)	Nalgene Nunc, Wiesbaden
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Sorvall RC 5B/Evolution	Kendro /Techno, USA

3.1.13 Software

ActiveState Perl	http://www.activestate.com/Products/activeperl/
NCBI UniGene Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene
Primer3 (PCR Primer Selektion)	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
RTPrimerDB(PCRPrimerDatenbank)	http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/index.php
PrimerBank (PCR Primer Datenbank)	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/
Quantitative PCR Primer Database	http://lpgws.nci.nih.gov/cgi-bin/PrimerViewer
Basic Local Alignment Tool (BLAST)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Washington University BLAST (WU-BLAST)	http://blast.wustl.edu/
KC4 V2.5 (für Microplate Spectrophotometer)	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
LocusLink (mRNA Sequenz Datenbank)	inzwischen ersetzt durch EntrezGene

Metamorph imaging software	Universal Imaging Corporation, USA
Microsoft Excel	Microsoft, Unterschleißheim
ND-1000 V3.1 (für Spectrophotometer)	NanoDrop, USA
Opticon Monitor (für Real time PCR)	MJ Research / Bio-Rad, München
PrimerExpress V2.0 (PCR Primer Selektion)	Applied Biosystems, Darmstadt
Prosite (DB für Portefamilien und Domänen)	http://www.expasy.org/prosite/
sfold/sirna (siRNA-Selektion)	http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl
siRNA selection server (siRNA-Selektion)	http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/
SMART (Protein Domänen Architektur Analyse)	http://smart.embl-heidelberg.de/
Vector NTI V10.0	Invitrogen, Karlsruhe
EntrezGene(mRNA Sequenz Datenbank)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ query.fcgi?db=gene
guide-only siRNA selection server (siRNA-Selektion)	http://www.mpibpc.mpg.de/groups/luehrmann/siRNA/
Reverse and/or complement DNA sequences	http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html

3.2 Methoden

3.2.1 Proteinbiochemische Standardmethoden

3.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in wässriger Lösung erfolgte mit Hilfe des Bradford-Assays. Diese Methode beruht auf der Färbung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau in phosphorsaurer Lösung (Bearden JC Jr., 1978). Zur Durchführung des Bradford-Assays wurde die entsprechende Proteinprobe in einem Volumen von 800 µl ddH₂O verdünnt und mit 200 µl Farbstofflösung (Bio-Rad Protein Assay) versetzt. Anschließend wurde die Extinktion der Lösung bei einer Welllänge von 595 nm photometrisch bestimmt und die Konzentration durch den Vergleich mit einer Standardmessreihe verschiedener Lösungen bekannter BSA-Konzentration berechnet.

3.2.1.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur analytischen Trennung von Proteinen wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. In Abhängigkeit von dem zu trennenden Proteingemisch wurden der Vernetzungsgrad und die Größe der Gele variiert. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden 13%ige bzw. 8%ige

Polyacrylamidgele (37,5 : 1 Acrylamid : Bisacrylamid) mit einer erhöhten TEMED Konzentration (0,33% v/v) verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in Proteinprobenpuffer (Roti-Load1) aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen, die Proteine bei 15 – 25 mA im Sammelgel fokussiert und bei 30 bis 45 mA aufgetrennt.

Sammelgelpuffer (4 x)

500 mM Tris/HCl pH 6,8
0,4% (w/v) SDS

Trenngelpuffer (4 x)

1,5 M Tris/HCl pH 8,8
0,4% (w/v) SDS

5%ige Sammelgellösung

1,7 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid : 0,8% Bisacrylamid)
1 x Sammelgelpuffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS)
ad 10 ml mit dd H₂O plus 50 µl 10% (w/v) APS und 25 µl TEMED

8%ige Trenngellösung

8 ml Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid : 0,8% Bisacrylamid)
1 x Trenngelpuffer (375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS)
ad 30 ml mit dd H₂O plus 110 µl 10% (w/v) APS und 110 µl TEMED

13%ige Trenngellösung

13 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid : 0,8% Bisacrylamid)
1 x Trenngelpuffer (375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS)
ad 30 ml mit dd H₂O plus 110 µl APS und 110 µl TEMED

Proteinlaufpuffer

25 mM Tris/HCl, pH 8,8
192 mM Glyzin
0,1 % (w/v) SDS

3.2.1.3 Immunoblot (Western Blot) und ECL-Detektion

Proteine aus Zellextrakten wurden in Western-Blot Analysen mit Standardmethoden (Burnette, 1981) untersucht. Proteinbanden eines SDS-Polyacrylamidgels wurden im Naßblotverfahren auf Nitrocellulose übertragen.

Dazu wurde das Gel auf die mit Transferpuffer angefeuchtete Membran gelegt und zwischen zwei Lagen angefeuchteten Whatmann-Papiers in den Kammereinsatz gesteckt. Der Transfer erfolgte 2 Stunden bei 60 V. Die Effizienz des Transfers wurde mittels Ponceau S Färbung überprüft. Vor der Inkubation den spezifischen Antikörpern wurde die Membran zunächst durch die Inkubation mit Magermilch-Lösung (5% (w/v) Magermilchpulver) in TBS-Tween) unspezifisch blockiert. Bei der Inkubation mit den primären Antikörpern wurde in Abhängigkeit von der Reaktivität der Antikörper unterschiedliche Konzentrationen derselben eingesetzt. Im Anschluß an die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran zunächst mit TBS-Tween gewaschen (1x 15 min und 2x 5 min). Und im nächsten Schritt mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen bzw. anti-Maus IgG Antikörper inkubiert. Dieser wurde in 1:50.000 facher Verdünnung in 1% Milchpulver/1x TBS eingesetzt. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Detektion durch ECL (enhanced chemiluminescence) nach dem Protokoll des Herstellers.

Um eine weitere ECL-Detektion mit der gleichen Membran durchzuführen wurde diese regeneriert durch Inkubation für 30 Minuten bei 50°C in Stripping-Puffer.

Blotkammertransferpuffer:

1,5 l SLAB 4
0,6 l Methanol
0,9 l ddH₂O

SLAB 4

50 mM Tris-HCl, pH 8,5
380 mM Glyzin
0,1 % (w/v) SDS

TBS-Tween

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
0,05 % (v/v) Tween 20

3.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration wurde die Extinktion der entsprechenden wässrigen Lösung bei 260 nm gegen einen Referenzwert

gemessen, hierbei gelten die Umrechnungen nach Sambrook *et al.* 1989:

1 OD 260 = 50 µg/ml doppelstränige DNA

1 OD 260 = 33 µg/ml einzelstränige DNA

1 OD 260 = 40 µg/ml einzelstränige RNA

3.2.2.2 Phenol-Chloroform-Isoamylextraktion

Die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCA-Extraktion) dient zur Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren. Die in wässriger Lösung vorliegende zu extrahierende Probe wurde mit dem gleichen Volumen PCA-Lösung versetzt und intensiv durchmischt. Zur Phasentrennung wurde die Suspension für 5 Minuten zentrifugiert (13 000 U/min, RT). Die obere nukleinsäurehaltige Phase wurde abgenommen und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol in der Anwesenheit von 10 µg Glykogen 1 Stunde bei -80°C oder über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die Präzipitate wurden 20 Minuten mit 13.000 U/min abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Nachdem die Präzipitate mit kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen worden waren, wurden sie erneut sedimentiert (13.000 U/min, 20 Minuten, 4°C) und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

PCA-Extraktionslösung

50% (v/v) Phenol

48% (v/v) Chloroform

2% (v/v) Isoamylalkohol,

gesättigt mit TE-Puffer

TE-Puffer pH 7.5

10 mM Tris/HCl pH 7.5

1 mM EDTA

3.2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden

Plasmid-DNA wurde mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen wurde nach Standardprotokollen (Sambrook, 1989) oder nach den Angaben des Herstellers (New England Biolabs) geschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.2.2.4) und anschließend mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (siehe

3.1.10) aus der Agarose extrahiert. Die Ethanol-präzipitierte DNA wurde in ddH₂O resuspendiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 3.2.2.1).

3.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese von DNA wurde nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Fragmente wurde die Agarosekonzentration innerhalb des Gels zwischen 0,8% und 2,5% variiert. Zur Detektion der DNA enthielten die Gele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Als Gel- und Kammerpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die DNA-Proben wurden vor ihrem Auftrag in Probenpuffer aufgenommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluß wurden die DNA Banden mit Hilfe von UV-Licht (312 nm und 365 nm) visualisiert.

Agarosegellösung

1x TBE

0,8 – 2,5% Agarose

0,5 µg/ml Ethidiumbromid

Agarosegel Probenpuffer (5x)

30% Saccharose (w/v) in ddH₂O + Prise Xylencyanol

3.2.2.5 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA-Fragmenten bis zu einer Länge von 2000 Nukleotiden wurde die denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt (Sambrook, 1989). Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurde die Polyacrylamidkonzentration zwischen 4% und 18% variiert. Dazu wurde das Gelkomponenten-Kit SequaGel von National Diagnostics nach Herstellerangaben eingesetzt. Die zu analysierende RNA wurde in RNA-Probenpuffer aufgenommen und vor ihrem Auftrag auf das Gel 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Verwendung von 0,5x TBE bei 20 mA.

Die Charakterisierung aufgetrennter, nicht-markierter siRNAs durch UV-Shadowing (siehe 3.2.2.6) erreicht. Aufgetrennte, nicht-markierte U snRNAs wurden durch eine sich anschließende Northern Blot Analyse nachgewiesen (siehe 3.2.2.8).

RNA-Probenpuffer**(zur siRNA Analyse)**

8 M (w/v) Harnstoff
50 mM EDTA (pH 8,0)
0,02%-0,04% (w/v) Bromphenolblau

RNA-Probenpuffer**(zur Analyse zelluläre RNA)**

80% Formamid
1 mM EDTA (pH 8,0)
0,025% (w/v) Bromphenolblau
0,025% (w/v) Xylen Cyanol

3.2.2.6 UV-Shadowing zum Nachweis von Nukleinsäuren

UV-Shadowing ist eine Technik zur Visualisierung von Nukleinsäuren, die in Acrylamid/Harnstoff-Gelen aufgetrennt wurden. Diese Technik nutzt kurzwelliges UV-Licht (254 nm) und Fluor-beschichtete Dünnschicht-Chromatographie-Platten (TLC). Das Detektionslimit des UV-Shadowing liegt bei ca. 0,3 µg Nukleinsäure.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das Gel aus den Glasplatten entnommen, mit Klarsichtfolie umhüllt und auf die TLC-Platte gelegt. Im Dunkelraum werden die Nukleinsäurebanden unter UV-Licht (254 nm) als Schatten sichtbar. Auch die Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau lassen sich als dunkle Banden nachweisen.

3.2.2.7 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

DNA-Sonden zur Detektion der komplementären U snRNAs in einer Northern Blot Analyse wurden mit Hilfe eines Kits („Prime It II Random Primer Labeling Kit“, Stratagene) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Als Matrize dienten 25-50 ng der DNA, die die kodierende Region der entsprechenden U snRNA enthielt. Diese DNA-Matrizen wurden mittels Restriktion aus den entsprechenden Plasmiden herausgeschnitten (siehe 3.2.1.3 und 3.2.1.6) und anschließend nach Protokoll des Herstellers unter

Verwendung von [α - 32 P] dATP (3000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. Die radioaktiven DNA-Sonden wurden mittels Gelfiltration (ProbeQuantTM G-50 Säule) von nicht eingebauten, radioaktiven Nukleotiden gereinigt. Um die Aktivität der Sonde zu bestimmen wurde die Cerenkov-Strahlung eines Mikroliters dieses Eluats gemessen. Für Northern Blot Analysen wurden im Schnitt $2\text{-}3 \times 10^7$ cpm einer Sonde eingesetzt.

3.2.2.8 Northern Blot Analyse

Die Northern Blot Analyse ermöglicht die spezifische Detektion eines RNA Moleküls unter Verwendung einer komplementären, radioaktiv-markierten DNA Sonde (3.2.1.7). In dem nach Standardprotokollen durchgeführten Verfahren (Sambrook,1989) wurde die zu analysierende RNA im Nassblotverfahren bei 17 V über Nacht elektrophoretisch aus einem denaturierenden Polyacrylamidgel auf eine Nylonmembran transferiert und durch Bestrahlung mit 120 mJ/cm^2 UV-Licht kovalent mit dieser quervernetzt. Unspezifischen Bindungsstellen der Nylonmembran wurden anschließend durch eine Vorinkubation mit Heringsspermien-DNA enthaltender Prä-Hybridisierungslösung (2 Stunden bei 42°C) abgesättigt. Zur Detektion der RNA-Moleküle wurde die Nylonmembran für 48 - 72 Stunden mit den radioaktiv-markierten DNA-Sonden hybridisiert. Um unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurde die Membran zweimal 5 Minuten mit $2\times$ SSC, 0,5% (w/v) SDS, zweimal 5 Minuten mit $2\times$ SSC, 0,1% (w/v) SDS bei RT und zum Abschluss mit $2\times$ SSC, 0,1% (w/v) SDS bei 50°C gewaschen, bevor die detektierten RNAs mittels einer Autoradiographie visualisiert wurden.

Prä-Hybridisierungslösung

25 mM Natriumphosphat pH 6.5
6 x SSC
5 x Denhardt's
0,5% SDS
50% deionisiertes Formamid
0.2 mg/ml denaturierte Heringsspermien-DNA

20 x SSC

300 mM Natriumcitrat
3 M NaCl

100 x Denhardt's

2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon
2% (w/v) BSA
2% (w/v) Ficoll 400

Hybridisierungslösung

wie Prä-Hybridisierungslösung plus
2–3 x 10⁷ cpm der jeweiligen radioaktiv-
markierten Sonde

Blotkammerpuffer

5 mM Natriumphosphat pH 6.5

Die Membran konnte zur erneuten Hybridisierung mit anderen Sonden wieder verwendet werden, wenn die bereits gebundenen Sonden durch zehnmütiges Kochen in einer Lösung, bestehend aus 1x SSC und 0,1% (w/v) SDS entfernt wurden.

3.2.2.9 Southern Blot Analyse

Die DNA wurde in einem 10% Polyacrylamid / 7 M Harnstoff Gel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nylonmembran übertragen. Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschschriffe wurden wie bei Schneider (Schneider et al., 2002). beschrieben durchgeführt. Mit Hilfe mit Hilfe eines Kits („Prime It II Random Primer Labeling Kit“, Stratagene) wurden ³²-P markierte Sonden gegen die zu analysierende PCR-Produkte durch PCR-Fragmente der entsprechenden Gene nach Angaben des Herstellers erzeugt.

3.2.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In den PCR Reaktionen diente cDNA als Vorlage. Die cDNA wurde durch reverse Transkription nach Angaben des Herstellers mit dem SuperScript II-Kit (Invitrogen) (siehe 3.1.10) erzeugt. Die Reaktionen wurden unter Verwendung von Taq- oder Pfu-Polymerase in einem „Programmable Thermal Controller“ (MJ Research/Bio-Rad) durchgeführt.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte wie in Tabelle 4 dargestellt zusammen, Standard-PCR-Programme sind in Tabelle 5 aufgeführt.

10x PCR-Puffer (für taq DNA-Polymerase)

1,5 mM MgCl₂
50 mM KCl (pH 8,6)
100 mM tris base
0,01% Gelatine

Tabelle 4. Reaktionskomponenten eines Standard-PCR-Ansatzes

	taq	pfu
ddH ₂ O	34,5 µl	x µl
10 x taq oder pfu PCR Puffer	5,0 µl	5,0 µl
DMSO	-	variabel
MgCl ₂ (25 mM) zusätzlich	-	0 bis 4 mM
dNTPs (je 10 µM)	1,0 µl	2,0 µl
Primerpaarmix (je 10 µM)	5,0 µl	4,0 µl
cDNA (1:4) aus RT-Reaktion	4,0 µl	-
Plasmid DNA (50 ng/µl)	-	2,0 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	-
Pfu-DNA Polymerase (2,5 U/µl) Stratagene	-	1,0 µl
	50 µl	50 µl

Tabelle 5. Standard-PCR-Programm

Zyklus	Programm für			
	taq-Polymerase		pfu-Polymerase	
A - 1x	94°C	1 min	94°C	1 min
B - 35x	94°C	40 sek	94°C	40 sek
	58°C	45 sek	53°C-60°C	45 sek
	72°C	30 sek/kb	72°C	120 sek/kb
C - 1x	72°C	5 min	72°C	5 min
D - 1x	4°C	unendlich	4°C	unendlich

Nach dem Abschluß der PCR-Zyklen wurden Aliquote des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel analysiert (siehe 3.2.2.4).

3.2.3 Zellkultur

3.2.3.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa SS6 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm²) unter adhärennten Wachstumsbedingungen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Hatten die Zellen eine Konfluenz von etwa 70% erreicht, wurde die Kultur geteilt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen, 2 ml vorgewärmtes Trypsin-EDTA zugegeben und für 2-3 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 8 ml warmen Zellkulturmedium wurde das Trypsin gestoppt. Um die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase

zu halten, wurde die Zellsuspension entsprechend der Ausgangskonzentration in einer neuen Kulturflasche mit 12 ml warmen Medium verdünnt (1:5 bis 1:20). Die Zellkulturflasche wurde kurz geschwenkt, damit die Zellen homogen auf dem Flaschenboden adhären.

Zellkulturmedium

Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM)

10% (v/v) Fötale Rinderserum (FBS)

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

3.2.3.1.1 Auftauen von Zellen

HeLa SS6 Zellen wurden in Experimenten eingesetzt bis sie zwischen 20 und 30 Passagen durchlaufen hatten. Dann mussten frische Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und aufgetaut werden. Dazu wurden ein Cryoröhrchen mit Zellen zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und tropfenweise 1 ml warmes Zellkulturmedium hinzugegeben. Diese Stammsuspension wurde in 9 ml Zellkulturmedium überführt. Die verdünnte Zellsuspension wurde dann bei RT in 50 ml Röhrchen (Greiner) für 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Im nächsten Schritt wurde das DMSO aus dem Einfriermedium mit dem Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 20 ml Medium resuspendiert und auf zwei Zellkulturflaschen (75 cm²) verteilt. Nach dem Anwachsen der Zellen auf dem Flaschenboden, wurde das Medium gewechselt, und die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 70% kultiviert.

3.2.3.1.2 Einfrieren von Zellen

Um den Fortbestand der verwendeten Zelllinie zu sichern, wurden in regelmäßigen Abständen Zellen aus der Kultur eingefroren. Dazu wurden Zellen nach der ersten Passage aus einer etwa 70% dicht bewachsenen Zellkulturflasche (75 cm²), wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben, geerntet, und das gesamte Zellsuspensionsvolumen auf 10 neue Zellkulturflaschen (75 cm²) verteilt. Hatten die Zellen wiederum eine Konfluenz von 80% erreicht wurde eine Flasche für die regelmäßige Zellkultur (Stammkultur) eingesetzt. Die Zellen der weiteren Flaschen wurden vereinigt, auf zwei 50 ml Röhrchen verteilt und

für 5 min bei 4°C und 800 rpm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 10 ml Einfriermedium resuspendiert und in 1 ml Aliquots auf Cryoröhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen wurden beschriftet (Zelllinie/Datum/Name). Um ein langsames Abkühlen der Zellen zu erreichen, wurden die Cryoröhrchen bei RT in eine „Mr. Frosty“ Zellkultureinfrierhilfe gestellt und über Nacht auf -80°C heruntergekühlt. „Mr. Frosty“ ist ein mit Isopropanol gefüllter Kunststoffbehälter, der bei -80°C Umgebungstemperatur eine langsame Kühlrate von etwa 1°C pro Stunde erlaubt. Schließlich wurden die Zellen in einem N₂-Cryotank bei -130°C Langzeit gelagert.

Einfriermedium

Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM)

20% (v/v) FBS (hitzebehandelt: 30 Minuten bei 56°C)

10% (v/v) DMSO oder DMSOTC (spezielles DMSO für die Zellkultur)

3.2.3.1.3 Ausplattieren von Hela SS6 Zellen

Die Zellen einer 70 % konfluenten Platte wurden wie oben beschrieben trypsiniert und in Zellkulturmedium verdünnt. Die Zelldichte (lebende Zellen / ml) wurde mit dem CASYcounter TT bestimmt. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension zu 10 ml CASYton in ein CASYtube gegeben, zweimal invertiert und die Zellzahl mit einer 150 µm CASYcounter Kapillare bestimmt. Ein Teil der Ausgangszellsuspension wurde mit Zellkulturmedium ohne Antibiotikum auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt und je nach Zellkulturgefäß ein entsprechendes Volumen in die Kavität pipettiert. Um eine homogene Verteilung der Zellen zu erreichen wurden die Kulturgefäße kurz hin- und hergeschwenkt.

Je nach Anwendung, Plattenformat und Analysezeitpunkt wurden unterschiedlich viele Zellen pro Kavität ausplattiert (Tabelle 6).

Tabelle 6. Leitfaden zur Menge der eingesetzten HeLa SS6 Zellen.

		Plattenformat (Kav. / Platte)		
		6	24	96
		[ml Zellsuspension / Kavität]		
		2,5 ml	500 µl	100 µl
Analyse-Methode	Zeitpunkt der Analyse [Stunden nach RNAi Transfektion]	[Lebende Zellen / ml] (in tausend)		
Immunofluoreszenz	48	30	30	-
Real-time PCR (RNA aus HeLa Zellen)	24 / 48 / 72	-	100 / 60 / 30	-
Zellzahlbestimmung	24 / 48 / 72	-	30	30
Zellzahlbestimmung (MTS Assay)	72	-	-	15
Zeitreihen (allgemein)	24 / 48 / 72	30	30	30

3.2.4 Mikroskopische Methoden

3.2.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die durch Immunfluoreszenzanalyse und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung generierten Präparate wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (Zeiss LSM 510 META mit Plan Apochromat 63x/1,4 Ölimmersionsobjektiv) oder eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axiophot mit F Fluor 40x/1,3 Ölimmersionsobjektiv) analysiert. Bei allen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops aufgenommen Bildern handelt es sich um einzelne konfokale Schnittbilder (Pinhole-Durchmesser 106 µm, 1,12 Airy Einheiten entsprechend einer Schichtdicke von ungefähr 0,8 µm). Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden mit jeweils denselben Parametern für kontrolltransfizierte und RNAi-depletierte Zellen aufgenommen. Bei der Wahl der entsprechenden Parameter wurde darauf geachtet, dass kein Pixel des Bildes überexponiert war.

3.2.4.2 Vorbereitung einer 24 Kavitäten Platte mit Deckgläschen für die Mikroskopie

Runde Deckgläschen (Ø 12 mm) wurden autoklaviert und auf den Boden der Kavität gelegt. Die Kavitäten wurden mit Zellsuspension geeigneter

Zelldichte (siehe Tabelle 6) befüllt und die Deckgläschen nochmals leicht mit einer Pipettenspitze auf den Boden angedrückt. Dadurch wird verhindert, dass Zellen auf beiden Seiten des Deckgläschens anwachsen.

3.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Lokalisierung von Proteinen und zur Kontrolle von siRNA vermittelten Proteinreduktion in Zellen wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Zur Analyse spleißosomale Faktoren wurden adhärent auf Deckgläschen wachsende Zellen (siehe Abschnitt 3.2.4.2) einmal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (~400 µl) fixiert. Die Fixierlösung wurde verworfen und die Zellen mit 0,2% Triton X-100 in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Vor der Zugabe von spezifischen primären Antikörpern wurden unspezifische Bindestellen in 10% FCS /PBS für 1 Stunde bis mehrere Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt. Dann wurde ein primärer Antikörper in 10% FCS /PBS verdünnt und ein 20 µl Tropfen der Verdünnung auf Parafilm in eine feuchte Kammer gesetzt. Ein Deckgläschen wurde mit der von Zellen bewachsenen Seite auf den Tropfen gelegt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurde das Deckgläschen in die ursprüngliche Kavität zurückgelegt und viermal 10 Minuten mit 300 µl PBS gewaschen. Die meisten sekundären Antikörper werden mit 1mg/ml geliefert und können 1:500 verdünnt werden. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 1 Stunde wie für den ersten beschrieben, jedoch im Dunkeln. Die Deckgläschen wurden abermals viermal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und mit Mowiol 4-88 auf die Objektträger montiert und bis zur Analyse im Dunklen bei 4°C gelagert.

Zur Analyse des Knockdowns von Lamin A/C und Emerin wurde eine Standard Methanolfixierung eingesetzt. Diese permeabilisiert die Zelle für das Eindringen der Antikörper und erhält die für die Untersuchungen bedeutsamen Aspekte der Zellmorphologie. Dazu wurden die Deckgläschen

6 Minuten in eiskaltem Methanol fixiert. Überschüssiges Methanol wurde entfernt und die luftgetrockneten Deckgläschen in eine befeuchtete Kammer überführt. Pro Deckgläschen wurden die Zellen mit 30 µl des primären Antikörpers anti-Lamin A/C (Klon 636.23, 1:500) und/oder anti-Emerin (4G9, 1:250) benetzt und für 1 Stunde bei 37°C in der befeuchteten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und wieder in die feuchte Kammer überführt. 30 µl einer geeigneten Konzentration von fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern gegen den Immunglobulin-Typ des entsprechenden primären Antikörpers wurde pro Deckgläschen angewendet und die deckgläschen für 45-60 Minuten inkubiert. Zur Färbung der zellulären DNA mit dem Farbstoff Hoechst (33342, Hoechst, Frankfurt/M) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 40 µl (1 µM) der Farbstofflösung auf jedes Deckgläschen gegeben und 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläschen wurden im Anschluss mit PBS gewaschen, überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Deckgläschen mit Mowiol 4-88 auf dem Objektträger montiert.

Verdünnungen der verwendeten Antikörper

monoklonaler Lamin A/C-Antikörper (636.23)	1:500
monoklonaler Emerin-Antikörper (4G9)	1:250
monoklonaler Coillin-Antikörper (5P10π)	1:200
monoklonaler SC35-Antikörper	1:500
affinitätsaufgereinigter hPrp3 Kaninchenserum („Berti“)	1:100
affinitätsaufgereinigter hPrp4 Kaninchenserum („Roy“)	1:2.000
affinitätsaufgereinigter p110 Kaninchenserum („SART3-C“)	1:1.000

3.2.4.4 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) (nach Taneja et al. 1992)

Auf Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) wachsende HeLa Zellen wurden einmal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und in 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA)/1x PBS (pH 7,4) fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und konnten in 70% (v/v) Ethanol mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Im Anschluss wurden die Zellen in PBS/5 mM MgCl₂ für 10 Minuten rehydriert und anschließend in 15% Formamid/2x SSC / 10 nM NaPhosphat (pH 7,0) für 10 Minuten bei Raumtemperatur vorhybridisiert. Für die Hybridisierung wurden pro Deckgläschen 10 ng fluoreszenzmarkierte einzelsträngige DNA

(ssDNA) Oligos (siehe 3.1.5) verwendet. Die Oligos wurden von MWG Biotech synthetisiert und wurden bei -20°C in wässriger Lösung gelagert. 10 ng des gewünschten Oligos wurden zusammen mit 10 μg tRNA und 10 μg sonifizierter Lachsspermien-DNA (SSS-DNA) eingedampft (SpeedVac) und dann in 10 μl 30% Formamid/20 mM NaPO_4 (pH 7,0) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 10 μl Hybridisierungspuffer (20% Dextransulfat/4x SSC/0,4% BSA) gegeben. Die fertige Hybridisierungslösung (20 μl Sonde (500 $\text{pg}/\mu\text{l}$)/ 500 $\text{ng}/\mu\text{l}$ tRNA/ 500 $\text{ng}/\mu\text{l}$ SSS-DNA/ 15% Formamid /2x SSC /10% Dextransulfat/ 10 nM NaPO_4 (pH 7,4)) wurde auf Parafilm pipettiert und das Deckgläschen wurde mit den Zellen nach unten auf den Tropfen gelegt. Die Hybridisierung erfolgte für 4 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer im Dunkeln (Inkubationsschrank für die Zellkultur; relative Luftfeuchtigkeit: 95 %). Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 15 % Formamid /2x SSC /10 mM NaPO_4 (pH 7,0) für 30 Minuten bei 37°C ; zweimal mit 2x SSC /0,1% (v/v) TritonX-100 für 15 Minuten bei Raumtemperatur und zweimal mit 1x SSC /0,1% (v/v) TritonX-100 für 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

3.2.5 Spezielle Methoden

3.2.5.1 Synthese von siRNAs

Die in dieser Arbeit eingesetzten siRNAs wurden von folgenden Firmen bezogen: Qiagen, Hilden (HPP aufgereinigt und *annealed*) von Ambion, UK (Standard Reinheit, Einzelstränge) oder von Dharmacon, USA (Standard Reinheit, Einzelstränge). Weitere siRNAs wurden im Hause mit Dharmacon-Chemie (2'-ACE-Methode) synthetisiert. Die von den genannten Firmen synthetisierten siRNAs wurden je nach Notwendigkeit nach den Herstellerangaben entschützt, entsalzt und hybridisiert.

siRNAs von Qiagen trugen am Passagier-Strang einen 3'-dTdT Überhang und am Leit-Strang einen 3'-dXdX Überhang. Wobei X für ein dNTP steht, welches komplementär zu der entsprechenden Position in der cDNA der Ziel-Sequenz ist. Alle anderen siRNAs wurden mit 3'-dTdT Überhang an beiden Strängen synthetisiert. Ein Teil der im Hause synthetisierten siRNAs wurde nach den "Tuschl"-Regeln (Elbashir et al., 2001a; Harborth et al., 2001) („The siRNA user guide“ - Tuschl 2001) ausgewählt. Die Sequenzspezifität der siRNAs wurde

durch blastn Analysen gegen die NCBI UniGene Datenbank überprüft, um die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Reduktion weiterer mRNAs zu reduzieren. Es wurden in der Regel je zwei siRNAs gegen den offenen Leserahmen (ORF, **o**pen **r**eading **f**rame) und zwei weitere gegen die 3'UTR (3' **u**ntr~~ans~~latierte **R**egion) als Ziel-Region gerichtet.

Alle anderen im Hause synthetisierten siRNAs wurden mit dem *siRNA selection server* (Yuan et al., 2004) ausgewählt. Das dahinterstehende Programm berechnete zur Bestimmung der Duplexstabilität die freie Energie an beiden Enden mittels der *Nearest- neighbour* Methode (Mathews et al., 1999). Dazu wurde für jede siRNA eine Helix aus beiden Enden des Duplexes modelliert. Diese bestand aus fünf Basen vom 5'-Ende des Sinn-Stranges plus zwei Ns (N steht für jedes der vier möglichen Nukleotide) und den sieben komplementären Basen des Gegensinn-Stranges. Für jedes Modell wurden die thermodynamischen Parameter für vier nächste Nachbarn und eines flexiblen 3'-Nukleotides aufsummiert. Die Einheit der Energie ist K/mol bei 1 M NaCl, pH 7 und 37°C. Einmal wöchentlich wurde jeder UniGene Eintrag einer BLAT-Analyse (Kent, 2002) gegen die jeweils aktuelle Version der humanen oder der Maus-Genom-Datenbank unterzogen. Die Position der siRNA im Genom wurde durch Identifizierung der Position der Ziel-Sequenz im Genom und der Position der siRNA innerhalb Ziel-Sequenz bestimmt.

Von Qiagen synthetisierte siRNAs wurden nach firmeneigenen Algorithmen zur siRNA-Selektion und zusätzlichen im Folgenden genannten Limitierungen ausgewählt: Wenn möglich sollten pro Gen zwei siRNAs gefunden werden, die gegen die 3'UTR und alle vorhandenen Isoformen gerichtet waren. Damit die siRNA Sequenz auch als Grundlage für RNA Polymerase III (Pol III) Promotor (U6, H1, tRNA) getriebene shRNA (engl. *short hairpin*) Konstrukte dienen konnte, mussten Abfolgen von mehr als drei der Nukleobasen Uracil oder Adenin vermieden werden. Dies war notwendig, da diese das Transkriptionsterminationssignal für die RNA Pol III bilden.

3.2.5.2 RNA-Synthese nach der 2'-TBDMS-Methode

Die Synthesen nach der TBDMS--(*tert*-Butyldimethylsilylshutzgruppe) Methode wurden an einem EXPEDITE-DNA/RNA-Synthesizer 8909 (Applied-

Biosystems) wie bei Manniga (Manninga, 2005) beschrieben durchgeführt.

3.2.5.3 RNA- Synthese nach der 2'-ACE-Methode

Für die Synthesen nach der 2'-ACE Methode (bis-(2-acetoxyethoxy)-methylorthoester) (Scaringe et al., 1998; Scaringe, 2001) wurde Acetonitril („Amidite-Diluent“ Qualität) der Firma Proligo, Hamburg eingesetzt. Alle anderen Lösungsmittel wurden in Synthesequalität von der Firma Merck, Darmstadt bezogen, falls nicht anders angegeben. Alle Lösungen wurden mit einem Edelstahl-Druckfiltrationsgerät der Firma Sartorius, Göttingen mit einem PTFE-Filter der Porengröße 0,2 µm filtriert. Alle Glasflaschen für die Synthese wurden von der Firma Proligo, Hamburg bezogen. Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien von der Firma Aldrich, Seelze bezogen. Glasflaschen wurden mit Dimethyldichlorsilan (Applichem, Darmstadt) silanisiert. Das Dimethyldichlorsilan wurde mehrfach zum Silanisieren wiederverwertet. Anschließend wurden die Flaschen getrocknet und mit Acetonitril gewaschen.

3.2.5.3.1 5-(Ethyl-thio)-1H-tetrazol-Lösung (Aktivator)

Zur Herstellung einer 0,5 M Lösung wurden 162,71g 5-(Ethyl-thio)-1H-tetrazol (American International Chemical) in 2,5 l Acetonitril gelöst. Zum Trocknen wurde die Lösung mit ca. 150 g 4Å Molekularsieb (Applichem) versetzt und mindestens eine Woche getrocknet. Währenddessen wurde wiederholt frisches Molekularsieb hinzugefügt (insgesamt ca. 100 g). Die getrocknete Lösung wurde wie zuvor beschrieben (siehe 3.2.5.3) kurz vor der Verwendung filtriert und im Vakuum getrocknete 200 ml Glasflaschen aliquotiert. Wenn möglich wurde unter Argon Schutzatmosphäre gearbeitet, da die Lösung feuchtigkeitsempfindlich ist. Die gebrauchsfertige Lösung wurde bis zu drei Wochen bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.5.3.2 DCA-Lösung

2425 ml Dichlormethan wurden mit 75 ml Dichloressigsäure versetzt, gut durchmischt und bei Raumtemperatur gelagert. Kurz vor der Verwendung

wurde die Lösung filtriert und in 200 ml Glasflaschen aliquotiert. Die Stamm-Lösung konnte bis zu 1 Jahr ohne Qualitätsverlust bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.2.5.3.3 Methylimidazol-Lösung (Cap A)

Zu 720 ml Acetonitril wurden langsam 80 ml 1-Methylimidazol gegeben und gut miteinander vermischt, filtriert, in 200 ml Glasflaschen abgefüllt. Diese Lösung konnte mehrere Monate bei RT gelagert werden.

3.2.5.3.4 Essigsäureanhydrid Lösung (Cap B)

720 ml Acetonitril und 80 ml Essigsäureanhydrid wurden gut miteinander vermischt, filtriert und in 200 ml Glasflaschen abgefüllt. Diese Lösung konnte für mehrere Monate bei RT gelagert werden.

3.2.5.3.5 TEAHF-Lösung

In einem Kunststoffbecher (kein Glas!) wurden 1440 ml N,N-Dimethylformamid (DMF) mit 960 ml Triethylamin versetzt. Dann wurde langsam (Vorsicht: exotherme Reaktion) unter ständigem Rühren 48%ige Flußsäure (48 % HF in H₂O) hinzugegeben. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung filtriert, in 500 ml IP2 HDPE-Kunststoffflaschen (Nunc Nalgene) aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Lösung konnte etwa 4 Wochen lang verwendet werden.

3.2.5.3.6 Tert-Butyl-hydroperoxid-Lösung (15% in Toluol; etwa 1,5 M)

In einem Schütteltrichter wurden 1500 ml Toluol und 360 ml 70% tert-Butylhydroperoxid in H₂O gründlich durchmischt. Um im Anschluß eine vollständige Separation der organischen und der wässrigen Phase zu erhalten, ließ man die Lösung einige Zeit ruhen. Die organische Phase wurde entnommen und über Nacht bei -20°C gelagert. Das restliche Wasser in der organischen Phase bildete sichtbare Eiskristalle, welche leicht durch Filtrieren über eine eiskalte Glasfritte abgetrennt werden konnten. Die Lösung wurde dann auf Raumtemperatur gebracht und nochmals wie beschrieben (siehe

3.2.5.3) filtriert, in 400 ml Glasflaschen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Diese Lösung konnte über mehrere Monate verwendet werden.

3.2.5.3.7 Phosphoramidite

Die Phosphoramidite wurden lyophilisiert zu je 1 mmol von Dharmacon Research, USA bezogen. Beim Umgang mit dem Phosphoramiditen musste immer unter Argonschutzatmosphäre gearbeitet werden. Um die Amidite in 10 ml Acetonitril (Amidite-Diluent Qualität) zu lösen, wurde zunächst eine 10 ml Spritze mit Argon befüllt. Das Argon wurde dann mit aufgesetzter Kanüle durch das Septum in die Acetonitril Glasflasche gepresst. Durch den entstandenen Überdruck füllte sich die Spritze selbsttätig mit Acetonitril. Dieses wurde durch das Septum der Amiditflasche zum Amidit gegeben und dieses bei RT vollständig gelöst. Die Amiditlösung wurde wieder mit einer Spritze aufgenommen und über einen 0,2 µm Vorsatzfilter (Minisart SRP25, Sartorius) in ein mit Acetonitril gereinigtes, vacuumgetrocknetes Syntheser-Glasfläschchen überführt. Das deoxy-Thymidine-Amidit wurde lyophilisiert zu 0,5 oder 1 mmol von Dharmacon Research, USA bezogen und wie oben beschrieben in 5 bzw. 10 ml Amidite-Diluent gelöst und filtriert. Gelöste Amidite konnten zwischenzeitlich bei -20°C gelagert werden. Dazu wurde das Glasfläschchen mit einem Septum verschlossen.

3.2.5.3.8 Entschützungslösung A

0,5 g S_2Na_2 (Disodium-2-carbamoyl-2-cyanoethylen-1,1-dithiolate-tri-hydrat) wurden in 10 ml DMF (Dimethylformamid/ddH₂O (98:2, v:v)) gelöst. Die Lösung kann in größerem Volumen angesetzt, aliquotiert, bei -20°C gelagert, und einige Male aufgetaut und weggefroren werden.

3.2.5.3.9 Entschützungslösung B (2' Deprotection buffer)

Zu 450 ml sterilfiltriertem ddH₂O wurden 2,86 ml Eisessig (Endkonzentration 100 mM) gegeben. Durch tropfenweise Zugabe von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylene-diamine)(ca. 850 µl) wurde ein pH-Wert von 3,8 eingestellt. Das Volumen wurde mit ddH₂O auf 500 ml ergänzt, die Lösung

durchmischt, in 15 ml Probenröhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Aufgetaute Aliquote können für ca. 2-3 Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.2.5.4 Durchführung der siRNA-Synthese nach der 2'-ACE-Methode

Die siRNA-Synthese wurde mit einem modifiziertem ABI 394B DNA/RNA-Synthesizer (Dharmacon Research, Lafayette) durchgeführt. Die Phosphoramidite und benötigte Synthesereagenzien wurden wie zuvor beschrieben gelöst bzw. hergestellt. Alle siRNA-Synthesen wurden in einem 0,2 µmol-Maßstab durchgeführt.

Tabelle 7. Ablauf eines einzelnen Synthesesyklus nach der 2'-ACE-Methode.

Zyklus	Durchgeführte Einzelschritte
Entfernen der 5'Hydroxylschutzgruppe	<ul style="list-style-type: none"> - Säule mit 310 µl Acetonitril waschen - in 35 Sekunden ca. 1 ml TEAHF-Lösung über die Säule fördern - Säule mit 1,9 ml Acetonitril waschen
Kopplung	<ul style="list-style-type: none"> - Säule mit 150 µl Aktivator befüllen - je 210 µl Aktivator und Phosphoramidit auf die Säule fördern, Leitungen mit Acetonitril spülen (damit das gesamte Amidit auf die Säulen gelangt) (50 – 165 µl je nach Amidit bzw. Säulenposition) - 30 Sekunden warten, 9 µl Acetonitril auf die Säule fördern - 30 Sekunden warten - waschen der Säule mit 460 µl Acetonitril und 300 µl Wasser
Oxidation	<ul style="list-style-type: none"> - Waschen der Säule mit 300 µl Acetonitril - 620 µl tert-Butyl-hydroperoxid-Lösung auf die Säule fördern - 10 Sekunden warten - 310 µl tert-Butyl-hydroperoxid-Lösung auf die Säule fördern - waschen mit 460 µl Acetonitril
Capping	<ul style="list-style-type: none"> - jeweils 370 µl CapA und CapB auf die Säule fördern - 10 Sekunden warten - Waschen mit 620 µl Acetonitril

Die an der Säule gebundenen RNA-Oligonukleotide wurden mit Entschützungslösung A behandelt, um die O-Methylschutzgruppen des Phosphatrückgrates zu entfernen. Zunächst wurden dafür vier Synthesesäulen mittels Adaptoren miteinander verbunden, dann wurden 8 ml der Entschützungslösung A mittels einer Peristaltikpumpe 20 - 25 Minuten durch die

Säulen zirkuliert. Im Anschluß wurde die Entschützungslösung A aus den Säulen entfernt, und die Säulen dann nacheinander mit 15 ml ddH₂O und mit 15 ml Acetonitril gewaschen. Abschließend wurden die einzelnen Säulen dann kurz durch Druckluft getrocknet. An diesem Punkt konnten die Säulen bis zur weiteren Prozessierung bei -20°C gelagert werden.

Um die RNA von der Festphase zu eluieren wurde eine 5 ml Spritze mit 2 ml Methylamin (40% H₂O) befüllt und auf ein Ende einer Säule aufgesteckt. Eine weitere leere Spritze wurde auf das andere Ende der Säule gesteckt. Mittels beider Spritzen wurde das Methylaminvolumen dreimal innerhalb von 5 Minuten durch die Säule gedrückt und dabei die RNA von der Festphase gelöst. Dann wurde das Methylamin-RNA Eluat in ein 2 ml Schraubdeckelröhrchen überführt, gut verschlossen und für 10 Minuten bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluß wurden die Röhrchen kurz auf Eis abgekühlt und vorsichtig geöffnet (Überdruck!) und das Eluat in einem Eppendorf-Konzentrator bei 60°C bis zur Trockenheit eingedampft (ca. 3-4 Stunden).

Die RNA Pellets wurden herunterzentrifugiert, 400 µl Entschützungslösung B hinzugegeben und 10 Minuten bei RT geschüttelt, bis das Pellet vollständig gelöst war. Die Lösung wurde kurz herabzentrifugiert und für 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Im Anschluß wurde 24 µl 5 N Natriumchloridlösung und das vierfache Volumen Ethanol abs. (1200 µl) hinzugegeben, die Reaktionsgefäße viertel invertiert und die RNA bei -20°C für mindestens 4 Stunden oder über Nacht präzipitiert. Das Präzipitat wurde bei 4°C und 13.000 rpm für 15 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig und möglichst vollständig abgenommen, und die Pellets im Eppendorf-Konzentrator bei 30°C getrocknet. Die RNA-Oligonukleotide wurden dann in 500 µl ddH₂O gelöst, die Konzentration in einer 1:150 Verdünnung UV-spektroskopisch bestimmt und bei -20°C gelagert.

Nach verschiedenen Schritten wurde die Qualität der Synthese kontrolliert. Während der chemischen Synthese war keine Kontrolle der Kopplungseffizienz möglich. Einen ersten Hinweis auf die Ausbeute ergab die Größe des Pellets in den Eindampfungsschritten. Zeigte sich durch die UV-spektroskopische Quantifizierung eine geringe Ausbeute, wurde die Synthese wiederholt.

Von jedem synthetisierten Einzelstrang wurden 7,5 µl mit 7,5 µl PAGE-

Ladepuffer gemischt und auf ein analytisches 8 M 18%iges Harnstoff Polyacrylamid Gel (SequaGelKit) (Gelgröße: 15 x 17 x 0,08 cm) geladen. Die Einzelstränge wurden 1 Stunde bei 28 W aufgetrennt und anschließend mittels UV-Shadowing detektiert. Da nach der Synthese des 21mers keine zusätzliche Aufreinigung des Produktes erfolgte, wurden nur Einzelstränge, die als eine einzelne deutliche Bande zu sehen war, mit dem komplementären Strang hybridisiert.

Zur Herstellung einer 20 μM siRNA Duplex Lösung wurden die entsprechenden Mengen von Sinn-Strang und Gegensinn-Strang, 2x Annealing Puffer und ddH₂O gemischt. Anschließend wurde die Lösung für 1 Minute bei 90°C denaturiert und für 1 Stunde bei 37°C hybridisiert (Elbashir et al., 2002). Die Bildung von Duplicess wurde durch Analyse in einem hochauflösenden 4% NuSieveAgarosegel (0,5X TBE Puffer, 0,04 % (w/v) Ethidiumbromid) überprüft. Dazu wurden 0,5 μl eines 20 μM siRNA Duplexes mit 7,5 μl Saccharose Ladepuffer auf das Gel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels UV-Licht visualisiert. Die siRNA-Duplices wurden bei minus 20°C aufbewahrt. Um eine Hydrolyse der RNA zu minimieren wurden RNA Lösungen möglichst auf Eis gehalten.

Dr. Heiko Manninga etablierte die siRNA-Synthese nach der 2'-ACE-Methode in unserem Labor und war bei der Herstellung der Lösungen, der Vorbereitung der Chemikalien und bei der Synthese beteiligt.

3.2.6 RNA-Interferenz

3.2.6.1 siRNA-Transfektion in Säugerzellen

Etwa 24 Stunden vor der siRNA-Transfektion wurden adhärent wachsende HeLa SS6 Zellen in einer vom Experiment abhängigen Zelldichte (siehe Tab. 6, Abschnitt 3.2.3.1.3) ausplattiert. Die Transfektion von siRNAs wurde mit dem Reagenz Oligofectamine (Invitrogen) nach Herstellerangaben in Zellkulturmedium ohne Antibiotikum durchgeführt. Alle folgenden Angaben beschreiben die Transfektion einer Kavität in einer 24 Kavitäten Platte. Für das 6er oder 96er Platten-Format wurden die Mengenangaben mit dem Faktor fünf entsprechend herauf- oder herabskaliert. Zuerst wurde eine Verdünnung der siRNA hergestellt. 3 μl einer 20 μM siRNA-Duplex-Lösung wurden in 47 μl

OptiMEM (serum-freies Medium) verdünnt. Dann wurden 3 µl Oligofectamine Reagenz auf Raumtemperatur gebracht und in 12 µl OptiMEM verdünnt, durch Schnippen gemischt und 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. 15 µl des verdünnten Transfektionsreagenzes wurden zur siRNA Verdünnung pipettiert, durch Schnippen gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Bildung der siRNA-Oligofectamine Komplexe wurde erneut kurz gemischt und der Transfektionsansatz tropfenweise ins Zellkulturmedium gegeben. Zur homogenen Verteilung des Transfektionsansatzes wurden die Zellkulturgefäße kurz geschwenkt.

3.2.6.2 Einbringen von siRNAs in HeLa Zellen durch Elektroporation

Für das Einschleußen von siRNAs durch Elektroporation mit dem speziellen Elektroporationssystem (Gene Pulser XCell mit CE-Modul) wurden pro Elektroporationsansatz zwei 175 cm² Zellkulturflaschen vorbereitet. Diese sollten am Tag der Experimentdurchführung eine Zelldichte von 70-80% (1,5 bis 1,8 x 10⁷ Zellen pro Platte) aufweisen. Die Zellen wurden zunächst einmal mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend mittels Zugabe von 6 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Flasche für 4-5 Minuten vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Dann wurden die Zellen in kaltem serumfreiem Medium (OptiMEM) gründlich resuspendiert, in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und anschließend fünf Minuten bei 4°C und 1000 rpm pelletiert

Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, jedes Zellpellet in 1 ml 1x PBS (pH 7,4) resuspendiert, und alle Zellpellets in einem Zentrifugationsröhrchen vereinigt. Dieses wurde mit 1 x PBS (pH 7,4) auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt. Von dieser Zellsuspension wurde ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl eingesetzt. Die restlichen Zellen wiederholt für 5 Minuten bei 4°C mit 1000 rpm pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in serumfreiem Medium in einer Konzentration von 1,4 x 10⁷ Zellen/ml aufgenommen. Parallel zu den beschriebenen Zentrifugationsschritten wurden Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,4 cm) mit 10 µl siRNA-Duplex (20 µM) und 300 µl OptiMEM vorbereitet und auf Eis gekühlt.

Um nach 48 Stunden eine ausreichende Zellanzahl (ca. 0,5 bis 1 x 10⁸ Zellen) für eine „Mini“-Kernextraktpräparation zu erhalten (siehe Abschnitt

XXX), wurden pro siRNA 8 Elektroporationsansätze eingesetzt. Die verdünnten siRNA-Duplices in den gekühlten Elektroporationsküvetten wurden mit 500 µl der Zellsuspension gemischt und für 5 bis 10 Minuten weiter auf Eis inkubiert. Dann wurden die Elektroporationsküvetten in den Gene Pulser XCell eingesetzt, die Zellen für 25-30 ms mit 260 V und 950 µF gepulst und die siRNAs dadurch in die Zellen eingeschleußt.

Im Anschluß an eine zirka fünfminütige Regnerationsphase bei Raumtemperatur wurde zu den Elektroporationsansätzen 1 ml warmes Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen gut resuspendiert. Nachfolgend wurden bis zu acht Elektroporationsansätze mit der gleichen siRNA in 25 ml Zellkulturmedium vereinigt und diese auf fünf Zellkulturschalen (14,5 cm Durchmesser) verteilt ausplattiert. Nach dem Adhären der Zellen wurde zum Entfernen toter Zellen das Zellkulturmedium einmalig ersetzt.

3.2.6.3 Präparation von HeLa „Mini“-Zellkernextrakten

Die Präparation von Kernextrakt aus einer geringen Anzahl von RNAi-behandelten HeLa-Zellen erfolgte nach der Methode von (Schaffert et al., 2004).

3.2.6.4 Analyse des Zellwachstums nach RNAi-vermittelter Protein-Depletion

Analyse des Zellwachstums nach Gen Knockdown mittels spezifischer siRNA kann einen negativen Effekt auf das Wachstum von Zellen haben. Das Ergebnis kann so einen ersten Hinweis auf die Bedeutung des Proteins bzw. auf die Effizienz der siRNA geben.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden und zwei verschiedene Plattenformate für die Analyse des Zellwachstums nach siRNA vermittelter Depletion von Proteinen eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein siRNA-Duplex (GL2) gegen *Photinus pyralis* Luziferase, der keine Sequenzhomologie zu humanen mRNAs aufweist (Elbashir et al., 2001a). Zusätzlich wurden als weitere Negativkontrolle unbehandelte Zellen (WT) untersucht.

3.2.6.4.1 CASYcounter TT

Ein initialer Screen zur Zellzahlbestimmung wurde 72 h nach Transfektion mit den im Hause synthetisierten siRNAs, mit 24 Kavitäten-Platten und mit dem CASYcounter TT (Schärfesystem, Reutlingen) durchgeführt. Jede siRNA-Transfektion erfolgte im Triplikot auf einer Platte. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Pro Kavität wurden 300 µl vorgewärmtes Trypsin-EDTA zugegeben und die Platte für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 350 µl vorgewärmtem DMEM (mit FBS) wurde das Trypsin abgestoppt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Boden der Kavität gelöst und resuspendiert. 200 µl der Zellsuspension wurden in ein CASYtube mit 10 ml CASYton überführt, das CASYtube zweimal invertiert und die Anzahl lebender Zellen pro ml mit dem CASYcounter TT bestimmt.

Zur Analyse der von Qiagen (Hilden) gelieferten siRNAs und zur Erzeugung von Wachstumskurven wurden siRNA Transfektionen in 96 Kavitäten-Platten durchgeführt und zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h nach der Transfektion analysiert. Jede Transfektion wurde im doppelten Duplikat auf einer Platte durchgeführt und je eine Platte pro Zeitpunkt vorbereitet. Zur Bestimmung der relativen Zellzahl wurde das Zellkulturmedium mit einem 8-Kanal Nunc-Immunowash abgesaugt und die Zellen einmal mit 100 µl vorgewärmtem Trypsin-EDTA/PBS (1:1, v/v) gewaschen und umgehend wieder abgesaugt. Pro Kavität wurden 100 µl vorgewärmtes Trypsin-EDTA zugegeben und die Platte für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl vorgewärmtem DMEM (mit FBS) wurde das Trypsin abgestoppt und die Zellen durch 2 minütiges Schütteln auf einem IKA-Vibrax Schüttler bei 600 rpm vom Boden der Kavitäten gelöst. Mit einer 200 µl 8-Kanalpipette wurden die Zellen durch gründliches Auf- und Abpipettieren unter Vermeidung von Schaumbildung vollständig vom Boden der Kavitäten gelöst und resuspendiert. Je 200 µl aus je zwei Kavitäten eines Duplikates wurden in einem CASYtube mit 10 ml CASYton vereinigt, das CASYtube zweimal invertiert und die Anzahl lebender Zellen pro ml mit dem CASYcounter TT bestimmt.

3.2.6.4.2 MTS Assay (CellTiter96AQueousOne Lösung)

Die CellTiter96AQueousOne Lösung besteht aus einer Tetrazolium Verbindung [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] und einem Elektronenkopplungs Reagenz (phenazine methosulfate; PMS). MTS wird durch Dehydrogenase Enzyme lebender Zellen in ein Formazan Produkt reduziert, welches in Zellkulturmedium löslich ist. Die Absorption kann bei 490 nm direkt in Mikrotiterplatten gemessen werden. Die Absorption ist in einem bestimmten Bereich direkt zur Zellzahl proportional. Im Bereich oberhalb von 6.000 Zellen pro Kavität einer 96er Mikrotiterplatte, ist die Absorption nicht mehr direkt zur Zellzahl proportional. Die Zellzahl kann jedoch angenähert errechnet werden durch die Abhängigkeit $y=m*\ln(x)-b$ (y entspricht der Absorption, x entspricht der Zellzahl). Wird die Gleichung nach x aufgelöst ergibt sich $x=e^{(y+b)/m}$. Die Variablen für die Steigung m und den Achsenabschnitt b müssen durch Messung einer Verdünnungsreihe von Zellen und anschließender Regressionsanalyse ermittelt werden. Durch eine Messung bei 650 nm wurden Verunreinigungen der Mikrotiterplatte, wie z.B. Fingerabdrücke, detektiert.

Die siRNA Transfektionen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt und 72h nach der Transfektion analysiert. Jede Transfektion wurde im Duplikat auf einer Platte durchgeführt und von jeder Platte eine Duplette erstellt und analysiert. Pro Kavität wurden 22 μ l CellTiter96AQueousOne Lösung unter Vermeidung von Luftblasenbildung pipettiert. Die Platte wurde anschließend 2 Stunden bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 28 μ l 10% SDS-Lösung (w/v) gestoppt. Zur Reduktion der Kondensatbildung am Deckel wurden die Platten im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Zum Auslesen bei 490 nm und 650 nm im Mikrotiterplatten-Spektrophotometer wurde der Deckel durch einen fabrikneuen Deckel ersetzt.

3.2.6.4.3 CellScreen

Der CellScreen (Innovatis, Bielefeld) ist ein Hochdurchsatz-Gerät zur nicht invasiven Zellzählung. Diese Funktion wird gewährleistet durch Kombination

eines inversen Autofokus-Phasenkontrast-Lichtmikroskopes, eines automatischen Objektisches, einer Bilddatenbank und einer automatischen Bildanalysesoftware. Der Cellscreen arbeitet ohne Färbung und Probenentnahme. Bestimmt wird der Bedeckungsgrad des Kavitätenbodens durch adhärent wachsenden Zellen. Bei diesem System können einzelne Mikrotiterplatten mithilfe eines beweglichen Motorkreuztisches präzise angesteuert werden. Zur Bildgewinnung tastet eine autofokussierende inverse Mikroskopoptik das Untersuchungsobjekt ab. Die Bilddaten der Zellkultur werden automatisch erfasst und analysiert. Jedes von einer Digitalkamera aufgenommene Bild wird in einer Datenbank abgelegt. Während das Mikroskop zum nächsten Punkt wandert, analysiert die Software das Bild. Artefakte, wie Zellfragmente, Schmutz oder Luftblasen werden aussortiert, die von Zellen bedeckte Fläche dagegen wird bestimmt. Da die Zellkultur nicht berührt wird, kann sie in einer Zeitreihe wiederholt gemessen, sowie für weitere Experimente verwendet werden. Vor Beginn einer Messung ist das Experiment zu definieren und der geeignete Operator auszuwählen. Je nach den Erfordernissen der Untersuchung können in den Proliferationsexperimenten einzelne Kavitäten für die Bildauswahl festgelegt werden.

Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion in der gleichen Mikrotiterplatte analysiert. Pro siRNA wurden die Transfektionen im Triplikot durchgeführt, die Kontrollen im doppelten Triplikot. Die äußersten Reihen und Spalten der Mikrotiterplatten wurden nicht für Transfektionen genutzt. Diese Kavitäten unterlagen während der Messung starker Verdunstung, da die Messungen nicht in einem befeuchteten Inkubator erfolgten. Zu jeder Platte wurde eine Duplette angelegt. Die Messung wurde mittels PA Modul (Programmmodul zur Bestimmung der bedeckten Fläche) mit einem 10x Objektiv und vier Bildern pro Kavität durchgeführt. Die Messwerte für die durch Zellen bedeckte Fläche wurden in Excel exportiert und eine relative Quantifizierung durchgeführt.

3.2.6.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa SS6 Zellen

RNA für Real-time PCR Anwendungen wurde über Säulen mit Silica-Gel Membran des RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert. In die Isolierungsprozedur

wurde ein DNase Verdau auf der Säule mit eingeschlossen. Alle Schritte wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zelllysate wurden in der Regel zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Zelllysate 3 Minuten bei 37°C und 1.200 rpm in einem Thermomixer aufgetaut und dann durch achtmaliges Aufziehen und Ausstoßen durch eine 23G x 1 ¼ Kanüle, mit einer 1 oder 2 ml Spritze homogenisiert.

Die RNA wurde mit 50-80 µl ddH₂O von der Säule eluiert, die Konzentration UV-spektrometrisch bestimmt und für die Real-time PCR Arbeitsverdünnungen zu 6,25 ng/µl angelegt und aliquotiert. Alle Gesamt-RNA Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

RNA für die Northern-Blot Analyse wurde wie folgt isoliert. HeLa Zellen wurden in Homogenisierungspuffer resuspendiert, gevortext und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die RNA wurde im Anschluß mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert.

Homogenisierungspuffer

1% SDS

1,5 mM MgCl₂

10 mM NaCl

10 mM Tris pH 7,6

3.2.7 Quantitative Einschritt-Echtzeit RT-PCR mit SYBR-Green

Die Methode der Real-Time PCR ermöglicht die Amplifikation der cDNA oder DNA Vorlage in Echtzeit zu verfolgen. Im Gegensatz dazu ist die konventionelle PCR eine Endpunkt Analyse, da die PCR-Produkte erst nach Beendigung eines PCR-Laufes im Agarosegel analysiert werden. Eine Quantifizierung der PCR-Produkte ist in diesem Fall nur möglich, wenn die PCR Reaktion während der linear-logarithmischen Amplifikationsphase gestoppt und analysiert wird. Ist die Reaktion über diese Phase hinaus fortgeschritten, nimmt die Amplifikationsgeschwindigkeit ab und erreicht die Plateuphase. Real-time PCR basiert darauf, dass gleichzeitig mit der Zunahme der PCR-Produkte die Veränderung eines Fluoreszenzsignals verfolgt wird (Higuchi et al., 1992). Das Fluoreszenzsignal kann zum Beispiel durch das Reagenz SYBR-Green

erzeugt werden (Morrison et al., 1998). Das schwach fluoreszierende SYBR-Green interkaliert in doppelsträngige DNA und ändert dabei seine Fluoreszenzeigenschaft, so dass es zu einer vielfach verstärkten Fluoreszenz kommt. Nachteil des Farbstoffes ist seine unspezifische Bindung an jegliche ds-DNA, einschließlich unspezifischer Amplikons und Primer-Dimere. Die Abwesenheit unspezifischer Produkte kann durch eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte nachgewiesen werden.

3.2.7.1 Auswahl und Charakterisierung von DNA-Primern für Einschritt-Echtzeit RT-PCR

Zur Selektion der Primer wurden die Programme Primer 3 und PrimerExpress eingesetzt (siehe 3.1.13). Folgende Parameter wurden bei der Auswahl beachtet: Produktlänge 90 bis 140 bp, Primerlänge 18 bis 24 nt, Schmelztemperatur der Primer $>59^{\circ}\text{C}$.

Aufgrund der Sequenzinformationen aus der LocusLink bzw. EntrezGene Datenbank (siehe 3.1.13) wurden, wenn möglich, die Primer so gewählt, dass alle bekannten Isoformen damit amplifiziert werden konnten.

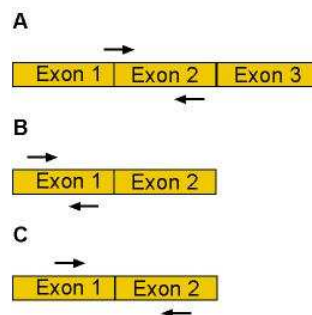


Abbildung 7. Auswahl der Primerbindestellen zur Amplifikation von mRNA und Prä-mRNA/mRNA. (A) Ein Primer überspannt eine Exon-Exon Grenze. (B) Beide Primer binden innerhalb eines Exons. (C) Vorwärts und Rückwärts Primer binden in zwei benachbarten Exons.

Des Weiteren wurde in Betracht gezogen, dass es durch Ausschalten von Spleißfaktoren zur Akkumulation von Prä-mRNA und zur Abnahme der mRNA-Menge kommen kann. Um sowohl die gesamte Prä-mRNA plus mRNA-Menge

für ein Gen, als auch nur die gespleißte mRNA separat nachweisen zu können, wurden in der Regel für jedes Gen zwei Primerpaare ausgewählt und synthetisiert.

Zur Nachweis der gesamten Prä-mRNA/mRNA-Menge wurden die Primer so gewählt, dass beide Primer innerhalb des gleichen Exons hybridisieren konnten (Abbildung 7B). Sollte nur die mRNA nachgewiesen werden, wurde einer der Primer so gewählt, dass er über einer Exon-Exon Grenze hybridisierte (Abbildung 7A). Insofern sie die o.g. Kriterien erfüllten, wurden auch Primersequenzen aus öffentlichen Real-time PCR Primerdatenbanken (siehe 3.1.13) verwendet

3.2.7.2 Validierung der PCR-Primer

Für die quantitative Echtzeit-RT-PCR ist es von besonderer Bedeutung die Spezifität und die PCR-Effizienz der Primer genau zu analysieren. Die Validierung der Primer erfolgte in mehreren Schritten, die im Flußdiagramm Abb 9 dargestellt sind. Zuerst wurden die Primer in einer RT-PCR Reaktion (siehe 3.2.2.10) eingesetzt und die PCR Produkte anschließend im 2,5%igen Agarose Gel analysiert. Darauf wurden die Primer in einem Einschnitt-Echtzeit RT-PCR Lauf mit abschließender Schmelzkurvenanalyse (siehe 3.2.7) eingesetzt und die PCR Produkte danach im 2,5%igen Agarose Gel analysiert. Konnte in der Schmelzkurvenanalyse ein spezifischer Scheitel ohne Primer-Dimere und Nebenschultern nachgewiesen werden und war im Agarosegel nur ein PCR-Produkt spezifischer Länge zu detektieren, wurden die Primer in einer RNA Verdünnungsreihe eingesetzt. Ausgehend von 25 ng Gesamt-RNA pro 25 µl Reaktionsansatz wurde $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ und $\frac{1}{64}$ dieser RNA Menge in jede Reaktion eingesetzt. Jeder PCR Lauf mit der RNA Verdünnungsreihe wurde im Duplikat durchgeführt.

Tabelle 8. Beispieldaten eines Experimentes zur Erzeugung einer Standardkurve.

RNA [ng]	RNA log [ng]	C(T) 1	C(T) 2	mean CT	stddev	CV%	slope	E	R ²
25,0000	1,398	22,137	22,269	22,203	0,094	0,4%	-3,013	2,147	0,9989
12,5000	1,097	22,968	23,427	23,197	0,324	1,4%			
6,2500	0,796	24,229	24,077	24,153	0,107	0,4%			
3,1250	0,495	24,754	24,968	24,861	0,152	0,6%			
1,5625	0,194	25,574	26,045	25,809	0,333	1,3%			
0,1953	-0,709	28,372	28,879	28,626	0,359	1,3%			

Um die Standardkurve zu zeichnen, wurde das Mittel aus den CT-Werten eines jeden Duplikates gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten RNA Menge aufgetragen.

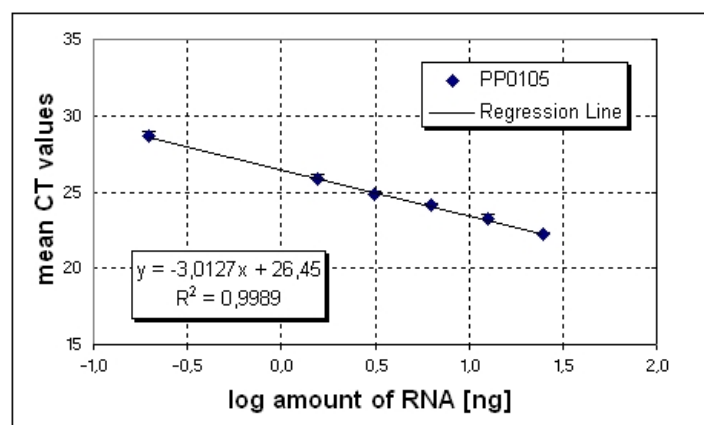


Abbildung 8. Beispiel einer Standardkurve zur Berechnung der Steigung und des Bestimmtheitsmaßes. Das Mittel aus den CT-Werten wurde gegen den dekadischen Logarithmus der in die Einschnitt-Echtzeit RT-PCR eingesetzten RNA Menge aufgetragen.

Die Steigung m der Regressionsgeraden wurde bestimmt und dieser Wert in die Berechnung der PCR Effizienz E ($E = 10^{(-1/m)}$) eingesetzt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Regressionsgeraden wurde aus den gegebenen Daten ermittelt. Lag der Wert des Bestimmtheitsmaßes zwischen 0,980 und 1,000, die PCR-Effizienz bei $2,0 \pm 0,2$ und erfüllten die Schmelzkurven auch bei niedrigen Mengen eingesetzter RNA die o.g. Kriterien, wurden die Primer zur Bestimmung von mRNA-Mengen in Einschnitt-Echtzeit RT-PCR Experimenten eingesetzt. Zur Berechnung der Steigung und des Bestimmtheitsmaßes wurden die entsprechenden Funktionen von Microsoft Excel genutzt.

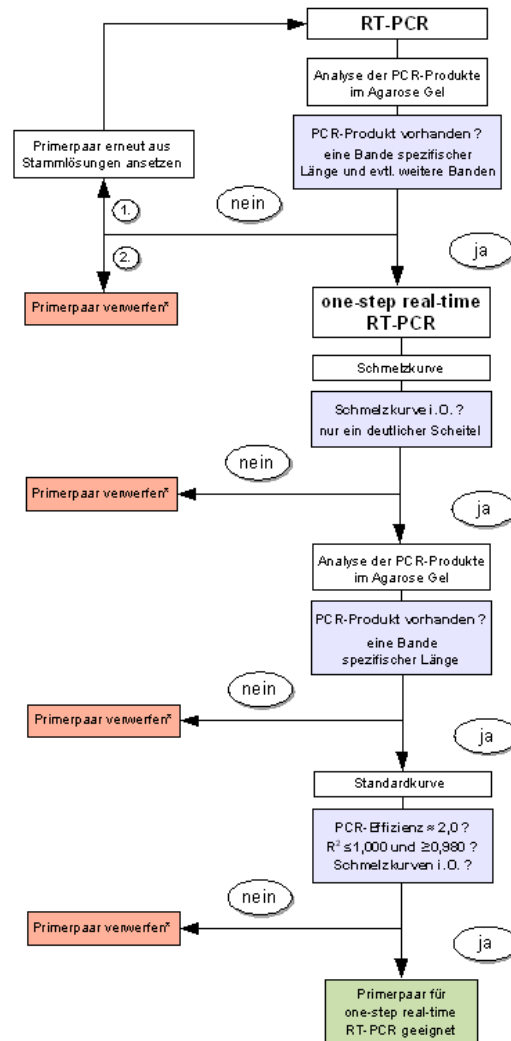


Abbildung 9. Flußdiagramm zur Validierung von Primern für die Einschritt-Echtzeit RT-PCR.

3.2.7.3 Reaktionsmix

Die Reaktionsmischung wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers erstellt. Das Reaktionsvolumen wurde jedoch von 50 µl auf 20 µl bzw. 10 µl herabskaliert. Beim Pipettieren der Reaktionsansätze und der Stammlösungen wurden Filter-Spitzen verwendet, um Kreuzkontamination zu unterbinden. Für den initialen Test von PCR-Primern auf Spezifität in der Schmelzkurvenanalyse wurden einfache Ansätze verwendet. Für die Erzeugung von Standardkurven und die Analyse von Expressionsprofilen wurden die Reaktionen im Duplikat durchgeführt. Die Reaktionen für das Referenz-Gen bei der Analyse von Expressionsprofilen wurde vier- bis sechsfach angesetzt. Für die Analyse von

siRNA vermittelter mRNA-Reduktion wurde jede Reaktion im Triplikat durchgeführt.

Tabelle 9. 20 µl und 10 µl RT-PCR Reaktionsansätze. Für Probe, blank-Kontrolle (ohne RNA) und minus RT-Kontrolle (ohne Reverse Transkription) für Einschritt-Echtzeit RT-PCR.

	20 µl Ansatz			10 µl Ansatz		
	Probe	- RNA	- RT	Probe	- RNA	- RT
RNase freies ddWasser	6,8 µl	8,8 µl	7,0 µl	1,9 µl	3,9 µl	2,0 µl
2x QuantiTect SYBR-Green RT-PCR Mastermix	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
Primerpaar (je 10 µM in ddH ₂ O)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Gesamt-RNA (6,25 ng/µl)	2,0 µl	-	2,0 µl	2,0 µl	-	2,0 µl
QuantiTect RT Mix	0,2 µl	0,2 µl	-	0,1 µl	0,1 µl	-
Endvolumen	20 µl	20 µl	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Alle Einschritt-Echtzeit RT-PCR Reaktionen wurden auf Eis pipettiert und mit geeignetem PCR-Programm (Tabelle 10) die Amplifikation durchgeführt.

Tabelle 10. PCR-Programm für Einschritt-Echtzeit RT-PCR mit „MJ Opticon1 DNA Engine“

Zyklus		Temp.	Dauer
A - 1x	Reverse Transkription	50°C	30 min
B - 1x	Aktivierung der Polymerasen	95°C	15 min
C - 45x	Denaturierung	94°C	15 sek
	Primerhybridisierung	58°C	25 sek
	Elongation	72°C	20 sek
	Fluoreszenz auslesen		
D - 1x		50°C	1 sek
E - 1x	Schmelzkurve	60°C-95°C	alle 0,3°C Fluoreszenz auslesen; dazwischen 10 sek Temp. halten
F - 1x	Kühlen	4°C	unendlich

3.2.7.4 Relative Quantifizierung des Genexpressionsniveaus

Die relative Quantifizierung des Genexpressionsniveaus erfolgte nach einem mathematischen Modell von Pfaffl (Pfaffl, 2001) (Gleichung 1). Dieses hat gegenüber vielen anderen mathematischen Modellen den Vorteil, dass es die experimentell bestimmten PCR-Effizienzen der Primerpaare zur

Amplifikation des Ziel-Gens und des Referenz-Gens miteinschließt, statt von einem fixen, theoretischen Wert $E = 2$ auszugehen.

$$relative\ Expression = \frac{E_{Zielgen}^{\Delta CT_{Zielgen} (Kontrolle - Knock\ down)}}{E_{Referenz}^{\Delta CT_{Referenz} (Kontrolle - Knock\ down)}} \quad \text{Gl.1}$$

Dieses Modell gilt jedoch nur unter der Annahme, dass die einmal experimentell bestimmte PCR-Effizienz in jeder Reaktion und jedem Experiment gleich ist und, dass die Expression des Referenz-Gens nicht durch die experimentellen Bedingungen beeinflusst wird. Die relative Quantifizierung erfolgte indem sowohl für ein Ziel-Gen, als auch für ein Referenz-Gen die differentielle Genexpression in zwei unterschiedlichen Proben bestimmt wurde. Die für Referenz- und Ziel-Gen erhaltenen Differenzwerte (ΔCT) wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Der resultierende normalisierte Wert ist Ausdruck der relativen Genexpression. Als Referenz-Gen wurde, wenn nicht anders erwähnt, das intronlose Gen *GLUD2* (Glutamat Dehydrogenase 2; NM_012084) eingesetzt. Die Kontroll-RNA wurde aus unbehandelten Zellen gewonnen oder aus Zellen, die mit *GL2* Kontroll-siRNAs transfiziert worden waren.

3.2.8 Der branched DNA Assay zur Quantifizierung von mRNA

Der branched DNA Assay (QuantiGene Discovery System, Genospectra, Fremont, CA) wurde zur Quantifizierung von mRNA-Mengen in zellulären Extrakten eingesetzt. Es handelt sich um eine sehr direkte Methode zur Evaluierung der mRNA-Menge, die weder Isolierungs-, noch Reinigungs-, noch Amplifikationsschritte benötigt.

Der Assay basiert auf einer Co-Hybridisierung von Ziel-mRNA und spezieller Oligonukleotid-Sonden. Die Sonden wurden von Genospectra geliefert. Ein Satz Sonden besteht aus drei verschiedenen Desoxyoligonucleotid Typen: (i) Die *Capture Extenders* (CEs), diese sind komplementär zur Ziel-mRNA und zu den Oligonukleotiden, die auf der *Capture*-Platte immobilisiert sind. (ii) Die *Label Extenders* (LEs) binden sowohl an die Ziel-mRNA als auch an die bDNA-Verstärker. (iii) Die blockierenden

Sonden (BLs) werden für die Spezifität der Chemielumineszenz benötigt, die durch eine enzymatische Entwicklung erzeugt wird. CEs, LEs und BLs sind derart gestaltet, dass sie auf einer Länge von 300 – 500 Nukleotiden mit der Ziel-mRNA hybridisieren und dabei einen DNA/RNA-Duplex formen.

Der branched DNA Assay wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet. HeLa SS6 Zellen wurden in 96 Kavitäten-Platten ausplattiert und mit siRNA transfiziert (siehe 3.2.6.1). Nach 66 Stunden wurden die Zellen durch Zugabe von Lysis-Puffer, der CEs, LEs, und BLs enthielt, aufgeschlossen. 50 µl Lysis-Puffer und 100 µl Medium wurden eingesetzt und die Zellen 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zelllysate wurden in die Capture-Platten transferiert, diese wurden versiegelt und bei 52°C über Nacht inkubiert. Die Capture-Platten wurden dann gewaschen und mit einer Marker/Signalverstärker-Lösung 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten bei 52°C mit der Substrat-Lösung inkubiert. Die emittierte Lumineszenz wurde mit einem Luminometer (VICTOR Light, Perkin Elmer, Wellesley, MA) analysiert.

Es wurden bDNA Sonden spezifisch für Lamin A/C, Emerin und b-Aktin mRNA eingesetzt. Die Zellen wurden 44 Stunden nach der siRNA-Transfektion lysiert und die mRNA-Mengen unter Verwendung geeigneter Sonden bestimmt. Die Lamin A/C und Emerin mRNA-Mengen wurden als Verhältnis relativ zur b-Aktin Kontroll-mRNA ausgedrückt. Der mRNA Knockdown (in %) wurde als Verhältnis von Zellen, die mit spezifischen siRNAs behandelt wurden, zu mit GL2 Kontroll-siRNA behandelten Zellen ausgedrückt.

4 ERGEBNISSE

4.1 siRNA-Design und siRNA-Synthese

4.1.1 Einleitung

Zu Beginn dieser Arbeit gab es sehr wenige Erkenntnisse zum rationalen Design von siRNAs und keine bioinformatischen Werkzeuge zur Auswahl von siRNA-Duplices. In Zusammenarbeit mit Bingbing Yuan vom Whitehead Institut, Cambridge/USA wurde deshalb ein siRNA-Selektions-Programm entwickelt und öffentlich verfügbar gemacht (Yuan et al., 2004) (Abschnitt 4.1.2). Mit Hilfe dieses Programmes wurden pro Ziel-Gen mindestens zwei siRNA-Duplices ausgewählt. Nach Möglichkeit war mindestens eine dieser siRNAs gegen die 3'-UTR (3'-**un**translatierte **R**egion) gerichtet, da diese siRNA-Sequenzen direkt in *Rescue*-Experimenten zur Bestätigung eines spezifischen Knockdowns eingesetzt werden können. Das *Rescue*-Experiment erfolgt durch transiente Expression der kodierenden mRNA-Sequenz des depletierten Proteins, um so den Knockdown spezifischen Phänotyp zu revertieren. Weitere Kriterien für das Design von siRNAs waren GC-Werte von 30-70% und die Vermeidung von Abfolgen von mehr als drei Adenin- oder Uracil-Resten in der siRNA-Sequenz. Ein weiteres Merkmal der siRNAs war, dass die ausgewählten siRNAs nach Möglichkeit gegen alle bekannten Isoformen des Ziel-Gens gerichtet waren. Dies erfolgte durch Abgleich der siRNAs-Sequenzen mit den in der NCBI Datenbank Gene (Maglott et al., 2007) eingetragenen mRNA RefSeq Sequenzen.

Eine weitere Software wurde zur Selektion von siRNA-Duplices spezieller Struktur erstellt (Abschnitt 4.1.3). Diese siRNA-Duplices unterscheiden sich von den prototypischen siRNAs durch die Abwesenheit eines Passagier-Stranges ohne definierte Ziel-mRNA. Stattdessen bestehen diese siRNAs aus zwei Leit-Strängen, und werden deshalb als "nur Leit-Strang siRNAs" bezeichnet. Beide Stränge sind zueinander nur partiell komplementär, aber vollkommen komplementär gegen eine oder zwei definierte Ziel-mRNA(s).

Zur Herstellung der siRNA-Duplices wurde die siRNA-Synthese im Labor etabliert und geeignete Methoden zur Kontrolle des Synthese-Prozesses und der Sequenzverwaltung entwickelt. Wenn nicht anders angegeben, wurden

die 3'-Enden der siRNA-Einzelstränge durch Austausch gegen Desoxyribonucleotide (N19dTdT) leicht stabilisiert.

4.1.2 siRNA-Selektions-Server: ein automatisierter Server zur Auswahl von siRNA-Oligonukleotiden

Zur Auswahl von spezifischen und effizienten siRNA-Duplicates wurde in Zusammenarbeit mit Bingbing Yuan (Yuan et al., 2004) ein siRNA-Selektions-Programm entwickelt und über das Internet öffentlich verfügbar gemacht (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>).

Die Benutzerschnittstelle gliedert sich in drei aufeinanderfolgende Ansichten: das Eingabe-Formular, ein Vorauswahlfenster und eine Ergebnisansicht. Das Eingabe-Formular bildet den Leitfaden für das siRNA-Design. Als Ziel-Sequenz der siRNAs kann eine cDNA Sequenz entweder im Roh- oder im FASTA-Format (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/fasta.shtml>) eingegeben werden. Alternativ ist die Angabe der GI- oder GenBank Accession-Nummer der zu analysierenden Sequenz möglich. Die Benutzerschnittstelle erlaubt die Vorgabe eines beliebigen Sequenzmusters, welches die gesuchte siRNA enthalten soll. Dies ermöglicht es, siRNA-Ziel-Regionen (23mer) mit unterschiedlichen Sequenzmustern auszuwählen: zum Beispiel Sequenzmuster nach den sogenannten Tuschl-Regeln (siehe Einleitung 2.1.4) oder auch komplexere Muster nach den Regeln von Reynolds, Hsieh und Ui-Tei (Hsieh et al., 2004; Reynolds et al., 2004; Ui-Tei et al., 2004). Zur Beschreibung des Musters können die komplette NC-IUB (engl. *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*) Nomenklatur und reguläre Ausdrücke genutzt werden.

Für die Analyse der Basenpaarzusammensetzung steht eine Anzahl verschiedener Filteroptionen zur Verfügung. So kann der GC-Gehalt, die Variation der Basen und die Anzahl repetitiver Basenabfolgen festgelegt werden. Die letztgenannte Option ist zum Beispiel von Bedeutung, wenn eine siRNA-Sequenz zum Design eines Haarnadel-RNA-Expressions-Vektors (shRNA, short hairpin RNA) mit RNA-Polymerase III Promotor (U6, H1 oder tRNA Promotor) verwendet werden soll. In diesem Fall darf die siRNA-Sequenz keine Abfolge von vier oder mehr konsekutiven Thymin- oder Adenosin-Resten

enthalten, da diese Abfolge das Transkriptionsterminationssignal für die RNA-Polymerase III darstellt. Des Weiteren sollten vier oder mehr aufeinanderfolgende Guanin-Reste vermieden werden, da oligoG-tragende RNA Tetraplexe bilden kann, die bei einigen Methoden der chemischen RNA-Synthese zu Schwierigkeiten führen können. Mit den beschriebenen Mustern und Filteroptionen sind alle Parameter für die Suche nach siRNA-Sequenzen festgelegt.


siRNA Selection Program

• * Enter your sequence in Raw or FASTA format below,

OR enter GI or Accession number

• *Choose the siRNA pattern:

Recommended patterns	<input type="radio"/> custom
<input checked="" type="radio"/> AAN19TT	<input type="radio"/> <input style="width: 150px;" type="text"/>
<input type="radio"/> NAN21	Enter pattern up to 23 bases

• Filter criteria:

- *GC percentage: from to
- *exclude a run of or more T or A in a row
- *exclude a run of or more Gs in a row
- *include less than consecutive GC in a row.
- equal % (+/-) for all 4 bases.

• *End your siRNAs with

•

Note: *: required parameters.

Copyright 2002,2003,2004 Whitehead Institute for Biomedical Research. All rights reserved.

Comments and suggestions to: sirna-help@wi.mit.edu

Abbildung 10. Startseite - Formular zur Eingabe der siRNA-Ziel-Sequenz und der Parameter für das siRNA-Design (Abb. aus Yuan, 2004).

Nach Abschluß des Auswahlprozesses stellt das Programm die siRNA Sequenzen für den Passagier-Strang und den Leit-Strang in 5'-3' Orientierung fertig aufbereitet für einen Syntheseauftrag zur Verfügung. Für diese Darstellung kann in einem letzten Auswahlfeld der Startseite festgelegt

werden, ob und gegebenenfalls durch welche Nukleotide die beiden Nukleotide der 3'-Überhänge eines jeden siRNA-Einzelstranges nachträglich ersetzt werden sollen. Die Eingabe „NN“ beläßt die Nukleotide der Originalsequenz unverändert.

Nach Absenden des Selektionsauftrages sucht das Programm anhand der eingegebenen Gen-Ziel-Sequenz und der gewählten Muster und Filteroptionen nach potentiellen siRNAs. Der Server übergibt nach abgeschlossener Analyse eine Liste von siRNA-Kandidaten an die Benutzerschnittstelle (Abbildung 11). Für jede siRNA werden in dieser Liste die 23mer siRNA-Ziel-Sequenz, die Position des 23mers innerhalb der Gen-Ziel-Sequenz, das Sequenzmuster, der GC-Gehalt und die thermodynamische Stabilität der 5'-Enden des Sinn-Stranges und des Gegensinn-Stranges angegeben. Eine geringere thermodynamische Stabilität am 5'-Ende des Gegensinn-Stranges ist ein sehr wichtiges Merkmal aktiver siRNAs, weil diese siRNAs bevorzugt in RISC eingebaut werden und so als Leit-Strang den Abbau der Ziel-mRNA vermitteln (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003) (siehe Einleitung).

Choose siRNA Candidate(s) [logout](#) [start over](#)

1. siRNA candidates after filtering the base_run, gc%, and base_variation: (The more oligos you choose, the longer time for you to get results.)
Oligo patterns: A=AAN19TT; B=NAN19NN; F=Custom

Sort the sequences by

	Position	Sequence	Patterns	GC%	Thermodynamic Values
<input checked="" type="checkbox"/>	142-164	AAGGCCGTGACCCGTGTATTATT	A,B	55	-8.21 (-13.50, -5.29)
<input checked="" type="checkbox"/>	273-295	AATCGACAACGTGAACCAGGATT	A,B	50	0.50 (-9.90, -10.40)
<input checked="" type="checkbox"/>	280-302	AACGTGAACCAGGATTAGGATTT	A,B	45	-0.77 (-9.66, -8.89)
<input checked="" type="checkbox"/>	825-847	AAAGCTCCTGCTAATAAAGCCTT	A,B	45	0.86 (-10.03, -10.89)
<input checked="" type="checkbox"/>	826-848	AAGTCCTGCTAATAAAGCCTTT	A,B	45	-1.37 (-12.31, -10.94)
<input checked="" type="checkbox"/>	1193-1215	AATGAGTTACCAGAGAGCAGCTT	A,B	50	2.85 (-9.38, -12.23)
<input checked="" type="checkbox"/>	1483-1505	AACTAGAACACAAGCCACTGTTT	A,B	45	0.33 (-8.44, -8.77)
<input checked="" type="checkbox"/>	1863-1885	AACTTTGTAGACTTAATGGTATT	A,B	30	2.89 (-6.65, -9.54)
<input checked="" type="checkbox"/>	1914-1936	AAGCATTGTGAAACTTCTGTGTT	A,B	35	-0.69 (-8.76, -8.07)
<input checked="" type="checkbox"/>	2016-2038	AATTCTGAGCCCATATTTCACTT	A,B	40	0.76 (-8.07, -8.83)
<input checked="" type="checkbox"/>	2050-2072	AATAAATCAATAAAGCTTGCCTT	A,B	30	6.03 (-4.89, -10.92)

2. Choose the database(s) you would like to blast against:

3. Exclude polymorphisms Exclude exon/exon boundaries

4. Receive result
 via email:
 on web browser.

5.

Abbildung 11. Formular zur Vorauswahl von siRNA-Oligos für weitergehende Analysen (Abb. aus Yuan, 2004).

Das Ziel der Anwendung Hit von siRNAs in Säugerzellen ist es, die Expression einzelner Gene spezifisch zu unterdrücken. Darum gilt es siRNA-Sequenzen sorgfältig auszuwählen, die eine möglichst geringe Sequenzübereinstimmung zu allen nicht-Ziel-mRNAs besitzen. Damit dies gewährleistet wird, führt das siRNA-Selektionsprogramm BLAST Analysen (Altschul et al., 1990) mit jedem siRNA-Kandidat gegen die gesamte humane oder Maus UniGene Datenbank (Benson et al., 2008; Wheeler et al., 2008) durch und übergibt die Ergebnisse an die Benutzerschnittstelle.

Wurden die siRNA-Kandidaten ausgewählt und der Auftrag abgesendet, können die Endergebnisse auf zwei verschiedenen Wegen erhalten werden. Entweder kann eine URL zu den Ergebnissen per Email übermittelt werden, oder der Nutzer kann sich die Ergebnisse nach einer Wartezeit direkt im Browser anzeigen lassen (Abbildung 12).

Welcome to siRNA results Logout 0001010

Best Hit: Unigene: [gnl|Un|Hs|51728251](#) [NM_000016](#) [similarity to your sequence](#)

length=2192 coding region: 192-1457

No.	pos.	siRNA	type	GC%	Thermodynamics	exon/exon boundary	SNP	blast result
<input checked="" type="checkbox"/>	1 142	S 5': GGCCGUGACCCGUGUAUUA cDNA: AA GGCCGUGACCCGUGUAUUA AS 3': UU CCGGCACUGGGCACUAUUA	UU TT	A,B	55 -8.21 (-13.50, -5.29)	0		17/20
<input checked="" type="checkbox"/>	2 273	S 5': UCGACAACCGUAACCAGGA cDNA: AA TCGACAACCGUAACCAGGA AS 3': UU AGCUGUUGCACUUGGUCCU	UU TT	A,B	50 0.50 (-9.90, -10.40)	1		17/20
<input checked="" type="checkbox"/>	3 280	S 5': CGUGAACCGAUUAGGAAU cDNA: AA CGTGAACCGATTAGGAT AS 3': UU GCACUUGGUCCUAUCCUA	UU TT	A,B	45 -0.77 (-9.66, -8.89)	1		17/20
<input checked="" type="checkbox"/>	4 425	S 5': AGCUCUGUCUAUAAAGCC cDNA: AA AGCTCCTGCTAATAAAGCC AS 3': UU UCGAGGACGUAUUUUCGG	UU TT	A,B	45 0.86 (-10.03, -10.89)	0		17/20
<input checked="" type="checkbox"/>	5 426	S 5': GCUCUGUCUAUAAAGCCU cDNA: AA GCTCCTGCTAATAAAGCCT AS 3': UU CGAGGACGUAUUUUCGGA	UU TT	A,B	45 -1.37 (-12.31, -10.94)	0		18/20
<input checked="" type="checkbox"/>	6 1100	S 5': UGAGUUUCCAGAGAGCAGC cDNA: AA TGAGTTACCAGAGAGCAGC AS 3': UU ACUCAAUGGUCUCUCGUGC	UU TT	A,B	50 2.85 (-9.38, -12.23)	0		18/20
<input checked="" type="checkbox"/>	7 1483	S 5': CUAGAACAACAGCCACUGU cDNA: AA CTAGAACAACAGCCACTGT AS 3': UU GAUCUUGUGUCUGGUGACA	UU TT	A,B	45 0.33 (-8.44, -8.77)	0		17/20
<input checked="" type="checkbox"/>	8 1903	S 5': CUUUGUGACUUAAGGUA cDNA: AA CTTTGTAGACTTAATGGTA AS 3': UU GAAACACUGGAAUUCAGU	UU TT	A,B	30 2.89 (-6.65, -9.54)	0		18/20
<input checked="" type="checkbox"/>	9 1914	S 5': GCATUUGUGAAAACUUCUG cDNA: AA GCATTTGTGAAACTTTCTG AS 3': UU CGUAAACACUUGGAAAGAC	UU TT	A,B	35 -0.69 (-8.76, -8.07)	0		18/20
<input checked="" type="checkbox"/>	10 2016	S 5': UUCGAGCCCAUUAUUCAC cDNA: AA TTCTGAGCCCATATTTTAC AS 3': UU AAGACUCGGUUAUAAAGUG	UU TT	A,B	40 0.76 (-8.07, -8.83)	0	rs#1803022	17/20
<input checked="" type="checkbox"/>	11 2050	S 5': UAAAUCAUUAAGCUUGCC cDNA: AA TAAATCAATAAAGCTTGCC AS 3': UU AUUUGUAUUAUUCGAAACGG	UU TT	A,B	30 6.03 (-4.89, -10.92)	0		18/20

Abbildung 12. Ergebnisseite nach beendeter BLAST Analyse mit ausgewählten siRNA-Sequenzen (Abb. aus Yuan, 2004).

Im Ergebnissenfenster werden folgende Informationen zu jedem siRNA-Kandidat angezeigt: die Position der siRNA innerhalb der mRNA-Ziel-Sequenz, die Sequenz des Passagier-Stranges und des Leit-Stranges (eventuell mit

modifizierten 2 nt 3'-Überhängen), die 23mer siRNA-Ziel-Sequenz, der GC-Gehalt, die thermodynamische Stabilität der Duplex-Enden, die Lage der siRNA im Bereich von Exon-Exon Grenzen (0 - nein, 1 – ja), das Vorkommen von SNPs (engl. *single nucleotide polymorphism*) und die Ergebnisse der BLAST Analyse. Standardmäßig werden die siRNAs - nach ihrer Position innerhalb Gen-Ziel-Sequenz sortiert - in einer Liste ausgegeben. Mittels eines Auswahlmenüs kann auch nach den anderen dargestellten Werten sortiert werden. Die Ergebnisse der BLAST Analyse sind verlinkt mit dem detaillierten Ergebnis der BLAST Analyse zu jedem einzelnen siRNA-Kandidat (Abbildung 13).

Target_Unigene	Description	Genbank	Identity	Alignment
Hs#51728251	Homo sapiens acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain (ACADM), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	NM_000016	20	<pre> 1 aggcctgaccctgttatta 20 143 aggcctgaccctgttatta 162 </pre>
Hs#53219279	Homo sapiens synovial sarcoma, X breakpoint 3 (S5X3), transcript variant 1, mRNA	NM_021014	17	<pre> 1 aggcctgaccctgttatta 20 329 agtcctgaccctttatta 310 </pre>
Hs#511134558	BX112847 Soares placenta Nb2HP Homo sapiens cDNA clone IMAp998807182, mRNA sequence	BX112847	14	<pre> 5 cgtgaccctgttat 18 235 cgtgaccctgttat 222 </pre>

Abbildung 13. Detaillierte Ausgabe der BLAST Ergebnisse zu einem ausgewählten siRNA-Duplex (Abb. aus Yuan, 2004).

Die Positionsangaben der siRNA-Kandidaten innerhalb der Gen-Sequenz werden farbkodiert dargestellt, entsprechend der Gen-Region, in welcher die siRNAs angreifen. Dabei repräsentiert eine grüne Färbung die 5'-UTR, Rot die kodierende Sequenz und Blau kennzeichnet die 3'-UTR als siRNA-Ziel-Region.

Der siRNA-Selektions-Server ist ein flexibles und leistungsfähiges Werkzeug zur Auswahl von siRNAs. Es ermöglicht dem Nutzer, eine Vielzahl von Filteroptionen individuell anzupassen und neueste Erkenntnisse zum siRNA-Design auf einfache Weise zu integrieren. Des Weiteren bietet es größtmögliche Transparenz während des Auswahlprozesses.

4.1.3 Ein alternativer Ansatz zum siRNA-Design mit "nur Leit-Strang siRNA"-Duplices

Analysen der Basen-Paarungen in prä-miRNA RNAse III Prozessierungsprodukten (miRNA/miRNA* Duplices) zeigten, dass mehrere

Basenfehlpaarungen in diesen dsRNA Prozessierungsintermediaten toleriert werden. Diese Befunde deuten auf eine signifikante Flexibilität bezüglich der Sequenzwahl des siRNA Passagier-Stranges hin und darauf, dass somit Abweichungen von den prototypischen, vollständig komplementären Passagier-Strang und Leit-Strang möglich sein könnten.

Aufgrund dieser Daten schien es möglich, siRNA-Duplices zu entwerfen, deren Passagier- und Leit-Strang vollkommen komplementär zur Ziel-mRNA sind, während die Einzelstränge zueinander nur eine partielle Komplementarität aufweisen. Die Komplementarität sollte jedoch ausreichen einen stabilen Duplex zu bilden.

Drei Arten von Sequenzen erfüllen diese Anforderungen:

(i) Ein siRNA Leit-Strang wird so gewählt, dass er partiell selbstkomplementär (oder palindromisch) ist. Da diese Duplices nur aus Leit-Strängen bestehen, werden sie als "nur Leit-Strang siRNAs" (engl. *guide-only siRNA*) bezeichnet. Es ist wichtig anzumerken, dass eine solche siRNA-Sequenz immer im Gleichgewicht mit einer kurzen Haarnadelrückfaltungsstruktur steht. Dabei wird das Gleichgewicht von Haarnadelrückfaltungsstruktur und Duplex von der Art der Basenfehlpaarungen und der Konzentration des Stranges abhängen.

(ii) siRNA-Duplices, die aus zwei verschiedenen siRNA-Einzelsträngen bestehen, welche vollständig komplementär zu zwei unterschiedlichen Regionen der Ziel-mRNA und gleichzeitig zueinander partiell komplementär sind. Da diese Duplices zwei verschiedene Ziel-Regionen einer Ziel-mRNA angreifen, werden sie im Folgenden als „gegen eine Ziel-mRNA gerichtete duale (dual *lat.* - eine Zweiheit bildend) nur Leit-Strang siRNA“ bezeichnet. Der Einsatz nicht-selbstkomplementärer Einzelstränge soll außerdem die Bildung von Haarnadelrückfaltungsstrukturen reduzieren.

(iii) siRNA-Duplices der gleichen Struktur wie unter (ii) beschrieben, jedoch mit Leit-Strängen, die gegen zwei verschiedene Ziel-mRNAs gerichtet sind. Dadurch könnte prinzipiell ein simultaner Knockdown zweier definierter Gene mit einem siRNA-Duplex ermöglicht werden. Dieser siRNA-Typ wird im Folgenden als „gegen zwei Ziel-mRNAs gerichtete duale nur Leit-Strang siRNA“ bezeichnet.

Diese besonderen Anforderungen an das siRNA-Design erforderten die

Entwicklung spezieller bioinformatischer Werkzeuge.

4.1.3.1 “Nur Leit-Strang siRNA“-Selektions-Server

Zur Identifizierung von partiell palindromischen oder partiell selbstkomplementären mRNA-Abschnitten und für das siRNA-Design wurde eine Software in Perl Skriptsprache erstellt und als Internet basiertes Auswahlwerkzeug öffentlich verfügbar gemacht (<http://www.mpibpc.mpg.de/groups/luehrmann/siRNA>; siehe Abbildung 14).

Guide-only siRNA selection server

Please select siRNA type:

(A) self complementary guide-only siRNA
 (B) dual-target guide-only siRNA

Restrict siRNA Pattern:

NAN21
 no restriction

Exclude siRNAs with stretches of or more times of same nucleotide

GU wobble base pair (max. content):

non-Watson-Crick base pair excluding GU wobbles (max. content):

non-Watson-Crick base pair including GU wobbles (max. content):

Name of sequence 1:
 (optional)

Paste sequence 1 in [raw format](#) into the field below (essential for siRNA type A and B):

Name of sequence 2:
 (optional)

Paste sequence 2 in [raw format](#) into the field below (essential for siRNA type B):

[Disclaimer](#)

Copyright 2005 Max Planck Institute for Biophysical Chemistry. All rights reserved.
Comments and suggestions to: ttuschi@rockefeller.edu

Abbildung 14. Startseite des “nur Leit-Strang siRNA“-Selektions-Servers – Einstellungen der Filteroptionen und Eingabe der Ziel-Sequenz(en)

Das Programm akzeptiert als Eingabe zwei cDNA- oder mRNA-Sequenzen im Roh-Format und analysiert das Maß an Komplementarität für alle

möglichen Kombinationen von 19-Nukleotid langen komplementären Sequenzabschnitten der Eingabesequenz bzw. -sequenzen.

Die *in-silico* hybridisierten Sequenzen werden hinsichtlich der Anzahl an G-U-Wobble-Paaren und anderer nicht-Watson-Crick-Basen-Paarungen analysiert. Für die Auswahl der "nur Leit-Strang siRNAs" wurde die maximale Anzahl an G-U-Wobble-Paaren und anderer nicht-Watson-Crick-Basen-Paarungen innerhalb des 19-Nukleotid langen hybridisierten Bereichs über einstellbare Filter festgesetzt. Dabei wurden maximal sieben nicht-Watson-Crick-Basen-Paarungen inklusive G-U-Wobble-Paaren zugelassen. Wahlweise kann über eine Filtereinstellung jede 23mer Ziel-Sequenz analysiert werden oder nur solche mit dem Sequenzmuster AAN19TT nach den sogenannten Tuschl-Regeln (siehe Einleitung 2.1.4). Unabhängig von den Einstellungen zum Auswahlprozess wird jedoch für die 2-nt 3'-Überhänge nach Abschluss der Analyse im Duplex dTdT angegeben (Abbildung 15).

4) partial palindromic target sites (I: PPIL1 II: PPIL1):			
SEQ I at pos.: 770		SEQ II at pos.: 770	nWC: *****
mRNA AGCUUCUAGAUGACAUGAAGAUGA		AGCUUCUAGAUGACAUGAAGAUGA	G/U: ..
AUUCUAUGUCAUCUAAGAAGTT	guide II	AUUCUAUGUCAUCUAAGAAGTT	guide I
. .		. .	
TTGAAAGAUCUACUGUAUCUUA	guide I	TTGAAAGAUCUACUGUAUCUUA	guide II

Abbildung 15. Ausgabe mit Darstellung der Duplices mit Basen-Paarungen.

Die Ausgabe des Programms liefert grafische und textbasierte Informationen zur Position der möglichen Oligos relativ zur Ziel-mRNA (Abbildung 15 und 16). Des Weiteren wird die Beschreibung und Sequenz der siRNA-Duplices, und die Watson-Crick- und nicht-Watson-Crick-Basenpaar-Zusammensetzung ausgegeben.

<p>Results from guide-only siRNA selection server (Tue Aug 15 09:44:37 2006) Copyright 2005 Max Planck Institute for Biophysical Chemistry</p> <p>Guide-only siRNAs for gene: PPIL1 (1723 bp)</p> <pre>#,nWC,G/U,sum_SEQ_I,SEQ_II,SEQ_I_pos,SEQ_II_pos,mRNA_SEQ_I,mRNA_SEQ_II,guide_II_5'-3',guide_I_3'-5',guide_I_5'-3',guide_II_3'-5' 1,5,2,7,PPIL1,PPIL1,318,318,CCAAAGACCUGUAGAACAUUUG,CCAAAGACCUGUAGAACAUUUG,AAAGUUCUACAGGCUUUUTT,TTUUCUGGACAUCUUGAAA,AAAGUUCUACAGGCUUUUTT,TTUUCUGGACAUCUUGAAA 2,5,2,7,PPIL1,PPIL1,466,466,UUGAAGAUGAACUUAUCCAGAC,UUGAAGAUGAACUUAUCCAGAC,CUGGAUGAAGUUAUCCUUTT,TTUUCUACUUGAAGUAGGUC,CUGGAUGAAGUUAUCCUUTT,TTUUCUACUUGAAGUAGGUC 3,5,2,7,PPIL1,PPIL1,664,664,ACUCCAGGACCGCCUGUGAC,ACUCCAGGACCGCCUGUGAC,CCACAGGCGGUCUGGAGATT,TTAGGUCUGGCGGACACT,CCACAGGCGGUCUGGAGATT,TTAGGUCUGGCGGACACT 4,5,2,7,PPIL1,PPIL1,770,770,AGCUUCUAGAUGACAUGAAGAUGA,AGCUUCUAGAUGACAUGAAGAUGA,AUUCUAUGUCAUCUAAGAAGTT,TTGAAAGAUCUACUGUAUCUUA,AUUCUAUGUCAUCUAAGAAGTT,TTGAAAGAUCUACUGUAUCUUA 5,5,2,7,PPIL1,PPIL1,792,792,ACAUGUAUGCUAUAUUCUUAU,ACAUGUAUGCUAUAUUCUUAU,AUGAAAUUAGCAUUAUUAU,TTUACUUAUGCAUUAUUAU,TTUACUUAUGCAUUAUUAU,AUGAAAUUAGCAUUAUUAU 6,5,2,7,PPIL1,PPIL1,1115,1115,CUUGAUGGUGACAGCCACAGAA,CUUGAUGGUGACAGCCACAGAA,CUGUGGUGUACAGCCACATT,TTACUACGACUGCGGUGUC,CUGUGGUGUACAGCCACATT,TTACUACGACUGCGGUGUC 7,3,2,5,PPIL1,PPIL1,1654,1654,AUACCUAUGUAUAUUAUUAUUAU,AUACCUAUGUAUAUUAUUAUUAU,UUCUAUGUAUAUUAUUAUUAU,UUCUAUGUAUAUUAUUAUUAU,TTUUGAUAUAUUAUUAUUAU,TTUUGAUAUAUUAUUAUUAU</pre> <p>In total 7 guide-only siRNAs were found.</p>
--

Abbildung 16. Ausgabe als Liste im CVS-Format zum Import in Tabellenkalkulation

Die Textausgabe erfolgt in einem durch Kommas getrennten Format (CSV) und ermöglicht so einen einfachen Import in Tabellenkalkulationsprogramme zum nachträglichen Sortieren und Filtern der Ergebnisse nach eigenen Kriterien.

4.1.3.2 siRNA-Design und Machbarkeitsstudie

Mit Hilfe des "nur Leit-Strang siRNA"-Selektions-Programms wurde zunächst untersucht, ob in einer durchschnittlichen humanen mRNA eine ausreichend große Anzahl stabiler "nur Leit-Strang siRNA"-Duplices zu erwarten ist.

Dazu wurde ein Test-Datensatz von 100 verschiedenen mRNAs unterschiedlicher Länge im Bereich von 400 bis 9000 Nukleotiden analysiert (siehe Anhang, Tabelle A-1). Es wurden nur Duplices akzeptiert, die nicht mehr als sieben nicht-Watson-Crick-Basenpaare enthielten, wobei die Zahl der nicht-G-U-Wobble-Basenpaare auf fünf und die Zahl der G-U-Wobble-Basenpaare auf sieben beschränkt wurde. Sequenzen mit Abfolgen von vier oder mehr Wiederholungen des gleichen Nukleotids wurden ausgeschlossen. Zur Analyse der dualen "nur Leit-Strang siRNAs" wurde die mRNA-Sequenz NM_012084 (2348 nt, Glutamat Dehydrogenase 2 (GLUD2) kodierend) als erste und feststehende Ziel-mRNA gewählt und mit dem o.g. Datensatz aus 100 verschiedenen zweiten Ziel-mRNAs nach geeigneten siRNA-Kandidaten durchsucht.

Partiell selbstkomplementäre "nur Leit-Strang siRNAs" wurden in diesem Datensatz mit einer Häufigkeit von 5 ± 2 siRNAs pro 1000 Nukleotiden der Ziel-mRNA gefunden. Für duale "nur Leit-Strang siRNAs" konnte eine Häufigkeit von 598 ± 443 (eine Ziel-mRNA) und 358 ± 58 (zwei Ziel-mRNAs, eine davon mit konstanter Länge) pro 1000 Nukleotide der Ziel-mRNA bestimmt werden (Abbildung 17).

Diese Zahlen belegen, dass der Ansatz grundsätzlich durchführbar scheint. Es wurden mehr siRNA-Kandidaten identifiziert, als in der Regel experimentell getestet werden müssen. Für die experimentelle Analyse wurden Lamin A/C und Emerin als Ziel-Gene gewählt, da diese bereits zuvor in einer Reihe von Studien mit einer großen Anzahl von prototypischen siRNAs untersucht wurden (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2002; Harborth et al., 2001; Harborth et

al., 2003).

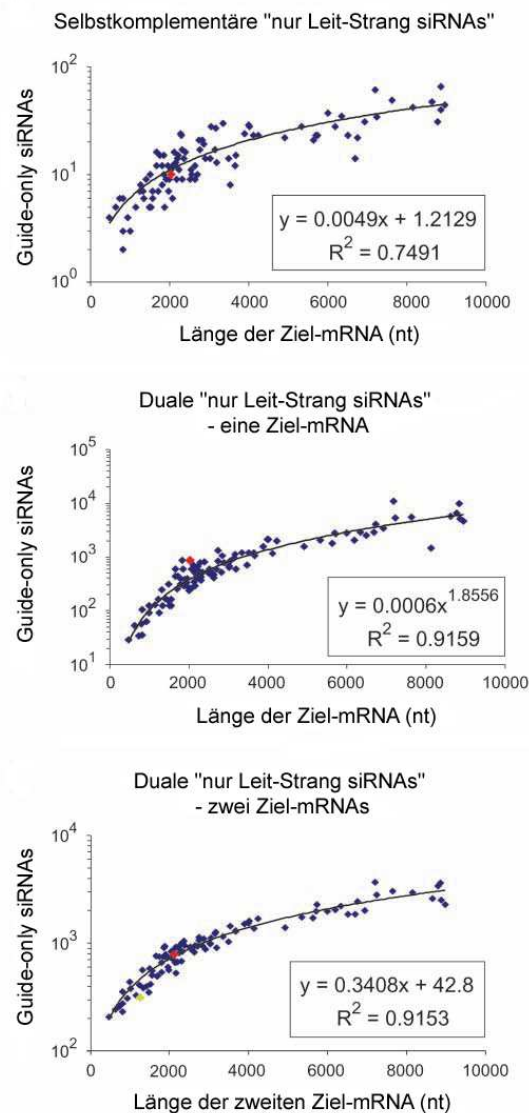


Abbildung 17. Analyse der Häufigkeit von "nur Leit-Strang siRNA" Ziel-Sequenzen innerhalb einer Zusammenstellung von 100 verschiedenen mRNAs. Die Graphen zeigen die Anzahl von siRNA-Duplicates als eine Funktion der Länge der ausgewählten siRNAs. Die Graphen zeigen die Anzahl von siRNA-Duplicates als eine Funktion der Länge der ausgewählten siRNAs. Die Datenpunkte wurden mit einer linearen oder exponentiellen Gleichung beschrieben und das Bestimmtheitsmaß (R^2) für die Plots angegeben. Es wurden Duplicates mit bis zu maximal sieben nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen analysiert. Rote Punkte repräsentieren die Datenpunkte der Lamin A/C mRNA. Der grüne Punkt markiert den Datenpunkt der Emerin mRNA. (C) Die erste mRNA-Sequenz mit einer Länge von 2348 bp wurde konstant gehalten, während für die zweite mRNA Sequenz ein Satz von 100 verschiedenen mRNAs eingesetzt wurde (Abb. aus Hossbach, 2006 verändert).

4.1.3.3 Knockdown von Lamin A/C durch partiell selbstkomplementäre "nur Leit-Strang siRNA"-Sequenzen

Zunächst wurden partiell selbstkomplementäre 18- oder 19-nt Abschnitte innerhalb der humanen Lamin A/C mRNA identifiziert. Duplices mit einer doppelsträngigen Region von 18 bp und einem 3 nt langen Überhang am 3'-Ende wurden aus folgendem Grunde in die Analyse mit einbezogen: Javier Martinez (Martinez et al., 2002) konnte in HeLa Zellen nach Transfektion von einzelsträngiger Leit-siRNA, die gegen Lamin A/C gerichtet war, eine signifikante Reduktion von Lamin A/C nachweisen. Eine genauere Analyse der siRNA-Sequenz zeigte, dass diese partiell selbstkomplementär war und potentiell eine Duplex-Struktur wie in Abbildung 18-A dargestellt bilden könnte. Es sollte darum untersucht werden, ob diese Struktur eventuell generell geeignet ist, Duplices zu bilden und einen Knockdown zu vermitteln.

Zur Identifikation der siRNAs wurde eine modifizierte, lokale Version des "nur Leit-Strang siRNA"-Selektions-Servers verwendet. Das Programm untersucht alle 18- und 19-nt Antisense Segmente innerhalb der eingegebenen Ziel-mRNA-Sequenz auf partielle Selbstkomplementarität, während eine Filterfunktion die Stabilität der potentiellen siRNA-Duplices kontrolliert. Obwohl der Einfluss von nicht-Watson-Crick Basen-Paarungen auf die Duplexstabilität bereits untersucht wurde (Mathews et al., 1999), sind doch die Parameter und Regeln zur verlässlichen Vorhersage der Duplexstabilität bei Basenfehlpaarungen unvollständig. Darum wurde die Duplexstabilität experimentell überprüft.

Es wurden die partiell selbstkomplementären Leit-siRNA-Stränge und auch die komplementären Passagier-Stränge entsprechend den Positionen 16, 94, 447 und 608 relativ zu dem ersten Nukleotid des Startkodons der Lamin A/C mRNA synthetisiert. Die vorhergesagten Strukturen der hybridisierten selbstkomplementären Sequenzen sind in Abbildung 18-A dargestellt.

Alle siRNAs wurden 5'-phosphoryliert synthetisiert. Die prototypischen Passagier/Leit siRNA-Duplices und die "nur Leit-Strang" selbstkomplementären siRNA-Duplices wurden in humane HeLa SS6 Zellen transfiziert. Ein prototypischer siRNA-Duplex (GL2) gegen *Photinus pyralis* Luziferase diente als

Negativkontrolle (Elbashir et al., 2001a).

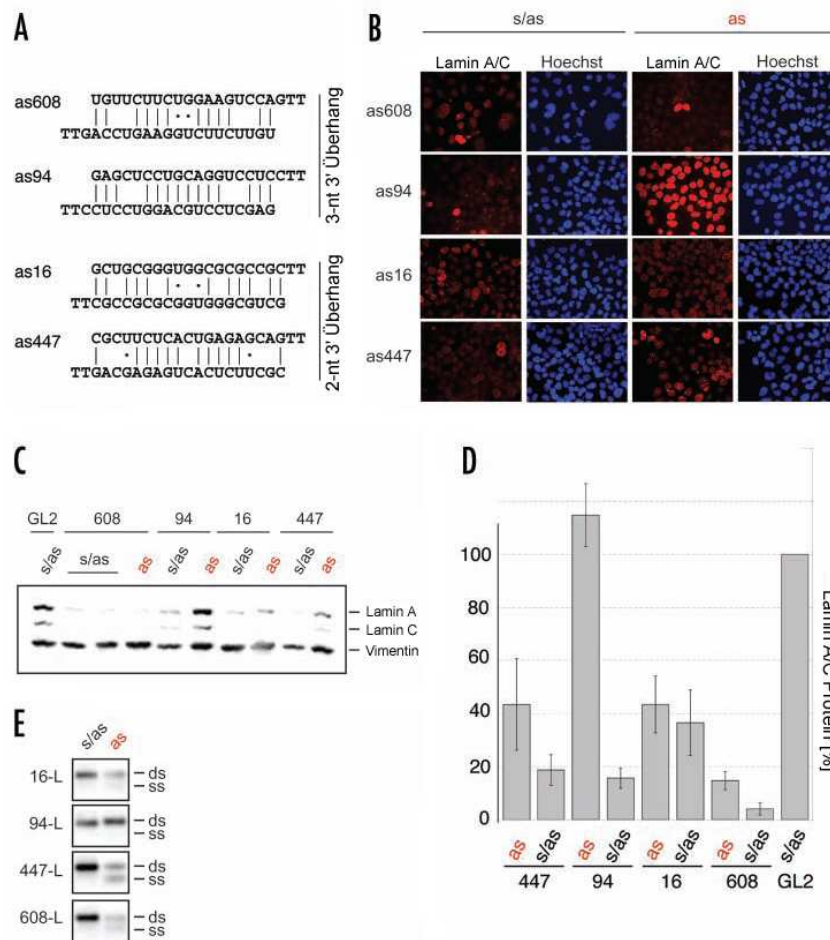


Abbildung 18. Knockdown von Lamin A/C mit partiell selbstkomplementären "nur Leit-Strang siRNAs". (A) Sequenz und Struktur der vorhergesagten partiell selbstkomplementären siRNA-Duplices. (B) Indirekte Immunfluoreszenz von HeLa Zellen nach Transfektion mit (s/as) prototypischen und (as) palindromischen siRNA-Duplices. Die Zellen wurden 44 Stunden nach der siRNA-Transfektion mit Lamin A/C Antikörper dekoriert. Die DNA wurde mit Hoechst 33342 angefärbt. Die Positionen der siRNA auf der Lamin A/C mRNA sind linksseitig angegeben. Die beiden linken Spalten zeigen Zellen, die mit prototypischen siRNAs (s/as) transfiziert wurden, die beiden rechten Spalten zeigen die mit "nur Leit-Strang siRNAs" transfizierten Zellen. (C) Western Blot Analysen von HeLa Zellen nach Transfektion mit partiell selbstkomplementären siRNAs. 44 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurden Zellextrakte gewonnen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen Lamin A/C und Vimentin. Die unspezifische GL2 siRNA diente als Negativkontrolle und die nicht-phosphorylierte Lamin A/C siRNA als Postivkontrolle. Eine Reduktion von Lamin A/C wurde sowohl nach Transfektion der prototypischen als auch der "nur Leit-Strang siRNAs", die gegen die Regionen 608, 16 und 447 gerichtet waren, beobachtet. (D) Quantitative Western Blot Analysen von HeLa Zellextrakten nach Transfektion mit prototypischen und "nur Leit-Strang siRNAs". Die Western Blots wurden detektiert wie in (C) beschrieben und mittels eines Lumineszenz-Lesegerätes ausgelesen. Die gezeigten Werte wurden mit Vimentin standardisiert und mit der als 100% definierten GL2 Negativkontrolle normalisiert. (E) Analyse der siRNA-Duplex Bildung mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese. "nur Leit-Strang siRNAs" (as) und hybridisierte prototypische (s/as) siRNAs wurden auf einem 4%igen Nusieve Agarose-

Gel aufgetrennt. Die Mobilität der Duplex (dsRNA) und der einzelsträngigen oder Rückfaltungs siRNA (ssRNA) sind gezeigt. Die Banden wurden nach Ethidiumbromidfärbung durch UV-Licht visualisiert und digital invertiert (Abb. aus (Hossbach et al., 2006) verändert).

Die Reduktion des Lamin A/C Proteins wurde 44 Stunden nach der Transfektion mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie und Lamin A/C spezifischer Antikörper untersucht. Alle prototypischen siRNAs und drei von vier "nur Leit-Strang siRNAs" bewirkten einen Knockdown des Lamin A/C Gens (Abbildung 18-B).

Die Passagier/Leit siRNA und "nur Leit-Strang siRNAs" gerichtet gegen Position 16 oder 608 waren gleichermaßen effektiv, während für Position 447 die "nur Leit-Strang siRNA" etwas effektiver war als die entsprechende prototypische siRNA. Die selbstkomplementäre gegen Position 94 gerichtete siRNA war vollkommen inaktiv, während die prototypische siRNA zu einer signifikanten Reduktion des Lamin A/C Proteins führte, vergleichbar mit der potenten prototypischen oder selbstkomplementären "nur Leit-Strang siRNA" gegen Position 608.

Die mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie gemachten Beobachtungen wurden auf quantitative Weise durch Western Blot Analysen mit Extrakten von transfizierten HeLa SS6 Zellen bestätigt (Abbildung 18-C). Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und mit Antikörpern gegen Lamin A/C und Vimentin entwickelt. Der Nachweis des Proteins Vimentin diente als Ladekontrolle und zur Normalisierung der durch die Western Blot Analyse erhaltenen quantitativen Daten. Das Western Blot-Signal nach ECL-Entwicklung wurde mit einem Lumineszenz-Lesegerät detektiert. Die Zielpositionen 608, 16 und 447 zeigten ein vergleichbares Knockdown-Niveau für prototypische und partiell selbstkomplementäre "nur Leit-Strang siRNAs". Die gegen Position 94 gerichtete "nur Leit-Strang siRNA" war ineffektiv, während die entsprechende prototypische siRNA zu einem mittelstarken Knockdown führte.

Abschließend wurden die siRNAs mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Elbashir et al., 2002). Alle partiell selbstkomplementären siRNAs zeigten eine Bande vergleichbar der elektrophoretischen Mobilität der vollkommen basengepaarten

prototypischen siRNA-Duplices. Zwei der vier partiell selbstkomplementären siRNAs zeigten zusätzlich noch eine zweite Bande schnellerer Mobilität, welche vermutlich der zuvor beschriebenen, in etwa 10 bp langen, konkurrierenden Haarnadelrückfaltungsstruktur entspricht (Abbildung 18-E). Es konnte keine offensichtliche Korrelation zwischen der Duplex-Struktur und der Aktivität der siRNA gefunden werden.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass mittels "nur Leit-Strang siRNA" Duplices, die aus zwei identischen einzelsträngigen RNA-Molekülen bestehen, ein Knockdown in einer generellen und effektiven Art und Weise erreicht werden kann.

4.1.3.4 Knockdown von Lamin A/C durch duale siRNA-Duplices aus zwei unterschiedlichen partiell komplementären "nur Leit-Strang siRNA"-Sequenzen

Mit der Selektionssoftware wurden siRNA-Duplices identifiziert und ausgewählt, die aus zwei nicht palindromischen Strängen bestehen, welche vollständig komplementär zu zwei verschiedenen Regionen der Lamin A/C Ziel-mRNA und partiell komplementär zueinander waren. Anschließend wurden diese siRNAs, as93/as402 und as880/as1348, synthetisiert, in HeLa Zellen transfiziert und die Knockdown-Effizienz mit den korrespondierenden prototypischen siRNA-Duplices (s/as) oder den ungepaarten einzelsträngigen Leit siRNA-Strängen (as) verglichen. Die beiden ausgewählten "nur Leit-Strang siRNA"-Duplices enthielten sechs nicht-Watson-Crick-Basenpaare inklusive GU-Wobble-Paare (Abbildung 19-A). Die Bildung der siRNA-Duplices wurde nach der Hybridisierung der siRNA-Stränge wie zuvor beschrieben durch native Agarose-Gelelektrophorese überprüft und bestätigt.

Der Gen-Knockdown wurde durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht und durch quantitative Western Blot Analysen bestätigt (Abbildung 19-B und C). Beide "nur Leit-Strang siRNA"-Duplices reduzierten die Expression des Lamin A/C Proteins um 70 bis 80% (vergleichbar den prototypischen siRNAs), während die Leit-siRNA Einzelstränge eine geringere Reduktion von Lamin A/C um 50% oder weniger bewirkten.

Diese Daten belegen die Durchführbarkeit des neuen siRNA-Design

Ansatzes.

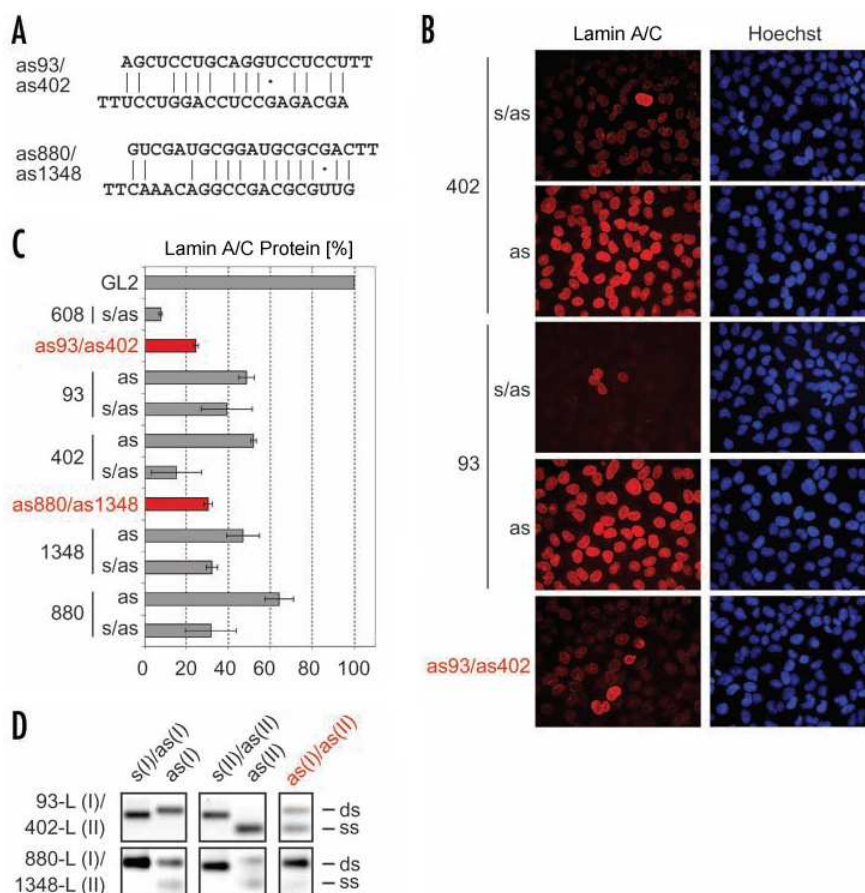


Abbildung 19. Knockdown von Lamin A/C durch siRNA-Duplices, welche aus zwei unterschiedlichen, partiell komplementären Leit siRNA Sequenzen bestehen. (A) Sequenz und Struktur der partiell komplementären siRNA-Duplices. (B) Untersuchungen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie wurden 44 Stunden nach der siRNA-Transfektion durchgeführt. Die DNA wurde mit dem Farbstoff Hoechst 33342 visualisiert. (C) Quantitative Western Blot Analyse 44 Stunden nach siRNA Transfektion. Die Balkengrafik zeigt die relativen Werte der verbleibenden Menge an Lamin A/C Protein, standardisiert mit Vimentin, und normalisiert zu GL2 Kontroll-siRNA behandelten Zellen. (D) Analyse der einzelsträngigen Passagier (s) und Leit (as) siRNA, und von siRNA-Duplices durch native Agarose-Gelelektrophorese. ds - Doppelstrang, ss - Einzelstrang (Abb. aus Hossbach, 2006 verändert).

4.1.3.5 Gleichzeitiger Knockdown zweier unterschiedlicher Gene durch duale siRNA-Duplices, die sich aus zwei unterschiedlichen partiell komplementären Leit-siRNA Sequenzen zusammensetzen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es möglich ist, mit einem dualen "nur Leit-Strang siRNA"-Duplex gleichzeitig die Expression zweier Gene zu unterdrücken. Mit dem siRNA-Selektionsprogramm wurden siRNAs ausgewählt,

die sowohl gegen Lamin A/C als auch gegen das mit Lamin A interagierende Protein Emerin gerichtet waren. Beide Gene sind nicht essentiell in HeLa SS6 Zellen (Elbashir et al., 2001a; Harborth et al., 2001). Ein Duplex wurde ausgewählt, welcher aus dem lamin-spezifischen Leit-siRNA-Strang as778-L und dem emerin-spezifischen Leit-siRNA-Strang as569-E besteht. Die vorhergesagte Struktur enthielt sieben Basenfehlpaarungen inklusive zwei G-U-Wobble-Basenpaaren (Abbildung 20).

Die Knockdown Effizienz der prototypischen siRNA-Duplices und der einzelsträngigen siRNAs wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz und mit qualitativer Western Blot Analyse bestimmt (Abbildung 20-B und C). Der Knockdown des prototypischen siRNA-Duplex 778-L war effektiv und verbunden mit einer ins Zytoplasma verlagerten Lokalisierung von Emerin. Dieser Effekt wurde schon zuvor in anderen siRNA Knockdown Studien beschrieben (Harborth et al., 2001). Die Emerin Expression wurde mittels des prototypischen siRNA-Duplex 569-E spezifisch reduziert. Die Transfektion der einzelnen Leit-Stränge alleine führte zu keinem Knockdown. Die duale siRNA as778-L/as569-E war etwa gleich effektiv wie die der individuellen prototypischen siRNAs. Um quantitative Aussagen bezüglich der Knockdown Effizienz machen zu können, wurde ein sogenannter „branched DNA (bDNA) Assay“ (Collins et al., 1997) zur Bestimmung der verbleibenden mRNA-Menge durchgeführt (Abbildung 20-D).

Wiederum konnte durch native Agarose-Gelelektrophorese nach der Hybridisierung der Einzelstränge eine Duplexbildung nachgewiesen werden (Abbildung 20-E). Es wurden zwei weitere duale siRNAs Duplices getestet und mit dem bDNA-Assay untersucht. Duplex as78-L/as627-E reduzierte die Emerin Expression um 50% und Lamin A/C Expression um 90%. Duplex as574-L/as495-E reduzierte nur die Lamin A/C Expression um 25% (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, potente duale siRNA-Duplices zu finden, die gleichzeitig und spezifisch die Expression von zwei verschiedenen Genen unterdrücken.

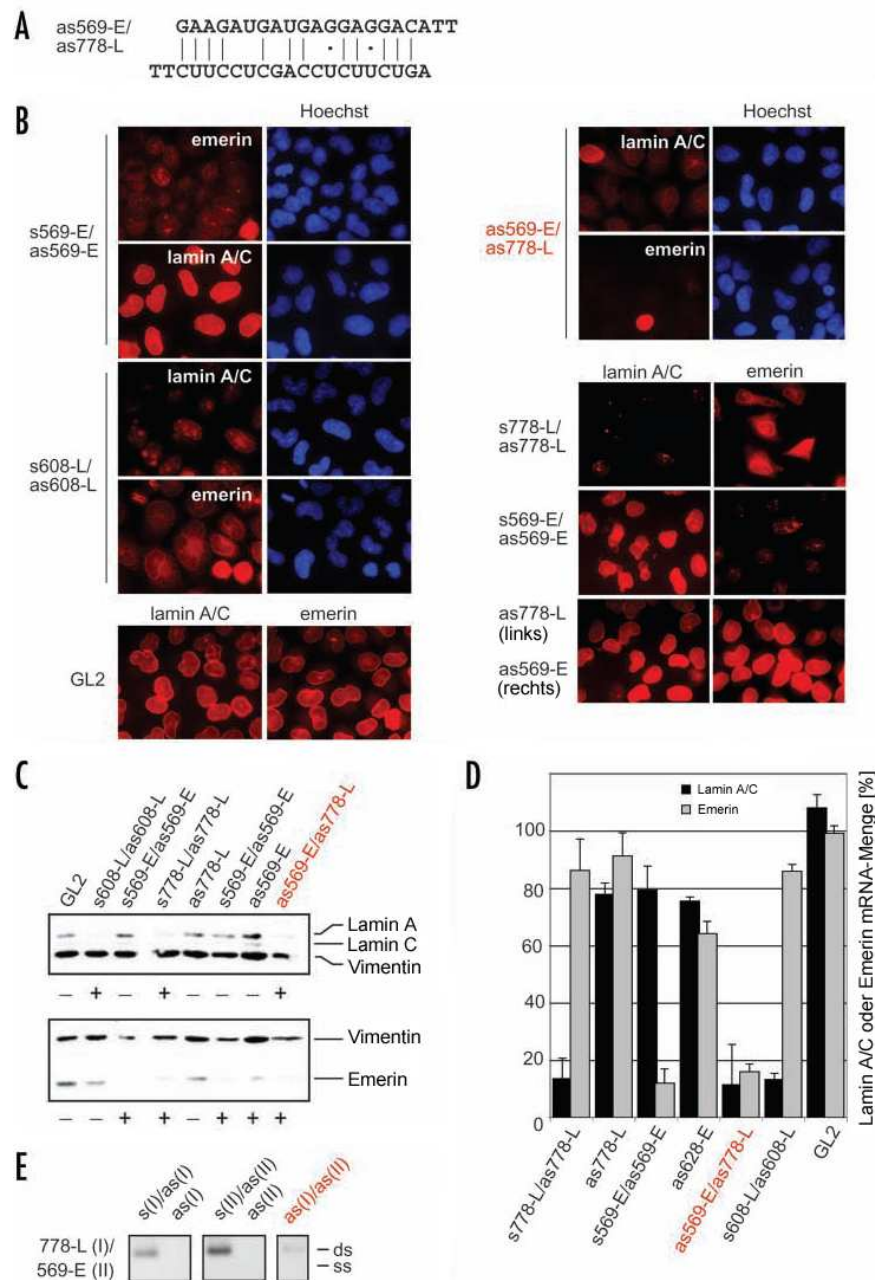


Abbildung 20. Simultaner Knockdown von Lamin A/C und Emerin durch duale "nur Leit-Strang siRNA"-Duplices. (A) Sequenz und Struktur der dualen siRNA-Duplices. Für die Analyse durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Lamin A/C und Emerin gefärbt. (C) Western Blot Analysen mit Extrakten von siRNA transfizierten Zellen. (D) Quantitative Analyse der Lamin A/C und Emerin mRNA-Mengen in Zellen, welche mit dualen siRNAs transfiziert worden waren. siRNAs wurden transient in HeLa SS6 Zellen transfiziert und die mRNA-Mengen von Emerin und Lamin A/C 48 Stunden nach der Transfektion mittels branched DNA Assay analysiert. Die dargestellten Werte wurden mit Actin mRNA standardisiert, die aus den Knockdown-Zellen isoliert wurde. Die Daten wurden anschließend mit den mRNA-Mengen aus den GL2-siRNA transfizierten Zellen normalisiert. (E) Analyse der einzelsträngigen Passagier (s), Leit (as) und siRNA-Duplices durch native Agarose-Gelelektrophorese (Abb. aus Hossbach, 2006 verändert).

4.1.4 Chemische Synthese von siRNAs

Zu Beginn dieser Arbeit waren kommerziell erhältliche, chemisch synthetisierte siRNAs noch sehr teuer. Darum wurden die siRNA-Oligonukleotide zunächst im Labor mit der klassischen chemischen Synthese nach der TBDMS-(*tert*-Butyldimethylsilyl)schutzgruppe) Methode synthetisiert (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Synthesen wurden mit einem Expedite DNA/RNA-Synthesizer durchgeführt. Mit diesem System konnten zwei siRNA-Oligonukleotide parallel synthetisiert werden. Die anschließenden Entschützungs- und Aufbereitungsschritte benötigten etwa zwei Arbeitstage inklusive einer zeitaufwendigen Gelaufreinigung.

Mit der TBDMS-Methode wurde eine relativ geringe Produktausbeute erreicht. Dies beruht auf den im Folgenden genannten Faktoren: Zum einen kommt es durch sterische Hinderung der TBDMS-Schutzgruppe zu einer reduzierten Effizienz bei den einzelnen Kopplungsschritten, was in einer Kopplungseffizienz von etwa 95% resultiert. Ein weiteres Problem liegt in der partiellen alkalischen Hydrolyse in wässriger, amoniakhaltiger Lösung nach dem Entfernen der 2'-TBDMS-Schutzgruppe. Infolge der alkalischen Hydrolyse treten verkürzte Formen des Hauptsyntheseproduktes auf. Diese müssen durch einen separaten Gelaufreinigungsschritt aus dem RNA-Oligonukleotid-Gemisch entfernt werden. Die aufgereinigten Vollängenprodukte repräsentierten dabei nur 20% der gesamten Syntheseprodukte. Um eine ausreichende Menge an aufgereinigtem Produkt zu erhalten, wurden deshalb alle Synthesen im 1 μ mol Maßstab ausgeführt. Die Ausbeute lag bei diesem Synthesemaßstab bei ca. 500 μ g (70 nmol) eines 21-nt RNA-Oligonukleotids.

Zur Synthese einer größeren Anzahl von siRNA-Duplices innerhalb eines kurzen Zeitraumes war die TBDMS-Methode somit nicht geeignet. Darum wurde nach alternativen Synthesemethoden gesucht. Zeitgleich mit dem Beginn dieser Arbeit wurde bei Dharmacon Research (Lafayette, USA) die ACE-RNA-Synthese-Methode entwickelt. Diese Methode ermöglichte einen deutlich beschleunigten Herstellungsprozess. Aus diesem Grunde wurde die ACE-Methode in unserm Labor - weltweit erstmals außerhalb der Entwicklerfirma - eingesetzt. Bis auf Amidite mussten alle für die ACE-Methode

spezifischen Reagenzien, selbst hergestellt werden. Für die Synthese nach der ACE-Methode kam ein von Dharmacon Research umgebauter ABI 394-DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems) zum Einsatz. Bei diesem Gerät wurden die aus Glas bestehenden Druckminderer entfernt und alle Leitungen durch Teflonleitungen mit verändertem Durchmesser ersetzt. Durch diese Modifikationen wurde die notwendige Flussgeschwindigkeit für die Reagenzien gewährleistet. Mit diesem Gerät konnten vier Synthesen parallel durchgeführt werden. Durch die parallele Synthese von vier RNA-Oligonukleotiden, kürzere Synthesesyklen, einen deutlich geringeren Arbeitsaufwand bei den Entschützungsritten und die nicht erforderliche Gelaufreinigung erlaubte die ACE-Methode einen deutlich höheren Durchsatz (siehe Tabelle 11). Durch Abwandlung des von Dharmacon beschriebenen Protokolls konnte der Zeitaufwand für den Bediener weiter verringert werden.

Tabelle 11. Vergleichende Darstellung des Zeitaufwandes für die TBDMS- und ACE-Methode zur RNA-Synthese.

Arbeitsschritt	TBDMS-Methode	ACE-Methode
Entfernen der 5'Hydroxylschutzgruppe	60 Sekunden	35 Sekunden
Aktivierung der Kopplung	13 Minuten	90 Sekunden
Blockieren nichtreagierter OH-Gruppen	30 Sekunden	30 Sekunden
Oxidation	30 Sekunden	45 Sekunden
Aufarbeitung	16 bis 24 Stunden + Extraktion + Präzipitation + Gelaufreinigung	4 Stunden + Präzipitation

So wurden zur Entfernung der Phosphatschutzgruppen bis zu sechs Synthesäulen durch Adaptoren miteinander verbunden und mittels einer Peristaltikpumpe die Disodium-2-carbamoyl-2-cyanoethylen-1,1-dithiolat-Lösung durch die Säulen gepumpt, anstatt die Lösung mit zwei Einwegspritzen durch jede einzelne Säule zu drücken.

Ein weiterer Vorteil der ACE-Methode war die gute Ausbeute aufgrund eines hohen Maßes an Vollängenprodukten. Dies erlaubte es, auf eine Gelaufreinigung der RNA-Oligonukleotide zu verzichten. In der Regel lagen die Ausbeuten bei der ACE-Methode bei etwa 1,0-1,5 mg (140-210 nmol) pro

Synthese im 0,2 µmol Maßstab. Im Vergleich zur TBDMS-Methode ergab sich damit für die ACE-Methode eine etwa 10-fach höhere Ausbeute.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die siRNA-Synthese nach der ACE-Methode aufgrund guter Ausbeuten und eines hohen Durchsatzes eine geeignete Methode für die Erstellung großer Bibliotheken von chemisch synthetisierten siRNAs ist.

4.1.5 Organisation der Sequenzaufbereitung und des siRNA-Synthese-Prozesses

Mit dem in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Whitehead siRNA-Selektions-Programm wurden 378 siRNA-Sequenzen gegen 154 RNA-prozessierende Gene ausgewählt und im Hause unter Nutzung von Dharmacon-Chemie synthetisiert (siehe Abschnitt 2.2.3). Nur Einzelstränge und Duplices, die alle Qualitätskontrollen ohne Beanstandung durchlaufen hatten, wurden in zellbasierten Experimenten eingesetzt.

Die Synthese einer größeren Anzahl siRNAs im Labor erforderte die Etablierung automatisierter *in-silico* Prozesse und Strukturen zur Verwaltung der Sequenzen und des Syntheseprozesses. Zur einfachen, schnellen und fehlerfreien Abwicklung der *in-silico* durchgeführten Bearbeitung der siRNA-Sequenzen wurden diese automatisiert. Dies wurde durch in Perl Scriptsprache (Wall und Schwartz, 1991) geschriebene Programme realisiert. Von der 23mer siRNA-Ziel-Sequenz auf der cDNA ausgehend, mussten die 21mer RNA Einzelstrang-Sequenzen für den Passagier-Strang und den Leit-Strang generiert, die 3'-Überhänge durch Deoxy-Thymidin ersetzt und die resultierenden Sequenzen nach spezieller Nomenklatur mit einem Namen versehen werden.

Es folgten die Umwandlung der Sequenzen in ein für den RNA-Synthesizer lesbare Kodierung und in das passende Format in 5'-3' Orientierung, und das Abspeichern jeder einzelnen Sequenz in einer separaten Datei unter dem zugeordneten Namen. Zu jedem in den Syntheseprozess gesendeten Satz siRNA-Sequenzen wurde automatisch ein Formblatt erstellt, welches das Erstellungsdatum, die siRNA-Sequenzen und deren Namen in einer Liste darstellte. Des Weiteren enthielt das Formblatt Felder zur Protokollierung des

Prozesses, von der Synthese der Einzelstränge, über die verschiedenen Entschütungs-, Aufbereitungs- und Qualitätskontrollschritte, bis zum abschließenden Test der Duplex-Bildung.

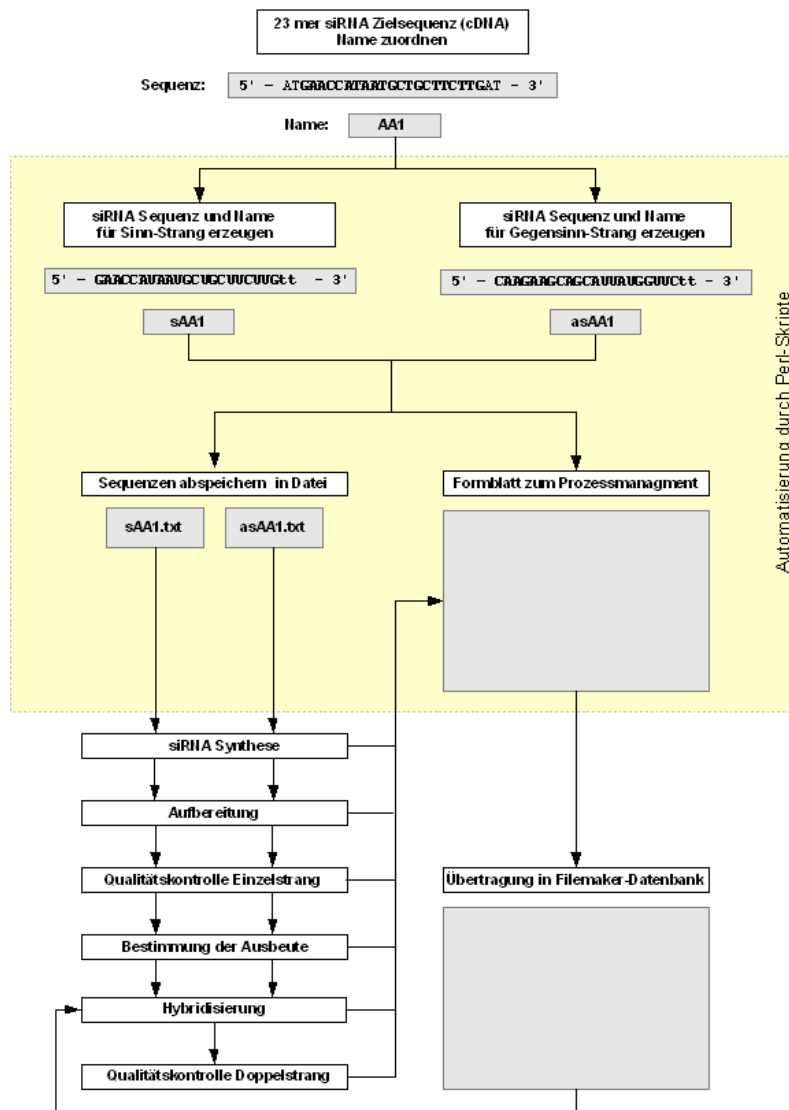


Abbildung 21. Flussdiagramm zur siRNA-Sequenz-Prozessierung und Verfolgung des Syntheseprozesses.

Zur Verwaltung der siRNA-Synthese wurde eine File-Maker Datenbank (File Maker GmbH, Unterschleißheim) angelegt. Diese vergibt automatisch für jeden synthetisierten siRNA-Strang eine eindeutige Identifikationsnummer, um Verwechslungen bei notwendigen Re-Synthesen einzelner Stränge auszuschließen. Weiter stellte die Datenbank auf einfache Weise Informationen bereit, die zur Hybridisierung der Einzelstränge notwendig waren.

Die chemische Synthese nach der ACE-Methode in Kombination mit Strukturen zur Sequenzbearbeitung und geeigneten Mitteln zur Verwaltung des Prozesses ermöglichte die Bereitstellung einer großen Anzahl von siRNAs in kurzer Zeit.

4.2 siRNA-Validierung und funktionelle Genanalyse mittels RNA-Interferenz

Zu Beginn dieser Arbeit wurden in massenspektrometrischen Analysen spleißosomaler Komplexe mehr als 200 co-aufgereingte Proteine identifiziert. Darunter befanden sich auch eine große Anzahl zuvor unbekannter mit dem Spleißosom assoziierter Faktoren (Hartmuth et al., 2002; Jurica et al., 2002; Makarov et al., 2002; Makarova et al., 2004; Rappsilber et al., 2002; Zhou et al., 2002). Alle identifizierten Proteine können in drei Hauptgruppen unterteilt werden: (i) bekannte Spleißfaktoren, (ii) Proteine die einen Bezug zu anderen Prä-mRNA Prozessierungsereignissen, zu Transkription oder mRNA Export haben, und (iii) Proteine mit unbekannter Funktion und solche ohne bekannten Bezug zum Prä-mRNA Spleißen oder einem der anderen zuvor genannten Prozesse.

Da die Rolle, der den Gruppen (ii) und (iii) zugeordneten Proteine, beim Prä-mRNA Spleißen unbekannt war, stellten diese sehr interessante Untersuchungsobjekte zur funktionellen Charakterisierung mittels RNAi dar.

Im vorhergehenden Kapitel wurden die Grundlagen zur Erstellung einer siRNA Bibliothek gegen 154 RNA-prozessierende Faktoren beschrieben. Diese siRNA Bibliothek wurde in initialen Screens für die funktionelle Genanalyse eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden drei Assays zur siRNA Validierung und zur funktionellen Genanalyse etabliert: (i) Analyse der Zellproliferation, (ii) Analyse der mRNA-Reduktion durch quantitative Echtzeit-RT-PCR und (iii) die Analyse zellulärer Indikatoren von Spleißdefekten mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie und FISH (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung).

Neben dem Screening-Ansatz wurde RNAi zur Klärung von Fragen der U snRNA Biogenese, der snoRNA Biogenese und der Proteinkomposition des minoren Spleißosoms angewendet.

In allen siRNA Experimenten wurden Negativ- und Positivkontrollen

eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten immer Kontroll-Zellen, die mit einer siRNA (siRNA GL2) gegen die *Photinus pyralis* Luziferase transfiziert wurden. In einigen Experimenten wurden zusätzlich unbehandelte Zellen als Negativkontrolle genutzt. In den meisten Experimenten wurde als Positivkontrolle eine siRNA (siRNA CT1/q138-1) gegen das hPrp8 Protein eingesetzt. Das 274 kDa Protein hPrp8, auch p220 genannt, ist eines der phylogenetisch am höchsten konservierten Proteine des Zellkerns und essentiell für die katalytischen Schritte I und II des Prä-mRNA Spleißens (Grainger und Beggs, 2005; Teigelkamp et al., 1995). hPrp8 ist eine Komponente des U5 snRNP (Lossky et al., 1987; Stevens et al., 2001) und des U4/U6.U5 tri-snRNP (Gottschalk et al., 1999; Stevens und Abelson, 1999; Teigelkamp et al., 1997). Wegen seiner essentiellen, zentralen Funktion und der Anwesenheit im Majoren- und Minoren-Spleißosom (Luo et al., 1999) schien hPrp8 eine geeignete Kontrolle bei der funktionellen Analyse von Spleißfaktoren zu sein. Vorversuche zeigten, dass diese siRNA die Ziel-mRNA-Menge um ca. 90% reduziert.

In der Regel wurden zunächst zwei bis vier siRNAs pro Ziel-Gen getestet. Dies erfolgte aus zwei Gründen: Zum einen führt nicht jede ausgewählte siRNA-Sequenz zu einem effektiven Gen-Knockdown. Zum anderen kann eine ausreichende Spezifität der siRNAs dadurch bestätigt werden, dass die Transfektion von verschiedenen siRNAs gegen die gleiche Ziel-mRNA zum gleichen Phänotyp führt (siehe Abschnitt 2.1.5).

Der Analysezeitpunkt jedes RNAi Experimentes hängt von der verwendeten Nachweismethode ab. Die mRNA-Reduktion wurde bereits 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion analysiert, da der durch siRNA vermittelte Gen-Knockdown die mRNA angreift und der mRNA-Abbau ein schneller Prozess ist. Die Auswirkungen auf die Proteinmenge hängen von der Halbwertszeit und dem zellulären Vorrat des Ziel-Proteins ab. Von der Reduktion der Proteinmenge hängt wiederum das Auftreten von Knockdown Phänotypen ab. Bei den untersuchten Proteinen wurden funktionelle Analysen in der Regel 48 Stunden nach Transfektion durchgeführt, da die Zellen noch vital waren und andererseits die Knockdown Phänotypen bereits deutlich ausgeprägt waren. Für die untersuchten Gene zeigte sich im Zellproliferationsexperiment der Zeitpunkt 72 Stunden nach Transfektion als

besonders geeignet. Zu diesem Zeitpunkt hat die Zellzahl-Reduktion nach Knockdown eines essentiellen Faktors bereits die maximale Ausprägung erreicht.

4.2.1 Etablierung des Zellproliferations-Assays mit HeLa SS6 Zellen nach Depletion zellulärer Proteine mittels RNA-Interferenz

Die Depletion zellulärer Proteine mittels spezifischer siRNAs kann das Zellwachstum beeinflussen. Das Ergebnis eines solchen Experimentes gibt somit einen ersten Hinweis auf die Bedeutung des Proteins für die Zelle und/oder auf die Effizienz der eingesetzten siRNA.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden und zwei verschiedene Plattenformate für die Analyse des Zellwachstums nach siRNA vermittelter Depletion von RNA-prozessierenden Proteinen eingesetzt.

Zur Durchführung der Zellproliferationsexperimente wurde in jede Kavität einer Zellkulturplatte die gleiche Anzahl adhärent wachsender HeLa SS6 Zellen ausplattiert und wie im Abschnitt 3.2.6.1 beschrieben mit siRNAs transfiziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (WT) und mit GL2 Kontroll-siRNA transfiziert Zellen. Als Positivkontrolle wurden siRNAs (siRNA CT1/q138-1) gegen das hPrp8 Protein eingesetzt.

Die einzelnen siRNA-Transfektionen wurden jeweils im Triplikat oder im zweifachen Duplikat durchgeführt.

72 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde die Zahl lebender Zellen mittels drei verschiedener Methoden direkt oder indirekt bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.6.4).

(i) Direkte Bestimmung der Zahl lebender Zellen im 24 oder 96 Kavitäten-Format mit dem CASYcounter TT (Schärfe System, Reutlingen). Dazu wurden die Zellen durch Trypsin vom Boden der Kavitäten gelöst, ein Aliquot der Zellen entnommen und die Zellzahl durch direkte Zählung mit dem CASYcounter TT bestimmt.

(ii) Indirekte Bestimmung der Zahl lebender Zellen durch einen kolorimetrisches MTS Assay im 96 Kavitäten-Platten Format. Die Tetrazolium Verbindung MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetra-zolium, inner salt] wird in lebenden Zellen durch eine

Dehydrogenase in ein Formazan Produkt reduziert. Diese ist in Zellkulturmedium löslich und führt zu einer Blaufärbung des Mediums. Die Absorption kann direkt in Mikrotiterplatten gemessen werden und ist in einem bestimmten Bereich direkt proportional zur Zellzahl.

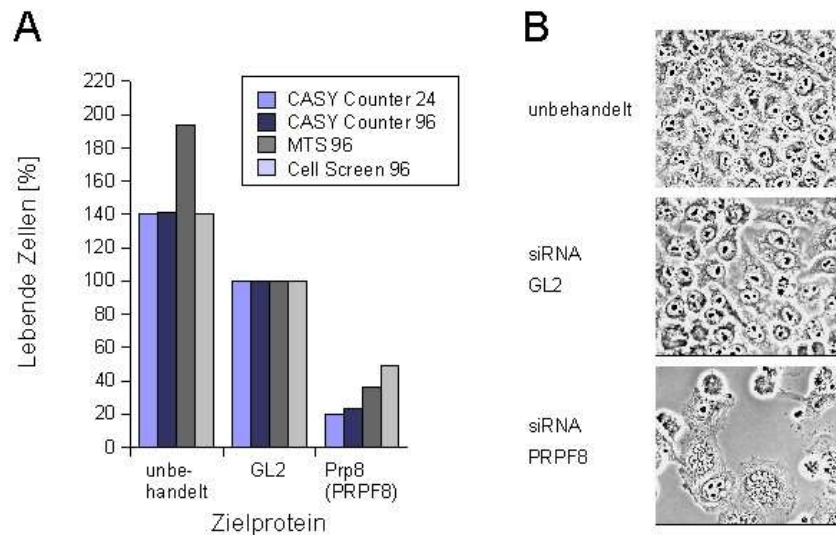


Abbildung 22. Kontrollen und Normalisierung der Proliferationsexperimente. HeLa SS6 Zellen wurden entweder mit siRNAs gegen hPrp8 oder Luziferase transfiziert oder blieben unbehandelt. (A) Vergleich der Ergebnisse, die mit vier verschiedenen Methoden (CASY Counter, MTS Assay, Cell Screen) bzw. Plattenformaten (24 und 96 Kavitäten) gewonnen wurden. 72 Stunden nach der Transfektion wurde die Zellzahl bestimmt. Die Transfektion mit einer unspezifischen siRNA, die kein Ziel in HeLa Zellen hat, reduziert das Zellwachstum. Dies geschieht aufgrund des toxischen Einflusses des Transfektionsreagenzes in Kombination mit siRNA. Die unspezifische siRNA wurde genutzt um die Zellzahl nach siRNA vermittelten Knockdown zu normalisieren. Die siRNA gegen hPrp8 führte zum Absterben der Mehrzahl der transfizierten Zellen. Darum wurde diese siRNA als Positivkontrolle eingesetzt. (B) Phasenkontrast-aufnahmen von unbehandelten HeLa SS6 Zellen und von Zellen 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA gegen hPrp8 Protein oder Leuchtkefer-Luziferase Protein. Der Knockdown von hPrp8 führte zu einer Induktion von Apoptose in den meisten Zellen.

(iii) Relative Bestimmung der Zellzahl im 96 Kavitäten-Format. Diese erfolgte mittels Analyse der durch adhärent wachsende Zellen bedeckten Fläche des Kavitätenbodens mit dem CellScreen Hochdurchsatz-Mikroskop (Innovatis, Bielefeld). Die CellScreen Einheit besteht aus einem Autofokus Phasenkontrast-Mikroskop, automatischem Objektisch, automatischer Bildanalysesoftware und angegliederter Datenbank. Aufgrund der nicht-invasiven Analyse-Technik konnten die gleichen Zellen in einer Zeitreihe 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion untersucht werden.

Zur Auswertung wurde für jeden Knockdown die Anzahl lebender Zellen bzw. die bedeckte Fläche mit dem Wert aus der Luziferase Kontroll-Transfektion normalisiert. Die Resultate wurden je nach Stärke des negativen Einflusses auf das Zellwachstum als „stark“, „mittel“, „schwach“ oder „kein negativer Einfluss“ klassifiziert.

Tabelle 12. Klassifizierung des negativen Einflusses auf das Zellwachstum durch siRNA vermittelte Protein-Depletion. Negativkontrolle: siRNA gegen Luziferase (siRNA GL2) entspricht 100% lebende Zellen, Positivkontrolle: siRNA gegen hPrp8 (siRNA CT1/q138-1) entspricht 16-36% (MTS Assay, CASY Counter) lebende Zellen. In Abhängigkeit von der Sensitivität der verwendeten Methode variieren die Klassengrenzen.

	CASY Counter 24 u. 96 Kavitäten	MTS Assay 96 Kavitäten	CellScreen 96 Kavitäten
stark	≤ 40%	≤ 40%	≤ 55%
mittel	>40% ≤ 65%	>40% ≤ 65%	>55% ≤ 70%
schwach	>65% ≤ 80%	>65% ≤ 90%	>70% ≤ 85%
kein	>80%	>90%	>85%

Die mit dem CASY Counter im 24 Kavitäten-Platten Format erhaltenen Werte wurden als Referenz genutzt und die Klassengrenzen für die beiden anderen Methoden entsprechend angepasst. Jede Reduktion der Zahl lebender Zellen auf weniger als 40% (Messung mit CASY Counter TT oder MTS Assay) bzw. 55% (Messung mit CellScreen) wurde als ein stark hemmender Einfluss eingestuft (Tabelle 12). Für die betreffenden depletierten Proteine wurde deshalb eine essentielle Funktion angenommen. Nach der Depletion des essentiellen Proteins hPrp8 verbleiben noch ca. 20% lebende Zellen im Vergleich zur GL2 Kontrolle (CASY Counter). Diese resultieren vermutlich vor allem aus der nicht 100%igen Transfektionseffizienz. Vorversuche zeigten, dass von ca. 5% nicht-transfizierten Zellen in der Startpopulation ausgegangen werden muss.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass mit den unterschiedlichen Methoden für einen kleinen, mittleren und großen Probendurchsatz vergleichbare Ergebnisse zu erzielen sind. Zellwachstumsuntersuchungen nach siRNA vermittelter Protein-Depletion erlauben Phänotypen einer stark verminderten Zellzahl zu identifizieren, und so direkte Rückschlüsse auf die Effizienz der eingesetzten siRNA bzw. auf die Bedeutung des Ziel-Gens für das Überleben der Zelle oder für die Zellteilung zu ziehen.

4.2.2 Auswirkungen auf das Wachstum von HeLa SS6 Zellen nach Depletion RNA-prozessierender Faktoren mittels RNA-Interferenz

Ein Screen mit 378 siRNAs gegen 154 RNA-prozessierende Faktoren (siehe Anhang, Tab. A-2) sollte im Zellproliferationsexperiment erste Hinweise auf die Effizienz der ausgewählten siRNAs und auf die Bedeutung der Ziel-Gene für die Zelle geben.

Die gleiche Anzahl adhärent wachsender HeLa SS6 Zellen wurde in jede Kavität einer Zellkulturplatte im 24 oder 96 Kavitäten-Format ausplattiert und nach 24 Stunden mit spezifischen siRNAs gegen RNA-prozessierende Faktoren transfiziert. Negativkontrolle und Positivkontrolle wurden wie beschrieben eingesetzt. 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde die Anzahl lebender Zellen bzw. die von adhärent wachsenden Zellen bedeckte Fläche mit einem CASY Counter, dem MTS-Assay oder einem CellScreen bestimmt (siehe 3.2.6.4). Die Werte wurden mit der Zellzahl der GL2 siRNA behandelten Kontroll-Zellen normalisiert und anschließend klassifiziert (siehe 3.2.6.4). In Tabelle 13-A sind die Proteine aufgelistet, deren siRNA vermittelte Depletion einen stark negativen Effekt auf das Zellwachstum zeigte.

Tabelle 13-A. Identifizierung von Faktoren, die essentiell für die Zellproliferation sind. HeLa SS6 Zellen wurden mit 378 spezifischen siRNAs gegen 154 verschiedene Proteine transfiziert, die in Aufreinigungen spleißosomaler Komplexe identifiziert wurden. Die Anzahl lebender Zellen in jedem Ansatz wurde 72 Stunden nach der Transfektion bestimmt und gegen die Anzahl lebender Zellen der Negativkontrolle (siRNA BB1 gegen Luciferase) normalisiert. Als Positivkontrolle wurde eine Transfektion mit einer siRNA (CT1/q138-1) gegen den Spleißfaktor hPrp8 (PRPF8) durchgeführt, was in einer starken Reduktion der Zellzahl resultierte. Die Klassifizierung der Zellzahl-Reduktion ist in Tabelle 12 (Abschnitt 4.2.1) beschrieben. Die aufgeführten siRNAs reduzierten die Anzahl der lebenden Zellen um mehr als 60%-80%, gekennzeichnet mit (++), die mit (+++) gekennzeichneten siRNAs führten zu einer Reduktion um mehr als 80%. In der Spalte Experiment Wiederholung (Exp. Wdhlg.) ist die Anzahl unabhängig durchgeführter Experimente angegeben.

Gruppe	Name des Proteins	Name des Proteins (alias)	Offizieller Name des humanen Gens	siRNA	Reduktion.	Exp. Wdhlg.
Sm Proteine	B		SNRPB	q142-1	++++	2
	B		SNRPB	q142-2	+++	2
	D1		SNRPD1	q144-2	+++	2
	D2		SNRPD2	q143-2	+++	2
	F		SNRPF	q145-1	+++	2
	F		SNRPF	q145-2	+++	2
U1 snRNP	U1-C		SNRPC	q093-2	+++	2
17S U2 snRNP	SF3a66		SF3A2	q033-1	++++	1
	SF3b155		SF3B1	q036-2	++++	1
	SF3b155		SF3B1	q036-1	+++	1

Gruppe	Name des Proteins	Name des Proteins (alias)	Offizieller Name des humanen Gens	siRNA	Reduktion.	Exp. Wdhlg.
17S U2 snRNP	SF3b14a	p14	SF3B14	AS4	++++	1
	SF3b14a	p14	SF3B14	AS5	++++	1
	SF3b14a	p14	SF3B14	AS1	+++	1
	SF3b14a	p14	SF3B14	AS2	+++	1
	SF3b14a	p14	SF3B14	AS6	+++	1
	SF3b14b			PHF5A	BL3	+++
17S U2 verwandte	SF3b10		SF3B5	BK4	+++	1
	hPRP43		DHX15	q099-1	+++	1
A Proteine	SPF30		SMNDC1	q039-2	+++	1
	hPRP5		DDX46	BT3	+++	2
	CDC2L2		CDC2L2	q051-1	+++	2
SR Proteine	CDC2L2		CDC2L2	q051-2	+++	2
	CDC2L2		CDC2L2	q051-3	+++	2
	SF4		SF4	q133-2	++++	1
	SF2	ASF	SFRS1	q149-2	+++	1
SR verwandte Proteine	SRp55		SFRS6	q085-2	++++	2
	SC35	SFRS2	SFRS2	q151-1	+++	1
	SC35	SFRS2	SFRS2	q151-2	+++	1
SR verwandte Proteine	SRm300		SRRM2	q082-1	+++	1
U5	220K	hPrp8	PRPF8	CT1 / q138-1	++++	2
	220K	hPrp8	PRPF8	CT2	+++	1
	220K	hPrp8	PRPF8	CT3	+++	1
	220K	hPrp8	PRPF8	CT4	+++	1
	200K	hBRR2	ASCC3L1	q130-2	++++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK1	++++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK10	+++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK2	+++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK3	+++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK4	+++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK5	+++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK6	+++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK7	+++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK8	+++	1
	102K	hPrp6	PRP6F	AL5	++++	1
	102K	hPrp6	PRP6F	AL8	+++	1
	U5	15K	hDIB1	TXNL4A	AH1	+++
15K		hDIB1	TXNL4A	AH3	+++	1
15K		hDIB1	TXNL4A	AH7	+++	1
52K		hLIN1	CD2BP2	AJ2	+++	1
52K		hLIN1	CD2BP2	AJ6	+++	1
LSm Proteine	LSm2		LSM2	CJ2	++++	1
	LSm2		LSM2	CJ1	+++	1
	LSm4		LSM4	BD2	+++	1
	LSm4		LSM4	BD3	+++	1
	LSm7		LSM7	CN4	+++	1
	LSm8		LSM8	BE4	+++	1
U4/U6	90K	hPrp3	PRPF3	AN4	+++	1
	20K	CypH	PPIH	AT4	+++	1
	15.5K	hSNU13	NHP2L1	CP2	+++	1
	15.5K	hSNU13	NHP2L1	CP3	+++	1
U4/U6.U5	110K	hSNU66	SART1	AP4	+++	1
	110K	hSNU66	SART1	AP6	+++	1
	65K	hSAD1	USP39	AR6	+++	1
Prp19-CDC5-Komplex	CDC5L		CDC5L	KK1	+++	2
	PRL1		PLRG1	KR1	+++	2
	PRL1		PLRG1	KR2	+++	2
	CCAP2 (hspc148)	AD-002	HSPC148	NC1	++++	2
Prp19-CDC5 verwandte	CRNKL1/hSYF3		CRNKL1	JX1	++++	3
	PPase-like 1	PPIL1	PPIL1	KE1	+++	2
B/B* Proteine	matrin 3		MATR3	q066-2	+++	2
	MFAP1		MFAP1	q023-1	++++	2

Gruppe	Name des Proteins	Name des Proteins (alias)	Offizieller Name des humanen Gens	siRNA	Reduktion.	Exp. Wdhlg.
B/B* Proteine	MFAP1		MFAP1	q023-2	+++	2
	RED		IK	q028-2	++++	2
	RED		IK	q028-1	+++	2
	hSmu-1	fSAP57	SMU1	q018-1	++++	2
	hSmu-1	fSAP57	SMU1	q018-2	++++	2
	hsp27		HSPB1	q129-2	+++	1
C Proteine	Abstrakt		DDX41	q002-2	++++	2
	KIAA1604	fSAPb	KIAA1604	q021-1	++++	2
	KIAA1604	fSAPb	KIAA1604	q021-2	++++	2
C Proteine	hPRP22		DHX8	q060-1	+++	1
	hPRP22		DHX8	q060-2	+++	1
	hPRP22		DHX8	JU1	+++	1
	hPRP17		CDC40	q059-2	+++	1
	hSLU7		SLU7	q038-1	++++	1
	hSLU7		SLU7	q038-2	+++	1
	AAH05870	MGC4238	MORG1	q104-2	+++	2
	TIP-49		RUVBL1	q042-1	+++	2
	TIP-49		RUVBL1	q042-2	++++	2
	NOSIP		NOSIP	q070-1	+++	2
EJC/mRNP	eIF4A3		DDX48	q071-1	+++	2
	Pinin		PNN	q073-1	+++	1
	Pinin		PNN	q073-2	+++	1
	RNPS1		RNPS1	q077-1	+++	1
	RNPS1		RNPS1	q077-2	+++	1
	Acinus	fSAP152	ACIN1	q049-2	+++	1

Tabelle 13-B. siRNAs, welche die Zellzahl mittelstark oder schwach beeinflussten. Die aufgeführten siRNAs reduzierten die Anzahl der lebenden Zellen um ca. 35%-60% (++) oder um ca. 15%-35% (+) (siehe Tabelle 12, Abschnitt 4.2.1).

Gruppe	Name des Proteins	Name des Proteins (alias)	Offizieller Name des humanen Gens	siRNA	Reduktion.	Exp. Wdhlg.
Sm Proteine	D2		SNRPD2	q143-1	+	2
U1 snRNP	U1-70K		SNRP70	q091-1	++	2
	U1-70K		SNRP70	q091-2	++	2
	U1-A		SNRPA	q092-2	+	2
	U1-C		SNRPC	q093-1	+	2
17S U2 snRNP	SF3a120		SF3A1	q031-1	+	1
	SF3a66		SF3A2	q033-2	++	1
	SF3a60		SF3A3	q032-1	++	1
	SF3a60		SF3A3	q032-2	+	1
	SF3b145		SF3B2	q035-1	++	1
	SF3b145		SF3B2	q035-2	++	1
	SF3b130		SF3B3	q034-1	++	1
	SF3b130		SF3B3	q034-2	++	1
	SF3b49		SF3B4	q037-1	++	1
	SF3b49		SF3B4	q037-2	++	1
	SF3b14a	p14	SF3B14	AS3	++	1
	SF3b14b		PHF5A	BL1	++	2
	SF3b14b		PHF5A	BL2	++	2
	SF3b14b		PHF5A	BL4	+	2
	SF3b10		SF3B5	BK2	+	2
	SF3b10		SF3B5	BK3	+	2
	hPRP43		DHX15	q099-2	+	1

Gruppe	Name des Proteins	Name des Proteins (alias)	Offizieller Name des human Gens	siRNA	Reduktion.	Exp. Wdhlg.
17S U2 verwandt	SPF45		RBM17	CA2	++	2
	SPF45		RBM17	CA1	+	2
	SPF30		SMNDC1	q039-1	+	1
	SPF31		DNAJC8	BU1	++	2
	SPF31		DNAJC8	BU2	++	2
	SPF31		DNAJC8	BU4	+	2
	SPF31		DNAJC8	BU3	+	2
	hPRP5		DDX46	BT4	++	2
	hPRP5		DDX46	BT1	+	2
	SR140	fSAPa	SR140	CD1	++	2
	SR140	fSAPa	SR140	CD4	++	2
	SR140	fSAPa	SR140	CD2	++	2
	CHERP		CHERP	BW4	++	2
	CHERP		CHERP	BW1	++	2
	CHERP		CHERP	BW2	++	2
	SF3b125		DDX42	BM1	++	2
	SF3b125		DDX42	BM4	++	2
SF3b125		DDX42	BM2	++	2	
SF3b125		DDX42	BM3	+	2	
A Proteine	MGC2803	fSAP18	SAP18	q101-1	+	2
	FLJ10839		CCAR1	q134-1	++	1
	SF1		SF1	q078-1	++	1
	SF1		SF1	q078-2	+	1
	CDC2L2		CDC2L2	q051-4	++	1
	RBM5	LUCA15	RBM5	q135-2	++	1
	tat SF1		HTATSF1	q086-1	+	2
A/B Proteine	RNPC2 (CC1.3.)	fSAP59	RNPC2	q131-2	++	1
A/B Proteine	RNPC2 (CC1.3.)	fSAP59	RNPC2	q131-1	+	1
A/B proteins	TCERG1	CA150	TCERG1	q004-2	+	2
A/B Proteine	TCERG1	CA150	TCERG1	q004-1	++	1
A/B Proteine	ELAV	HuR	ELAVL1	q056-1	++	1
A/B proteins	PPP1CA		PPP1CA	NE1	+	2
A/B Proteine	PPP1CA		PPP1CA	NE2	+	2
A/B Proteine	DNaJ homolog	DNAJC6	DNAJC6	q132-2	++	2
A/B Proteine	DNaJ homolog	DNAJC6	DNAJC6	q132-1	++	2
A/B Proteine	ASR2B		ARS2	q003-1	++	2
A/B Proteine	ASR2B		ARS2	q003-2	+	2
SR Proteine	SF2	ASF	SFRS1	q030-2	++	2
	SF2	ASF	SFRS1	q149-3	++	1
	SF2	ASF	SFRS1	q030-1	+	2
	SF2	ASF	SFRS1	q149-1	+	1
	SRp20		SFRS3	q040-1	++	2
	SRp40		SFRS5	q084-1	++	2
	SRp55		SFRS6	q150-1	++	1
	SRp55		SFRS6	q150-2	++	1
	SRp55		SFRS6	q085-1	+	2
	hTra-2 alpha		TRA2A	q062-2	++	2
	hTra-2 beta	SFRS10	SFRS10	q079-1	++	1
	hTra-2 beta	SFRS10	SFRS10	q079-2	+	2
	SR verwandte Proteine	SRm160		SRRM1	q081-2	++
SRm300			SRRM2	q082-2	++	1
cap bindender Komplex	CBP80		NCBP1	q007-1	+	2
	CBP80		NCBP1	q007-2	++	2
U5	200K	hBRR2	ASCC3L1	q130-1	++	1
	116K	hSNU114	EFTUD2	AK9	+	1
	40K	hPrp8bp	WDR57	q094-1	++	1
	40K	hPrp8bp	WDR57	q094-2	++	1
	102K	hPrp6	PRP6F	AL6	++	1
	102K	hPrp6	PRP6F	AL7	++	1
	15K	hDIB1	TXNL4A	AH2	++	1
	15K	hDIB1	TXNL4A	AH4	++	1
	15K	hDIB1	TXNL4A	AH5	++	1
	52K	hLIN1	CD2BP2	AJ3	++	1
	52K	hLIN1	CD2BP2	AJ5	++	1
	LSm Proteine	LSm4		LSM4	BD1	++
LSm7			LSM7	CN2	++	1

Gruppe	Name des Proteins	Name des Proteins (alias)	Offizieller Name des human Gens	siRNA	Reduktion.	Exp. Wdhlg.	
LSm Proteine	LSm7		LSM7	CN3	++	1	
	LSm7		LSM7	CN1	+	1	
	LSm8		LSM8	BE2	++	1	
	LSm8		LSM8	BE3	++	1	
U4/U6	90K	hPrp3	PRPF3	AN1	++	1	
	90K	hPrp3	PRPF3	AN2	++	1	
	90K	hPrp3	PRPF3	AN3	++	1	
	90K	hPrp3	PRPF3	CU2	++	1	
	90K	hPrp3	PRPF3	CU3	++	1	
	90K	hPrp3	PRPF3	CU4	++	1	
	90K	hPrp3	PRPF3	CU1	+	1	
	60K	hPrp4	PRPF4	AM5	++	1	
	60K	hPrp4	PRPF4	AM8	++	1	
	60K	hPrp4	PRPF4	AM6	+	1	
	20K	CypH	PIIH	AT3	++	1	
	20K	CypH	PIIH	AT5	+	1	
	15.5K	hSNU13	NHP2L1	CP1	++	1	
	15.5K	hSNU13	NHP2L1	CP4	++	1	
U4/U6.U5	110K	hSNU66	SART1	AP5	++	1	
U4/U6.U5	110K	hSNU66	SART1	AP7	+	1	
	65K	hSAD1	USP39	AR7	++	1	
	65K	hSAD1	USP39	AR5	+	1	
	27K		RY1	q045-1	+	1	
	hSnu23		ZMAT2	q019-1	+	2	
	hPRP38		PRPF38A	q061-1	++	2	
	hPRP38		PRPF38A	q061-2	++	2	
Prp19-CDC5-Komplex	hPRP19		PRPF19	JW1	+	3	
	hPRP19		PRPF19	JW2	+	3	
	CDC5L		CDC5L	KK2	++	3	
	SPF27		BCAS2	KN1	++	3	
	SPF27		BCAS2	KN2	+	3	
	CCAP1	hsp73	HSPA8	NF1	++	3	
	CCAP1	hsp73	HSPA8	NF2	+	3	
	CCAP2 (hspc148)	AD-002	HSPC148	NC2	+	3	
	catenin, b-like 1	CTNNB1	CTNNB1	ND1	++	3	
	catenin, b-like 1 (CTNNB1, NAP)		CTNNB1	ND2	+	3	
	Npw38BP		WBP11	JS1	+	3	
	Npw38BP		WBP11	JS2	+	3	
	Npw38		PQBP1	JT1	+	3	
	Prp19-CDC5 verwandt	hSYF1	XAB2	XAB2	KS1	++	3
		CRNKL1/hSYF3		CRNKL1	JX2	+	3
		SKIP		SNW1	KU1	++	2
SKIP			SNW1	KU2	+	2	
Cyp-E			PPIE	KD1	++	2	
Cyp-E			PPIE	KD2	+	2	
PPlase-like 1		PPIL1	PPIL1	KE2	++	3	
KIAA0560		fSAP164	AQR	KC1	++	1	
KIAA0560		fSAP164	AQR	q110-1	++	1	
KIAA0560		fSAP164	AQR	q110-2	++	1	
G10		fSAP17	BUD31	NA1	++	2	
hECM2		RBM22	RBM22	KA1	++	1	
hECM2		RBM22	RBM22	KA2	++	1	
RES-Komplex		SNIP1		SNIP1	q141-1	++	2
RES-Komplex	MGC13125	fSAP71	BUD13	q024-1	+	2	
B/B* Proteine	matrin 3		MATR3	q066-1	++	2	
	PPIL2	Cyp-60	PPIL2	q008-2	++	2	
	PPIL2	Cyp-60	PPIL2	q008-1	+	2	
	hsp27		HSPB1	q129-1	++	1	
	MGC23918		CCDC12	KX1	++	2	
	hPRP2		DHX16	q016-2	+	2	
	hPRP4-Kinase		PRPF4B	q017-2	+	1	
C Proteine	Abstrakt		DDX41	q002-1	++	2	
	KIAA0073 (CyP64)	PPWD1	PPWD1	q112-2	+	2	
	GCIP p29	fSAP29	SYF2	KW2	++	2	
	DDX35		DHX35	KF2	++	2	
	DDX35		DHX35	q011-1	++	2	
	DDX35		DHX35	q011-2	+	2	

Gruppe	Name des Proteins	Name des Proteins (alias)	Offizieller Name des human Gens	siRNA	Reduktion.	Exp. Wdhlg.
	Q9BRR8		GPATC1	q113-1	+	1
	hPRP22		DHX8	JU2	+	1
	hPRP18		PRPF18	q075-2	+	1
	hPRP18		PRPF18	q075-1	+	2
	hPRP17		CDC40	q059-1	+	1
	hPRP16		DHX38	q027-2	+	2
	AAH05870	MGC4238	MORG1	q104-1	++	2
	DKFZP586O0120	FAM32A	FAM32A	q55-2	+	1
EJC/mRNP	eIF4A3		DDX48	q071-2	++	1
	Magoh		MAGOH	q065-1	+	2
	Y14		RBM8A	q096-1	+	2
EJC/mRNP	Acinus	fSAP152	ACIN1	q049-1	+	1
	Aly/REF		THOC4	q050-2	++	2
	Aly/REF		THOC4	q050-1	++	2
	UAP56		DDX39	q047-1	+	2
TREX	THOC1		THOC1	q087-1	+	2
	THOC2		THOC2	q088-1	++	2
Methylosome	MEP50		WDR77	AX3	+	1
	MEP50		WDR77	AX5	++	1
	MEP50		WDR77	AX6	++	1
	PRMT5	SKB1	PRMT5	AF5	+	1
	PRMT5	SKB1	PRMT5	AF6	++	1

Tabelle 13-C. siRNAs ohne Einfluss auf Zellproliferation. Die aufgeführten siRNAs reduzierten die Anzahl der lebenden Zellen um weniger als 15% (-) (siehe Tabelle 12, Abschnitt 4.2.1).

Gruppe	Name des Proteins	Name des Proteins (alias)	Offizieller Name des human Gens	siRNA	Reduktion.	Exp. Wdhlg.
Sm proteins	D1		SNRPD1	q144-1	-	2
U1 snRNP	U1-A		SNRPA	q092-1	-	2
U1 snRNP assoziiert	FBP11	FNBP3	PRPF40A	q107-1	-	2
17S U2 snRNP	SF3a120		SF3A1	q031-2	-	1
	SF3b10		SF3B5	BK1	-	2
17S U2 verwandt	hPRP43		DHX15	CE1	-	2
	hPRP43		DHX15	CE2	-	2
	hPRP43		DHX15	CE3	-	2
	hPRP43		DHX15	CE4	-	2
	SPF45		RBM17	CA3	-	2
	SPF45		RBM17	CA4	-	2
	hPRP5		DDX46	BT2	-	2
	SR140	fSAPa	SR140	CD3	-	2
	CHERP		CHERP	BW3	-	2
A Proteine	MGC2803	fSAP18	SAP18	q101-2	-	2
	FLJ10839		CCAR1	q134-2	-	2
	RBM5	LUCA15	RBM5	q135-1	-	2
	tat SF1		HTATSF1	q086-2	-	2
	SF4	F23858	SF4	q133-1	-	2
A/B Proteine	ELAV	HuR	ELAVL1	q056-2	-	2
	NIPP1		PPP1R8	q069-1	-	2
	NIPP1		PPP1R8	q069-2	-	2
	p72	DDX17	DDX17	q009-1	-	2
	p72	DDX17	DDX17	q009-2	-	2
	DDX9		DHX9	q013-1	-	2
	DDX9		DHX9	q013-2	-	2
	NFAR		ILF3	q025-1	-	2
	NFAR		ILF3	q025-2	-	2
	YB-1		YBX1	q048-1	-	2
	YB-1		YBX1	q048-2	-	2
	p68	DDX5	DDX5	q012-1	-	2
	p68	DDX5	DDX5	q012-2	-	2

Gruppe	Name des Proteins	Name des Proteins (alias)	Offizieller Name des human Gens	siRNA	Reduktion.	Exp. Wdhlg.
SR Proteine	9G8		SFRS7	q001-1	-	2
	9G8		SFRS7	q001-2	-	2
	SRp20		SFRS3	q040-2	-	2
	SRp30c		SFRS9	q083-1	-	2
	SRp30c		SFRS9	q083-2	-	2
	SRp40		SFRS5	q084-2	-	2
	SRp55		SFRS6	q150-3	-	1
	SC35	SFRS2	SFRS2	q029-1	-	2
	SC35	SFRS2	SFRS2	q029-2	-	2
	hTra-2 alpha		TRA2A	q062-1	-	2
SR verwandte Proteine	SRm160		SRRM1	q081-1	-	2
cap bindender Komplex	CBP20		NCBP2	q006-1	-	2
	CBP20		NCBP2	q006-2	-	2
U5	15K	hDIB1	TXNL4A	AH6	-	1
	100K	hPrp28	DDX23	q046-1	-	1
	100K	hPrp28	DDX23	q046-2	-	1
LSm Proteine	LSm2		LSM2	CJ3	-	1
	LSm2		LSM2	CJ4	-	1
LSm Proteine	LSm4		LSM4	BD4	-	1
	LSm8		LSM8	BE5	-	1
U4/U6	60K	hPrp4	PRPF4	AM7	-	1
	20K	CypH	PPIH	AT1	-	1
U4/U6.U5	27K		RY1	q045-2	-	1
	hSnu23		ZMAT2	q019-2	-	2
Prp19-CDC5 Komplex	Npw38		PQBP1	JT2	-	2
Prp19-CDC5 verwandt	PRCC		PRCC	q147-1	-	2
	PRCC		PRCC	q147-2	-	2
	hSYF1	XAB2	XAB2	KS2	-	3
	hlsy1	fSAP133	KIAA1160	KT1	-	2
	hlsy1	fSAP133	KIAA1160	KT2	-	2
	KIAA0560	fSAP164	AQR	KC2	-	1
	G10	fSAP17	BUD31	NA2	-	2
	B/B* Proteine	FBP21		WBP4	q136-1	-
	FBP21		WBP4	q136-2	-	1
	MGC23918		CCDC12	KX2	-	2
	hPRP2		DHX16	q016-1	-	1
C Proteine	KIAA0073 (Cyp64, PPWD1)		PPWD1	q112-1	-	2
	PPlase-like 3b		PPIL3	q026-1	-	2
	PPlase-like 3b		PPIL3	q026-2	-	2
	GCIP p29	fSAP29	SYF2	KW1	-	2
	DDX35		DHX35	KF1	-	2
	Q9BRR8		GPATC1	q113-2	-	1
	hPRP16		DHX38	KJ1	-	2
	hPRP16		DHX38	KJ2	-	2
	hPRP16		DHX38	q027-1	-	2
	FRG1		FRG1	q015-1	-	2
	FRG1		FRG1	q015-2	-	2
	DKFZP58600120	FAM32A	FAM32A	q55-1	-	1
	EJC/mRNP	Y14		RBM8A	q096-2	-
EJC/mRNP	UAP56		DDX39	q047-2	-	2
EJC/mRNP	ELG		HSA277841	q127-1	-	2
	ELG		HSA277841	q127-2	-	2
	DDX3		DDX3X	q10-1	-	1
	DDX3		DDX3X	q10-2	-	1
TREX	THOC1		THOC1	q087-2	-	2
	THOC2		THOC2	q088-2	-	2
	THOC3		THOC3	q089-1	-	2
	THOC3		THOC3	q089-2	-	2
Methylosome	MEP50		WDR77	AX2	-	1
	PRMT5	SKB1	PRMT5	AF4	-	1
	PRMT5	SKB1	PRMT5	AF8	-	1

Die Ergebnisse zeigen zwei Auffälligkeiten. Zum einen führte nur ein geringer Teil der erstellten siRNA Bibliothek, 96 siRNAs gegen 58 Faktoren, zu einer deutlich verminderten Zellzahl. Dies könnte auf mangelnde Effizienz der siRNAs, aber auch auf eine nicht-essentielle Bedeutung der depletierten Faktoren hinweisen. Zum anderen erzeugten in vielen Fällen alle oder zumindest eine Vielzahl der gegen den gleichen Faktor gerichteten siRNAs einen deutlichen Wachstumsphänotyp. Dies könnte neben einer essentiellen Funktion des Faktors für die Zelle auch auf eine feinregulierte mRNA-Menge oder eine besonders kurze Halbwertszeit des Ziel-Proteins hindeuten. Des Weiteren könnten diese siRNAs jedoch auch in ihrerer Struktur besonders geeignet sein RNA-Interferenz zu induzieren oder die Ziel-mRNA ist besonders zugänglich für den siRNA vermittelten Abbau.

4.2.3 Validierung des siRNA vermittelten Knockdowns mittels quantitativer Einschrift-Echtzeit-RT-PCR am Beispiel des Prp19-CDC5-Komplexes und der damit verwandten Proteine

Die grundlegende Kontrolle eines jeden RNAi-Experimentes ist der Nachweis der reduzierten Expression auf Protein-Ebene. Die Validierung von Knockdowns auf Protein-Ebene ist jedoch oft durch die mangelnde Verfügbarkeit an geeigneten Antikörpern limitiert. Dagegen ermöglicht die quantitative Echtzeit-RT-PCR die mRNA-Menge eines jeden beliebigen Ziel-Gens zu analysieren.

Am Beispiel der Faktoren des Prp19-CDC5-Komplexes und der damit verwandten Proteine (siehe Einleitung 2.3.1.4) soll in dieser Arbeit die Validierung des siRNA-vermittelten Knockdowns auf mRNA-Ebene demonstriert werden. Der Prp19-CDC5-Komplex ist von besonderem Interesse, da zahlreiche Studien gezeigt haben, dass der Prp19/CDC5-Komplex eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung des Spleißosoms spielt (Tarn, 1993; Makarova, 2004; Chan und Cheng, 2005).

Die quantitative Echtzeit-RT-PCR bietet den Vorteil, dass relativ leicht und in kurzer Zeit geeignete PCR-Primer entworfen und synthetisiert werden können und somit die Möglichkeit eröffnen, die Expression eines jeden beliebigen Gens zu untersuchen. Außerdem wird nur eine relativ kleine

Menge Zellen für eine RNA-Präparation benötigt.

Es wurde angenommen, dass die Depletion einiger Spleißfaktoren direkt in einer Blockade des Spleißprozesses resultiert. In der Folge könnte Prä-mRNA im Zellkern akkumulieren. Deshalb wurden für die Analyse der mRNA-Mengen pro Gen zwei PCR-Primerpaare ausgewählt, die zur Amplifikation reifer mRNA oder sowohl zur Amplifikation reifer mRNA als auch Prä-mRNA geeignet waren. Beide Primerpaare hybridisierten idealerweise in der gleichen Region der Ziel-mRNA und wurden so gewählt, dass sie den Nachweis aller bekannten Transkriptvarianten eines Gens ermöglichten. Als Referenz wurde die mRNA des Gens *GLUD2* (Glutamat-dehydrogenase 2) eingesetzt. Das *GLUD2* Gen enthält keine Introns.

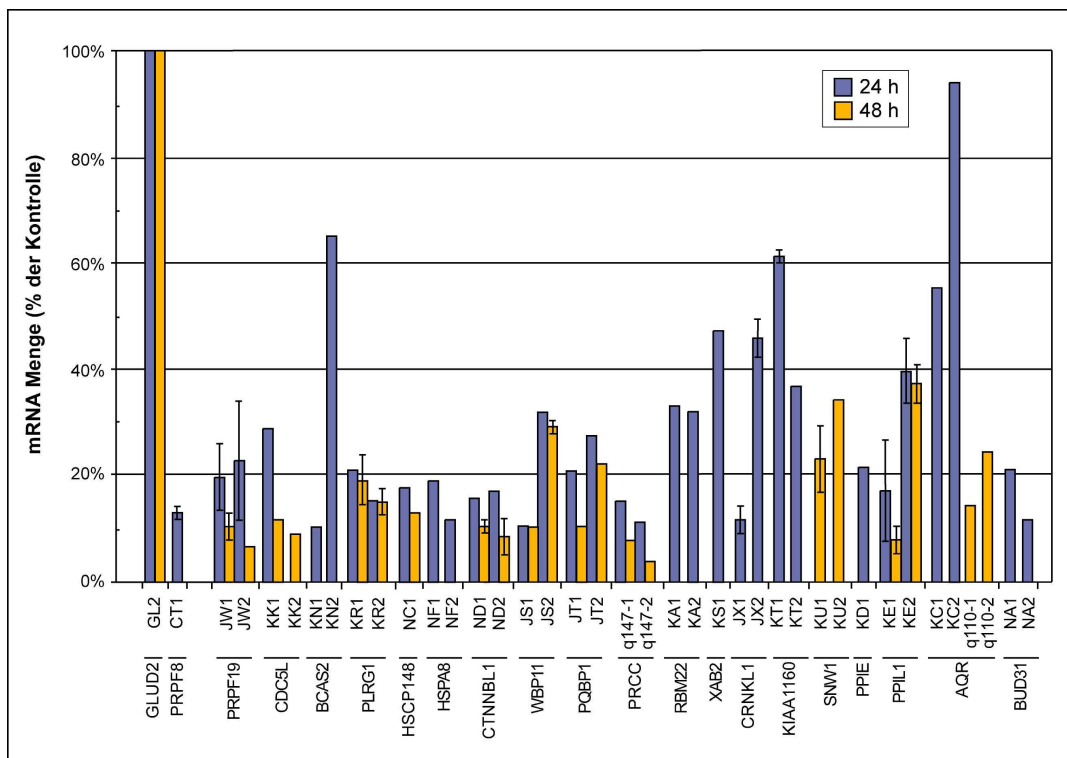


Abbildung 23. Validierung der Effizienz von siRNAs mit Einschritt-Echtzeit-RT-PCR. HeLa SS6 Zellen wurden mit 110 nM GL2 Kontroll-siRNA gegen Luziferase oder siRNAs gegen Faktoren des Prp19-CDC5-Komplexes und der assoziierten Proteine transfiziert. Als Positivkontrolle wurde ein Knockdown mit einer siRNA (CT1) gegen das hPrp8 (PRPF8) Protein durchgeführt, das essentiell für die katalytischen Schritte I und II des Prä-mRNA Spleißens ist. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit DNase I behandelt. Anschließend wurden 12,5 ng Gesamt-RNA in die Einschritt Echtzeit RTR-PCR eingesetzt (QuantiTec SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN). Die Balken repräsentieren die Spannweite der Werte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Der Graph zeigt die verbleibenden mRNA-Mengen wie aus den Echtzeit-RT-PCR Daten errechnet und normalisiert zur mRNA-Menge des Referenz-Gens Glutamatdehydrogenase 2 (*GLUD2*).

HeLa SS6 Zellen wurden mit siRNAs gegen Faktoren des Prp19-CDC5-Komplexes und der verwandten Proteine transfiziert (siehe 3.2.6.1). Als Positivkontrolle wurden Zellen mit siRNAs gegen den Spleißfaktor Prp8 transfiziert. 24 und/oder 48 Stunden später wurde die Gesamt-mRNA aus den Zellen isoliert und die mRNA-Menge der Ziel-Gene mit Einschritt-Echtzeit-RT-PCR unter Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR-Green bestimmt (siehe 3.2.7). Die mRNA-Menge des Ziel-Gens wurde relativ zu einer Kontroll-mRNA aus mit der Kontroll-siRNA GL2 transfizierten Zellen und relativ zu dem Referenz-Gen GLUD2 nach einer Methode von Pfaffel (Pfaffel, 2001) berechnet.

Für die meisten Gene des Prp19-CDC5-Komplexes und der assoziierten Proteine wurde mindestens eine siRNA gefunden, die zu einer Reduktion der betreffenden mRNA um ca. 80% führte (Abbildung 23). Ausnahmen stellten die Faktoren RBM22 und KIAA1160 (hlsy1) dar. Die effizientesten siRNAs gegen diese Gene reduzierten deren zugehörige mRNA lediglich um zirka 70% bzw. 60%. Auffällig war, dass in 47% der Fälle eine von 24 auf 48 Stunden verlängerte Inkubationszeit der Zellen mit der siRNA zu einer um mehr als 50% gesteigerten Reduktion der Ziel-mRNAs führt. Für die restlichen siRNAs konnte keine gesteigerte Genunterdrückung solchen Ausmaßes verzeichnet werden. Jedoch kam es auch in keinem Fall zu einer Zunahme der mRNA-Menge 48 Stunden nach der Transfektion gegenüber dem nach 24 Stunden bestimmten Wert.

Mit diesem siRNA-Satz stand ein Werkzeug zur tiefergehenden funktionellen Analyse des Prp19-CDC5-Komplexes und der verwandten Proteine zur Verfügung.

4.2.4 Subzelluläre Lokalisierung des SC35 (SFRS2) Proteins, von Poly(A)⁺-mRNA und U2, U4 und U5 snRNA als Indikatoren für Spleißdefekte nach siRNA vermitteltem Knockdown von Faktoren des Prp19/CDC5-Protein Komplexes und damit verwandter Proteine

Ein RNAi-Screen mittleren Durchsatzes sollte erste Hinweise auf die funktionelle Rolle von Proteinen beim Spleißen geben. Deshalb wurde nach einem geeignetem Nachweisverfahren gesucht. Die fluoreszenz-

mikroskopische Analyse der subzellulären Verteilung von Protein und RNA Komponenten des Spleißosoms schien eine geeignete Methode zu sein. Denn es war bereits bekannt, dass sich nach Inhibition des Prä-mRNA Spleißens die subzelluläre Lokalisierung der Bestandteile des Spleißosoms dramatisch verändern kann. Des Weiteren kann auch die Verteilung von mRNA und Prä-mRNA durch Spleißinhibition massiv beeinflusst werden.

Wie gezeigt wurde, verändert sich die Lokalisierung des Specklemarkers SC35 (SFRS2) deutlich und charakteristisch nach Inhibition des Spleißens als auch der Transkription (Carmo-Fonseca et al., 1992; O'Keefe et al., 1994). Das Protein SC35 akkumuliert unter diesen Bedingungen in einer verringerten Anzahl von abgerundeten Regionen, die nicht mehr miteinander verbunden sind. Somit kann die Untersuchung der SC35 Verteilung durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie nach siRNA vermittelter Depletion eines Spleißfaktors einen Hinweis auf mögliche Spleißdefekte liefern.

Als weitere zelluläre Indikatoren für Spleißdefekte wurde die Verteilung von U snRNAs analysiert, die eine zentrale Komponente der snRNPs darstellen. snRNAs lokalisieren in der Zelle im Nukleoplasma, in den Speckles und in den Cajal Bodies. Cajal Bodies sind subzelluläre Domänen, die alle spleißosomalen snRNAs, jedoch mit unterschiedlicher Abundanz, enthalten. Andererseits konnten einige essentielle nicht-snRNP Faktoren, wie SR-Proteine, nicht in den Cajal Bodies nachgewiesen werden. Deshalb stellen sie vermutlich keine Bereiche aktiven Spleißens dar, sondern sind sehr wahrscheinlich bei der Assemblierung und Reifung von snRNPs involviert (Schaffert et al., 2004). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Depletion spleißosomaler Faktoren mittels RNAi zu einer Reorganisation der U snRNAs in der Zelle führen kann. So akkumulieren die di-snRNP Komponenten U4 und U6 snRNA nach Inhibition der tri-snRNP Bildung durch Depletion des U4/U6 di-snRNP spezifischen Proteins Prp31 (PRPF31) oder des U5 spezifischen Proteins Prp6 (PRPF6) in den Cajal-Bodies, während sie in den Speckles abnehmen. Im Gegensatz dazu relokalisieren U1, U2 und U5 snRNA nach Depletion der o.g. Faktoren nicht in Cajal Bodies, sondern in Speckles, die gegenüber den Speckles der Kontroll-Zellen grobkörniger erscheinen (Schaffert et al., 2004). Unter der Annahme, dass auch die Depletion anderer snRNP und nicht-snRNP Spleißfaktoren zu einer Reorganisation der snRNAs führen könnte, soll die

Verteilung von U2 und U5 snRNA untersucht werden, die Bestandteil des aktivierten Spleißosoms sind, um Hinweise auf Spleißdefekte zu erhalten. Außerdem sollte die Lokalisierung von U4 snRNA untersucht werden, die im Zuge der Aktivierung vom Spleißosom dissoziiert.

Wird das Prä-mRNA Spleißen inhibiert kann es zu einer Akkumulation von ungespleißter mRNA im Zellkern kommen, da ungespleißte mRNA nicht aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert wird (Luo und Reed, 1999; Proudfoot et al., 2002). Weil die Polyadenylierung von Prä-mRNA unabhängig vom Prä-mRNA-Spleißen erfolgt, kann der Nachweis von nukleär akkumulierter Prä-mRNA einen Hinweis auf einen Spleißdefekt geben. Die zelluläre Verteilung der Poly(A)⁺-mRNA Gesamtpopulation kann durch fluoreszenz-markierte Oligo(dT)-Sonden in der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden. In nicht RNAi-behandelten Zellen lokalisiert polyadenylierte Prä-mRNA im Kern in Bereichen aktiver Transkription und des Prä-mRNA Spleißens, während reife polyadenylierte mRNA diffus im Zytoplasma verteilt vorliegt.

Im folgenden Kapitel soll untersucht werden, ob diese Veränderungen als Indikatoren für Spleißdefekte in RNAi-Screens nutzbar sind. Beispielhaft werden die Veränderungen nach der Depletion von Faktoren des Prp19/CDC5-Komplexes und der damit verwandten Faktoren untersucht (siehe Einleitung 2.3.1.4).

In allen im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden siRNAs gegen die Proteine CDC5L, AD-002 (HSPC148), Npw38BP (WBP11), Npw38 (PQBP1), RBM22, PRCC, CRNKL1, Syf1 (XAB2) und PPIL1, und GL2-Kontroll-siRNA in HeLa SS6 Zellen transfiziert. 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion erfolgte die Analyse der o.g. zellulären Indikatoren.

4.2.4.1 Untersuchung der Verteilung des Spleißfaktors SC35 (SFRS2)

HeLa SS6 Zellen wurden 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion fixiert, gefärbt und die Fluoreszenzsignale mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. Die erhaltenen Phänotypen der Verteilung des SC35 Proteins wurden vier Grundmustern zugeordnet.

Neben dem Phänotyp der Wildtypsituation (Abbildung 24-A) wurde auch die Akkumulation des Proteins SC35 in abgerundeten Bereichen (Abbildung 24-

B) beobachtet. Dieses Phänotyp stellt einen deutlichen Hinweis auf Inhibition von Transkription oder Prä-mRNA Spleißen dar.

Neben diesen Phänotypen wurden noch zwei weitere bislang unbeschriebene Phänotypen nachgewiesen (Abbildung 24-C und D): (i) Nach Depletion des Proteins AD-002 lokalisierte das SC35 Protein in einem fleckenartigen Muster mit erhöhter Fluoreszenzintensität (Abbildung 24-C). Innerhalb dieser Flecken waren feine Punkte besonders hoher Signalintensität zu beobachten (Abbildung 24-G, I u. J). (ii) Auch nach Knockdown von CDC5L und Syf1 lokalisierte das Protein SC35 in größeren, fleckenartigen Regionen.

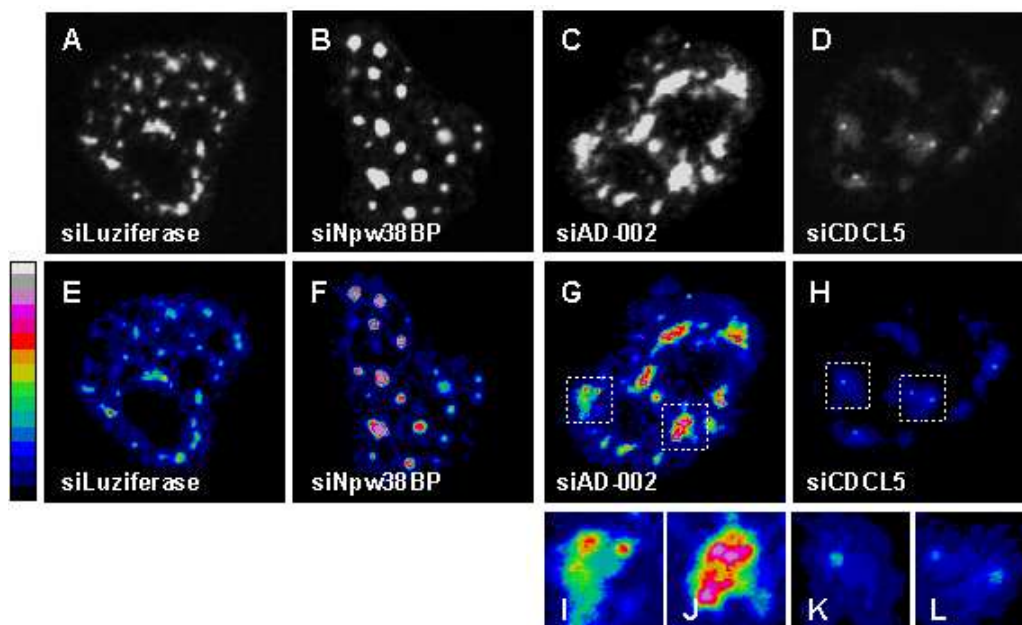


Abbildung 24. Muster der zellulären Lokalisation des SC35 Proteins nach Depletion von Komponenten des Prp19/CDC5-Komplexes und damit assoziierter Faktoren. siRNAs gegen (A) das Luziferase, (B) das Npw38BP (siRNA JT1), (C) das AD-002 (siRNA NC1) und (D) das CDC5L (siRNA KK1) Protein wurden in HeLa SS6 Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und die Verteilung des SC35 Proteins mittels spezifischer Antikörper durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop unter Einstellung derselben Parameter aufgenommen. Zur verbesserten Darstellung von (D) wurde der Kontrast für (A-D) mit Adobe Photoshop in gleicher Weise verändert. (E-H) Um Bereiche geringerer Signalintensität hervorzuheben, sind in der mittleren Reihe die Abbildungen der oberen Reihe – jedoch ohne vorhergehende Kontrastveränderung in Photoshop - in Falschfarben dargestellt. Dazu wurden die Aufnahmen mit der Falschfarben Tabelle „ratio“ der Software ImageJ (NIH, USA) bearbeitet. In (G) und (H) sind je zwei Regionen mit feinen punktförmigen Substrukturen innerhalb fleckenartiger Bereiche durch Quadrate markiert. (I-J) und (K-L) zeigen je zwei vergrößerte Ausschnitte aus (G) bzw. (H). Schwarz - geringste Signalintensität, hellgrau – höchste Signalintensität. Der 16-farbige LUT (engl. look up table) -Verlauf ist links dargestellt.

Diese zeichnen sich jedoch im Gegensatz zu Abbildung 24-C durch eine geringere Intensität des Fluoreszenzsignals und eine geringere Anzahl der Flecken aus, die weitgehend voneinander separiert sind (Abbildung 24-D).

Etwa 50% der Zellen zeigten zudem eine weitere Sublokalisierung des SC35 Proteins. Innerhalb jeder fleckenartigen Region akkumulierte das Marker-Protein in bis zu zwei feinen Punkten (Abbildung 24-H, K u. L).

Das Auftreten mehrerer Phänotypen spiegelt möglicherweise das komplexe Protein-Netzwerk bzw. das regulatorische Netzwerk wieder, in welches die Spleißfaktoren eingebunden sind. So üben einige Faktoren Funktionen bei verschiedenen zellulären Prozessen aus. Die Ergebnisse belegen weiter, dass der *in vivo* gezeigte Phänotyp durch Inhibition des Spleißens mittels Antisense-Oligonukleotiden auch durch siRNA vermittelte Depletion von Spleißfaktoren erzeugt werden kann. Die Akkumulation des SC35 Proteins in abgerundeten Bereichen ist somit ein deutlicher Hinweis darauf, dass die depletierten Spleißfaktoren essentiell für den Fortgang des Spleißprozesses sind.

4.2.4.2 Untersuchung der Verteilung der U2, U4 und U5 snRNAs

48 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurden die HeLa SS6 Zellen fixiert und mit fluoreszenz-markierten DNA-Sonden gegen U2, U4 und U5 snRNA mittels FISH gefärbt. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. Auch hier konnten wieder Verteilungsmuster beobachtet werden, die auf einen Spleißdefekt schließen lassen. Die unterschiedlichen Muster der snRNA Verteilung wurden in die vier Grundmuster A bis D eingruppiert. Mit Ausnahme von Muster D wurden diese für U2, U4 und U5 snRNA beobachtet. Am Beispiel der U2 snRNA werden diese Muster im Folgenden beschrieben (Darstellung aller Ergebnisse siehe Tabelle 14).

In der Luziferase-Kontrolle lokalisiert U2 snRNA diffus im Nukleoplasma und in den Speckles. In den Cajal Bodies liegt es konzentriert vor (Abbildung 25-A). Nach Depletion des Proteins PRCC (siRNA q147-1) akkumulierte U2 snRNA sehr stark in den Cajal Bodies, während die Menge im Nukleoplasma weitestgehend unbeeinflusst blieb (Abbildung 25-D). Dagegen kam es nach

dem Knockdown von CRNKL1 (siRNA JX1) zu einer deutlichen Akkumulation von U2 snRNA in den Spleckles (Abbildung 25-B). Des Weiteren war auch hier eine Zunahme des U2 snRNA Signals in den Cajal Bodies festzustellen, welche allerdings deutlich geringer war, als nach Depletion des PRCC Proteins. Die Depletion von Npw38 führte zu einer generellen Reduktion der U2 snRNA (Abbildung 25-C), die im Nukleoplasma deutlich ausgeprägter war als in den Cajal Bodies. Zusätzlich zeigten die Npw38 depletierten Zellen eine verringerte Anzahl Cajal Bodies.

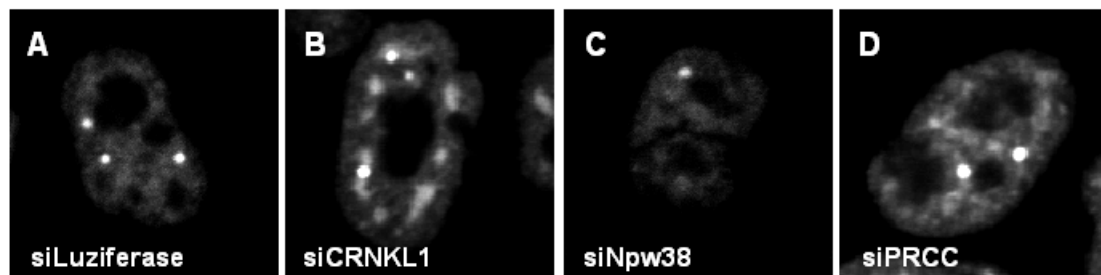


Abbildung 25. Muster der zellulären Lokalisation der U2 snRNA nach Depletion von Komponenten des Prp19/CDC5-Komplexes und damit assoziierter Faktoren. HeLa SS6 Zellen wurden mit siRNAs gegen (A) das Luziferase, (B) das CRNKL1 (siRNA JX1), (C) das Npw38 (siRNA JT1) und (D) das PRCC (siRNA q147-1), Protein transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und mittels fluoreszenz-gekoppelter Oligonukleotid-Sonden durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) die zelluläre Verteilung der U2 snRNA in der Zelle untersucht. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop unter Einstellung derselben für (A) optimierten Parameter aufgenommen.

Die Ergebnisse belegen, dass auch die Depletion von nicht snRNP-Spleißfaktoren zu unterschiedlichen Veränderungen im subzellulären Verteilungsmuster von U snRNAs führen können. Unter anderem konnte eine Akkumulation von U2 snRNA in den Speckles nach Depletion von CRNKL1 Protein gezeigt werden. Dieser Phänotyp gibt einen starken indirekten Hinweis auf einen vorliegenden Spleißdefekt. Somit ist auch die Analyse der U snRNA Verteilung ein geeigneter zellulärer Indikator, um Spleißdefekte *in vivo* zu untersuchen.

4.2.4.3 Untersuchung der Verteilung der Poly(A)⁺-mRNA

48 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde die intrazelluläre Verteilung der Poly(A)⁺-mRNA in den transfizierten HeLa SS6 Zellen mittels FISH und fluoreszenz-markierten Oligo(dT)-Sonden untersucht. Es wurden

unterschiedliche Phänotypen der Poly(A)⁺-mRNA Verteilung beobachtet. Diese wurden drei Grundmustern zugeordnet.

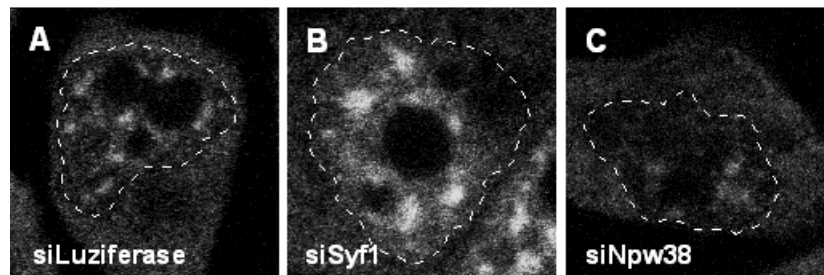


Abbildung 26. Muster der zellulären Lokalisation der Poly(A)⁺-mRNA nach Depletion von Komponenten des Prp19/CDC5-Komplexes und damit assoziierter Faktoren. HeLa SS6 Zellen wurden mit siRNAs gegen (A) Luziferase, (B) Syf1 (siRNA KS1) und (C) Npw38 (siRNA JT1) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und mittels fluoreszenz-gekoppelter Oligo(dT)-Sonden durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) die zelluläre Lokalisation der Poly(A)⁺-mRNA in der Zelle untersucht. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop unter Einstellung derselben für (A) optimierten Parameter aufgenommen. Die gestrichelte Linien markieren die Zellkerne.

In den Kontroll-Zellen, die stellvertretend für das Muster A gezeigt sind (Abbildung 26-A), lokalisiert Poly(A)⁺-mRNA in den Speckles und diffus im Nucleoplasma. Ein Großteil der Poly(A)⁺-mRNA in Kontroll-Zellen zeigt eine diffuse Verteilung im Zytoplasma. Im Gegensatz dazu führt die Depletion von Syf1 (siRNA KS1) zu einer deutlichen Akkumulation von Poly(A)⁺-mRNA im Zellkern. Dieser Phänotyp wurde als Muster B bezeichnet (Abbildung 26-B). Ein dritter Phänotyp, Muster C, wurde nach Deletion des Npw38 Protein (siRNA JT1) beobachtet (Abbildung 26-C). Im Gegensatz zum Phänotyp in Abbildung 26-B ist hier das nukleäre Poly(A)⁺-mRNA Signal im Vergleich zu den Kontroll-Zellen reduziert.

Diese Resultate belegen, dass die siRNA vermittelte Depletion von Faktoren des Prp19/CDC5-Komplexes und damit verwandter Proteine zu einer Akkumulation von Poly(A)⁺-mRNA führen kann. Die Poly(A)⁺-mRNA Akkumulation gibt somit einen weiteren indirekten Hinweis auf einen möglichen Spleißdefekt.

4.2.4.4 Gesamtanalyse der Verteilungsmuster

Die für die untersuchten Indikatoren (zelluläre Verteilung von SC35, Poly(A)⁺-mRNA, U2, U4 und U5 snRNA) gefundenen verschiedenen Muster, die in den Abschnitten 4.2.4.1, 4.2.4.3 und 4.2.4.2 näher beschrieben wurden, sind für alle untersuchten Faktoren in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tabelle 14. Zusammenfassung der Ergebnisse zum Nachweis von subzellulären Markern der Spleißinhibition. Die gefundenen Phänotypen wurden den Mustern A-E der SC35 Verteilung (siehe Abschnitt 4.2.4.1), den Mustern A-C der Poly(A)⁺-mRNA Verteilung (siehe Abschnitt 4.2.4.3) und den Mustern A-D der U2, U4 und U5 snRNA Verteilung (siehe Abschnitt 4.2.4.2) zugeordnet. Für Phänotypen, die nicht deutlich ausgeprägt waren, sind mehrere mögliche Muster durch einen Schrägstrich getrennt aufgeführt.

Faktor	siRNA	SC35	Poly(A) ⁺ -mRNA	U2 snRNA	U4 snRNA	U5 snRNA
CDC5L	KK1	C	A/B	A/D	B	A/D
AD-002 (HSPC148)	NC1	B	A	A	A	A
Npw38BP(WBP11)	JS1	A	A/B	A/D	A	B
Npw38 (PQBP1)	JT1	D	C	C§	D	A/D
RBM22	KA1	A	A	A	A	-
PRCC	q147-1	A	A	D	D	A
PRCC	q147-2	A	A	A	A	A
CRNKL1	JX1	B	B	B	B	C
CRNKL1	JX2	A/D	A	A	A	A
Syf1 (XAB2)	KS1	C	B	A	B‡	B
PPIL1	KE1	D	A	A/B/D	B/D	A
PPIL1	KE2	A/D	A	A	B/D	A

Legende

	SC35	pA	UsnRNAs
A	unverändert	unverändert	unverändert
B	akkum. in flächigen Speckles	akkum. in Speckles	akkum. in Speckles leichte Akkum. in Cajal Bodies
C	reduziert in flächigen Speckles	reduziert in Speckles	reduziert in Speckles und Cajal Bodies
D	akkum. in runden Speckles	-	akkum. in Cajal Bodies
‡	-	-	Anzahl der Cajal Bodies erhöht
§	-	-	Anzahl der Cajal Bodies reduziert

Die Ergebnisse zeigen im Falle der CRNKL1 (siRNA JX1) Depletion klare indirekte Hinweise auf einen Spleißdefekt, da vier von fünf zellulären Indikatoren (SC35, p(A)⁺-mRNA, U2 und U4 snRNA) in den Speckles akkumulieren. Die Depletion von RBM22 (siRNA KA1) und PRCC (q147-2) führten eindeutig zu keinen Veränderungen im Verteilungsmuster der untersuchten Indikatoren.

Die Vielfalt der Phänotypen nach Depletion von Spleißfaktoren unterstreicht die Notwendigkeit mehrere zelluläre Marker parallel zu analysieren.

4.2.5 RNAi vermittelter Knockdown von hPrp31 (PRPF31) führt zu einer Akkumulation des U4/U6 di-snRNPs in den Cajal Bodies

Der U4/U6.U5 tri-snRNP ist eine zentrale Einheit des Spleißosoms und muss nach jedem durchlaufenen Spleißzyklus aus seinen Einzelkomponenten neu gebildet werden. Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, wo die Assemblierung des U4/U6.U5 tri-snRNP in der Zelle stattfindet. In diesem Zusammenhang wurden die Cajal Bodies als möglicher Ort der snRNP Assemblierung und Reifung vorgeschlagen. Jedoch war die zelluläre Funktion der Cajal Bodies wenig verstanden.

In Zusammenarbeit mit Nina Schaffert wurden deshalb die Orte der U4/U6.U5 tri-snRNP Assemblierung im Zellkern durch Kombination von RNA-Interferenz und Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Schaffert et al., 2004).

4.2.5.1 RNAi-Experimente bestätigen eine essentielle zelluläre Funktion der Proteine hPrp31 (PRPF31) und hPrp6 (PRPF6)

Um die Funktionen der Proteine hPrp31 und hPrp6 bei der tri-snRNP Formation zu untersuchen wurden RNAi-Experimente in HeLa SS6 Zellen mit synthetischen siRNA-Duplicates durchgeführt (Elbashir et al., 2002). Die siRNA-Duplicates waren entweder gegen die kodierende Region oder die 3'-UTR der mRNAs gerichtet, die für die Proteine hPrp31 und hPrp6 kodieren. Als Positivkontrolle dienten siRNAs gegen das Protein SF3b14a (SF3B14). Als Negativkontrolle wurde eine siRNA gegen *Photinus pyralis* Luziferase

eingesetzt. Die siRNA-Duplices gegen alle drei snRNP-Proteine reduzierten das Zellwachstum nach 72 Stunden relativ zur Negativkontrolle signifikant um 55% (hPrp31), 70% (hPrp6) und 80% (SF3b14a) (Abbildung 27). Diese Ergebnisse bestätigen eine essentielle zelluläre Funktion dieser Proteine. Damit übereinstimmend zeigten in Hefe durchgeführte Studien, dass das Ausschalten der für hPrp31 und hPrp6 kodierenden Gene zu lethalen Phänotypen führt (Legrain et al., 1991; Weidenhammer et al., 1996).

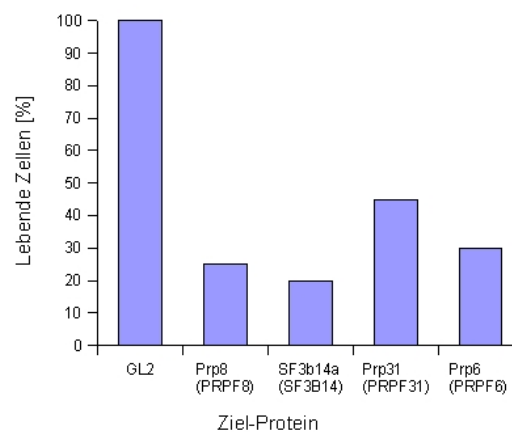


Abbildung 27 RNAi Knockdown Experimente bestätigen eine essentielle zelluläre Funktion der Proteine hPrp31 und hPrp6. (A) Die Zahl lebender Zellen wurde 72 Stunden nach Transfektion eines siRNA-Duplexes bestimmt und der Durchschnitt einer dreifachen Bestimmung als prozentualer Anteil des Kontroll Knockdowns (siRNA BB1, gegen GL2 Luziferase) dargestellt. Als Positivkontrollen dienten Knockdowns mit siRNAs gegen das hPrp8 (PRPF8) Protein und das SF3b14a Protein.

Ein TUNEL-Test (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) zeigte, dass die Zellen, die mit siRNAs gegen spleißosomale Faktoren transfiziert worden waren, jedoch nicht mit GL2 Kontroll-siRNA behandelte Zellen, zu diesem Zeitpunkt apoptotisch waren (Daten nicht gezeigt). Da 48 Stunden nach der Transfektion keine Apoptose festgestellt werden konnte, wurden alle weiteren Analysen zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Um die spezifische Depletion der Proteine nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen mit Antikörper gegen jedes der Proteine durchgeführt. Wie in Abbildung 28 dargestellt, wurde das hPrp31 und das hPrp6 Protein im Vergleich zur Negativkontrolle (Spuren 1, 3 und 5) um etwa 95% reduziert (Spuren 2 und 4) und das Protein SF3b14a um etwa 85% (Spur 6). Die Mengen von Prp4 (PRPF4) und p110 (SART3) wurden durch den Verlust der zuvor

genannten Proteine nicht beeinflusst. Auch wurden die Proteinmengen von hPrp6 und hPrp31 nicht durch die Depletion des jeweils anderen Proteins beeinflusst (Abbildung 28, Spuren 2, 4 und 6).

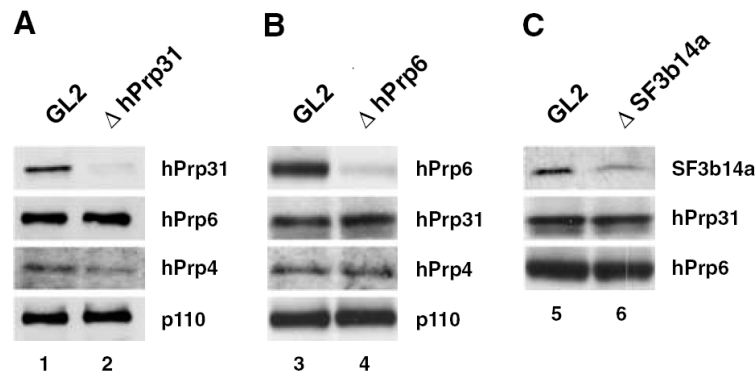


Abbildung 28 Knockdown von spleißosomalen Proteinen durch siRNAs. (A) Die Western Blot Analyse zeigt die Mengen der Proteine hPrp31, hPrp6, Prp4 und p110 in Kernextrakt, der aus HeLa Zellen 48 Stunden nach Transfektion mit einer siRNA gegen hPrp31 (siRNA EA1) und mit der Kontroll-siRNA GL2 gegen das Leuchtkäfer-Luziferase Protein. (B) Auf gleiche Art wurde ein Blot 48 Stunden nach Transfektion mit einer siRNA gegen hPrp6 (siRNA AL5) erzeugt. (C) Die Western Blot Analyse zeigt die Proteinmengen von SF3b14a, hPrp31 und hPrp6 48 Stunden nach Transfektion mit einer siRNA gegen SF3b14a (siRNA AS1). Es wurden gleiche Mengen an Protein aus Kernextrakt von Kontroll- und Knockdown-Zellen geladen (Abb. aus Schaffert, 2004).

4.2.5.2 In der Abwesenheit von hPrp31 und hPrp6 akkumuliert U4/U6 di-snRNP in Cajal Bodies

Die Proteine hPrp4, hPrp3 und p110 wurden durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit geeigneten Antikörpern und die snRNAs durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) in den Zellen lokalisiert. Die Depletion von hPrp31 oder hPrp6 durch RNAi führte zu einer verstärkten Akkumulation der U4/U6 spezifischen Proteine in diskreten Punkten im Kern unter gleichzeitiger Abnahme der nukleoplasmatischen Färbung. Die Punkte, in denen die Proteine akkumulierten, konnten durch Co-Immunfluoreszenz des hPrp4 Proteins und von Coilin als Cajal Bodies identifiziert werden (Abbildung 29-B und Abbildung 29-C im Vergleich zu Abbildung 29-A). Eine vergleichbare Akkumulation in Cajal Bodies wurde für hPrp3 (Abbildung 29-D bis F) und das U6 spezifische Protein LSm4 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu den Kontroll-Zellen nahm die Intensität der Fluoreszenzsignale in den Cajal Bodies signifikant zu.

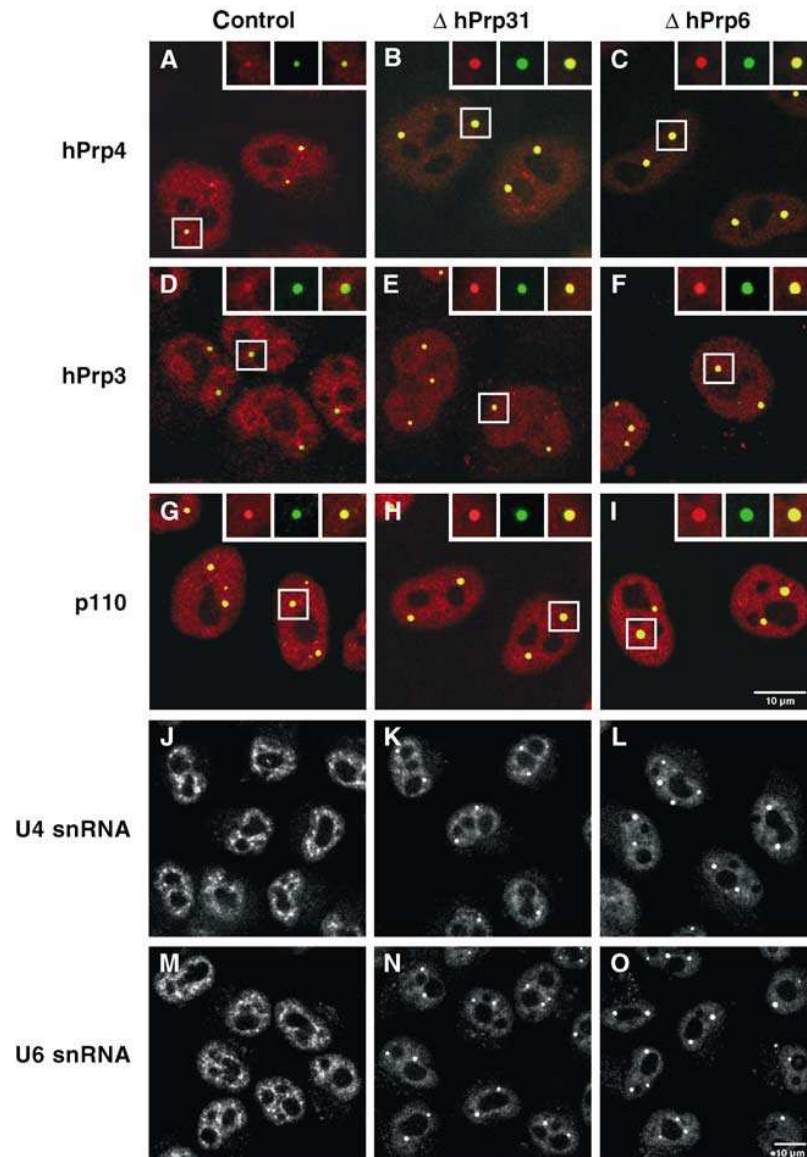


Abbildung 29. Inhibition der tri-snRNP Bildung führt zur Akkumulation der U4/U6 spezifischen Komponenten in Cajal Bodies. HeLa Zellen wurden mit siRNAs gegen Luziferase (Negativkontrolle), das U4/U6-Protein hPrp31 (siRNA EA1) oder das U5 Protein hPrp6 (siRNA AL5) transfiziert. 48 Stunden später wurden die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz (A-I) oder Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) untersucht (J-O). (A-I) Grün, monoklonale Antikörper gegen Coilin markieren die Cajal Bodies; Rot, Antikörper gegen das jeweils untersuchte Protein. (A-C) Transfizierte HeLa Zellen wurden gefärbt mit Antikörpern gegen Coilin (Grün) und gegen das U4/U6 Protein hPrp4 (Rot). Die Akkumulation des hPrp4 Proteins in den Cajal Bodies wird durch Überlagerung der beiden Einzelbilder deutlich (Gelb). (D-F) wie (A-C), statt Antikörper gegen hPrp3 wurden jedoch Antikörper gegen hPrp4 eingesetzt. (G-I) wie zuvor, jedoch mit affinitäts-gereinigtem Antikörper gegen das Protein p110. Die roten und grünen Fluoreszenzsignale wurden unabhängig voneinander aufgenommen und überlagert um die gezeigten Abbildungen zu erhalten. Die vergrößerten Bildausschnitte zeigen separate Bilder ausgewählter Cajal Bodies. (J-O) Zur Visualisierung der snRNAs wurden die Zellen mit Cy3-markierten Oligonukleotiden komplementär zu (J-L) U4 snRNA oder (M-O) U6 snRNA hybridisiert. Für die optimale Darstellung wurden Helligkeit und Kontrast der Aufnahmen angepasst (Abb. aus Schaffert, 2004).

Co-Immunfluoreszenzen der Proteine p110 und Coilin (Abbildung 29-G bis I) zeigten in hPrp31 oder hPrp6 depletierten Zellen ebenfalls eine Akkumulation von p110 in den Cajal Bodies. Jedoch war die damit einhergehende Abnahme der nukleoplasmatischen Färbung weniger stark ausgeprägt, als in der für hPrp4 und hPrp3 beschriebenen Situation.

Die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität der Proteine hPrp4, hPrp3 und p110 wurde in den Cajal Bodies und im restlichen Kern bestimmt. Die Messung erfolgte bei geringer Exposition, um Sättigungseffekte zu verhindern. Für jeden Faktor wurde das Verhältnis der Intensität in den Cajal Bodies zur Intensität im restlichen Kern berechnet (Daten nicht gezeigt). Die relative Intensität erhöhte sich um den Faktor 3 bis 5, wenn hPrp31 oder hPrp6 in HeLa Zellen depletiert wurde.

Im nächsten Schritt wurde die Verteilung von U4 und U6 snRNA im Kern durch FISH untersucht. Knockdown der Proteine hPrp31 oder hPrp6 führte zu einem drastischen Anstieg der U4 und U6 snRNA Mengen in den Cajal Bodies und zu einer Abnahme dieser RNAs in den Speckles (Abbildung 29-J bis L und M bis O). Die Zunahme der Signalintensität in den Cajal Bodies wurde wie zuvor beschrieben quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die relative Zunahme der U4 und U6 snRNA lag in der gleichen Größenordnung, wie dies auch für die Proteine hPrp4 und hPrp3 beobachtet wurde. Diese Ergebnisse sind deutliche Hinweise darauf, dass der Verlust der Proteine hPrp31 oder hPrp6 nicht nur zur Inhibition die tri-snRNP Bildung, sondern auch zu einer Akkumulation von U4 und U6 snRNAs und U4- und U6-spezifischer Proteine in den Cajal Bodies führt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass hPrp6 und hPrp31 eine essentielle Rolle in der Zelle spielen. Die Depletion eines der beiden Proteine führt zur Akkumulation des U4/U6 di-snRNPs in Cajal Bodies, was darauf hindeutet, dass die Bildung des U4/U6.U5 tri-snRNPs in diesen subnuklearen Strukturen stattfindet. Außerdem stützt dieser Befund die Vermutung, dass hPrp6 und hPrp31 im tri-snRNP gemeinsam eine Brückenfunktion ausüben.

4.2.6 RNAi-Experimente verdeutlichen die essentielle zelluläre Funktion einiger U11/U12-Proteine

Zu Beginn dieser Arbeit wurde in Studien, durchgeführt von Cindy Will (Will et al., 2004), die Proteinzusammensetzung von affinitätsgereinigten humanen 18S U11/U12 und 12S U11 snRNPs durch Massenspektroskopie (MALDI; Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation) bestimmt. Unter den gefundenen Proteinen konnten sieben neue U11/U12-Proteine identifiziert werden, die nicht Bestandteil des Hauptspleißosoms waren. Die von diesen Proteinen ausgeübten Funktionen waren unbekannt.

Funktionelle *in-vitro* Analysen der neu identifizierten U11/U12 Proteine mittels Depletion durch spezifische Antikörper ließen sich nur schwer durchführen. Aufgrund des sehr geringen zellulären Auftretens dieser Proteine waren diese nur schwer nachweisbar, und folglich konnte auch Depletionen nicht verifiziert werden.

In Zusammenarbeit mit Cindy Will wurden deshalb RNAi-Experimente in HeLa SS6 Zellen durchgeführt, um zu untersuchen, ob diese Proteine essentielle Funktionen ausüben (Will, 2004). Dazu wurden siRNA-Duplicates ausgewählt, die gegen den ORF oder die 3'-UTR der mRNAs der Gene 59K (PDCD7), 35K (U1SNRNPBP), 25K (C16orf33) und 20K (ZMAT5) gerichtet waren. Der Einfluss des Knockdowns mit diesen siRNAs auf das Zellwachstum wurde untersucht. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Duplicates, die das Zellwachstum am stärksten beeinflussten, dargestellt. Zum Zeitpunkt der Analyse konnte bei den meisten Zellen keine Apoptose nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Alle gegen U11/U12-Proteine eingesetzten siRNA-Duplicates führten zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums um ca. 60% bis 80% im Vergleich zu Kontroll-Zellen, die mit siRNAs gegen das Luziferase-Protein transfiziert wurden. Der Knockdown des essentiellen Spleißfaktors hPrp8 führte zu einer Reduktion des Zellwachstums um etwa 85%. Wegen des sehr geringen Vorkommens der U11/U12-Proteine konnte der Knockdown nicht auf Protein-Ebene mittels spezifischer Antikörper verifiziert werden. Deshalb wurde der Knockdown über die Abnahme der mRNA-Menge verifiziert. Zu diesem Zeitpunkt war die Echtzeit-RT-PCR in unserem Labor noch nicht etabliert. Darum erfolgte die Bestimmung der mRNA-Menge

mit quantitativer RT-PCR und nachfolgendem Southernblot. Als interne Ladekontrolle wurde die Histon 3B mRNA-Menge bestimmt.

welche nicht durch Knockdown der U11/U12-Proteine beeinflusst sein sollte. Für jedes Protein wurde zunächst der lineare Bereich der PCR-Amplifikation durch Änderung der PCR-Zyklen-Anzahl und der eingesetzten cDNA-Menge bestimmt. Die Menge der mRNAs die für die Proteine 59K, 35K, 25K und 20K kodieren war nach Normalisierung mit der Histon 3B mRNA-Menge in den Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen deutlich reduziert (Abbildung 30). Quantifizierung zeigte eine mRNA-Reduktion um 70% bis 85% in den verschiedenen mRNAs.

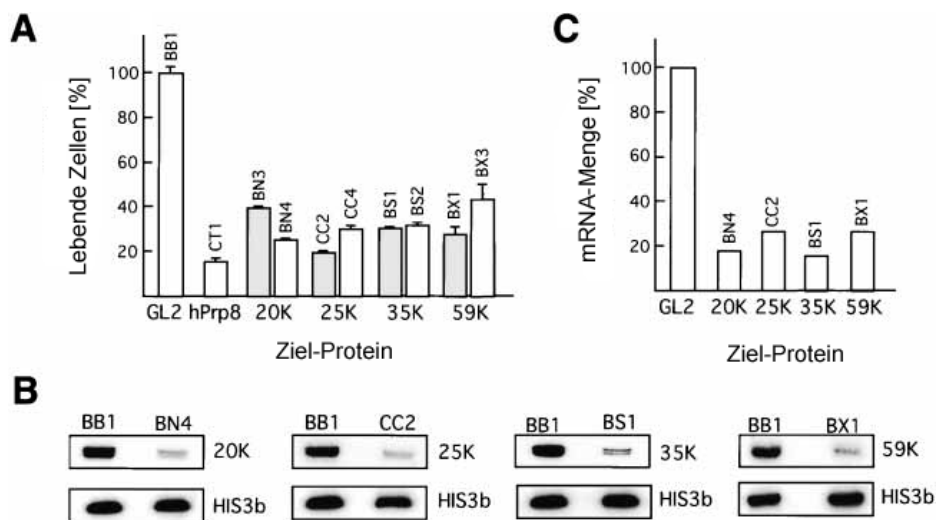


Abbildung 30. RNAi Knockdown Experimente bestätigen eine essentielle zelluläre Funktion der U11/U12-Proteine. (A) Die Zahl lebender Zellen wurde 72 Stunden nach Transfektion eines siRNA-Duplexes bestimmt und der Durchschnitt einer dreifachen Bestimmung als prozentualer Anteil des Kontroll Knockdowns (siRNA BB1, gegen GL2 Luziferase) dargestellt. Es sind die Ergebnisse von je zwei verschiedenen siRNA-Duplices für jedes U11/U12 Protein gezeigt. Als Positivkontrolle diente ein Knockdown mit einer siRNA gegen das hPrp8 Protein. (B) RT-PCR Analyse der 20K, 25K, 35K und 59K mRNA in Kontroll und Knockdown Zellen. Die RT-PCR wurde mit zellulärer Gesamt-RNA und spezifischen Primern durchgeführt. Die 73 bis 113 bp langen PCR-Produkte wurden mittels denaturierender PAGE aufgetrennt und durch Southern-Blotting visualisiert. (C) Die mRNA-Mengen nach RNAi Knockdown wurden mit einem Phosphoimager quantifiziert und sind als prozentualer Anteil der Kontrolle (siRNA gegen GL2 Luziferase) dargestellt (Abb. aus Will, 2004 verändert).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Proteine 59K, 35K, 25K und 20K übereinstimmend mit ihrer Funktion beim U12-abhängigen Spleißen eine essentielle Rolle in der Zelle spielen.

4.2.7 RNAi-Experimente in HeLa Zellen verdeutlichen essentielle zelluläre Funktionen von nukleolären U3 snoRNA-assoziierten Proteinen

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht klar, ob die snoRNP-Assemblierung und die snoRNP-Prozessierung durch einen großen Multi-Protein-Komplex, ähnlich dem Spleißosom, erfolgt, oder ob die snRNP-Biogenese durch eine Abfolge unabhängiger Schritte verläuft. Eine Anzahl von Proteinen, die bei der snoRNP Assemblierung und Biogenese möglicherweise eine Rolle spielen, waren bereits bekannt. Direkte Beweise für ihre funktionelle Beteiligung lagen aber nicht vor.

Nicolas Watkins konnte in unserem Labor nachweisen, dass unreife und reife U3 snoRNA im Nukleoplasma in großen Multi-Protein-Komplexen vorkommt (Watkins et al., 2004). Diese Komplexe enthielten die Haupt-C/D-Box-Proteine (15.5K, NOP56, NOP58, Fibrillarin) und weitere Faktoren, für die eine Beteiligung bei der RNA-Prozessierung (TGS1, La, LSm4, hRrp46), snoRNP Assemblierung (SMN, TIP48, TIP49, Nopp140) und RNA-Export/Lokalisierung (CRM1, PHAX) angenommen wurde. Weitere Untersuchungen lieferten Anhaltspunkte dafür, dass eine mit der nukleolären Lokalisierung verbundene Umstrukturierung des U3 snRNP die Bindung der Haupt-C/D-Box-Proteine stabilisiert.

In Zusammenarbeit mit Nicolas Watkins wurde die Bedeutung der U3 snoRNA-assoziierten Proteine bei der C/D-Box-snoRNP Akkumulation untersucht (Watkins et al., 2004). Dazu wurden siRNA-Duplicates zur spezifischen Depletion von Faktoren, die mit nukleoplasmatischen snRNP-Komplexen assoziiert sind, ausgewählt und HeLa SS6 Zellen damit transfiziert. Nach 60 Stunden wurde die Anzahl lebender Zellen bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen nicht apoptotisch (Daten nicht gezeigt). Jede siRNA, die gegen Faktoren der snoRNP-Biogenese oder die Haupt-snoRNP-Proteine gerichtet war, führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 31-A). Daraus lässt sich folgern, dass jedes dieser Proteine essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellwachstumsrate ist.

Western Blot Analysen der Knockdown-Zellen zeigten in allen Fällen eine signifikante Reduktion des Expressionsniveaus der Ziel-Proteine (Abbildung 31-B). Im Gegensatz dazu wurde die Menge an LSm8 Protein, welches als

Kontrolle diente, nicht beeinflusst. Dieser Befund bestätigte die Spezifität der siRNA vermittelten Depletion.

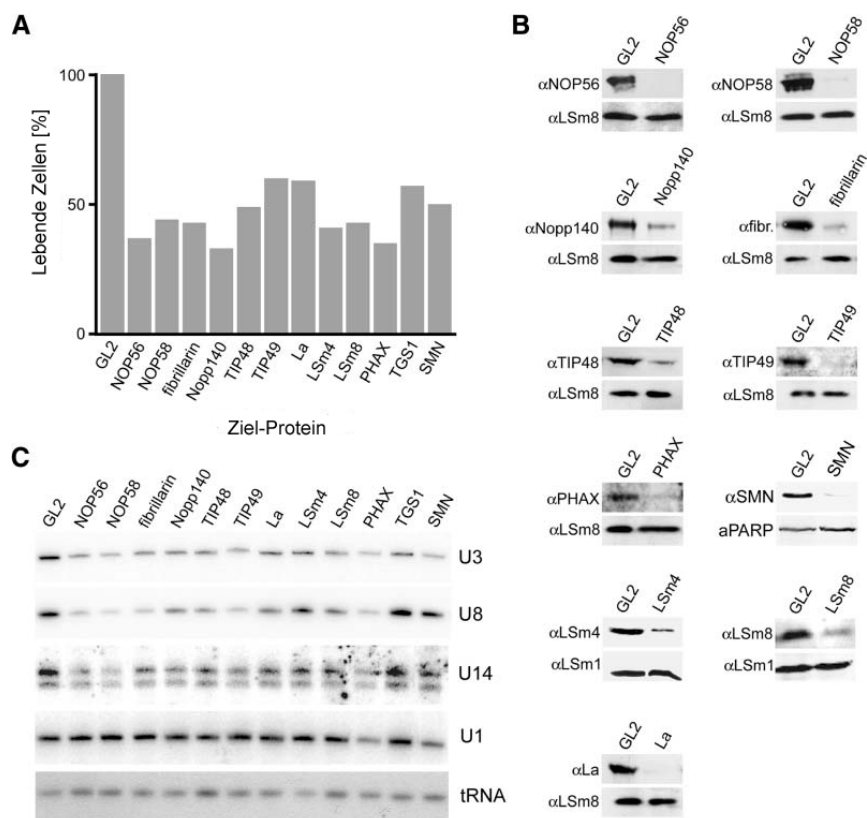


Abbildung 31. RNAi Knockdowns belegen essentielle Funktionen für nukleoplasmatische U3 snRNA assoziierte Proteine bei der C/D-Box-snoRNP Akkumulation in HeLa Zellen. (A) Die Anzahl lebender Zellen wurde 60 Stunden nach Transfektion der siRNA-Duplices bestimmt und als prozentualer Anteil der Kontroll-Zellen dargestellt (siRNA GL2 gegen Leuchtkäfer Luziferase). (B) Western Blot Analyse der Protein-Depletion. Die Ziel-Proteine sind jeweils über der entsprechenden Spur genannt. Die genutzten Antikörper sind links der Teilabbildungen beschrieben. In jede Spur wurde Protein aus der gleichen Anzahl von Zellen geladen. Als Kontrolle wurde siRNA gegen GL2 Luziferase eingesetzt. (C) Proteinbedarf für die C/D-Box-snoRNA Akkumulation. Gesamt-RNA wurde aus HeLa Zellen 60 Stunden nach der siRNA-Transfektion isoliert. Mittels Northern Blot Analyse wurden die relativen Mengen an U3, U8 und U14 C/D-Box-snoRNAs, U1 sRNA und tRNAArg bestimmt. Die eingesetzten spezifischen Sonden sind rechts jeder Tafel bezeichnet. Über jeder Spur sind die Ziel-Proteine genannt (Abb. aus Watkins, 2004 verändert).

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der siRNA vermittelten Depletion einzelner Proteine auf die snoRNA-Mengen in HeLa Zellen untersucht. 60 Stunden nach erfolgter siRNA-Transfektion wurden von der gleichen Anzahl Zellen die Gesamt-RNA isoliert und diese durch Hybridisierung mit spezifischen Northern Blot Sonden gegen C/D-Box-snoRNAs, snRNAs und tRNA analysiert.

Es sollte bestimmt werden, ob die Faktoren spezifisch für die U3 Biogenese sind, oder ob sie sowohl bei der Akkumulation der beiden Polymerase II transkribierten U3 und U8 snoRNA, als auch bei der Akkumulation der intron-kodierten U14 snoRNA beteiligt sind. Dazu wurden die Mengen an 5' trimethylierten U3, U8 und U14 snoRNAs untersucht. Übereinstimmend mit einer Beteiligung dieser Proteine bei der Biogenese beider C/D-Box-snoRNP-Typen, resultierte die Depletion der meisten Proteine in einer reduzierten Menge aller untersuchten C/D-Box-snoRNAs (Abbildung 31-C). Interessanterweise wurde im Vergleich zur U3 snoRNA für U8 und U14 snoRNA eine deutlich stärkere Abnahme beobachtet. Möglicherweise spiegelt dies die unterschiedlichen Halbwertszeiten der einzelnen snoRNPs wider. Der Verlust eines jeden Haupt-Proteins führte zu einer Reduktion der C/D-Box-snoRNA-Menge (Abbildung 31). Die Depletion war für NOP56, NOP58 und Fibrillarin in etwa gleich effizient. Dies erlaubt einen direkten Vergleich der relativen Bedeutung bei der snoRNA Akkumulation. Der stärkste Effekt wurde nach Knockdown des NOP58 Proteins beobachtet, ein Protein für das bereits zuvor in Hefe eine essentielle Rolle für die snoRNA Stabilität/Akkumulation gezeigt wurde (Lafontaine und Tollervey, 1999). Interessanterweise scheinen NOP56 und Fibrillarin für die U8 Akkumulation wichtiger zu sein als für U3 und U14. Auch die Depletion von TIP49 und PHAX resultierte in einer vergleichbaren Abnahme der C/D-Box-snoRNA-Mengen. Die Depletion anderer Proteine wie LSm4, LSm8, La, TIP48 und Nopp140 hatten einen geringeren Effekt auf die Menge von C/D-Box-snoRNAs. Der Verlust von SMN und - in einem geringeren Ausmaß - von TGS1 führte zu einer reduzierten Menge von U3, hatte aber keinen deutlichen Einfluss auf U8 und U14 snoRNAs. Das deutet darauf hin, dass diese Proteine nicht essentiell für die Biogenese aller snoRNAs zu sein scheinen. Mit Ausnahme der Proteine PHAX und SMN, die beide auch bei der snRNP Biogenese involviert sind, war kein anderer der untersuchten Faktoren essentiell für die Akkumulation der U1 snRNA, die als Kontrolle diente. Wichtig anzumerken ist, dass weder die Depletion von PHAX noch von SMN einen Einfluss auf die tRNA Menge hatte.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die beobachteten Effekte spezifisch sind, und dass die Mehrheit der untersuchten Proteine essentiell ist für die C/D-Box-snoRNA Akkumulation und die snoRNP-Biogenese in HeLa Zellen

5 DISKUSSION

5.1 siRNA-Design und siRNA-Synthese

5.1.1 siRNA-Selektions-Server

Der von mir in Rahmen dieser Arbeit mitentwickelte siRNA-Selektions-Server war eines der ersten frei verfügbaren Programme zur Vorhersage und Auswahl aktiver und spezifischer siRNAs. Basis der Auswahl aktiver siRNAs ist die Analyse des thermodynamischen Profils (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003) und die Duplex-Stabilität anhand des GC-Gehaltes (Chalk et al., 2004; Reynolds et al., 2004). Zusätzlich wird das Auftreten von SNPs (*single nucleotide polymorphism*) analysiert.

Der Einfluss des thermodynamischen Profils auf die Aktivität ist das am besten untersuchte Kriterium und wurde vielfach bestätigt. Die bioinformatische SNP Analyse wird in vielen siRNA-Selektions Programmen vernachlässigt, obwohl gezeigt wurde, dass eine einzige Fehlbasenpaarung die Effizienz einer siRNA deutlich reduzieren kann (Hickerson et al., 2007; Schwarz et al., 2006).

Andere Algorithmen beziehen die Duplex-Struktur (Köberle et al., 2006; Patzel et al., 2005), die Sekundärstruktur der Ziel-mRNA (Cullen, 2006a; Cullen, 2006b; Ding et al., 2004; Heale et al., 2005; Luo und Chang, 2004; Overhoff et al., 2005; Schubert et al., 2005; Yiu et al., 2005) und einige Sequenz-Charakteristika mit ein (siehe Einleitung, Abbildung 2). Dennoch ist kein derzeit bekannter Algorithmus perfekt. Nicht jede ausgewählte siRNA ist aktiv, und insbesondere hoch effektive siRNAs (mindestens 95% mRNA-Reduktion nach 48 Stunden) sind nicht vorherzusagen. Der Einsatz vieler Selektionskriterien erhöht sogar die Wahrscheinlichkeit sehr aktive siRNAs auszuschließen, die nur einem Teil der Kriterien genügen. Jedoch tragen alle Programme dazu bei, die ungewollte Auswahl von inaktiven siRNAs deutlich zu minimieren.

Der siRNA-Selektions-Server erlaubt dem Nutzer über das Textfeld „*custom pattern*“ auch komplexe Sequenz-Charakteristika durch die Verwendung von regulären Ausdrücken in die Selektion miteinzubeziehen.

Die Untersuchung der siRNA-Spezifität kann beim siRNA-Selektions-Server unter Verwendung zweier Algorithmen erfolgen.

Der NCBI BLASTn-Algorithmus (Altschul et al., 1990) ist sehr schnell, aber nicht sehr spezifisch, da er mit einer minimalen Wortgröße von sieben arbeitet. D.h., dass in einem Alignment der kürzeste perfekt gepaarte Abschnitt mindestens sieben Basenpaarungen umfassen muss. Demzufolge können bereits drei ungünstig verteilte Basenfehlpaarungen in einem 19mer Alignment dazu führen, dass BLAST keine Sequenzidentität findet. Viele potentielle Off-Targets werden deshalb durch BLASTn nicht identifiziert. Der siRNA-Selektion-Server bietet darum die Möglichkeit eine Spezifitätsanalyse mit WU-BLAST 2.0 (Lopez et al., 2003) durchzuführen. WU-BLAST arbeitet mit einer Wortgröße von eins und kann im Gegensatz zu BLASTn auch mehrere mögliche Regionen mit Ähnlichkeit zu einer siRNA-Sequenz innerhalb einer mRNA-Sequenz erkennen.

Ein Nachteil des siRNA-Selektions-Servers ist, dass keine gesonderte Analyse der Seed-Region Analoga von miRNAs zur Vermeidung von Off-Targets erfolgt (siehe Einleitung 2.1.5.1.1). Ein sehr konservativer Ansatz wäre in siRNA-Sequenzen keine Sequenzen bekannter miRNA Seed-Regionen zu erlauben. Die Datenbank experimentell nachgewiesener humaner miRNAs (miRNA-base, Version 10.1) am Sanger-Institut enthält ca. 520 spezifische Hexamer Seed-Regionen (Positionen 2-7 vom 5' Ende des Gegenginn-Stranges). Theoretisch könnten 4096 (4^6) Hexamer Seed-Regionen vorliegen. Etwas mehr als ein Achtel der möglichen Hexamere wurden folglich als miRNA-Seeds identifiziert. Damit würde ein Ausschluss der Seed-Region-Sequenzen zum Ausschluss von einem Achtel aller möglichen siRNAs führen.

Die Qualität der Spezifitätsanalyse hängt neben dem Algorithmus auch von der Qualität und der Vollständigkeit der verwendeten Datenbanken ab.

Aus diesem Grunde wurden drei Datenbanken eingesetzt: Neben dem konservativen Ansatz, allein die NCBI RefSeq Referenz Sequenz Datenbank zu durchsuchen, wurden auch die NCBI UniGene Datenbank und die automatisch annotierte Genom Datenbank EBI ENSEMBL herangezogen.

Neue Erkenntnisse, vor allem im Bereich der Vorhersage von echten miRNA Ziel-Regionen, werden dazu beitragen, die Spezifitätsanalyse dieses und anderer siRNA-Auswahl Programme zu verbessern und Off-Target-Effekte

auf ein Minimum reduzieren.

5.1.2 “Nur Leit-Strang siRNAs”

Wir konnten zeigen, dass siRNA-Duplices entworfen werden können, die keinen Passagier-Strang besitzen. Diese siRNA-Duplices bestehen aus zwei zur Ziel-mRNA vollkommen komplementären Strängen, die zueinander unvollkommen, aber ausreichend komplementär sind, um einen stabilen Duplex mit charakteristischen Überhängen an den 3' Enden zu bilden.

Die Effizienz des Silencing von “nur Leit-Strang siRNAs” ist vergleichbar jener von prototypischen Passagier/Leit siRNAs, obwohl “nur Leit-Strang siRNAs” eine signifikante Anzahl von nicht-Watson-Crick *Wobble*-Basenpaaren enthalten können. Bei den 25 bis 30 bp langen Vorläufermolekülen von microRNAs (miRNA) sind ebenfalls häufig fehlerhafte Basenpaarungen zu beobachten. miRNAs gelangen, ähnlich den siRNAs, über die Inkorporation eines reifen miRNA Stranges in den Argonaut-Komplex in die RNAi-Prozessierung (Hutvagner und Zamore, 2002; Liu et al., 2004; Matranga et al., 2005; Meister et al., 2004; Mourelatos et al., 2002). Die Verteilung und die Anzahl der Basenfehlpaarungen, einschließlich der *G-U-Wobbles*, in den miRNAs variiert zwischen 5 und 6. Diese Anzahl wurde als Schwellenwert für die Selektion von partiell komplementären oder palindromischen siRNA-Strängen verwendet.

siRNA-Duplices im Ganzen weisen eine zweifach symmetrische Struktur auf. Durch die Sequenz des Passagier- und des Leit-Stranges wird jedoch eine thermodynamische und kinetische Asymmetrie eingeführt, welche die Assoziierung verschiedener dsRNA bindender Proteine beeinflusst. Diese Unterschiede können bestimmen, welcher der beiden Stränge bevorzugt in RISC eingebaut wird. Zahlreiche Regeln wurden aufgestellt, um die Vorhersage von effektiven siRNA-Duplices zu verbessern (Khvorova et al., 2003; Reynolds et al., 2004; Schwarz et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass durch Einführen von Basenfehlpaarungen in den Passagier-Strang das Silencing ineffektiver siRNA-Duplices in einem gewissen Maße gesteigert werden kann. Partiiell palindromische siRNAs, die durch intermolekulares Annealing nur eines Leit-siRNA-Stranges gebildet werden, weisen eine punktsymmetrische Struktur

auf. Folglich integrieren beide Stränge mit der gleichen Wahrscheinlichkeit in den RISC. Aufgrund des Gleichgewichtes zwischen inter- und intramolekular gepaarter Strukturen ist es möglich, dass solche siRNAs (oder ein Teil solcher siRNAs) die reguläre Duplex-initiierte Assemblierung umgehen, und dass Leit-siRNAs als Einzelstrang direkt mit den Argonaut Proteinen interagieren. Die RISC-Assemblierung unter Nutzung eines Einzelstranges wurde bereits zuvor gezeigt. Es wurde außerdem zellbasiertes RNA-Silencing durch Leit-siRNAs gezeigt, für die die Bildung palindromischer Strukturen sehr unwahrscheinlich ist. Zellbasiertes RNA-Silencing durch siRNA-Einzelstränge ist jedoch meist weniger effektiv oder nicht nachweisbar (Harborth et al., 2003; Holen et al., 2003; Martinez et al., 2002).

Das Design von siRNA-Duplices, die aus zwei unterschiedlichen partiell komplementären Leit-Strängen bestehen, führt eine signifikante Asymmetrie ein. Da beide Stränge komplementär zur jeweiligen Ziel-mRNA sind, limitiert möglicherweise nur der am wenigsten potente Leit-Strang die Knockdown Effizienz. Die in dieser Studie verwendeten dualen "nur Leit-Strang siRNAs" gegen Lamin A/C waren in ihrer Effektivität entweder vergleichbar der effektivsten prototypischen siRNA, oder sie lagen zwischen den Aktivitäten beider prototypischen siRNAs. Folglich hat die gestörte Symmetrie in den partiell gepaarten siRNA Duplices keine Konsequenz. Somit stellen duale "nur Leit-Strang siRNAs" eine Alternative zu prototypischen auf den Asymmetrie-Regeln basierenden siRNAs dar. Wenn duale "nur Leit-Strang siRNAs" so ausgewählt werden, dass sie gegen zwei verschiedenen Gene gerichtet sind, dann kann die asymmetrische Assemblierung des RISC problematisch werden. Zwei von drei gegen Lamin A/C und Emerin gerichteten funktionellen Duplices zeigten solche Probleme. Zur Identifizierung effektiver siRNA-Duplices, die zwei Ziel-Gene gleichzeitig ausschalten können, wurde jedoch nur eine kleine Anzahl Duplices dieses Typs untersucht.

Duale "nur Leit-Strang siRNAs" könnten eine elegante Lösung für das Problem schnell auftretender Resistenzen bei siRNA-vermittelten antiviralen Ansätzen darstellen (Gitlin et al., 2002; Gitlin et al., 2005). Die Verabreichung von zwei gegen das Virus gerichteten siRNA-Strängen erfordert, dass zwei Mutationen gleichzeitig durch das Virus selektioniert werden müssten, um dem siRNA vermittelten Angriff zu entgehen.

Ein weiterer Vorzug von dualen "nur Leit-Strang siRNAs" ist, dass diese im Vergleich zu prototypischen siRNAs theoretisch spezifischer sind. Off-Target Aktivität in siRNA Silencing Experimenten basieren auf einer unerwünschten Silencing Aktivität des Passagier- und des Leit-Stranges aufgrund partieller Komplementarität zu nicht verwandten mRNAs (Birmingham et al., 2006; Jackson et al., 2003; Jackson et al., 2006; Jackson und Linsley, 2004). Bei den dualen "nur Leit-Strang siRNAs" fehlt ein nicht-zielkomplementärer Passagier-Strang. Damit sind mögliche Off-Target Aktivitäten allein mit den Leit-Strängen verbunden. Im Allgemeinen sind Off-Target Aktivitäten gering, und sie können nicht mehr nachgewiesen werden, wenn verschiedene prototypische siRNA-Duplices kombiniert werden, die jeder eine andere Off-Target-, jedoch die gleiche On-Target-Aktivität besitzen. Auf die gleiche Art könnten duale "nur Leit-Strang siRNAs", die mit beiden Leit-Strängen verbundenen Off-Target-Aktivitäten halbieren, während die On-Target-Aktivität erhalten bleibt.

Im Hinblick auf siRNAs als potentielle Therapeutika würde die Herstellung von partiell palindromischen siRNAs nur die Synthese eines RNA-Stranges erfordern und somit die Kosten für die Produktion im Großmaßstab deutlich reduzieren.

Der einzige Nachteil dieses neuen siRNA-Design-Ansatzes ist, dass nur eine begrenzte Anzahl von siRNA-Kandidaten identifiziert werden kann, die eine partielle Sequenz-Komplementarität der zur Ziel-mRNA komplementären Strängen aufweist. Des Weiteren wird dadurch auch die Auswahl von siRNAs begrenzt, die in mehreren Spezies kreuzreaktiv sind, oder die Auswahl hoch spezifischer siRNA-Duplices, welche eine möglichst geringe Sequenz-Komplementarität zu allen nicht-Ziel-mRNAs aufweisen.

5.1.3 Chemische Synthese von siRNAs und Pozeßmanagement

Für RNAi-Experimente in HeLa Zellen wurde eine größere Anzahl von siRNAs benötigt. Dazu wurden zwei verschiedene RNA-Synthesemethoden eingesetzt. Zum einem wurde auf einem EXPEDITE-Synthesizer die TBDMS-Methode genutzt und zum anderen die ACE-Methode auf einem von DharmaconResearch umgebauten ABI-394-Synthesizer angewendet.

Im direkten Vergleich der beiden Synthese-Methoden erwies sich die ACE-

Methode in unserem Labor bezüglich Zeitaufwand und Reinheit der Produkte als besser geeignet. Darum wurde nach einer Vergleichsphase ausschließlich die ACE-Methode verwendet. Diese Methode ermöglichte es in einem überschaubaren Zeitraum eine größere Anzahl von siRNAs herzustellen.

Die Reinheit der Produkte war bei der ACE-Methode ausreichend hoch, so dass auf zeitaufwendige Aufreinigungsschritte verzichtet werden konnte. Dagegen erforderte die Synthese nach der TBDMS-Methode eine zusätzliche Gelaufreinigung, die zeitintensiv war und außerdem mit Verlusten an Produkt einherging. Die Ausbeute bei der TBDMS-Methode lag um 70 nmol aus einer 1 μ molaren Synthese, während mit der ACE-Methode Ausbeuten von ca. 150 nmol aus einer 0,2 μ molaren Synthese erzielt werden konnten.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung der 2'ACE Schutzgruppe zum Schutz der 2'-Hydroxylgruppen liegt darin, dass die geschützten RNA-Oligos wasserlöslich sind, und so eine Aufbereitung in geschützter Form möglich ist. Die 2'-Hydroxylgruppen sind durch die 2'ACE Schutzgruppe fast vollständig gegen Hydrolyse und Nukleaseaktivität geschützt.

Jedoch weist die ACE-Methode gegenüber der TBDMS-Methode zwei Nachteile auf: Erstens mangelt es bei der ACE-Methode an kommerziell erhältlichen modifizierten Synthesebausteinen. Die für die TBDMS-Methode entwickelten Amidite und Festphasenträger unterschiedlicher Modifikationen sind unter den Synthesebedingungen der ACE-Methode nicht ausreichend stabil, und können somit nicht eingesetzt werden. Ein weiterer Nachteil der ACE-Methode liegt an fehlenden Kontrollmöglichkeiten der einzelnen Kopplungsschritte während des Syntheseprozesses. Bei der TBDMS-Methode kann aufgrund einer Farbreaktion durch Abspaltung der Schutzgruppe mit dem sogenannten Tritylmonitoring der Prozess kontrolliert werden. Im Gegensatz dazu können bei der ACE-Methode lediglich verstopfte Leitungen während der Synthese anhand einer reduzierten Flussrate nachgewiesen werden. Andere aufgetretene Störungen, z.B. durch fehlerhafte Reagenzien, werden erst durch die postsynthetische Qualitätskontrolle sichtbar.

Der Syntheseprozess der RNA-Oligonukleotide wurde durch Perl-Skripte und eine Datenbank unterstützt. Der Einsatz der Perl-Skripte beschleunigte und erleichterte die Sequenzaufbereitung. Des Weiteren wurde eine Anzahl von Schritten automatisiert, die bei manueller Durchführung sehr fehleranfällig

sind.

Es wurde eine FileMaker-Datenbank aufgebaut, die die Schritte der Synthese und der Aufbereitung der RNA-Oligonukleotide verfolgt, und die Sequenzen verwaltet. Die Datenbank vergab automatisch eindeutige Identifikationsnummern für jedes RNA-Oligonukleotid. Dies war insbesondere bei Re-Synthesen bedeutsam und erleichterte das Auffinden zusammengehöriger Sequenzen für die Hybridisierung. Die Hybridisierung wurde ebenfalls durch automatische Kalkulation der benötigten Reagenz Volumina vereinfacht.

Insgesamt ermöglichte erst die Einführung der ACE-Methode in Verbindung mit dem teilautomatisierten Prozessmanagement die Herstellung einer größeren Anzahl von siRNA-Duplicates in einem überschaubaren Zeitraum.

5.2 siRNA-Validierung und funktionelle Genanalyse mittels RNA-Interferenz

5.2.1 Identifizierung essentieller RNA-prozessierender Faktoren in HeLa S6 Zellen

Zwei Ziele wurden mit dem Screen von siRNAs im Zellproliferationsassay verfolgt. Erstens, wurde eine initiale Validierung der siRNA-Bibliothek durchgeführt, ohne aufwendigere Techniken zum Nachweis der Reduktion von Ziel-mRNA oder Ziel-Protein einzusetzen. Zweitens, konnten erste Hinweise zur Bedeutung einiger Ziel-Proteine für Zellproliferation und Vitalität der Zellen gewonnen werden.

Die siRNA-Transfektionen gegen RNA-prozessierende Faktoren führte bei mehr als einem Drittel (39%) der untersuchten Faktoren 72 Stunden nach der Transfektion zu einer stark bis sehr stark reduzierten Zellzahl. Bei etwa einem weiteren Drittel (32%) wurde eine mittelstark verminderte Zellzahl beobachtet und bei 29% der Ziel-Faktoren führte die siRNA-Transfektion zu einer schwachen oder keiner Reduktion der Zellzahl.

Die Reduktion der Zellzahl kann verschiedene Ursachen haben: inhibierte oder verlangsamte Zellteilung, oder apoptotischer Zelltod. Diese Phänotypen können als indirekte Folge von RNAi vermittelten Defekten des Prä-mRNA Spleißens auftreten. So könnte die Depletion von Spleißfaktoren zu einer

gestörten Prä-mRNA Prozessierung von Genen führen, die essentiell für den Zellteilungsprozess sind. Diese Störung könnte schließlich zur Depletion der entsprechenden Proteine führen. Die beobachtete Zellzahl-Reduktion wäre somit ein Sekundäreffekt. Andererseits könnten Spleißfaktoren auch eine direkte Rolle bei der Zellteilung und in anderen Prozessen spielen. In einem siRNA-Screening in HeLa Zellen wurden 37 Gene identifiziert, die essentiell für die Zellteilung sind (Kittler et al., 2004). Darunter waren die acht spleißosomalen Faktoren U1-A (SNRPA1), B (SNRPB), SKIP (SNW1), hPRP22 (DHX8), p68 (DDX5), LSM6 und MFAP1. Beim MFAP1 handelt sich um eine Komponente der extrazellulären Matrix der Elastin-assoziierten Mikrofibrillen. In der Studie von Kittler zeigte der Knockdown von MFAP1 den gleichen Zellteilungs-Phänotyp, wie er auch bei den anderen sieben Spleißfaktoren zu beobachten war. Ob auch diese Faktoren eine direkte Rolle bei der Zellteilung spielen, bedarf noch einer weiteren Untersuchung.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, reduziert nicht jede siRNA die Ziel-mRNA im selben Ausmaß. Dies erklärt, warum der Einsatz verschiedener siRNAs gegen die gleiche mRNA-Sequenz mit sehr unterschiedlichen Wachstums-Phänotypen verbunden sein kann. Führen verschiedene siRNAs gegen die gleiche Ziel-mRNA zu einem stark reduzierten Zellwachstum, dann ist dies ein deutlicher Hinweis auf einen spezifischen Knockdown.

Treten unterschiedliche Wachstums-Phänotypen auf, können jedoch auch Off-Target-Effekte die Ursache für eine Zellzahl-Reduktion sein. Off-Target-Effekte können durch eine hohe Ähnlichkeit der siRNA-Sequenz (Kreuzreaktivität) zu einer nicht Ziel-mRNA hervorgerufen werden, oder auch durch Sequenzidentität einer siRNA Seed-Region mit Sequenzabschnitten in der 3'UTR von nicht Ziel-mRNAs.

Neben diesen beiden Möglichkeiten wurde eine weitere mögliche Ursache für Off-Target-Effekte identifiziert, die sich auf die Vitalität der Zellen auswirkt. Vermutlich können bestimmte kurze Motive in siRNA-Sequenzen zytotoxisch wirken (Fedorov et al., 2006). In einer Untersuchung von 300 siRNAs gegen nicht-essentielle Gene wurden bei etwa einem Drittel der transfizierten Zellen unspezifische Effekte festgestellt, die unabhängig vom eigentlichen Ziel der siRNA auftraten und zu einer reduzierten Zellzahl führten. Als eine mögliche Ursache wurde das Sequenz-Motiv UGGC identifiziert, das in etwa

einem Drittel der toxischen siRNAs im Leit-Strang enthalten war (Fedorov et al., 2006).

Durch die in dieser Arbeit vorangestellte bioinformatische Spezifitätsanalyse mit dem siRNA-Selektions-Server wurde die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Off-Target-Effekten aufgrund hoher Sequenzähnlichkeit minimiert. Sowohl die Seed-Region-Sequenz, als auch zytotoxische Sequenzmotive wurden bei der Auswahl der siRNAs jedoch nicht berücksichtigt.

162 siRNAs führten in den Untersuchungen lediglich zu einer schwachen oder zu keiner Wachstumsreduktion. Dies könnte auf mangelnde Effizienz der siRNAs, aber auch auf eine nicht-essentielle Funktion der depletierten Faktoren hinweisen.

Der Anteil von siRNA-Transfektionen, die nur einen schwachen oder keinen Einfluss auf das Zellwachstum zeigten, war besonders hoch bei den gegen nicht-snRNP Proteine, der sogenannten A/B Gruppe, gerichteten siRNAs (siehe Tabelle 13B u. 13C). Hier führten 75% der 24 siRNAs zu keinem oder nur einem schwachen Effekt. Und keine einzige der siRNA-Transfektionen resultierte in einer starken oder sehr starken Reduktion der Zellzahl.

Ein anderes Bild bot die Gruppe der U5 Proteine. Mindestens je eine siRNA pro Faktor führte zu einem starken bis sehr starken Wachstumphänotyp (siehe Tabelle 13A). Ausnahmen bildeten lediglich die Proteine 100K und 40K, die keinen bzw. einen mittleren Wachstumsdefekt hervorriefen. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass in dieser Gruppe bis zu 10 siRNAs pro Ziel-mRNA untersucht wurden, was die Wahrscheinlichkeit effiziente siRNAs zu identifizieren erhöhte.

In drei weiteren Gruppen konnten deutliche Wachstumphänotypen beobachtet werden (Tabelle 13A). Bei den B/B* Proteinen führten 42% (von 19 siRNAs) der Knockdowns zu starker oder sehr starker Reduktion Zellzahl. Bei der Gruppe der C Proteine führten 30% (von 30 siRNAs) und bei Proteinen der EJC/miRNP Gruppe um Pinin 50% der 10 untersuchten siRNAs zu einer stark reduzierten Zellzahl.

Die Ergebnisse bestätigten die Notwendigkeit, mehrere siRNAs zu untersuchen, die gegen eine Ziel-mRNA gerichtet sind, um die Spezifität der siRNA und des funktionellen Phänotyps zu verifizieren.

5.2.2 Bestimmung effektiver siRNAs gegen Faktoren des Prp19-CDC5-Komplexes und damit verwandter Proteine

Die Analyse der Ziel-mRNA-Menge mittels quantitativer RT-PCR 24 und/oder 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion bestätigte, dass es notwendig ist, mehrere gegen eine Ziel-mRNA gerichtete siRNAs untersuchen, um effektive siRNAs zu identifizieren. Wegen der Schlüsselrolle des Prp19-CDC5-Komplexes bei der Aktivierung des Spleißosoms wurde die mRNA-Reduktion nach Transfektion von siRNAs gegen Faktoren dieses Komplexes untersucht.

Alle fünf siRNAs gegen die mRNAs der Gene PLRG1, HSPC148, CRNKL1 und PPIL1, reduzierten die Ziel-mRNA um mehr als 80% und hatten zuvor im Zellproliferationsexperiment zu einer stark reduzierten Zellzahl geführt.

Uneinheitlich ist das Ergebnis für die beiden CDC5L siRNAs. Während mit beiden siRNAs ebenfalls eine in etwa gleich starke Ziel-mRNA-Reduktion um mehr als 80% erreicht wurde, zeigte eine siRNA (KK1) einen starken Wachstumsphänotyp, die zweite siRNA aber nur einen Effekt mittleren Grades. In diesem Fall ist es denkbar, dass die stark reduzierte Zellzahl durch einen Off-Target-Effekt hervorgerufen sein könnte.

Für die Mehrzahl der untersuchten Gene wurde ebenfalls eine RNAi vermittelte Ziel-mRNA-Reduktion um 80% beobachtet, die jedoch nur zu einem mittleren bis schwachen Wachstumsphänotyp führte.

Für diese Gruppe könnten folgende Punkte zutreffen: Eine Verminderung der Protein-Menge verlangsamt die Zellteilung direkt oder indirekt. Der Knockdown ist jedoch nicht effizient genug, so dass die vorhandene Protein-Menge aufgrund einer langen Halbwertszeit noch für die Aufrechterhaltung der zellulären Grundfunktionen ausreicht.

Es ist auch denkbar, dass andere Proteine einen effizienten Knockdown funktionell kompensieren können. Dies könnte für das Protein PRCC zutreffen. Zwei siRNAs gegen PRCC führten trotz starker mRNA-Reduktion zu keiner Beeinflussung der Zellzahl. Eine andere Erklärung ist, dass dieses Protein keine essentielle zelluläre Funktion ausübt, so dass nach Depletion des Proteins weder ein indirekter noch ein direkter Einfluss auf die Zellzahl erwartet werden kann.

5.2.3 Subzelluläre Lokalisierung von Indikatoren für Spleißdefekte nach siRNA vermitteltem Knockdown von Faktoren des Prp19/CDC5-Protein Komplexes und damit verwandter Proteine

Die Umverteilung der zellulären Marker SC35, poly(A)⁺-mRNA U2, U4 und U5 snRNA wurde nach Knockdown einzelner Faktoren des Prp19-CDC5 Komplexes und verwandter Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Die parallele Analyse mehrerer für die Inhibition des Prä-mRNA Spleißens typischer Phänotypen wurde unter der Annahme durchgeführt, dass diese ein deutliches Gesamtbild ergeben könnten, das erste Hinweise auf Spleißdefekte gibt.

Die Analyse der Verteilung zellulärer Marker mittels indirekter Immunfluoreszenz ergab jedoch ein heterogenes Bild. Die mit qRT-PCR bestimmte Effizienz eines siRNA vermittelten Knockdowns spiegelte sich nicht in jedem Fall in einem deutlichen von der GL2 Kontrolle abweichenden Phänotyp wieder.

Die Akkumulation des SC35 Proteins in abgerundeten Speckles wurde nur nach Knockdown von PPIL1 und Npw38 in deutlicher Ausprägung beobachtet. Npw38BP wurde als positiver Regulator des Prä-mRNA Spleißens in HEK293 Zellen identifiziert und interagiert mit der WW Domäne von Npw38 (Komuro et al., 1999; Llorian et al., 2004; Llorian et al., 2005). Der Knockdown beider Proteine führte jedoch zu einer völlig unterschiedlichen Lokalisierung der zellulären Marker. Die Depletion von Npw38 resultierte in einer Umverteilung aller untersuchten Marker im Vergleich zu GL2 siRNA transfizierten Kontroll-Zellen. Dies wurde sonst nur beim CDC5L und CRNKL1 (siRNA JX1) Knockdown beobachtet.

Immunodepletion von CDC5L alleine (Ajuh et al., 2000) oder von CDC5L gemeinsam mit AD-002 (HSPC148) inhibiert in HeLa Kernextrakt Prä-mRNA Spleißen *in-vitro* (Makarova et al., 2004). Deshalb wurde eine Akkumulation von SC35 in abgerundeten Speckles erwartet. Die Depletion der beiden Komponenten des Prp19-CDC5-Komplexes, CDC5L und AD-002, führte jedoch zur Reduktion bzw. Akkumulation in flächig ausgebildeten Speckles. Diese Phänotypen sind bislang nicht beschrieben.

Es wurden zwei verschiedene siRNAs gegen PRCC eingesetzt. Beide

siRNAs reduzieren die PRCC mRNA nach 24 Stunden um mehr als 80%. Während siRNA q147-2 zu keiner Veränderung der Verteilung der untersuchten zellulären Marker führte, führte der Knockdown mit siRNA q147-1 zu einer Akkumulation von U2 und U4 snRNA in den Cajal Bodies. Ob es sich dabei um einen spezifischen Phänotyp für einen PRCC Knockdown handelt, könnte durch den Einsatz von mehr als zwei verschiedenen siRNAs pro Ziel-mRNA überprüft werden. Auch Zeitreihen mit verlängerten siRNA Inkubationszeiten könnten bei heterogenen Phänotypen Aufschluß geben.

Bei den Proteinen CRNKL1 und PPIL1 führte jeweils eine siRNA zu einer mRNA-Reduktion um mehr als 80% während mit jeweils einer zweiten siRNA nur eine 50 bzw. 60%ige mRNA-Reduktion erreicht wurde. Dies stimmt mit den beobachteten Veränderungen der zellulären Marker überein. Während der Knockdown mit effektiven siRNAs deutliche Umverteilungen der Marker hervorrief, führten der Knockdown mit weniger effektiven siRNAs zu keinen oder undeutlich ausgeprägten Veränderungen der Lokalisierung zellulärer Marker.

Auffällig an den Ergebnissen ist die große Heterogenität der Phänotypen, die nach siRNA vermittelter Depletion von Proteinen zu beobachten sind, die vermutlich zu einer strukturellen Einheit gehören. Dies könnte einerseits von der unterschiedlichen Bedeutung und Funktion der Proteine innerhalb des Subkomplexes herrühren, wobei manche Proteine eine bedeutendere Rolle zur Funktion des gesamten Subkomplexes beitragen als andere. Andererseits kann die Effizienz des Knockdowns und die verbleibende Proteinmenge zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen führen. Dadurch ist es schwierig - zumindest anhand der in dieser Arbeit ausgewählten zellulären Marker - Rückschlüsse auf Gruppen kooperativer Proteine zu ziehen.

Es ist nicht auszuschließen, dass durch Analyse einer größeren Anzahl spleißosomaler Faktoren Gruppen von Proteinen identifiziert werden können, die nach Depletion die gleichen Veränderungen zellulärer Marker aufweisen. Auch nicht-offensichtliche Veränderungen könnten durch den Einsatz von Bildanalyse-Software, die eine quantitative Auswertung und Aussagen zur statistischen Signifikanz der beobachteten Veränderungen ermöglicht, offengelegt werden. Zusammenfassend ergibt sich aus den Untersuchungen, dass zum Nachweis von in lebenden Zellen induzierten Spleißdefekten ein

direkter Nachweis der Inhibition des Prä-mRNA Spleißens unumgänglich ist.

5.3 RNAi vermittelter Knockdown von hPrp31 (PRPF31) führt zu einer Akkumulation des U4/U6 di-snRNPs in den Cajal Bodies

In dieser Arbeit wurde erstmals in lebenden Zellen gezeigt, dass das U4/U6 Protein hPrp31 essentiell ist für die Interaktion des U4/U6 di-snRNPs mit dem 20S U5 snRNP. Dieses Ergebnis stimmt mit zuvor im zellfreien System durchgeführten Studien überein (Makarova et al., 2002). Eine ähnliche Eigenschaft kann aufgrund der Ergebnisse nun auch dem U5 Protein hPrp6 zugeschrieben werden.

Von Zwei-Hybrid Analysen ist bekannt, dass hPrp31 und hPrp6 stark und spezifisch aneinander binden (Liu et al., 2006; Makarova et al., 2002). Es wird angenommen, dass U4/U6 und U5 snRNPs über eine molekulare Brücke verbunden werden, die mindestens von diesen beiden Proteinen gebildet wird. In Hefe führt die Depletion des hPrp6 homologen Proteins Prp6p zur Inhibition der tri-snRNP Bildung, und zur Akkumulation der U4/U6 di-snRNPs und von U5 snRNP Mono-Partikel (Galisson und Legrain, 1993). Unsere Ergebnisse zum RNAi Knockdown von hPrp6 stimmen mit diesen Beobachtungen überein.

Nina Schaffert (Schaffert et al., 2004) konnte durch Kombination von RNAi und biochemischen Methoden ebenfalls demonstrieren, dass nach Knockdown von hPrp31 und hPrp6 in HeLa Zellen die tri-snRNP Bildung inhibiert ist und stabile U5 Mono-snRNPs und U4/U6 di-snRNPs akkumulieren, welche die U4/U6 Proteine und den U4/U6 Recycling Faktor p110 enthalten. Folglich stellen hPrp31 und hPrp6 *in vivo* eine essentielle Verbindung zwischen dem U4/U6 und dem U5 snRNP her.

Eine zentrale Beobachtung dieser Arbeit war, dass unter hPrp31 und hPrp6 Knockdown Bedingungen, welche die tri-snRNP Bildung inhibierten, die beiden U4/U6-spezifischen Proteine hPrp4 und hPrp3 (durch spezifische Antikörper nachgewiesen) und U4 und U6 snRNAs (durch FISH nachgewiesen) in den Cajal Bodies akkumulierten.

Im Gegensatz dazu konnte Nina Schaffert zeigen, dass die U5 snRNPs nach Inhibition des tri-snRNPs nicht in den Cajal Bodies akkumulierten. Das U5

snRNP Speckle Muster ist jedoch etwas gröber, als jenes, das nach Inhibition des Spleißens für den nicht-snRNP Spleißfaktor SC35 beschrieben wurde (O'Keefe et al., 1994). Auch die Depletion von hPrp31 und hPrp6 führte zu einem gröberem Speckle Muster der U1 und U2 snRNA Verteilung. Dies deutet darauf hin, dass Spleißen in HeLa Zellen inhibiert ist, wenn die tri-snRNP Bildung blockiert wurde.

Die Unterschied in der selektiven Akkumulation des U4/U6 di-snRNPs in den Cajal Bodies gegenüber den unveränderten Verteilung der U5 snRNPs lässt sich noch nicht vollständig erklären. Es ist jedoch anzunehmen, dass der Faktor p110 bei der U4/U6 snRNP Akkumulation eine wichtige Rolle spielt. Eine signifikante Menge des Proteins ist in Cajal Bodies lokalisiert (Stanek et al., 2003). Diese Akkumulation erfolgt aufgrund einer sogenannten HAT Domäne am N-Terminus von p110 (Stanek et al., 2003). Das Protein p110 wird für die di-snRNP Bildung benötigt und bindet sowohl an den U6 (mono) snRNP als auch an den U4/U6 di-snRNP, ist jedoch nicht Bestandteil des U4/U6.U5 tri-snRNP (Bell et al., 2002).

Die durch RNAi erzielten Ergebnisse deuten auf eine Schlüsselrolle der Cajal Bodies in den letzten Schritten bzw. beim letzten Schritt der tri-snRNP Biogenese hin, bevor dieser in das Spleißosom integriert. Und die gezeigten Daten unterstützen die Idee einer grundsätzlichen Rolle der Cajal Bodies bei der Assemblierung und Reifung von snRNPs. Stanek (Stanek et al., 2008) konnte durch siRNA vermittelte Depletion der Proteine hPrp22 und hNtr1, die eine Rolle bei der Deassemblierung des Spleißosoms spielen, eine Akkumulation von U4/U6 di-snRNP in Cajal Bodies nachweisen. Dies deutet auf eine gehemmte Reassemblierung des U4/U6.U5 tri-snRNP und auf eine Schlüsselrolle der Cajal Bodies hin. Aufgrund mathematische Modelle wurde außerdem postuliert, dass Cajal Bodies durch Bereitstellung einer lokalen Umgebung erhöhter snRNP Konzentration die U4/U6 di-snRNP Assemblierung um eine Größenordnung verstärken (Klingauf et al., 2006).

Die Möglichkeit hPrp31 und andere tri-snRNP Proteine mittels RNAi zu depletieren ist ein erster Schritt zur molekularen Analyse ihrer Funktion in lebenden Zellen. In weiteren Schritten könnten die Effekte von Mutationen in hPrp31 auf die tri-snRNP Bildung und die subzelluläre Lokalisation untersucht werden. Dies könnte durch Kopplung der hPrp31 Depletion mit einer

simultaner Expression von mutanten hPrp31 Formen durch Transfektion der entsprechenden cDNAs erreicht werden.

5.4 RNAi-Experimente verdeutlichen die essentielle zelluläre Funktion einiger U11/U12-Proteine

MS Analysen gereinigter U11 und U12 snRNPs zeigten, dass dem humanen U11/U12 snRNP einerseits alle U1-spezifischen Proteine fehlen, dieser andererseits aber sieben Proteine enthält, die nicht im majoren Spleißosom vorkommen. Cindy Will (Will et al., 2004) hat in Ihrer Studie gezeigt, dass eine Anzahl von Proteinen dem minoren und dem majoren Spleißosom nicht gemein sind. Dies deutet auf spezifische molekulare Interaktionen hin, die im U12-Typ Prä-Spleißosom die Erkennung der 5' Spleißstellen und das Überbrücken von Introns vermitteln. Durch siRNA-Transfektion in HeLa-Zellen wurden die mRNAs der Faktoren 20K, 25K, 35K und 59K um mehr als 70% reduziert. RNAi-vermittelte Knockdowns zeigten, übereinstimmend mit einer bedeutenden Funktion beim U12-Typ Spleißen, dass die neuen U11/U12 Proteine 20K, 25K, 35K, 59K offenbar essentielle Faktoren in lebenden Zellen darstellen.

Kürzlich wurde das U11/U12 Protein 48K funktionell charakterisiert (Turunen et al., 2008). Die Studie zeigte, dass dieses Protein ebenfalls eine essentielle zelluläre Funktion besitzt. Die siRNA vermittelte Depletion des 48K Proteins führte 96 Stunden nach der siRNA-Transfektion zu einer um 70% reduzierten Zellzahl und 72 Stunden nach Transfektion konnte eine Inhibition des U12-abhängigen Spleißens nachgewiesen werden. Des Weiteren führte die 48K Depletion zu reduzierten U11/U12 di-snRNP Mengen, was auf eine Funktion bei der Stabilisierung und/oder Bildung dieses Komplexes hindeutet. 48K interagiert sowohl mit der 5' Spleißstelle, als auch mit dem 59K Protein. Die Interaktion mit der 5'-Spleißstelle erfolgt dabei schon während den ersten Schritten der Intron-Erkennung, entweder zusammen mit oder kurz nach dem U11 snRNA bindet.

Auch für das U11/12-65K Protein wurde ein Interaktion mit dem 59K Protein gezeigt (Benecke et al., 2005). 65K bindet zusätzlich noch direkt an U12 snRNA. Benecke konnte belegen, dass im minoren Spleißosom 59K und 65K als integrale Proteine des U11/U12 di-snRNP U11 und U12 verbinden. Direkte

Interaktionen des 48K mit den integralen Komponenten 65K und 20K konnte nicht nachgewiesen werden (Turunen et al., 2008), was eine Lokalisierung des 48K im Bereich zwischen den U11 und U12 Komponenten des di-snRNPs unwahrscheinlich macht.

Das U11/U12-20K hat einige Ähnlichkeit zum U1-C und könnte somit bei der Erkennung von U12-typ 5'-Spleißstellen eine Rolle spielen (Will et al., 2004).

Die Bildung und Stabilität des minoren Spleißosoms hängt vom Zusammenspiel verschiedener Sequenz-spezifischer Interaktionen mit der 5'-Spleißstelle und dem Verzweigungspunkt ab. Dieses schließt eine Basenpaarung von U11 mit der 5'-Spleißstelle, eine Interaktion des 48K Proteins mit der 5'-Spleißstelle, und die Basenpaarung von U12 mit der Verzweigungsstelle mit ein. Welche Rolle die Proteine 25K, 35K bei Bildung und Stabilität des minoren Spleißosoms spielen, und ob 59K neben der U11-U12 Brückenfunktion noch auf andere Art dazu beiträgt, bleiben Fragen, die weitergehende Untersuchungen benötigen.

5.5 RNAi-Experimente in HeLa Zellen verdeutlichen essentielle zelluläre Funktionen von nukleolären U3 snoRNA-assoziierten Proteinen

Watkins (Watkins et al., 2004) untersuchte die frühen Phasen der snoRNP Biogenese durch Charakterisierung der Prä-snoRNP-Komplexe aus Kernextrakten. Die Analysen erfolgten unter der Annahme, dass das lösliche nukleoplasmatische Material durch Kernextrakt repräsentiert wird. Auf dieser Basis konnte gezeigt werden, dass die im Kernextrakt vorliegenden U3 snoRNPs deutlich größer sind als die reifen nukleolären Komplexe. Diese Komplexe enthielten, neben den Haupt C/D-Box Proteinen und dem U3-spezifischen hU3-55K, eine Anzahl nukleoplasmatischer Proteine der RNA-Prozessierung (TGS1, La, LSm4, hRrp46), putative Assemblierungsfaktoren (SMN, TIP48, TIP49, Nopp140), und RNA-Export-/Lokalisations-Faktoren (CRM1, PHAX). Alle diese Proteine kommen nicht im reifen nukleolären U3-snRNP vor. Dies lässt vermuten, dass die snoRNP Assemblierung, ähnlich jener des Spleißosoms, durch einen großen Multiproteinkomplex erfolgt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch RNAi die meisten der genannten

Proteine spezifisch depletiert. Die Knockdowns führten in allen Fällen zu einer deutlichen Reduktion des Zellwachstums. Jedes der untersuchten Proteine ist somit bedeutsam für die Aufrechterhaltung der Zellproliferation.

Des Weiteren konnte durch siRNA vermittelte Depletion nachgewiesen werden, dass die meisten dieser Proteine in HeLa Zellen essentiell sind für die Beibehaltung physiologischer C/D-Box snoRNA-Mengen. Damit wurde die Rolle dieser Proteine bei der snoRNP Biogenese in höheren Eukaryonten erstmals direkt funktionell untersucht. Auf Grundlage der deutlichen Hinweise, dass diese Proteine essentiell für die Akkumulation der U3, U8 und U14 snoRNAs sind, schlussfolgern wir, dass viele dieser Proteine gemeinsame C/D-Box Biogenese Faktoren sind.

Der nukleare Exportfaktor PHAX ist ausschließlich mit der U3 Prä-snoRNA stabil assoziiert, während CRM1 sowohl an die Prä-U3 snoRNA, als auch an die reife U3 snoRNA stabil gebunden vorliegt (Watkins et al., 2004). Beide Faktoren sind für unterschiedliche Lokalisierungen neu synthetisierter U3 snoRNAs essentiell. Während PHAX1 für die Lokalisierung in den Cajal Bodies (CB) benötigt wird, ist CRM1 für die nukleoläre Lokalisierung unabdingbar (Boulon et al., 2004). Die beiden in Zusammensetzung und Lokalisierung unterschiedlichen U3 snoRNP Populationen könnten folgendes Szenario repräsentieren: Zum einen den PHAX assoziierten Komplex mit U3 Prä-snoRNA auf dem Weg zum CB oder aus dem CB heraus. Und zum anderen einen intermediären Komplex mit reifer U3 snoRNA und gebundenem CRM1, der den CB verlassen hat und sich auf dem Weg zum Nukleolus befindet. Durch siRNA vermittelte Depletion konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PHAX essentiell für die snoRNA Akkumulation ist. Dies verdeutlicht die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen PHAX und dem Prä-snoRNP.

Watkins (Watkins et al., 2004) konnte zeigen, dass neben PHAX auch die Proteine TIP48, La, LSm4 und hRrp46 exklusiv mit der U3 Prä-snoRNA assoziiert sind. Diese Proteine sind bei der 3' Reifung kleiner RNAs involviert (Perumal und Reddy, 2002). Sowohl La als auch LSm Proteine erkennen U-reiche Sequenzen am 3'-Ende von Transkripten und beide Proteine können an die U-reiche 3' Extension der U3 Prä-snoRNA binden (Achsel et al., 1999; Wolin und Cedervall, 2002). Dass LSm4, aber nicht LSm1, an den nukleoplasmatischen U3 snoRNP Komplex bindet, deutet darauf hin, dass der LSm2 bis LSm8 Komplex

mit der snoRNA assoziiert ist. Durch siRNA vermittelte Depletion von LSM8 konnte die essentielle Bedeutung von LSM8 für die U3 snoRNA Akkumulation gezeigt werden. Diese Beobachtung unterstützt die Vorstellung der Beteiligung mehrerer LSM Proteine bei snoRNP Biogenese.

Zusammengefasst deuten die Daten dieser Arbeit und aus (Watkins et al., 2004) darauf hin, dass der mit der U3 Vorläufer RNA assoziierte Multiprotein-Komplex sowohl die Assemblierung des snoRNP Komplexes, als auch die Prozessierung der Prä-snoRNA vermittelt und koordiniert. Die Nutzung eines Multiprotein-Assemblierungs-Komplexes erlaubt somit vermutlich die Regulation der verschiedenen Aspekte der snoRNP Biogenese.

5.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass RNAi mit chemisch synthetisierten siRNAs eine geeignete Methode darstellt, um *ex vivo* funktionelle Studien an Komponenten von Ribonukleoprotein-Komplexen durchzuführen. Die Identifikation von Spleißdefekten, die nach Depletion von am Spleißen beteiligter Proteine erwartet werden, könnte durch geeignete Reporter Assays oder Methoden zum direkten Nachweis der mRNA und Prä-mRNA Mengen erreicht werden. Die Interaktionspartner dieser Spleißfaktoren könnten *in vivo* durch Depletion des endogenen Faktors und Expression einer markierten Variante dieses Faktors, und durch Nachweise mittels Immunpräzipitation und Massenspektroskopie identifiziert werden. Nachgewiesene Interaktionspartner könnten wiederum durch RNAi depletiert werden und der Einfluss des Verlustes dieses Proteins auf das Interaktionsnetzwerk untersucht werden. Es stellt sich auch die Frage, welchen Einfluss der Verlust eines Spleißfaktors auf die Assemblierung des Spleißosoms hat. Zur Klärung dieser Frage könnten induzierbare Knockdown Zelllinien für diese Proteine generiert werden. Dies ermöglicht die Kultur dieser Zellen im Großmaßstab, um nach Induktion des Knockdowns ausreichende Mengen an Zellen für biochemische Analysen und insbesondere für die Isolierung defizienter spleißosomaler Komplexer zu erhalten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Achsel,T., Brahm,H., Kastner,B., Bachi,A., Wilm,M., and Lührmann,R. (1999). A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J* 18(20), 5789-5802.
- Ajuh,P., Kuster,B., Panov,K., Zomerdijk,J.C., Mann,M., and Lamond,A.I. (2000). Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J* 19, 6569-81.
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Meyers,E.W., and Lipman,D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-410.
- Amarzguioui,M., Rossi,J.J., and Kim,D. (2005). Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett* 579, 5974-5981.
- Bach,M., Winkelmann,G., and Luhrmann,R. (1989). 20S small nuclear ribonucleoprotein U5 shows a surprisingly complex protein composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6038-42.
- Bachellerie,J.P., Cavaille,J., and Huttenhofer,A. (2002). The expanding snoRNA world. *Biochimie* 84, 775-790.
- Bagga,S., Bracht,J., Hunter,S., Massirer,K., Holtz,J., Eachus,R., and Pasquinelli,A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553-563.
- Bearden JC Jr. (1978). Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim. Biophys. Acta* 533, 525-529.
- Beaucage,S.L. and Caruthers,M.H. (1981). Deoxynucleoside Phosphoramidites - a New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Letters* 22, 1859-1862.
- Behzadnia,N., Hartmuth,K., Will,C.L., and Luhrmann,R. (2006). Functional spliceosomal A complexes can be assembled in vitro in the absence of a penta-snRNP. *Rna* 12, 1738-46.
- Bell,M., Schreiner,S., Damianov,A., Reddy,R., and Bindereif,A. (2002). p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. *EMBO J* 21, 2724-2735.
- Benecke,H., Lührmann,R., and Will,C.L. (2005). The U11/U12 snRNP 65K protein acts as a molecular bridge, binding the U12 snRNA and U11-59K protein. *EMBO J* 24, 3057-3069.
- Benson,D.A., Karsch-Mizrachi,I., Lipman,D.J., Ostell,J., and Wheeler,D.L. (2008). GenBank. *Nucleic Acids Res* 36, D25-D30.

- Bessonov,S., Anokhina,M., Will,C.L., Urlaub,H., and Lührmann,R. (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* 452, 846-850.
- Birmingham,A., Anderson,E.M., Reynolds,A., Ilesley-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. *Nat. Methods* 3, 199-204.
- Boden,D., Pusch,O., Silbermann,R., Lee,F., Tucker,L., and Ramratnam,B. (2004). Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res* 32, 1154-1158.
- Boulon,S., Verheggen,C., Jady,B.E., Girard,C., Pescia,C., Paul,C., Ospina,J.K., Kiss,T., Matera,A.G., Bordonne,R., and Bertrand,E. (2004). PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol Cell* 16, 777-787.
- Branlant,C., Krol,A., Ebel,J.P., Lazar,E., Haendler,B., and Jacob,E. (1982). U2 RNA shares a structural domain with U1, U4 and U5 RNAs. *EMBO J* 1, 1259-1265.
- Brosi,R., Groning,K., Behrens,S.E., Lührmann,R., and Kramer,A. (1993). Interaction of mammalian splicing factor SF3a with U2 snRNP and relation of its 60-kD subunit to yeast PRP9. *Science* 262, 102-105.
- Brow,D.A. (2002). Allosteric cascade of Spliceosome Activation. *Annual Review of Genetics* 36, 333-360.
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R., and Agami,R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-3.
- Buchholz,F., Kittler,R., Slabicki,M., and Theis,M. (2006). Enzymatically prepared RNAi libraries. *Nat Meth* 3, 696-700.
- Burge,C., Tuschl,T., and Sharp,P.A. (1999). Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In *RNA World*, J. Atkins, ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 525-560.
- Burge,C.B., Padgett,R.A., and Sharp,P.A. (1998). Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell* 2, 773-785.
- Burnette,W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- Carmo-Fonseca,M., Pepperkok,R., Carvalho,M.T., and Lamond,A.I. (1992). Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *Journal of Cell Biology* 117, 1-14.

- Caspary, F. and Seraphin, B. (1998). The yeast U2A'/U2B complex is required for pre-spliceosome formation. *EMBO J* 17, 6348-6358.
- Cavaille, J., Nicoloso, M., and Bachellerie, J.P. (1996). Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* 383, 732-735.
- Chalk, A.M., Wahlestedt, C., and Sonnhammer, E.L. (2004). Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 319, 264-274.
- Chan, S.P., Kao, D.I., Tsai, W.Y., and Cheng, S.C. (2003). The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science* 302, 279-82.
- Collins, M.L., Irvine, B., Tyner, D., Fine, E., Zayati, C., Chang, C., Horn, T., Ahle, D., Detmer, J., Shen, L.P., Kolberg, J., Bushnell, S., Urdea, M.S., and Ho, D.D. (1997). A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Res* 25, 2979-2984.
- Company, M., Arenas, J., and Abelson, J. (1991). Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature* 349, 487-93.
- Cullen, B.R. (2006a). Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nat. Methods* 3, 677-681.
- Cullen, B.R. (2006b). Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Ther.* 13, 503-508.
- Das, R., Zhou, Z., and Reed, R. (2000). Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. *Mol Cell* 5, 779-87.
- Decatur, W.A. and Fournier, M.J. (2003). RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J Biol Chem.* 278, 695-698.
- Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C.L., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., and Luhrmann, R. (2006). Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Mol Cell Biol* 26, 5528-43.
- Ding, Y., Chan, C.Y., and Lawrence, C.E. (2004). Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 32, W135-W141.
- Dorsett, Y. and Tuschl, T. (2004). siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 318-329.
- Editors (2003). Whither RNAi? *Nat Cell Biol* 5, 489-490.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T.

- (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Weber,K., and Tuschl,T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.
- Elbashir,S.M., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Elbashir,S.M., Martinez,J., Patkaniowska,A., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.
- 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, 1188-1196.
- Fedorov,Y., King,A., Anderson,E., Karpilow,J., Ilesley,D., Marshall,W., and Khvorova,A. (2005). Different delivery methods-different expression profiles. *Nat. Methods* 2, 241.
- Ferreira,J.A., Carmo-Fonseca,M., and Lamond,A.I. (1994). Differential interaction of splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and assembly of daughter cell nuclei. *J. Cell Biol.* 126, 11-23.
- Filipowicz,W., Jaskiewicz,L., Kolb,F.A., and Pillai,R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 331-341.
- Filipowicz,W. and Pogacic,V. (2002). Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 14, 319-327.
- 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, 806-11.
- Fischer,U., Liu,Q., and Dreyfuss,G. (1997). The SMN-SIP1 Complex Has an Essential Role in Spliceosomal snRNP Biogenesis. *Cell* 90, 1023-1029.
- Galisson,F. and Legrain,P. (1993). The biochemical defects of prp4-1 and prp6-1 yeast splicing mutants reveal that the PRP6 protein is required for the accumulation of the [U4/U6.U5] tri-snRNP. *Nucleic Acids Res* 21, 1555-1562.
- Gall,J.G. (2003). The centennial of the Cajal body. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 975-980.
- Ganot,P., Jady,B.E., Bortolin,M.L., Darzacq,X., and Kiss,T. (1999). Nucleolar Factors Direct the 2'-O-Ribose Methylation and Pseudouridylation of U6 Spliceosomal RNA. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6906-6917.

- Gee,S., Krauss,S.W., Miller,E., Aoyagi,K., Arenas,J., and Conboy,J.G. (1997). Cloning of mDEAH9, a putative RNA helicase and mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* splicing factor Prp43. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 11803-11807.
- Gitlin,L., Karelsky,S., and Andino,R. (2002). Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418, 430-434.
- Gitlin,L., Stone,J.K., and Andino,R. (2005). Poliovirus Escape from RNA Interference: Short Interfering RNA-Target Recognition and Implications for Therapeutic Approaches. *J. Virol.* 79, 1027-1035.
- Gottschalk,A., Neubauer,G., Banroques,J., Mann,M., Luhrmann,R., and Fabrizio,P. (1999). Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP. *Embo J* 18, 4535-48.
- Grainger,R.J. and Beggs,J.D. (2005). Prp8 protein: At the heart of the spliceosome. *RNA* 11, 533-557.
- Granneman,S. and Baserga,S.J. (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp. Cell Res* 296, 43-50.
- Granneman,S., Pruijn,G.J., Horstman,W., van Venrooij,W.J., Lührmann,R., and Watkins,N.J. (2002). The hU3-55K protein requires 15.5K binding to the box B/C motif as well as flanking RNA elements for its association with the U3 small nucleolar RNA in Vitro. *J Biol Chem.* 277, 48490-48500.
- Guo,S. and Kempthues,J. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620.
- Hall,S.L. and Padgett,R.A. (1996). Requirement of U12 snRNA for in vivo splicing of a minor class of eukaryotic nuclear pre-mRNA introns. *Science* 271, 1716-8.
- 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, 293-6.
- Hannon,G.J. and Rossi,J.J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-378.
- Harborth,J., Elbashir,S.M., Bechert,K., Tuschl,T., and Weber,K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114, 4557-65.
- Harborth,J., Elbashir,S.M., Vandenburgh,K., Manninga,H., Scaringe,S.A., Weber,K., and Tuschl,T. (2003). Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 13, 83-105.

- Hartmuth,K., Urlaub,H., Vornlocher,H.P., Will,C.L., Gentzel,M., Wilm,M., and Lührmann,R. (2002). Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 16719-16724.
- Hastings,M.L. and Krainer,A.R. (2001). Functions of SR proteins in the U12-dependent AT-AC pre-mRNA splicing pathway. *RNA* 7, 471-482.
- Heale,B.S., Soifer,H.S., Bowers,C., and Rossi,J.J. (2005). siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res* 33, e30.
- Henras,A.K., Capeyrou,R., Henry,Y., and Caizergues-Ferrer,M. (2004). Cbf5p, the putative pseudouridine synthase of H/ACA-type snoRNPs, can form a complex with Gar1p and Nop10p in absence of Nhp2p and box H/ACA snoRNAs. *RNA* 10, 1704-1712.
- Hickerson,R.P., Smith,F.J.D., Reeves,R.E., Contag,C.H., Leake,D., Leachman,S.A., Milstone,L.M., McLean,W.H.I., and Kaspar,R.L. (2007). Single-Nucleotide-Specific siRNA Targeting in a Dominant-Negative Skin Model. *J Invest Dermatol*.
- Higuchi,R., Dollinger,G., Walsh,P.S., and Griffith,P.R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413-417.
- Holen,T., Amarzguioui,M., Babaie,E., and Prydz,H. (2003). Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res.* 31, 2401-2407.
- Holen,T., Amarzguioui,M., Wiiger,M.T., Babaie,E., and Prydz,H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30, 1757-66.
- Hornung,V., Guenther-Biller,M., Bourquin,C., Ablasser,A., Schlee,M., Uematsu,S., Noronha,A., Manoharan,M., Akira,S., de Fougères,A., Endres,S., and Hartmann,G. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 11, 263-270.
- Horowitz,D.S., Kobayashi,R., and Krainer,A.R. (1997). A new cyclophilin and the human homologues of yeast Prp3 and Prp4 form a complex associated with U4/U6 snRNPs. *Rna* 3, 1374-87.
- Hossbach,M., Gruber,J., Osborn,M., Weber,K., and Tuschl,T. (2006). Gene Silencing with siRNA Duplexes Composed of Target-mRNA-Complementary and Partially Palindromic or Partially Complementary Single-Stranded siRNAs. *RNA. Biol.* 3.
- Hsieh,A.C., Bo,R., Manola,J., Vazquez,F., Bare,O., Khvorova,A., Scaringe,S., and Sellers,W.R. (2004). A library of siRNA duplexes targeting the

- phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucleic Acids Res* 32, 893-901.
- Huesken,D., Lange,J., Mickanin,C., Weiler,J., Asselbergs,F., Warner,J., Meloon,B., Engel,S., Rosenberg,A., Cohen,D., Labow,M., Reinhardt,M., Natt,F., and Hall,J. (2005). Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat. Biotechnol.* 23, 995-1001.
- Hutvagner,G. and Zamore,P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-60.
- Incorvaia,R. and Padgett,R.A. (1998). Base pairing with U6atac snRNA is required for 5' splice site activation of U12-dependent introns in vivo. *RNA* 4, 709-718.
- Ingelfinger,D., rndt-Jovin,D.J., Lührmann,R., and Achsel,T. (2002). The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA* 8, 1489-1501.
- 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. *Nat. Biotechnol.* 21, 635-637.
- 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*. 12, 1179-1187.
- Jackson,A.L. and Linsley,P.S. (2004). Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet.* 20, 521-524.
- Jones,K.W., Gorzynski,K., Hales,C.M., Fischer,U., Badbanchi,F., Terns,R.M., and Terns,M.P. (2001). Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem.* 276, 38645-38651.
- Judge,A.D., Bola,G., Lee,A.C., and MacLachlan,I. (2005a). Design of Noninflammatory Synthetic siRNA Mediating Potent Gene Silencing in Vivo. *Mol Ther.*
- Judge,A.D., Sood,V., Shaw,J.R., Fang,D., McClintock,K., and MacLachlan,I. (2005b). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* 23, 457-462.
- Jurica,M.S., Licklider,L.J., Gygi,S.R., Grigorieff,N., and Moore,M.J. (2002). Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA* 8, 426-39.
- Kambach,C., Walke,S., and Nagai,K. (1999). Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. *Curr Opin Struct Biol* 9(2), 222-230.

- Kent, W.J. (2002). BLAT-The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Res.* 12, 656-664.
- Khorana, H.G. (1971). Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Pure Appl Chem* 25, 91-118.
- Khvorovova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
- King, T.H., Decatur, W.A., Bertrand, E., Maxwell, E.S., and Fournier, M.J. (2001). A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins. *Mol Cell Biol* 21, 7731-7746.
- Kiss, T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109, 145-148.
- Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85, 1077-1088.
- Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., and Kiss, T. (1998). Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *EMBO J* 17, 797-807.
- Kittler, R. and Buchholz, F. (2005). Functional genomic analysis of cell division by endoribonuclease-prepared siRNAs. *Cell Cycle* 4(4), 564-567.
- Kittler, R., Putz, G., Pelletier, L., Poser, I., Heninger, A.K., Drechsel, D., Fischer, S., Konstantinova, I., Habermann, B., Grabner, H., Yaspo, M.L., Himmelbauer, H., Korn, B., Neugebauer, K., Pisabarro, M.T., and Buchholz, F. (2004). An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432, 1036-1040.
- Klingauf, M., Stanek, D., and Neugebauer, K.M. (2006). Enhancement of U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle association in Cajal bodies predicted by mathematical modeling. *Mol Biol Cell* 17, 4972-4981.
- Köberle, C., Kaufmann, S.H., and Patzel, V. (2006). Selecting effective siRNAs based on guide RNA structure. *Nat Protoc.* 1, 1832-1839.
- Kolossova, I. and Padgett, R.A. (1997). U11 snRNA interacts in vivo with the 5' splice site of U12-dependent (AU-AC) pre-mRNA introns. *Rna* 3, 227-33.
- Komuro, A., Saeki, M., and Kato, S. (1999). Association of two nuclear proteins, Npw38 and NpwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine. *J Biol Chem.* 274, 36513-36519.
- Kufel, J., Allmang, C., Verdone, L., Beggs, J., and Tollervy, D. (2003). A complex pathway for 3' processing of the yeast U3 snoRNA. *Nucleic Acids Res* 31, 6788-6797.

- Kuhn, J.F., Tran, E.J., and Maxwell, E.S. (2002). Archaeal ribosomal protein L7 is a functional homolog of the eukaryotic 15.5kD/Snu13p snoRNP core protein. *Nucleic Acids Res* 30, 931-941.
- Kunkel, G.R., Maser, R.L., Calvet, J.P., and Pederson, T. (1986). U6 Small Nuclear RNA is Transcribed by RNA Polymerase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 8575-8579.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lafontaine, D.L. and Tollervey, D. (1999). Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA* 5, 455-467.
- Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* 30, 363-364.
- Lamond, A.I. and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 605-612.
- Legrain, P., Chapon, C., Schwob, E., Martin, R., Rosbash, M., and Dujon, B. (1991). Cloning of the two essential yeast genes, PRP6 and PRP9, and their rapid mapping, disruption and partial sequencing using a linker insertion strategy. *Mol Gen. Genet.* 225, 199-202.
- Leuschner, P.J., Ameres, S.L., Kueng, S., and Martinez, J. (2006). Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Reports* 7(3), 314-320.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
- Liautard, J.P., Sri-Widada, J., Brunel, C., and Jeanteur, P. (1982). Structural organization of ribonucleoproteins containing small nuclear RNAs from HeLa cells : Proteins interact closely with a similar structural domain of U1, U2, U4 and U5 small nuclear RNAs. *J. Mol. Biol.* 162, 623-643.
- 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* 305, 1437-41.
- Liu, S., Rauhut, R., Vornlocher, H.P., and Lührmann, R. (2006). The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA*. 12, 1418-1430.
- Llorian, M., Beullens, M., Andres, I., Ortiz, J.M., and Bollen, M. (2004). SIPP1, a novel pre-mRNA splicing factor and interactor of protein phosphatase-1. *Biochem. J* 378, 229-238.
- Llorian, M., Beullens, M., Lesage, B., Nicolaescu, E., Beke, L., Landuyt, W.,

- Ortiz, J.M., and Bollen, M. (2005). Nucleocytoplasmic shuttling of the splicing factor SIPP1. *J Biol Chem.* 280, 38862-38869.
- Lopez, R., Silventoinen, V., Robinson, S., Kibria, A., and Gish, W. (2003). WU-Blast2 server at the European Bioinformatics Institute. *Nucleic Acids Res* 31, 3795-3798.
- Losick, R. (1972). In vitro transcription. *Annu Rev Biochem* 41, 409-46.
- Lossky, M., Anderson, G.J., Jackson, S.P., and Beggs, J. (1987). Identification of a yeast snRNP protein and detection of snRNP-snRNP interactions. *Cell* 51, 1019-1026.
- Lührmann, R., Kastner, B., and Bach, M. (1990). Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochim. Biophys. Acta* 1087, 265-292.
- Luo, H.R., Moreau, G.A., Levin, N., and Moore, M.J. (1999). The human Prp8 protein is a component of both U2- and U12-dependent spliceosomes. *RNA* 5, 893-908.
- Luo, K.Q. and Chang, D.C. (2004). The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 318, 303-310.
- Luo, M.J. and Reed, R. (1999). From the Cover: Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 14937-14942.
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K.D., and Tatusova, T. (2007). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* 35, D26-D31.
- Makarov, E.M., Makarova, O.V., Achsel, T., and Lührmann, R. (2000). The human homologue of the yeast splicing factor prp6p contains multiple TPR elements and is stably associated with the U5 snRNP via protein-protein interactions. *J Mol Biol* 298, 567-575.
- Makarov, E.M., Makarova, O.V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C.L., Wilm, M., and Lührmann, R. (2002). Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* 298, 2205-8.
- Makarova, O.V., Makarov, E.M., Liu, S., Vornlocher, H.P., and Lührmann, R. (2002). Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *Embo J* 21, 1148-57.
- Makarova, O.V., Makarov, E.M., Urlaub, H., Will, C.L., Gentzel, M., Wilm, M., and Lührmann, R. (2004). A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *EMBO J* 23, 2381-91.
- Manninga, H. "Untersuchung zur räumlichen Struktur eines lassobildenden Ribozyms mit einer 2'-5'-verzweigten Phosphodiesterbindung sowie Studien zur siRNA-basierten RNA-Interferenz im Zebrafisch-Embryo". 2005.

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen; Abteilung Zelluläre Biochemie.

Ref Type: Thesis/Dissertation

- Martin,A., Schneider,S., and Schwer,B. (2002). Prp43 Is an Essential RNA-dependent ATPase Required for Release of Lariat-Intron from the Spliceosome. *J. Biol. Chem.* 277, 17743-17750.
- Martinez,J., Patkaniowska,A., Urlaub,H., Luhrmann,R., and Tuschl,T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-74.
- Massenet,S. and Branlant,C. (1999). A limited number of pseudouridine residues in the human atac spliceosomal UsnRNAs as compared to human major spliceosomal UsnRNAs. *Rna* 5, 1495-503.
- Matera,A.G., Terns,R.M., and Terns,M.P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 209-220.
- Mathews,D.H., Sabina,J., Zuker,M., and Turner,D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288, 911-940.
- 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, 607-620.
- Mattaj,I.W. (1986). Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* 46, 905-911.
- McManus,M.T., Petersen,C.P., Haines,B.B., Chen,J., and Sharp,P.A. (2002). Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *Rna* 8, 842-50.
- McManus,M.T. and Sharp,P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3, 737-47.
- Meister,G., Landthaler,M., Patkaniowska,A., Dorsett,Y., Teng,G., and Tuschl,T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15(2), 185-197.
- Meister,G. and Tuschl,T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Milligan,J.F., Groebe,D.R., Witherell,G.W., and Uhlenbeck,O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res* 15, 8783-98.
- Minks,M.A., West,D.K., Benveniste,S., and Baglioni,C. (1979). Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254, 10180-10183.

- Misteli, T., Caceres, J.F., and Spector, D.L. (1997). The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387, 523-527.
- Montzka, K.A. and Steitz, J.A. (1988). Additional low-abundance human small nuclear ribonucleoproteins: U11, U12, etc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 8885-8889.
- Morrison, T.B., Weiss, J.J., and Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-962.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16, 720-728.
- 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. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Narayanan, A., Lukowiak, A., Jady, B.E., Dragon, F., Kiss, T., Terns, R.M., and Terns, M.P. (1999a). Nucleolar localization signals of box H/ACA small nucleolar RNAs. *EMBO J* 18, 5120-5130.
- Narayanan, A., Speckmann, W., Terns, R., and Terns, M.P. (1999b). Role of the box C/D motif in localization of small nucleolar RNAs to coiled bodies and nucleoli. *Mol Biol Cell* 10, 2131-2147.
- Newman, D.R., Kuhn, J.F., Shanab, G.M., and Maxwell, E.S. (2000). Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription. *RNA* 6, 861-879.
- Nilsen, T.W. (1994). RNA-RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind. *Cell* 78, 1-4.
- Nottrott, S., Hartmuth, K., Fabrizio, P., Urlaub, H., Vidovic, I., Ficner, R., and Lührmann, R. (1999). Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA. *Embo J* 18, 6119-33.
- Nottrott, S., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2002). Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *EMBO J* 21, 5527-5538.
- Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-21.
- O'Keefe, R.T., Mayeda, A., Sadowski, C.L., Krainer, A.R., and Spector, D.L. (1994). Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *J Cell Biol* 124, 249-260.
- Ogg, S.C. and Lamond, A.I. (2002). Cajal bodies and coilin--moving towards

- function. *Journal of Cell Biology* 159, 17-21.
- Ogilvie,K.K., Usman,N., Nicoghosian,K., and Cedergren,R.J. (1988). Total chemical synthesis of a 77-nucleotide-long RNA sequence having methionine-acceptance activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5764-8.
- Ohno,M. and Shimura,Y. (1996). A human RNA helicase-like protein, HRH1, facilitates nuclear export of spliced mRNA by releasing the RNA from the spliceosome. *Genes Dev.* 10, 997-1007.
- Overhoff,M., Alken,M., Far,R.K., Lemaitre,M., Lebleu,B., Sczakiel,G., and Robbins,I. (2005). Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: A Systematic Global Analysis. *J. Mol. Biol.* 348, 871-881.
- Paddison,P.J., Caudy,A.A., Bernstein,E., Hannon,G.J., and Conklin,D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-58.
- Paddison,P.J. and Hannon,G.J. (2002). RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell* 2, 17-23.
- Patel,A.A. and Steitz,J.A. (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 960-970.
- Patzel,V. (2007). In silico selection of active siRNA. *Drug Discov. Today* 12, 139-148.
- Patzel,V., Rutz,S., Dietrich,I., Köberle,C., Scheffold,A., and Kaufmann,S.H. (2005). Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat. Biotechnol.* 23, 1440-1444.
- Pei,Y. and Tuschl,T. (2006). On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat. Methods* 3, 670-676.
- Pellizzoni,L. (2007). Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep.* 8, 340-345.
- Pellizzoni,L., Baccon,J., Charroux,B., and Dreyfuss,G. (2001). The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol* 11, 1079-1088.
- Persengiev,S.P., Zhu,X., and Green,M.R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA.* 10, 12-18.
- Perumal,K. and Reddy,R. (2002). The 3' end formation in small RNAs. *Gene Expr.* 10, 59-78.
- Pfaffl,M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Proudfoot,N.J., Furger,A., and Dye,M.J. (2002). Integrating mRNA processing

- with transcription. *Cell* 108, 501-512.
- Rader,S.D. and Guthrie,C. (2002). A conserved Lsm-interaction motif in Prp24 required for efficient U4/U6 di-snRNP formation. *RNA* 8, 1378-1392.
- Rana,T.M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23-36.
- Rand,T.A., Ginalski,K., Grishin,N.V., and Wang,X. (2004). Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Rand,T.A., Petersen,S., Du,F., and Wang,X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621-629.
- Rappsilber,J., Ryder,U., Lamond,A.I., and Mann,M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 12, 1231-45.
- Raska,I., Andrade,L.E.C., Ochs,R.L., Chan,E.K.L., Chang,C.M., Roos,G., and Tan,E.M. (1991). Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Experimental Cell Research* 195, 27-37.
- Reddy,R. and Busch,H. (1983). Small nuclear RNAs and RNA processing. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 30, 127-162.
- Reddy,R., Henning,D., Das,G., Harless,M., and Wright,D. (1987). The capped U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* 262, 75-81.
- Reed,R. and Palandjian,L. (1997). Spliceosome assembly. In *Eukaryotic mRNA processing*, A.R.Krainer, ed. (Oxford, UK: Oxford University Press), pp. 103-129.
- Reynolds,A., Leake,D., Boese,Q., Scaringe,S., Marshall,W.S., and Khvorova,A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22, 326-330.
- Rivas,F.V., Tolia,N.H., Song,J.J., Aragon,J.P., Liu,J., Hannon,G.J., and Joshua-Tor,L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12, 340-9.
- Romano,N. and Macino G (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.* 6(22), 3343-3353.
- Ruskin,B. and Green,M.R. (1985). An RNA processing activity that debranches RNA lariats. *Science* 229, 135-40.
- Sambrook,J.F.E.F.a.M.T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Santoyo, J., Vaquerizas, J.M., and Dopazo, J. (2005). Highly specific and accurate selection of siRNAs for high-throughput functional assays. *Bioinformatics*. 21, 1376-1382.
- Saxena, S., Jonsson, 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. *J Biol. Chem.* 278, 44312-44319.
- Scacheri, P.C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N.J., Wolfsberg, T.G., Umayam, L., Lee, J.C., Hughes, C.M., Shanmugam, K.S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M., and Collins, F.S. (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 1892-1897.
- Scaringe, S.A. (2001). RNA oligonucleotide synthesis via 5'-silyl-2'-orthoester chemistry. *Methods* 23, 206-17.
- Scaringe, S.A., Wincott, F.E., and Caruthers, M.H. (1998). Novel RNA synthesis method using 5'-O-silyl-2'-O-orthoester protecting groups. *Journal of the American Chemical Society* 120, 11820-11821.
- Schaffert, N., Hossbach, M., Heintzmann, R., Achsel, T., and Lührmann, R. (2004). RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *EMBO J* 23, 3000-3009.
- Schneider, C. "Isolierung und biochemische Charakterisierung der snRNP-Komponenten des U12-abhängigen Spleißosoms im Menschen und in der Fruchtfliege *D. melanogaster*". 2004. Philipps-Universität Marburg. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Schneider, C., Will, C.L., Makarova, O.V., Makarov, E.M., and Lührmann, R. (2002). Human U4/U6.U5 and U4atac/U6atac.U5 tri-snRNPs exhibit similar protein compositions. *Mol Cell Biol* 22, 3219-3229.
- Schubert, S., Grunweller, A., Erdmann, V.A., and Kurreck, J. (2005). Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: Systematic Analysis of Intentionally Designed Binding Regions. *J. Mol. Biol.* 348, 883-893.
- Schwarz, D.S., Ding, H., Kennington, L., Moore, J.T., Schelter, J., Burchard, J., Linsley, P.S., Aronin, N., Xu, Z., and Zamore, P.D. (2006). Designing siRNA That Distinguish between Genes That Differ by a Single Nucleotide. *PLoS. Genet.* 2, e140.
- 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, 199-208.
- Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D.N., and Fesik, S.W. (2003). Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 6347-6352.

- Singh,R. and Reddy,R. (1989). gamma -monomethyl Phosphate: A Cap Structure in Spliceosomal U6 Small Nuclear RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 86, 8280-8283.
- Sledz,C.A., Holko,M., de Veer,M.J., Silverman,R.H., and Williams,B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat. Cell Biol. 5, 834-839.
- Sleeman,J.E., Ajuh,P., and Lamond,A.I. (2001). snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. J. Cell Sci. 114, 4407-4419.
- Smith,M., Khorana,H.G., Rammler,D.H., and Goldberg,I.H. (1962). Studies on Polynucleotides .14. Specific Synthesis of C3'-C5' Internucleotide Linkage - Syntheses of Uridyl-(3'- 5')-Uridine and Uridyl-(3'- 5')-Adenosine. Journal of the American Chemical Society 84, 430-&.
- Smith,T.F. and Waterman,M.S. (1981). Identification of common molecular subsequences. J Mol Biol 147, 195-197.
- Stanek,D., Pridalova,J., Novotny,I., Huranova,M., Blazikova,M., Wen,X., Sapra,A.K., and Neugebauer,K.M. (2008). Spliceosomal snRNPs Repeatedly Cycle through Cajal Bodies. Mol Biol Cell.
- Stanek,D., Rader,S.D., Klingauf,M., and Neugebauer,K.M. (2003). Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. J Cell Biol 160, 505-516.
- Stark,A., Brennecke,J., Russell,R.B., and Cohen,S.M. (2003). Identification of Drosophila MicroRNA targets. PLoS. Biol 1, E60.
- Stark,G.R., Kerr,I.M., Williams,B.R., Silverman,R.H., and Schreiber,R.D. (1998). How cells respond to interferons. Annu. Rev. Biochem. 67, 227-264.
- Stevens,S.W. and Abelson,J. (1999). Purification of the yeast U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein particle and identification of its proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 7226-31.
- Stevens,S.W., Barta,I., Ge,H.Y., Moore,R.E., Young,M.K., Lee,T.D., and Abelson,J. (2001). Biochemical and genetic analyses of the U5, U6, and U4/U6 x U5 small nuclear ribonucleoproteins from Saccharomyces cerevisiae. RNA 7, 1543-1553.
- Szewczak,L.B., Degregorio,S.J., Strobel,S.A., and Steitz,J.A. (2002). Exclusive interaction of the 15.5 kD protein with the terminal box C/D motif of a methylation guide snoRNP. Chem. Biol 9, 1095-1107.
- Szewczak,L.B., Gabrielsen,J.S., Degregorio,S.J., Strobel,S.A., and Steitz,J.A. (2005). Molecular basis for RNA kink-turn recognition by the h15.5K small RNP protein. RNA 11, 1407-1419.
- Tang,J., Abovich,N., and Rosbash,M. (1996). Identification and

- characterization of a yeast gene encoding the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle B' protein. *Mol Cell Biol* 16, 2787-2795.
- Tarn,W.Y., Lee,K.R., and Cheng,S.C. (1993a). The yeast PRP19 protein is not tightly associated with small nuclear RNAs, but appears to associate with the spliceosome after binding of U2 to the pre-mRNA and prior to formation of the functional spliceosome. *Mol Cell Biol* 13, 1883-91.
- Tarn,W.Y., Lee,K.R., and Cheng,S.C. (1993b). Yeast precursor mRNA processing protein PRP19 associates with the spliceosome concomitant with or just after dissociation of U4 small nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10821-5.
- Tarn,W.Y. and Steitz,J.A. (1996a). A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. *Cell* 84, 801-11.
- Tarn,W.Y. and Steitz,J.A. (1996b). Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns. *Science* 273, 1824-32.
- Teigelkamp,S., Achsel,T., Mundt,C., Gothel,S.F., Cronshagen,U., Lane,W.S., Marahiel,M., and Lührmann,R. (1998). The 20kD protein of human [U4/U6.U5] tri-snRNPs is a novel cyclophilin that forms a complex with the U4/U6-specific 60kD and 90kD proteins. *RNA* 4, 127-141.
- Teigelkamp,S., Mundt,C., Achsel,T., Will,C.L., and Lührmann,R. (1997). The human U5 snRNP-specific 100-kD protein is an RS domain-containing, putative RNA helicase with significant homology to the yeast splicing factor Prp28p. *RNA* 3, 1313-1326.
- Teigelkamp,S., Newman,A.J., and Beggs,J.D. (1995). Extensive interactions of PRP8 protein with the 5' and 3' splice sites during splicing suggest a role in stabilization of exon alignment by U5 snRNA. *Embo J* 14, 2602-12.
- Terns,M.P. and Terns,R.M. (2002). Small nucleolar RNAs: versatile trans-acting molecules of ancient evolutionary origin. *Gene Expr.* 10, 17-39.
- Tran,E.J., Zhang,X., and Maxwell,E.S. (2003). Efficient RNA 2'-O-methylation requires juxtaposed and symmetrically assembled archaeal box C/D and C'/D' RNPs. *EMBO J* 22, 3930-3940.
- Turunen,J.J., Will,C.L., Grote,M., Lührmann,R., and Frilander,M.J. (2008). The U11-48K protein contacts the 5' splice site of U12-type introns and the U11-59K protein. *Mol. Cell. Biol.* MCB.
- Tycowski,K.T., Smith,C.M., Shu,M.D., and Steitz,J.A. (1996). A small nucleolar RNA requirement for site-specific ribose methylation of rRNA in *Xenopus*. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 93, 14480-14485.
- Ui-Tei,K., Naito,Y., Takahashi,F., Haraguchi,T., Ohki-Hamazaki,H., Juni,A., Ueda,R., and Saigo,K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference.

- Nucleic Acids Res. 32, 936-948.
- Verheggen,C., Lafontaine,D.L., Samarsky,D., Mouaikel,J., Blanchard,J.M., Bordonne,R., and Bertrand,E. (2002). Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO J* 21, 2736-2745.
- Verheggen,C., Mouaikel,J., Thiry,M., Blanchard,J.M., Tollervey,D., Bordonne,R., Lafontaine,D.L., and Bertrand,E. (2001). Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *EMBO J* 20, 5480-5490.
- Vickers,T.A., Koo,S., Bennett,C.F., Crooke,S.T., Dean,N.M., and Baker,B.F. (2003). Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol. Chem.* 278, 7108-7118.
- Vidovic,I., Nottrott,S., Hartmuth,K., Lührmann,R., and Ficner,R. (2000). Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. *Mol Cell* 6, 1331-1342.
- Wall,L. and Schwartz,R.L. (1991). *Programming Perl*. O'Reilly).
- Watkins,N.J., Dickmanns,A., and Lührmann,R. (2002). Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol Cell Biol* 22, 8342-8352.
- Watkins,N.J., Lemm,I., Ingelfinger,D., Schneider,C., Hossbach,M., Urlaub,H., and Lührmann,R. (2004). Assembly and Maturation of the U3 snoRNP in the Nucleoplasm in a Large Dynamic Multiprotein Complex. *Mol Cell* 16(5), 789-798.
- Watkins,N.J., Segault,V., Charpentier,B., Nottrott,S., Fabrizio,P., Bachi,A., Wilm,M., Rosbash,M., Branlant,C., and Lührmann,R. (2000). A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell* 103, 457-466.
- Weidenhammer,E.M., Singh,M., Ruiz-Noriega,M., and Woolford,J.L., Jr. (1996). The PRP31 gene encodes a novel protein required for pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 24, 1164-1170.
- Wheeler,D.L., Barrett,T., Benson,D.A., Bryant,S.H., Canese,K., Chetvernin,V., Church,D.M., DiCuccio,M., Edgar,R., Federhen,S., Feolo,M., Geer,L.Y., Helmberg,W., Kapustin,Y., Khovayko,O., Landsman,D., Lipman,D.J., Madden,T.L., Maglott,D.R., Miller,V., Ostell,J., Pruitt,K.D., Schuler,G.D., Shumway,M., Sequeira,E., Sherry,S.T., Sirotkin,K., Souvorov,A., Starchenko,G., Tatusov,R.L., Tatusova,T.A., Wagner,L., and Yaschenko,E. (2008). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 36, D13-D21.

- Will,C.L., Behrens,S.E., and Lührmann,R. (1993). Protein composition of mammalian spliceosomal snRNPs. *Mol Biol Rep.* 18, 121-126.
- Will,C.L. and Lührmann,R. (1997). Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* 9, 320-8.
- Will,C.L. and Lührmann,R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 290-301.
- Will,C.L. and Lührmann,R. (2006). Spliceosome structure and function. In *The RNA world*, R.F.Gesteland, T.R.C., and a.J.F.Atkins, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 369-400.
- Will,C.L., Schneider,C., Hossbach,M., Urlaub,H., Rauhut,R., Elbashir,S., Tuschl,T., and Lührmann,R. (2004). The human 18S U11/U12 snRNP contains a set of novel proteins not found in the U2-dependent spliceosome. *RNA* 10, 929-941.
- Will,C.L., Schneider,C., Reed,R., and Lührmann,R. (1999). Identification of both shared and distinct proteins in the major and minor spliceosomes. *Science* 284, 2003-2005.
- Will,C.L., Urlaub,H., Achsel,T., Gentzel,M., Wilm,M., and Lührmann,R. (2002). Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. *Embo J* 21, 4978-88.
- Wolin,S.L. and Cedervall,T. (2002). The La protein. *Annu. Rev Biochem.* 71, 375-403.
- Xu,Y., Zhang,H.Y., Thormeyer,D., Larsson,O., Du,Q., Elmen,J., Wahlestedt,C., and Liang,Z. (2003). Effective small interfering RNAs and phosphorothioate antisense DNAs have different preferences for target sites in the luciferase mRNAs. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 306, 712-717.
- Yang,Y., Isaac,C., Wang,C., Dragon,F., Pogacic,V., and Meier,U.T. (2000). Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140. *Mol Biol Cell* 11, 567-577.
- Yekta,S., Shih,I.H., and Bartel,D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594-596.
- Yiu,S.M., Wong,P.W., Lam,T.W., Mui,Y.C., Kung,H.F., Lin,M., and Cheung,Y.T. (2005). Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics.* 21, 144-151.
- Yong,J., Golembe,T.J., Battle,D.J., Pellizzoni,L., and Dreyfuss,G. (2004). snRNAs contain specific SMN-binding domains that are essential for snRNP assembly. *Mol Cell Biol* 24, 2747-2756.

-
- Yu, Y.T., Scharl, E., Smith, C.M., and Steitz, J.A. (1999). The growing world of small nuclear ribonucleoproteins. In *The RNA world*, R.F. Gesteland, T.R. Cech, and J.F. Atkins, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 561-583.
- Yu, Y.T. and Steitz, J.A. (1997). Site-specific crosslinking of mammalian U11 and u6atac to the 5' splice site of an AT-AC intron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6030-5.
- Yuan, B., Latek, R., Hossbach, M., Tuschl, T., and Lewitter, F. (2004). siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Res* 32, W130-W134.
- Zeng, Y., Wagner, E.J., and Cullen, B.R. (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 9, 1327-33.
- Zhou, Z., Licklider, L.J., Gygi, S.P., and Reed, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419, 182-5.

7 ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

a	anti
A	Adenosin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BLAST	<i>Basic Local Alignment Tool</i>
BP	<i>branchpoint</i> (Verzweigungsstelle)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
5'ss	5'-Spleißstelle
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CB	<i>Cajal Body/Coiled Body</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
Δ	delta, steht hier für: depletiert
d	desoxy
Da	Dalton
dd	bi-destilliert (als Präfix)
d.h.	das heißt
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
Ds	doppelsträngig
dT	Desoxythymidin
DTE	1,4-Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
et al.	<i>et alii</i> (lateinisch für: und andere)
f	femto

G	Guanosin
g	Gramm/Zentrifugalkraft
h	Stunden/ human (als Präfix)
HCl	Salzsäure
His	Histidin
hn	<i>heterogenous nuclear</i>
k	kilo (als Präfix)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
M	molar
m	milli (als Präfix)
μ	mikro (als Präfix)
MG/MW	Molekulargewicht/molecular weight
m3G	N2,N2,N7-Trimethylguanosin
m7G	N7-Monomethylguanosin
min	Minuten
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
ms	Millisekunden
n	nano (als Präfix)
NIS	<i>Non-Immuneserum/Präimmuneserum</i>
nts	Nukleotide
NTPs	Nukleosid-5'-Triphosphate
OAc	Acetat
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Phosphat
p	pico (als Präfix)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol
PFA	Paraformaldehyd
pers.	persönlich
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
Prä-mRNA	Vorläufer-mRNA
Prp	<i>pre-mRNA processing</i>
%	Prozent
Py	Pyrimidinbase
R	Purinbase
RBD	RNA-Bindungsdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit (10-13 s)
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
s.d.	Standardabweichung (standard deviation)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sn	<i>small nuclear</i>
sno	<i>small nucleolar</i>
s. o.	siehe oben
SR	serin-arginin-reich
ss	einzelsträngig
SS	Spleißstelle
s. u.	siehe unten
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	transfer RNA
U	Uracil/Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
U snRNA	<i>uridine-rich small nuclear RNA</i>
U snRNP	<i>uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein</i>
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
WU-BLAST	<i>Washington University Basic Local Alignment Tool</i>
Y	Pyrimidinbase
z.B.	zum Beispiel

Nicht angegebene Abkürzungen für physikalische Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System.

Tabelle A-1. mRNA Sequenzen eingesetzt zur statistischen Analyse des Vorkommens von "nur Leit-Strang siRNA" Ziel-Regionen. Accession-Nummern und Kurzbeschreibung zu 100 mRNAs (siehe Abschnitt 4.1.3.2).

gi 40805828 ref NM_006710.4 Homo sapiens COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 8 (Arabidopsis) (COPS8), transcript variant 1, mRNA
gi 41327743 ref NM_004321.4 Homo sapiens kinesin family member 1A (KIF1A), mRNA
gi 56711325 ref NM_003983.3 Homo sapiens solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 6 (SLC7A6), mRNA
gi 34328912 ref NM_004625.3 Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 7A (WNT7A), mRNA
gi 4504482 ref NM_000194.1 Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome) (HPRT1), mRNA
gi 37704380 ref NM_004048.2 Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA
gi 61744433 ref NM_003194.3 Homo sapiens TATA box binding protein (TBP), mRNA
gi 34222313 ref NM_014502.3 Homo sapiens PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (PRPF19), mRNA
gi 17999536 ref NM_006445.2 Homo sapiens PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast) (PRPF8), mRNA
gi 4557552 ref NM_000117.1 Homo sapiens emerín (Emery-Dreifuss muscular dystrophy) (EMD), mRNA
gi 27436944 ref NM_005572.2 Homo sapiens lamin A/C (LMNA), transcript variant 2, mRNA
gi 83641890 ref NM_002046.3 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA
gi 28302128 ref NM_000518.4 Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB), mRNA
gi 15718673 ref NM_000024.3 Homo sapiens adrenergic, beta-2-, receptor, surface (ADRB2), mRNA
gi 14717406 ref NM_005642.2 Homo sapiens TAF7 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 55kDa (TAF7), mRNA
gi 28872795 ref NM_005194.2 Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (CEBPB), mRNA
gi 18765721 ref NM_019066.2 Homo sapiens MAGE-like 2 (MAGEL2), mRNA
gi 5174532 ref NM_005912.1 Homo sapiens melanocortin 4 receptor (MC4R), mRNA
gi 66346710 ref NM_000529.2 Homo sapiens melanocortin 2 receptor (adrenocorticotrophic hormone) (MC2R), mRNA
gi 44890066 ref NM_002228.3 Homo sapiens v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) (JUN), mRNA
gi 34222271 ref NM_012084.3 Homo sapiens glutamate dehydrogenase 2 (GLUD2), mRNA
gi 26787973 ref NM_005345.4 Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA
gi 53759132 ref NM_001393.2 Homo sapiens extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific (ECM2), mRNA
gi 19743828 ref NM_003529.2 Homo sapiens histone 1, H3a (HIST1H3A), mRNA
gi 4504222 ref NM_000181.1 Homo sapiens glucuronidase, beta (GUSB), mRNA
gi 14589948 ref NM_000937.2 Homo sapiens polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa (POLR2A), mRNA
gi 29570786 ref NM_030877.3 Homo sapiens catenin, beta like 1 (CTNBL1), mRNA
gi 5016088 ref NM_001101.2 Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA
gi 62414288 ref NM_003380.2 Homo sapiens vimentin (VIM), mRNA
gi 52630339 ref NM_002105.2 Homo sapiens H2A histone family, member X (H2AFX), mRNA
gi 13259530 ref NM_022877.1 Homo sapiens survival of motor neuron 2, centromeric (SMN2), transcript variant c, mRNA
gi 77404429 ref NM_002669.2 Homo sapiens pleiotropic regulator 1 (PRL1 homolog, Arabidopsis) (PLRG1), mRNA
gi 45439322 ref NM_006347.3 Homo sapiens peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H) (PPIH), mRNA
gi 16357499 ref NM_001253.2 Homo sapiens CDC5 cell division cycle 5-like (<i>S. pombe</i>) (CDC5L), mRNA
gi 18860912 ref NM_012245.2 Homo sapiens SNW domain containing 1 (SNW1), mRNA
gi 18375679 ref NM_016312.2 Homo sapiens WW domain binding protein 11 (WBP11), mRNA
gi 28872757 ref NM_003913.3 Homo sapiens PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (yeast) (PRPF4B), transcript variant 1, mRNA
gi 40254447 ref NM_003629.2 Homo sapiens phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (p55, gamma) (PIK3R3), mRNA
gi 7657312 ref NM_014462.1 Homo sapiens LSM1 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>) (LSM1), mRNA
gi 10947034 ref NM_019843.2 Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E nuclear import factor 1 (EIF4ENIF1), mRNA
gi 58331235 ref NM_152624.4 Homo sapiens DCP2 decapping enzyme homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (DCP2), mRNA
gi 53829366 ref NM_015455.3 Homo sapiens CCR4-NOT transcription complex, subunit 6 (CNOT6), mRNA
gi 1732072 gb U75308.1 HSU75308 Human TBP-associated factor (hTAFII130) mRNA, partial cds
gi 458435 gb U06632.1 HSU06632 Homo sapiens p80-coilin mRNA, complete cds
gi 50726967 ref NM_005926.2 Homo sapiens microfilament-associated protein 1 (MFAP1), mRNA
gi 44890049 ref NM_203399.1 Homo sapiens stathmin 1/oncoprotein 18 (STMN1), transcript variant 2, mRNA
gi 56237019 ref NM_018695.2 Homo sapiens erbb2 interacting protein (ERBB2IP), transcript variant 2, mRNA
gi 57165437 ref NM_003370.3 Homo sapiens vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), transcript variant 1, mRNA
gi 23308730 ref NM_003302.1 Homo sapiens thyroid hormone receptor interactor 6 (TRIP6), mRNA
gi 15431325 ref NM_002284.2 Homo sapiens keratin, hair, basic, 6 (monilethrix) (KRTHB6), mRNA

gi 83267869 ref NM_003746.2 Homo sapiens dynein, light chain, LC8-type 1 (DYNLL1), transcript variant 3, mRNA
gi 72198188 ref NM_000633.2 Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant alpha, mRNA
gi 16306490 ref NM_001786.2 Homo sapiens cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M (CDC2), transcript variant 1, mRNA
gi 71061467 ref NM_001813.2 Homo sapiens centromere protein E, 312kDa (CENPE), mRNA
gi 13699823 ref NM_004523.2 Homo sapiens kinesin family member 11 (KIF11), mRNA
gi 24430145 ref NM_005124.2 Homo sapiens nucleoporin 153kDa (NUP153), mRNA
gi 34222329 ref NM_015934.3 Homo sapiens nucleolar protein NOP5/NOP58 (NOP5/NOP58), mRNA
gi 41406063 ref NM_005964.1 Homo sapiens myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle (MYH10), mRNA
gi 34222261 ref NM_178014.2 Homo sapiens tubulin, beta (TUBB), mRNA
gi 38327534 ref NM_005543.2 Homo sapiens insulin-like 3 (Leydig cell) (INSL3), mRNA
gi 21071011 ref NM_002769.2 Homo sapiens protease, serine, 1 (trypsin 1) (PRSS1), mRNA
gi 18375649 ref NM_080685.1 Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase) (PTPN13), transcript variant 4, mRNA
gi 30089990 ref NM_004300.2 Homo sapiens acid phosphatase 1, soluble (ACP1), transcript variant 3, mRNA
gi 18860901 ref NM_002844.2 Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, K (PTPRK), mRNA
gi 37655179 ref NM_004090.2 Homo sapiens dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1-related) (DUSP3), mRNA
gi 73747916 ref NM_018833.2 Homo sapiens transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) (TAP2), transcript variant 2, mRNA
gi 46592963 ref NM_207627.1 Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1 (ABCG1), transcript variant 5, mRNA
gi 71361681 ref NM_006185.2 Homo sapiens nuclear mitotic apparatus protein 1 (NUMA1), mRNA
gi 29337287 ref NM_006530.2 Homo sapiens YEATS domain containing 4 (YEATS4), mRNA
gi 60115820 ref NM_021961.3 Homo sapiens TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor) (TEAD1), mRNA
gi 47157323 ref NM_006254.3 Homo sapiens protein kinase C, delta (PRKCD), transcript variant 1, mRNA
gi 38787996 ref NM_033627.3 Homo sapiens three prime repair exonuclease 1 (TREX1), transcript variant 2, mRNA
gi 4506164 ref NM_000447.1 Homo sapiens presenilin 2 (Alzheimer disease 4) (PSEN2), transcript variant 1, mRNA
gi 41327753 ref NM_020639.2 Homo sapiens receptor-interacting serine-threonine kinase 4 (RIPK4), mRNA
gi 4502638 ref NM_000579.1 Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5), mRNA
gi 33946328 ref NM_005402.2 Homo sapiens v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related) (RALA), mRNA
gi 34147632 ref NM_005030.3 Homo sapiens polo-like kinase 1 (Drosophila) (PLK1), mRNA
gi 20149636 ref NM_016442.2 Homo sapiens type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator (ARTS-1), mRNA
gi 8400737 ref NM_000546.2 Homo sapiens tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome) (TP53), mRNA
gi 73747817 ref NM_013247.4 Homo sapiens Htra serine peptidase 2 (HTRA2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA
gi 18141577 ref NM_080732.1 Homo sapiens egl nine homolog 2 (C. elegans) (EGLN2), transcript variant 3, mRNA
gi 50345996 ref NM_001429.2 Homo sapiens E1A binding protein p300 (EP300), mRNA
gi 45439351 ref NM_003955.3 Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), mRNA
gi 39812034 ref NM_004313.3 Homo sapiens arrestin, beta 2 (ARRB2), transcript variant 1, mRNA
gi 28610153 ref NM_000584.2 Homo sapiens interleukin 8 (IL8), mRNA
gi 73623018 ref NM_001228.3 Homo sapiens caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP8), transcript variant A, mRNA
gi 47132615 ref NM_001755.2 Homo sapiens core-binding factor, beta subunit (CBFB), transcript variant 2, mRNA
gi 66934968 ref NM_004348.3 Homo sapiens runt-related transcription factor 2 (RUNX2), transcript variant 3, mRNA
gi 46488908 ref NM_006879.2 Homo sapiens Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse) (MDM2), transcript variant MDM2b, mRNA
gi 19923847 ref NM_030928.2 Homo sapiens DNA replication factor (CDT1), mRNA
gi 58761545 ref NM_015013.2 Homo sapiens amine oxidase (flavin containing) domain 2 (AOF2), transcript variant 2, mRNA
gi 4758395 ref NM_004119.1 Homo sapiens fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3), mRNA
gi 33188458 ref NM_004333.2 Homo sapiens v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF), mRNA
gi 23397677 ref NM_003153.3 Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced (STAT6), mRNA
gi 21264342 ref NM_002967.2 Homo sapiens scaffold attachment factor B (SAFB), mRNA
gi 22208966 ref NM_145899.1 Homo sapiens high mobility group AT-hook 1 (HMGA1), transcript variant 1, mRNA
gi 46249365 ref NM_006115.3 Homo sapiens preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME), transcript variant 1, mRNA
gi 5730022 ref NM_006666.1 Homo sapiens RuvB-like 2 (E. coli) (RUVBL2), mRNA
gi 34098945 ref NM_004559.2 Homo sapiens Y box binding protein 1 (YBX1), mRNA
gi 40807446 ref NM_005973.4 Homo sapiens papillary renal cell carcinoma (translocation-associated) (PRCC), transcript variant 1, mRNA

Tabelle A-2. siRNA-Sequenzen zum RNAi-Screening. Syn. – synthetisiert durch Hersteller: I – eigenes Labor, Q – Qiagen, D – Dharmacon, A – Ambion. siRNA Ziel-Region: ND –Region nicht bestimmt, da die siRNA Ziel-Sequenz unter angegebener Acc.-Nummer(n) der humanen RefSeq Datenbank (Rel.28) nicht mit 100%iger Sequenzidentität vorliegt.

siRNA-ID	Protein Name	Offizielles Gen-Symbol	Accession Nummer(n)	mRNA Ziel-Sequenz (19mer, 5'-3')	siRNA Ziel-Region	Syn.
1-1	9G8	SFRS7	NM_001031684	GGUAGACCUUAGAAUGUUA	3'UTR	Q
1-2				GCAUCUCCUCGACGAUUA	ND	Q
2-1	ABSTRAKT	DDX41	NM_016222	AGCUGCCAUUAAGCCCAA	3'UTR	Q
2-2				GCCCAAACCUUAGCCCAA	3'UTR	Q
3-1	ASR2	ARS2	NM_015908 NM_182800	GGCGGUUCGCAACAACAA	ORF	Q
3-2				CAGCCUUACUGCUAAUAAA	3'UTR	Q
4-1	CA150 (TAF2S)	TCERG1	NM_006706	CGGUCUAACUAACAUUUU	3'UTR	Q
4-2				GGUGUUUCUUGAAACUA	3'UTR	Q
5-1	Cactin	C19orf29	NM_001080543	GGCUCGUGAGAAGCAGGAA	3'UTR	Q
5-2				GGAAACAUCUCCAACAGAA	3'UTR	Q
6-1	CBP20	NCBP2	NM_007362	CGUUAACUGAGUGUAGAA	3'UTR	Q
6-2				GAAUCUUGAGUAUUUACUAA	3'UTR	Q
7-1	CBP80	NCBP1	NM_002486	GGCAGUAAUGUGACUAUGA	3'UTR	Q
7-2				ACUUGUUAAAGGAAACAAA	ND	Q
8-1	Cyp-60	PPIL2	NM_014337 / NM_148176 NM_148175	GGAGGAGUCCGCAUUGAU	ORF	Q
8-2				CCAAUUUGGACAAAGUCAA	ORF	Q
9-1	DDX17	DDX17	NM_006386 NM_030881	GGGACAUUGUAUCAUAAA	3'UTR	Q
9-2				GGAGUGCAUUUGAUAGUUA	3'UTR	Q
10-1	DDX3	DDX3X	NM_001356	CGUUGUACGUGCUGACGUA	5'UTR	Q
10-2				CGUUGUACGUGCUGACGUA	5'UTR	Q
11-1	DDX35	DHX35	NM_021931	GCAUGUCUCUACGAUAGAA	3'UTR	Q
11-2				CAUGUAAAUAUAGUGUAU	3'UTR	Q
12-1	p68	DDX5	NM_004396	GAAAGACUAUUUCAUUA	ORF	Q
12-2				GGAAUAUUGUCCAAUA	ORF	Q
13-1	DDX9	DHX9	NM_001357	CCUUAUGAUUGGCAGUACA	ORF	Q
13-2				GGUUGUUGGUGAGGCUAUA	ORF	Q
14-1	DHX34	DHX34	NM_014681	GGUGGCAGGUGAAUCUGA	ORF	Q
14-2				GAUUGUGAAUAAGCCUCA	3'UTR	Q
15-1	FRG1	FRG1	NM_004477	AAUUGAAAGCCGACAGUA	ORF	Q
15-2				GAAAUUUCAGACUCCAA	ORF	Q
16-1	hPRP2	DHX16	NM_003587	CCUAUUAAAUAUUAUUU	3'UTR	Q
16-2				CCAAGUCCUCAUCAUGAA	ORF	Q
17-1	hPRP4 kinase	PRPF4B	NM_003913	GUAGAACCUCGUUAUUA	3'UTR	Q
17-2				CAUAACACAUGGUUGUCAA	3'UTR	Q
18-1	hSmu-1	SMU1	NM_018225	CAACUGAGCAGGCAUUA	ORF	Q
18-2				CGGCUAUGUCGAUCGAAA	5'UTR/ORF	Q
19-1	hSNU23 FLJ31121)	ZMAT2	NM_144723	CACCUGAGUCCAAUAAA	3'UTR	Q
19-2				CAUGUAACAGGAAUAAA	3'UTR	Q
20-1	KIAA0052	SKIV2L2	NM_015360	CCUGUUUGAUUACAGUUGA	3'UTR	Q
20-2				GAUUAACAGUUGACUACAAA	3'UTR	Q
21-1	KIAA1604	KIAA1604	NM_020943	GCAUACACACCGAAUAAA	ORF	Q
21-2				CGAGAUAAUCCAAAGAAACA	ORF	Q
22-1	LUC7A	CROP	NM_016424 NM_006107	CCUUGGAAUUUAGAAGUAA	3'UTR	Q
22-2				CGUUAGUAUUCGUGUGAAU	3'UTR	Q
23-1	MFAP1	MFAP1	NM_005926	GGACCGAGUGACAGUCAA	ORF	Q
23-2				CGGCGUUUACGAACCGUA	ORF	Q
24-1	MGC13125	BUD13	NM_032725	GCGAGUAUUCAGUGGUAA	3'UTR	Q
24-2				CAGUUGUCUGGCUAAUUA	3'UTR	Q
25-1	NFAR	ILF3	NM_012218 / NM_004516 NM_153464	CGAUUUCACCACAUUCUGAA	ND,3'UTR,3'UTR	Q
25-2				GGUUUAGCUAGAGAGUGAA	ND,3'UTR,3'UTR	Q
26-1	PPlase-like 3b	PPIL3	NM_130906 / NM_032472 NM_131916	CGUAGGACAAUUAUUAU	3'UTR	Q
26-2				GAGCAUAUUCUUUAUUAU	3'UTR	Q
27-1	PRP16	DHX38	NM_014003	GACCUAAAGGAAUUGUAA	3'UTR	Q
27-2				CCUUGUGUAAAGCAGCAA	3'UTR	Q
28-1	RED	IK	NM_006083	CCCUGAAACAAGACUUA	ORF	Q
28-2				GCGAGUAUAUGAACACAA	ORF	Q
29-1	SC35	SFRS2	NM_003016	GGAGCAGGUUUGUCUUUA	3'UTR	Q
29-2				GAUUGUUUAUCAACACAA	3'UTR	Q
30-1	SF2/ASF	SFRS1	NM_006924	GGUAGCAAUUGCCAGUAAA	3'UTR	Q
30-2				GUUUAGCCUUUAUCAAAA	3'UTR	Q
31-1	SF3a120	SF3A	NM_005877 NM_001005409	GCAUGUAGGUAGCGUCCUA	3'UTR	Q
31-2				AGGAUUUGUAUAAAGUUUA	3'UTR	Q
32-1	SF3a60	SF3A3	NM_006802	GCCAUUGAUGCAAUAUUA	3'UTR	Q
32-2				GGCACUGAUCGCCUUAUA	3'UTR	Q
33-1	SF3a66	SF3A2	NM_007165	GCCUGACACUUCACAACAA	ORF	Q
33-2				CGUAUCUCAUGAAGAACCA	ORF	Q
34-1	SF3b130	SF3B3	NM_012426	CCUGUAACAUGUAUCAUGA	3'UTR	Q
34-2				CCACUGUCUUGAAUCUUA	3'UTR	Q

siRNA-ID	Protein Name	Offizielles Gen-Symbol	Accession Nummer(n)	mRNA Ziel-Sequenz (19mer, 5'-3')	siRNA Ziel-Region	Syn.
35-1	SF3b145	SF3B2	NM_006842	CCAACUUUUUUCUUUUUAA	ORF	Q
35-2				AGAAGACCAUGAAGUCAAA	ORF	Q
36-1	SF3b155	SF3B1	NM_012433 NM_001005526	GGGAUUGUUUUAUUGAGAA	3'UTR,ND	Q
36-2				CAGUGAUUUUUUACACUUAU	3'UTR	Q
37-1	SF3b49	SF3B4	NM_005850	CCAUGGCCUUAUGGCUUA	ORF	Q
37-2				CAGGCAACUCCAAAGGUUA	ORF	Q
38-1	SLU7	SLU7	NM_006425	GGCUUUAAUAAUUAUUUCA	3'UTR	Q
38-2				GGCAGAUCCUACAAAGCUA	ORF	Q
39-1	SPF30	SMNDC1	NM_005871	CAAUAUCAAGAUACCUCUA	ORF	Q
39-2				GAGUUGAUUUUAGCCAAA	3'UTR	Q
40-1	SRp20	SFRS3	NM_003017	AAGAAUUGUUAUUUACAA	3'UTR	Q
40-2				AGUUGUAUAGAAUGUUA	3'UTR	Q
41-1	TIP48	RUVBL2	NM_006666	CGCAGUACAUGAAGGAGUA	ORF	Q
41-2				CAGAUUGAUCGACCCAGCAA	ORF	Q
42-1	TIP49	RUVBL1	NM_003707	CGGCCAACUUGCUUGCUAA	ORF	Q
42-2				GGAAGGACAGCAUUGAGAA	ORF	Q
43-1	U11/U12 59K	PDCD7	NM_005707	AGAGUGACUUGUUAUUUA	3'UTR	Q
43-2				GGAGGCGUCUAGUAGGAA	3'UTR	Q
44-1	U11/U12 65K	RNP	NM_017619	ACCUGUUGAUCCAGGUUA	ND	Q
44-2				ACACUUUUUUCAAUUGAAA	ND	Q
45-1	U4/U6*U5-27K	RY1	NM_006857	GACUUGCCAUUUUAAUUUA	3'UTR	Q
45-2				GGUUCUCUCCGCAAGUUA	3'UTR	Q
46-1	U5-100K	DDX23	NM_004818	UGAAUUUUUAAAGACUUA	3'UTR	Q
46-2				GGAUGGUAARGGAAUGUGA	3'UTR	Q
47-1	UAP56	DDX39	NM_005804	GAGAUGUAUGAGAAUAAA	3'UTR	Q
47-2				AGGUGAAUUUUUCCGUCAA	ORF	Q
48-1	YB-1 / NSEP1	YBX1	NM_004559	GCAAGCACCUUUUAAUAAA	3'UTR	Q
48-2				UGUUAAUUAAAGGCUUUAAA	3'UTR	Q
49-1	AcinusL	ACIN1	NM_014977	GGGUCUUUCAUACACCUA	3'UTR	Q
49-2				GGGUCACCUAUGAGCUGAA	3'UTR	Q
50-1	ALY	THOC4	NM_005782	GAGGUGGCAUGACUAGAAA	ORF	Q
50-2				GGAACUCUUUGCUGAAUUU	ORF	Q
51-1	CDC2L2	CDC2L2	NM_033529	GGAAUAAAGCUCGCGGAA	ORF	Q
51-2				CGCUUGGAGCAGUUAGAAA	ORF	Q
51-3				AGAUCUACAUCGUGAUGAA	ORF	Q
51-4				GCAACAUGGACAAGAUUA	ORF	Q
52-1	DBP5	DDX19B	NM_007242 / NM_001014451 NM_001014449	AGUAGAACCUGCAAAACAAA	ORF	Q
52-2				GGAAUUAUAGGCAUAGAAA	3'UTR	Q
53-1	DGS1	DGCR14	NM_022719	CAAGCUGUUUGCUGUUUA	3'UTR	Q
53-2				GAAGCUGUUGACCAUACCA	3'UTR	Q
54-1	DKFZP4341116	KIAA1429	NM_015496 NM_183009	GAAUUUGUUUGAUUACCUAA	3'UTR,ND	Q
54-2				AGAAUUUCUCAAACUUUCU	3'UTR,ND	Q
55-1	DKFZP58600120	FAM32A	NM_014077	CGUCCUUGUAUCAGUUUA	3'UTR	Q
55-2				GGAAAGUUUCUAAGUUUAU	3'UTR	Q
56-1	ELAV	ELAVL1	NM_001419	CGAAUUUGAUCGCUAACUA	ORF	Q
56-2				GGGAUCGCGGUUUUAAA	3'UTR	Q
57-1	FLJ21827	C11orf60	NM_020153	CGAAGAGGUUGCAAGUAUU	5'UTR	Q
57-2				GGCCCAUGCCGACAUUGA	ORF	Q
58-1	HDAC2	HDAC2	NM_001527	CGGUAUUAUUGGAAUUUAU	ORF	Q
58-2				GGAGGAUUACAUCAGUCUA	ORF	Q
59-1	hPRP17	CDC40	NM_015891	GAGGAGGUUUUUAUUUA	3'UTR	Q
59-2				ECCUAUGACAGGUUUCUUA	ORF	Q
60-1	hPRP22	DHX8	NM_004941	GGAUGAAGAUUGAUGAAA	ORF	Q
60-2				GCCUGAUUAUCGUUAUGCA	ORF	Q
61-1	hPRP38/FLJ14936/ MGC3320	PRPF38A	NM_032864	GCUGUUUUCAAAGAUCAA	3'UTR	Q
61-2				CACGGACAUCGAUUAUCA	3'UTR	Q
62-1	hTraa/HSU53209	TRA2A	NM_013293	CAUAGCAUAGAAUUCUUA	3'UTR	Q
62-2				AGCUAAUCAAUAAGGAAA	3'UTR	Q
63-1	KIAA0853	KIAA0853	NM_015070	GGCAUUAAGUAAUACCCAA	3'UTR	Q
63-2				CAAUAAGUUCUAAUAUCA	3'UTR	Q
64-1	KIAA1590	C20orf23	NM_024704	GAAUUUUGGUGACGUAGAA	ORF	Q
64-2				GCAUCGUGUAUUUAGUGAA	ORF	Q
65-1	Magoh	MAGOH	NM_002370	AGAGGCUUAUGUACAUA	ORF	Q
65-2				GGAAUUUAAGAUUAGCCAA	ORF	Q
66-1	matrin3	MATR3	NM_018834 NM_199189	CGCUGAUGAUCCCAACAAA	ORF	Q
66-2				CGGUGAAGAUGGUGAGAAA	ORF	Q
67-1	MGC2655	THOC6	NM_024339	AGACGAUCGAGGUCUAUA	ORF	Q
67-2				AGACGAUCGAGGUCUAUA	ORF	Q
68-1	MOV10	MOV10	NM_020963	CGUUAUGGAGGCAUUUA	ORF	Q
68-2				GCCUGGAUUUGAACCCCAA	ORF	Q
69-1	NIPP1	PPP1R8	NM_014110 / NM_138558 NM_002713	GCUGAAGUUUUUUUUUA	3'UTR	Q
69-2				CAUUGUAAAUUUAACGUAA	3'UTR	Q
70-1	NOSIP	NOSIP	NM_015953	CCCUCGAAUUGCGUGGAGAA	ORF	Q
70-2				GCGACAUCAGGUGGUGCA	ORF	Q
71-1	NUK-34	DDX48	NM_014740	GGAAGGGUGUGGCCAUUA	ORF	Q
71-2				CAUAAACUCUUAUACUUA	3'UTR	Q

siRNA-ID	Protein Name	Offizielles Gen-Symbol	Accession Nummer(n)	mRNA Ziel-Sequenz (19mer, 5'-3')	siRNA Ziel-Region	Syn.
72-1	p55PIK	PIK3R3	NM_003629	GGCCUGUAGUUAUCAGUAA	3'UTR	Q
72-2				GCCUUGAUUAACCAAAUAA	3'UTR	Q
73-1	PININ	PNN	NM_002687	GGAUUACCUUUCUUGUAA	3'UTR	Q
73-2				GCAGAAGAUUUCUUGAUAA	3'UTR	Q
74-1	pK1.3 / C22orf19	THOC5	NM_003678 / NM_001002877 NM_001002879 NM_001002878	GAGAGUGCCUAUCACAA	ORF	Q
74-2				GACUUUGAGCGACUAUGUA	ORF	Q
75-1	PRP18	PRPF18	NM_003675	GGACUUAUUUUUUCAGUA	3'UTR	Q
75-2				AGUUGUGGUUAGAUUA	3'UTR	Q
76-1	PSF	SFPQ	NM_005066	GGCAAAGGAUUCGGAUUUA	ORF	Q
76-2				GGUGUAAGACAAUUGGUA	3'UTR	Q
77-1	RNPS1	RNPS1	NM_006711 / NM_080594	CGUUCAGUGGUCUUUCA	3'UTR	Q
77-2				GGAAUGUGACAAAGGAUCA	ORF	Q
78-1	SF1	SF1	NM_004630 / NM_201995 NM_201997 / NM_201998	CAGAGAUGGUUCACUCAA	ORF,ORF,ND,ORF	Q
78-2				GGUCUUCUGCUGCAAUUUA	3'UTR,3'UTR,ND,3'UT	Q
79-1	SFRS10	SFRS10	NM_004593	CGAUCUGAAUUCUAGGUCUA	ORF	Q
79-2				GGUAUUUCUGAAGAUCGAA	3'UTR	Q
80-1	SFRS14	SFRS14	NM_014884 NM_001017392	GAAUGUUGUUUAUCAUUUA	3'UTR,ND	Q
80-2				GACAUUGACAUAGACAA	ORF	Q
81-1	SRM160	SRRM1	NM_005839	GAAUAAAUUUUUAAAUUUA	3'UTR	Q
81-2				GGUUUAUUAUUGAUGUUA	3'UTR	Q
82-1	SRM300	SRRM2	NM_016333	GGGACUGGAGGUUGUUA	3'UTR	Q
82-2				GUGAGUUUCUCCUGGUUA	3'UTR	Q
83-1	SRp30c	SFRS9	NM_003769	CAAUUUCACUCAAUUGUUU	ND	Q
83-2				GGUAUUUCUGAAGAUCGAA	ND	Q
84-1	SRp40	SFRS5	NM_006925	GAAUUAGUUUAUUGCCUUA	3'UTR	Q
84-2				GGGUGUCCUCCACUCUUUA	3'UTR	Q
85-1	SRp55	SFRS6	NM_006275	CGUUCUAGAUCUCGCUCAA	ORF	Q
85-2				GGAGUUAUCUAGGUUAGCAA	3'UTR	Q
86-1	TAT-SF1	HTATSF1	NM_014500	UAGUUACAUAUGCAAGUAAA	3'UTR	Q
86-2				GAUGAUUUUAUUCUUUA	3'UTR	Q
87-1	THOC1	THOC1	NM_005131	CGGCGAGACAAACUUGUAA	ORF	Q
87-2				GACGGGAAUAGAGGUUA	ND	Q
88-1	THOC2	THOC2	NM_020449	GAGCCUGAAGGGAAACAA	ORF	Q
88-2				GCUCUAUGACCAGUGUCAU	ORF	Q
89-1	THOC3	THOC3	NM_032361	GAAUUGAGCAUUUAUAAA	3'UTR	Q
89-2				AGUUGGUUAAAUUGUAAA	3'UTR	Q
90-1	TPX2	TPX2	NM_012112	GGCUAAAUAUUGAUGUUA	3'UTR	Q
90-2				ACCGUAAUUUAUAGUUUA	3'UTR	Q
91-1	U1-70K	SNRP70	NM_003089	GAUUGAGCGGCACAGCAA	ORF	Q
91-2				GGAGAAACUGCCACAUGAA	ORF	Q
92-1	U1-A	SNRPA	NM_004596	CUGUUAGCCCGGAUUAAA	3'UTR	Q
92-2				CGCAGAACCAACCCAUGAA	ORF	Q
93-1	U1-C	SNRPC	NM_003093	GACUAAUUCAGAAAUGGA	ORF	Q
93-2				GCAGUGGAGGAAACACAA	ORF	Q
94-1	U5-40K/PRPF8BP	WDR57	NM_004814	GGCCCAAUGUGACAAAUUU	3'UTR	Q
94-2				GCUUCUUUGGGUUUUUA	ND	Q
95-1	WTAP	WTAP	NM_004906 / NM_152858 NM_152857	GGUUCGAUUGAGUGAACA	ORF	Q
95-2				GCAAGUACACAGAUUUUA	ORF	Q
96-1	Y14	RBM8A	NM_005105	GGUCUAGGGUUAAGGAUUA	3'UTR	Q
96-2				CAGUAAUUAUUGGUAAA	3'UTR	Q
97-1	DNP1	PRKDC	NM_006904	GCUAAGUAUAGUUGAUGUA	3'UTR	Q
97-2				CAGGCUUACCAAAGUUAUUA	3'UTR	Q
98-1	KIAA0164	BCLAF1	NM_014739	GGAGGACCCGAAAGAUACA	ORF	Q
98-2				GAGGAAGCAUACCCGUUA	ORF	Q
99-1	PRP43	DHX15	NM_001358	GAAAGUAGUUCUAUUAUUA	3'UTR	Q
99-2				UUCUGAUUUCAUAAUUA	3'UTR	Q
100-1	XTP2	BAT2D1	NM_015172	GAACUGGCCACUAAUUUA	3'UTR	Q
100-2				AGAUAAUGCUGGCAGCCAA	3'UTR	Q
101-1		SAP18	NM_005870	CGGGAUUGUAUGAAUCAA	3'UTR	Q
101-2				CCUUUAGUUUUGUACAGUA	3'UTR	Q
102-1	KIAA0700	SIN3A	NM_015477	CAUCUAAGAUCACCCAUUA	3'UTR	Q
102-2				CCUGUGGCCUAAAUUUCAA	3'UTR	Q
103-1	TRAP150	THRAP3	NM_005119	GCUUUACUAAAUACUAAA	ORF	Q
103-2				CGAGGUAJAUUCGAGAGAAU	ORF	Q
104-1	AAH05870 / MGC4238	MORG1	NM_032332	GGAAGGACUUCAGAUACCA	3'UTR	Q
104-2				CAGACAUGGAAGGACUUA	3'UTR	Q
105-1	CPSF100	CPSF2	NM_017437	CAGUAAUUCAGACUCGAA	3'UTR	Q
105-2				GAUUUAUGUGUUAAUGCAA	3'UTR	Q
106-1	CPSF160	CPSF1	NM_013291	CCAUGUACGCCGUGUACAA	5'UTR/ORF	Q
106-2				GGGAAGACUCCCAUGAU	ORF	Q
107-1	FBP11 / FNBP3	PRPF40A	NM_017892	GAUUAAAAGGUGGCAUUUA	3'UTR	Q
107-2				GGCUAUUGUGAGGGCAUUA	3'UTR	Q

siRNA-ID	Protein Name	Offizielles Gen-Symbol	Accession Nummer(n)	mRNA Ziel-Sequenz (19mer, 5'-3')	siRNA Ziel-Region	Syn.
108-1	HDB / DICE / DDX26	INTS6	NM_012141	CUAUCUUCUCAAUAUCAA	3'UTR	Q
108-2				GGCUAUUUUGAAUACUAAA	3'UTR	Q
109-1	hUPF / RENT1	UPF1	NM_002911	GGAGCGCUGCACACCGAAA	3'UTR	Q
109-2				GGGCCUUCAUUUAAAAGAAA	3'UTR	Q
110-1	KIAA0560	AQR	NM_014691	GAGUGUGUCUGUAUAUCAUA	3'UTR	Q
110-2				GGAGGACAUGGCAGUCAAA	3'UTR	Q
111-1	NY-CO-10	SDCCAG10	NM_005869	GUGGAAUGAUGUAAGCAAA	3'UTR	Q
111-2				GCUGGAAUUGUCCUACAA	3'UTR	Q
112-1	Q15002/KIAA0073	PPWD1	NM_015342	AGAUCAUUUUCAAAGAUA	3'UTR	Q
112-2				UAAUGUACUUGCAAAUAAA	3'UTR	Q
113-1	Q9BRR8	GPATC1	NM_018025	GGCUCGUCUAGAUAUCAUU	3'UTR	Q
113-2				GACUGAACAGUUUAUUUA	3'UTR	Q
114-1	TFIP11	TFIP11	NM_012143 NM_001008697	GGAAAGAUUCUGAUGACGAA	ORF	Q
114-2				GCAUUGUGAUCUACAUCGA	ORF	Q
114-3				GGAAAGAUUCUGAUGACGAA	ORF	Q
114-4				CGGCGAGACAACCCUGUAA	ND	Q
117-1	CLK1	CLK1	NM_004071	CGAUAGUAAGGAGCAUUUA	ORF	Q
117-2				GUUUUUCACACACAGUAUA	ORF	Q
118-1	SRPK2	SRPK2	NM_182691 NM_182692	CCAGUACAUUGGACCUAAA	3'UTR	Q
118-2				ACGUGUUAUUUGUGUGGAA	3'UTR	Q
119-1	SIP3	GEMIN7	NM_024707 / NM_001007270 NM_001007269	CGACAGGAGUCCRGAUAAA	3'UTR	Q
119-2				CCUUCAGCCAAUAAAGUA	3'UTR	Q
126-1	p80-coilin	COIL	NM_004645	GCAUUUAAAUGACGUGGUA	3'UTR	Q
126-2				CCAGCAAGUAGAUAUAGAA	3'UTR	Q
127-1	ELG protein/HSA277841	HSA277841	NM_018553	GAUUUGAAUUGUUGCGGAA	3'UTR	Q
127-2				GAGCCGGUUAAGUAACUUA	3'UTR	Q
128-1	TNRC15	TNRC15	NM_015575 NM_015575	GGAAAGAAUUGUUAACGCAA	ORF	Q
128-2				GCAUGAAUUUAUACGCUCA	ORF	Q
129-1	hsp27	HSPB1	NM_001540	CAAAUAAAAGUUCAAAGCAA	ORF	Q
129-2				CAAAGCAACCACCUUAAA	ORF	Q
130-1	hBRR2	ASCC3L1	NM_014014	GGUUGUGACCCAGUCUAAA	ORF	Q
130-2				GGGUCAGCAUAAAUAUCAUA	ORF	Q
131-1	RNPC2 (CC1.3)	RNPC2	NM_004902 / NM_184234	CAUUCUCCUAAAUAUAGUA	3'UTR	Q
131-2				GGAUUCUACUGUCAUUUGUA	3'UTR	Q
132-1	DNAJ homolog	DNAJC6	NM_014787	GGUUUAAAUGAAACAUUA	3'UTR	Q
132-2				CCGUUAAAGUUAUCUACUGAA	3'UTR	Q
133-1	SF4 (F23858)	SF4	NM_172231	CGAGUGCCGUGCCGUGUAA	3'UTR	Q
133-2				CAGAGUACAAGGAGUUCAA	3'UTR	Q
134-1	FLJ10839	CCAR1	NM_018237	GGUGUAAAUAUUGUAAUA	3'UTR	Q
134-2				AAUAAAGUUAUCAGUUUA	3'UTR	Q
135-1	RBM5	RBM5	NM_005778	CCUUGUGUAUUUUGUUAUA	3'UTR	Q
135-2				GUGUACAUAUAGUUAUUGUA	ORF	Q
136-1	FBP21	WBP4	NM_007187	CUAUUACUAUUAUACAGAA	3'UTR	Q
136-2				CGUUUGGGUAGAAGGUUA	3'UTR	Q
138-1	U5 220K	PRPF8	NM_006445	GCCCAUCAACGGAGCCAUUC	3'UTR	Q
139-1	U11/U12 48K	C6orf151	NM_152551	CGUUUUUUUGUGAUCUAA	3'UTR	Q
139-2				GGUGAAUUGUAGUAGGAA	ORF	Q
140-1	Kin17	KIN	NM_012311	GAGGUUAUCAAUAUGUAA	ORF	Q
140-2				GCUUUAUUGUGGUAUAAU	ORF	Q
141-1	SNIP1	SNIP1	NM_024700	CGAAGUCCUCACCACUCA	ORF	Q
141-2				UGGUGGCAACAACAAGAA	3'UTR	Q
142-1	SmB/B'	SNRPB	NM_003091 NM_198216	CCUGGUUAUGAGACUCCUA	3'UTR	Q
142-2				GGACCUCCUCCAAAGUA	ORF	Q
143-1	SmD2	SNRPD2	NM_004597 NM_177542	GGUUCUGACUGGCCGCGAA	ORF	Q
143-2				GGUUUGAAUUCAGACUGCCU	ORF	Q
144-1	SMD1	SNRPD1	NM_006938	GAGCUGUCUAUUUAGUUA	5'UTR	Q
144-2				CGCUGAGUAUUCGAGGAA	5'UTR	Q
145-1	SmF	SNRPF	NM_003095	CAGUGAUGGUAACUUA	5'UTR	Q
145-2				GGUGUAUUAUUGUCCUUA	5'UTR	Q
146-1	Snurportin	RNUT1	NM_005701	GAUCCACAUAUAAAUAUA	3'UTR	Q
146-2				AGACUGAUUCCGUAUUCUA	ORF	Q
147-1	PRCC	PRCC	NM_005973 NM_199416	GGUGCUUAUUAUCAGUUUA	ORF	Q
147-2				GGUUGUCUGUUAUAAA	3'UTR,ORF	Q
148-1	ECM2	ECM2	NM_001393	GGUGGAAUUGGACCGAAUA	ND	Q
148-2				GAUCAUUGCAUUGUACUA	ORF	Q
149-1	SF2/ASF	SFRS1	NM_006924	CGACGGCUAUGAUUACGAU	3'UTR	Q
149-2				GAAAGAAGAUUAGACCUAU	3'UTR	Q
149-3				UAACUUACCUCCAGACAUC	ORF	Q
150-1	SRp55	SFRS6	NM_006275	ACAUAGGACGCCUGAGCUA	ORF	Q
150-2				UAAUUGAGUUUCGCUCCUA	ORF	Q
150-3				AGACGGUCACGAAGUAGGA	ORF	Q
151-1	SC35	SFRS2	NM_003016	AAAUCCAGGUCGCAUCGA	ORF	Q
151-2				AAGUCCAGAUCCGACGAA	ORF	Q

siRNA-ID	Protein Name	Offizielles Gen-Symbol	Accession Nummer(n)	mRNA Ziel-Sequenz (23mer, 5'-3')	siRNA Ziel-Region	Syn.
AA1	SMN1	SMN1	NM_000344 NM_022874	AAGAAGAAUACUGCAGCUUCUU	ORF	I
AA2				AAGUGGAAUUGGUAACUCUUCUU	3'UTR	I
AA3				AAUGGGUAAACUCUUCUGAUUAA	3'UTR	I
AA4				AACCAAUUGCAAUGUGAAUAUU	3'UTR	I
AC1	GEMIN2	SIP1	NM_003616 NM_001009183 NM_001009182	AAGUGGCACAGUUUUCACUCUU	ORF	I
AC4				AAGUACAGAUUUCACACUCUU	3'UTR	I
AC5				CAGCCUAAACUCUGAGGAAAACAA	3'UTR	I
AC6				AAGGCUGGAAGAAUUUUGUCUG	ORF	I
AD2	GEMIN3	DDX20	NM_007204	AAUUUUUGGACAUAGAGCUGAA	3'UTR	I
AD3				AAGUUUCAGGGUGCCAUUUUCUA	3'UTR	I
AD5				AAGCUUUUAGAAGAAGGCAGCUU	ORF	I
AD6				GAGCUUAAAGUUUCAGGGGCCA	3'UTR	I
AE4	p1Cln	CLNS1A	NM_001293	AACAAGUUGUCACCAGCAGAAGA	3'UTR	I
AE5				AAGAAUUGAUGUGGAAGCACAU	ORF	I
AE6				CAGUUUUUCUGAGACAGACUA	3'UTR	I
AE7				CAGAAGAUAGAUAAUUGACCUU	3'UTR	I
AF4	PRMT5	PRMT5	NM_006109	AAUCUUAUGAGACCCUAGGCCAG	3'UTR	I
AF5				AAGACUAUCUGCAGUCCCGCUU	ORF	I
AF6				AAGCCACCAUCUAUGAAGACCU	3'UTR	I
AF8				AAUUAGUCUGGAUUUGAAGCUA	3'UTR	I
AH1	U5-15.5K	TXNL4A	NM_006701	AACGGCUGGCAGGUGGACCAAGC	ORF	D
AH2				AAGAUGGACGAGGUCCUGUACAG	ORF	D
AH3				AAUUGUCUGGAGCCUUUUUGU	3'UTR	D
AH4				AAGCUUUUAAAGCCUUUGGAAA	3'UTR	D
AH5				AAAGCCUUUGGAAAUAACAGGAA	3'UTR	D
AH6				AAGCUCAGGGCUGGAGCACCUC	3'UTR	I
AH7				AAGCAGGAGUUGUGGACAUCAU	ORF	I
AJ2	U5-52K	CD2BP2	NM_006110	AAGUGUCUCAGGCAGCGAGGAAA	3'UTR	I
AJ3				CAGCCAGGAAAUUGGAGGCCAUU	3'UTR	I
AJ5				AAGGGUUUGGGUGUCAGACCU	ORF	I
AJ6				GAGGCACCAAGUGUCUCAGGCAG	3'UTR	I
AK1	Snu114 Snrp116 KIAA0031 U5-116KD	EFTUD2	NM_004247	AAAGCGCUAUGACCAAGAUCUGU	ORF	D
AK2				AAGACUCCAGAUUUGCACCUG	ORF	D
AK3				AAAAGAGAGAGCUUGGGCUCAC	3'UTR	D
AK4				AAACCCCAAGGGCCUUAUCUUU	3'UTR	D
AK5				AAGGGCCCUAUCUUUGGAAUUU	3'UTR	D
AK6				AAGCCCAAGAUUGAGCACACCUA	ORF	I
AK7				GAGCCCCAGUGAGAGAGGAGCAU	3'UTR	I
AK8				GAGAGAGGAGCAUUUGCCUCCU	3'UTR	I
AK9				GAGGAGCAUUUGCCUCCUGCUU	3'UTR	I
AK10				AAUUGAGACCCUUUGGGAUUC	ORF	I
AL5	hPrp6 U5-102K; PRP6F	PRPF6	NM_012469	AAGCUACAAGUAGCUCGGAACCU	ORF	I
AL6				GAGCGGUUGCCAUGGCCGGUCUC	3'UTR	I
AL7				CAUGGCCGGUCUCCGUGGGCAG	3'UTR	I
AL8				CAGGGUUGGGCCGCAUGUGGAAG	3'UTR	I
AM5	Prp4p	PRPF4	NM_004697	AAGUUCGAGAUUGAAGGCAU	ORF	I
AM6				AAUGGAAAAGGACUUGAACCUC	3'UTR	I
AM7				AAGGACUUGAACCUCAAGCUCUC	3'UTR	I
AM8				AAGGAGCUGUUUCCUCAACGA	3'UTR	I
AN1	Prp3p	PRPF3	NM_004698	AAGCUCGAAUCCAAGCCAGCUG	ORF	I
AN2				AACUGGCCAAGCAGACACUGGG	3'UTR	I
AN3				AAGCAGACACUGGGACAAAGGGA	3'UTR	I
AN4				AAGGGAGAAUUCUUGCUCCCU	3'UTR	I
AP4	Snu66 MGC2038 SART1259	SART1	NM_005146	AAAGCUCCCUCCUUAUUUUUCA	3'UTR	I
AP5				AAGCUGGGGAAAGUAAAAGCCCU	ORF	I
AP6				AAGAGUUUGGUGUCAGCACUCUG	ORF	I
AP7				AAGAAGCCUGACUACUGCCCUA	ORF	I
AR4	U4/U6.U5 65 kD CGI-21 HSPC332	USP39	NM_006590	AAACAUAAGCCUUGGGAUUCU	3'UTR	I
AR5				AAGUUGCCUCCAUAUCUAAUCUU	ORF	I
AR6				AAGCCUUGGGAUUCUUGGAGCAA	3'UTR	I
AR7				AAGCAGAAAGCCAGUAACUUCGC	3'UTR	I
AS1	SAP14 CGI-110 HSPC175 SF3B14a	SF3B14	NM_016047	AAGAAUGCAUGUGAUCACCUAUC	ORF	D
AS2				UAAAUCCACGAAUGACAACUAC	3'UTR	D
AS3				GAGGAACAGUUGAAGCUUCUCAA	ORF	I
AS4				AAUCCACGAAUGACAACUACCA	3'UTR	I
AS5				CACGAAUGACAACUACCAACUUU	3'UTR	I
AS6				AACUACCAACUUUUUUUCCUUUU	3'UTR	I
AT1	CYPH CYP-20 MGC5016	PIIH	NM_006347	CAGUUCUGCACCCGGAGAUAUCU	ORF	I
AT3				AAGACUGAAUCAGGCCUUCUUUU	3'UTR	I
AT4				AAUCAGGCCUUCUUUUUUUUUU	3'UTR	I
AT5				CAGACAAAGACUGAAUCAGGCCU	3'UTR	I

siRNA-ID	Protein Name	Offizielles Gen-Symbol	Accession Nummer(n)	mRNA Ziel-Sequenz (23mer, 5'-3')	siRNA Ziel-Region	Syn.
AU5	hPrp 24; TIP110 KIAA0156 MGC138188	SART3	NM_014706	AAGAUGAGUGAAAUCUUUCCUU	ORF	
AU6				AAGGCUGGCAGAAUAUCAAGCAU	ORF	
AU9				AAGUAAUUUCUGUAACCUUCGAG	ORF	
AU10				GAGAAAGCUUUGAAUCCCGGCUU	ORF	
AW4	GEMIN4	GEMIN4	NM_015721	AACAUGGCAGGUCUGUAGGGGUC	3'UTR	
AW5				AAGGGAUCCAGUGGCUGUCUU	ORF	
AW6				CAGGUCUGUAGGGGUCAGACCCG	3'UTR	
AW7				UAGGGGUCAGACCCGAGCAGCCU	3'UTR	
AX2	WD45 MEP50	WDR77	NM_024102	AAAGCAAGUCCCCCAUGAGUGUC	3'UTR	
AX3				AAGUCCCCCAUGAGUGUCACUU	3'UTR	
AX5				AAGCCAGCAUCAAGAUUGGCUG	ORF	
AX6				AAGACAAAAGCAAGUCCCCAU	3'UTR	
BA1	GEMIN6	GEMIN6	NM_024775	AAGCAUACAGCCCAGAGGAUCUG	ORF	
BA2				AAGUGGAAACAUAUCUGAUGAAA	3'UTR	
BA3				AACAUAUCUGAUAAGAAAAGACUA	3'UTR	
BA4				AAGACUAUUUUUAUCCCUCAUA	3'UTR	
BD2	hLSm4	LSM4	NM_012321	AAGCAGCAGAAAGGCCCGCGCAU	ORF	
BD3				CAGAAAGGAAGAGGCAGGCCCA	3'UTR	
BD4				CAGGCGCCAGGGGGAACCCUUU	3'UTR	
BD5				CAGGGGGAACCCUUUCUGUUUU	3'UTR	
BD6	AACGCCGCUCCAAAGCUGGCUU	3'UTR				
BE2	hLSm8	LSM8	NM_016200	AAGAAACAGAUUCUGCGUUGAU	ORF	
BE3				AAAUCUUUGUACAGAAACUGAAU	3'UTR	
BE4				AACUGAAUUUUCUGAGGAUGAUA	3'UTR	
BE5				GAGUUUUUAUGAGUGUGUCAUG	3'UTR	
BJ1	GEMIN5	GEMIN5	NM_015465	AAGAAGAGAAAAGCUCGUUCCUU	ORF	
BJ2				UAGAUUUUUUUGCAGUAAUCCAA	3'UTR	
BJ3				AAGGAUUAAAGUUAGAAUACACC	3'UTR	
BJ4				AAGUUUGAAUACAACCCUGCCUAC	3'UTR	
BJ5	AACCAUUCGAAUCUGGAGCUGUU	ORF				
BK1	SF3B5 SF3b10	SF3B5	NM_031287	GAGAGCAAAGCCGAGUCGCUU	ORF	
BK2				CAUGGCUCUCGCGCCUCGUGCUU	3'UTR	
BK3				UACAGAAAGUCUUUCCCGGGGAG	3'UTR	
BK4				AAGUGCUUCCCGGGGAGUCCCG	3'UTR	
BL1	PHF5A SF3b14b	PHF5A	NM_032758	AAGUGUGUAUUUGGACUCCUA	ORF	
BL2				CAGCAGAAAGGGAGCAGAGCCCA	3'UTR	
BL3				GAGCAGAGCCAGAGCAUCCCA	3'UTR	
BL4				CAGAGCAUACCCAGGAGUCCUG	3'UTR	
BM1	DDX42 Sf3b125	DDX42	NM_007372 NM_203499	AAGGUGGGCCUAUACCCUACUC	ORF	
BM2				AAGUGUAAGGACCCUCCUCCUU	3'UTR	
BM3				AAGGACCCUCCUCCUUAUGUGGA	3'UTR	
BM4				GAGAGCUGGAGCUUGGAGCAUU	3'UTR	
BN1	U11/U12-20kD	ZMAT5	NM_019103 NM_001003692	AAGAGAGCCAAAGCGCUGAGCUC	ORF	
BN2				UAGGAAGCCAAGCCCGUUCUG	3'UTR	
BN3				AAGCCCGGUUCCUGCUACGCCCC	3'UTR	
BN4				GAGGCUCGAGACCAUCUGCCA	3'UTR	
BR1	U11/U12-65kD	RNPC3	NM_017619	AAGAAGACUCUGAUGAAUGCCU	ORF	
BR2				UAGAAAUUGUUGUCCUCCCCCA	3'UTR	
BR3				AAUGUUUGUCCUCCCCACCUG	3'UTR	
BR4				CACCUUGUAGUCCAGGUUAAGGA	3'UTR	
BS1	U11/U12-35kD	U1SNRNPBP	NM_180703 NM_180699 NM_007020 NM_022717	AAGGGUGGAUCCUCGGCGACUU	ORF	
BS2				GAGGCCAACACAGAGAACCCTAA	3'UTR	
BS3				AACAGCAGAACCCAAAGUGAAG	3'UTR	
BS4				AACCCCAAAGUGAAGUUACAGUG	3'UTR	
BT1	DDX46 Prp5	DDX46	NM_014829	AAGUUACCUCUAAGGAAGCUCUG	ORF	
BT2				AAGAUUUUUACCGUGCUGGUCU	3'UTR	
BT3				GAUGUAUGGGCAGUUGCUGUCU	3'UTR	
BT4				CAGUUGCUGUCGAGUUUACAA	3'UTR	
BU1	DNAJC8 SPF31	DNAJC8	NM_014280	AAGACUGACCCGUCCUGGUUCCU	ORF	
BU2				CAGAACCUUCCUCCUGCUAUCUC	3'UTR	
BU3				UAUCUCCUCCUCCUGCUUGAAGG	3'UTR	
BU4				AAGGACUCAUUUUUCCUCCAC	3'UTR	
BW1	CHERP	CHERP	NM_006387	CAGCCUCCGACCCCAACAACUU	ORF	
BW2				GAGGAAGAUUGCAGUGACAGCUC	3'UTR	
BW3				GACAGCUCAGUUUUACACCCGUC	3'UTR	
BW4				CAGUUUUACACCCGUCUCCACUU	3'UTR	
BX1	U11/U12-59kD	PDCD7	NM_005707	AAGCAGCCGCUAUGGCGUACUA	ORF	
BX2				CAGGAARAGGACUUAGGGUAGACUG	3'UTR	
BX3				UAGGUGAACUGAGGUUUUUACCA	3'UTR	
BX4				CAGUGAAUGACCUUGGUUACCA	3'UTR	

siRNA-ID	Protein Name	Offizielles Gen-Symbol	Accession Nummer(n)	mRNA Ziel-Sequenz (23mer, 5'-3')	siRNA Ziel-Region	Syn.			
CA1	RBM17	RBM17	NM_032905	AAGAGUUACCCCGCGAUUUUCCU	ORF				
CA2				UAAGAACUAGAGCAGGUCUAUC	3'UTR				
CA3				GAUCCUUAAAUGAACUGCAGGCU	3'UTR				
CA4				GAGAAAAGAGGAAAAGGUCAC	3'UTR				
CC1	U11/U12-25kd	C16orf33	NM_024571	AAGUCAACUCCCAAUAGCCCUA	ORF				
CC2				GAUUCUUCGUGCCUUCUUCACAG	3'UTR				
CC3				CAGAAAGGACGUGUGGGCCCU	3'UTR				
CC4				AAAGGACGUUGUGGGCCUCAC	3'UTR				
CD1	SR140	SR140	XM_031553	AAGCAACGGGUAUUGACUUGCUU	ORF				
CD2				UAAGAUGCUGUCACUUAUUGGAA	3'UTR				
CD3				AAAUUGCAUUUUGUUUGUGCCUG	3'UTR				
CD4				GAUUUGUUUUGGCCUGAACGGU	3'UTR				
CE1	DDX15 PRPF43	DHX15	NM_001358	AAGAAAGCCCGCAGUAGGCCAA	ORF				
CE2				GAACUCAAAAAGUUCGAGUUGGC	3'UTR				
CE3				GAGUUGUCUUCUUCACGUGGUU	3'UTR				
CE4				CACGUGGUUCGAUUAUGGCCUU	3'UTR				
CF1	U11/U12-48kd	C6orf151	NM_152551	AAGAGGAUGAAUGUUAUUAUCCU	ORF				
CF2				AACUCGAGUUGGAAAGACAGUG	ORF				
CF3				AAAGAUUAGCAGUAUCCUUUUUG	3'UTR				
CF4				CAAUUGAUUAUCCUUUAAAAGUA	3'UTR				
CJ1	hLSm2	LSM2	NM_021177	AAGAACUGCUUCAUUCGGGGCUC	ORF				
CJ2				AAGUCCAGCCAGAACCCCUAA	3'UTR				
CJ3				CAGCCAGAACCCCUAACCCCA	3'UTR				
CJ4				AACCCCAUUAUCUUAAGGGGUU	3'UTR				
CK1	hLSm3	LSM3	NM_014463	AAAUAGAAAAGACCGAGAGCUU	ORF				
CK2				AAGAGAAACCGCAUACAUUUUG	3'UTR				
CK3				AAGAAAUAUUCGGGGAAUUCUU	3'UTR				
CK4				AAUUCGGGGAAUUCUCCACUCC	3'UTR				
CM1	hLSm6	LSM6	NM_007080	CAGUACACAGAAGAGACGGAUGU	ORF				
CM2				AAGACACCAAGAGAGACACGUU	3'UTR				
CM3				AAGAGACCAACCGUUUUCAUAGU	3'UTR				
CM4				AACGCUUUUCAUAGUUGGAUUA	3'UTR				
CN1	hLSm7	LSM7	NM_016199	GAGGCCAUCCCAACCCUUCAU	ORF				
CN2				CAGGCCAGCCCGAGCAGCUCGG	3'UTR				
CN3				CAGCUCGGUUUCCCGGACUUG	3'UTR				
CN4				GACUUGGUCGUCUCCACCUGC	3'UTR				
CP1	SNU13	NHP2L1	NM_005008 NM_001003796	AAGAAGGUCGACGCUAAACAG	ORF				
CP2				GAGGUUGUUAUCAUUAUUCU	3'UTR				
CP3				UAUCUGUUAUAGCAUGUAGUAU	3'UTR				
CP4				CAUGUAGUAUUUCAGCUACUCU	3'UTR				
CR1	CPSF 160 kd	CPSF1	NM_013291	CAGGAACCAAGGCUUUCGCGUU	ORF				
CR2				AAGGUCCUCACACAUCUACU	ORF				
CR3				AAGAGCAUUUCGUCGCGCUA	ORF				
CS1				AAGAGGAUCUAGGAGAAACCCUC	ORF				
CS2	Xrn1	Xrn1	NM_019001	AAAUAUUCUAUUGGCUUACUGG	ORF				
CS3				AAAUCUACAGGGUACAUAUAU	3'UTR				
CS4				UAGUAAAUAUUGUUCAAAUCUA	3'UTR				
CT1				AAGCCAUACAACGGGCAUUCUU	ORF				
CT2	PRPF8	PRPF8	NM_006445	CAGGCCGUCGACAUUCAGCAGUU	3'UTR				
CT3				GACAUUCAGCAGUUUGGCCUUCU	3'UTR				
CT4				CAGCAGUUUGGCCUUCUUCUUC	3'UTR				
CU1				AAGAAAAGUUCAGGCGGGCCUG	ORF				
CU2	PRPF3	PRPF3	NM_004698	CAGUCCUCACUUAUUCUUAUU	3'UTR				
CU3				UAUUUCCCAACCCUCCACUU	3'UTR				
CU4				AACCCCUCCCAUUGUUUGUGU	3'UTR				
CW1				hAar2 CGI-23	C20orf4	NM_015511	AAGUGGAUCUCACUACCAACUU	ORF	
CW2	AAUCUCUCCAGGUCCUGCAAAGA	3'UTR							
CW3	CAGGUCUGCAAAGAUGGAGCCA	3'UTR							
CW4	AAAGAUGGAGCCAGAAUUCUUU	3'UTR							
DE2	TIP49	RUVBL1	NM_003707	AAGAGACUCCCAAGGUGGCCUG	3'UTR				
DE3				AAGGAACCAAACAGUUGAAACUG	ORF				
DE4				GAGUCUUCUAUCGCUCCUACUGU	ORF				
DD2				TIP48 CGI-46	RUVBL2	NM_006666	CAUCCCCGACCCACCCUGUUU	3'UTR	
DD3	GAGACCAUCUACGACCUUGGGCAC	ORF							
DD4	GAGAGUACAUUGCCGUUCUUCU	ORF							
DN1	hDcp2	DCP2	NM_152624				AAAUAUGGAGUACCAACAUAUGG	ORF	
DN2				AAGACUAUAUUUGUAAGGAUGAU	ORF				
DR1				hDcp1; SMIF SMAD4IP1; HSA275986	DCP1A	NM_018403	AAGACUGAUUAAGAGGGACUUU	ORF	
DR2							AAGAGGAGACACGGGCAUCCAG	ORF	
DT1	hLSm5	LSM5	NM_012322	AAUGCUGGUUCCUGGAGGAGAAG	ORF				
DT2				AAGUUUCCCGUUAAGGGAAAGU	3'UTR				
DT3				AAAGGGAAGUGCUUUUGAAGUUG	3'UTR				
DT4				AAGUCUUUGAAGAUUGUACCC	3'UTR				

siRNA-ID	Protein Name	Offizielles Gen-Symbol	Accession Nummer(n)	mRNA Ziel-Sequenz (23mer, 5'-3')	siRNA Ziel-Region	Syn.
EA1	U4/U6 61 kD	PRPF31	NM_015629	AAGCCAAAGCUUCAGGAAGUGAUG	ORF	I
EA2				CAGUAUGGGCUAGAGCAGGUCUU	3'UTR	I
EA3				AAGGGACACAGAGGUCCAGUCCU	3'UTR	I
EC1	U5 40 kD	WDR57	NM_004814	AAGACUCCAAGGCCGCUUGUCUU	3'UTR	I
EC2				CAAAUGUUUGAUGUCCAGGCUAG	3'UTR	I
EC3				CAGGAUGAUCUAGGCAAGCUUCC	3'UTR	I
ED1	PRPF28 MGC8416 U5-100K	DDX23	NM_004818	GAAGCCAGACACGGAUGAGGCGU	ORF	I
ED2				AAAACAAUCCAACUCCUAGGCC	3'UTR	I
ED3				GAGGACGACGUCUGCGAGGCAG	3'UTR	I
EE1	Y14	RBM8A	NM_005105	CAAGAUUCCAUUUGACCAUGCAG	3'UTR	I
EE2				CAGGCGAACAGGAUAUCUGAAGG	ORF	I
EF1	ALY BEF	THOC4	NM_005782	GAACAUCAGCUUGUCAGGUCAC	ORF	I
EF2				GAAGGUGGCUUCCACCUUUUC	3'UTR	I
EF3				CAGACCAGCAAUCCCGGUGCGG	3'UTR	I
EJ1	Nop56	NOL5A	NM_006392	GAGUGGUACGGUAUCACUUUCC	ORF	I
EJ2				CAUAUUGAUAUCCAGUCCAUUA	ORF	I
EJ3				GAAUGCAAUUGGACAUUCUCUGG	3'UTR	I
EK1	HSPC120	NOP5/NOP5	NM_015934	CAAGCAUGCAGCUUCUACCGUUC	ORF	I
EK2				UAACUUCAAACCUAUUUUGUCUUG	3'UTR	I
EN1	Fib1 FIB FLRN / RNU3IP1	FBL	NM_001436	CAAGCUAGCAGCAGCAAUCCUGG	ORF	I
EN2				CAGUCGAGUUCUCCACCGUCUCU	ORF	I
EN3				GAUGUGUGUUGAUAUCUGUUCAC	3'UTR	I
ER1	La LARP3	SSB	NM_003142	CAGAAAGGUCUCCAAAGCAAACCC	ORF	I
ER2				GAAUUAGGUCCACUUCUUAUGUCC	3'UTR	I
ER3				AAGAUCUUCCAAUAUAAUUGCCU	3'UTR	I
ES1	PLK; STPK13	PLK1	NM_005030	AAAGAGACCUUACUCCGGAUCA	ORF	I
EW1	Snurprotein KPNBL	RNU1	NM_005701	CAGACUGAUUCCGUAUUCUACUG	ORF	I
EW2				GAGGUUCCAGAUUUGGUAUGCAU	3'UTR	I
EX1	DAN	PARN	NM_002582	CAGUGAAUUCGUGUUGUCUCUUG	3'UTR	I
EX2				CAGUUGCAGCCUCGUGUUGUCU	3'UTR	I
FA1	Dhh1; P54; RCK HLR2; FLJ36338	DDX6	NM_004397	CAGCUGACUCUCUGCAUUUCA	3'UTR	I
FA2				AAAAGGCUCGUUUGGUAUCUGUA	3'UTR	I
FC1	TAP; MEX67	NXF1	NM_006362	UAGUCCUUGGAUAUACCGUCUG	3'UTR	I
FC2				AAGAUAUGACCUACUUGGUCUCA	3'UTR	I
FD1	MGC8417 MGC18203	DDX39	NM_138998 NM_005804	CAGUGCAUGAUGUUCAGCGCCAC	ORF	I
FD2				CAGGCGCCACUUGGAGAAGCUA	3'UTR	I
FE1	CAF1	CNOT7	NM_013354 NM_054026	GAACGGUAAGGACCAACAUCA	ORF	I
FE2				CAGUACUAAAGUAUGACCGUUCU	3'UTR	I
FF1	CCR4 KIAA1194	CNOT6	NM_015455	CAGACUCUGGUGUUGAUAUAU	ORF	I
FF2				AAUUGUGUAACAGCGUAUUCUC	3'UTR	I
FJ1	Nucleolin	NCL	NM_005381	CAGUAUACAGUCCUGGUCUCU	3'UTR	I
FJ2				AAGGAGUCAUUGACCGCUCUCC	ORF	I
FK1	4E-T	EIF4ENIF1	NM_019843	AAGGAUCACCGUCUUAAGCAUA	ORF	I
FK2				CAGUCGAGUGGAGUGUAUAUUG	3'UTR	I
FN1	EBNA-2 co-activator p100	SND1	NM_014390	UAGCUACAAGCCGUGUUGUGA	ORF	I
FN2				CAGACUGCCUCGUCUCCAGUCU	3'UTR	I
FR1	TGS1	NCOA6IP	NM_024831	AAGAUAUGCCUUGCUCGAAUA	ORF	I
FR2				UAUCACCGUAUGAAUUGGAAACU	3'UTR	I
FS1	PHAX	RNUXA	NM_032177	UAGUAUCAGCGAGGAACAAUA	ORF	I
FS2				AAGAGUAUAUAGCACAGGAUUA	3'UTR	I
FT1	Transportin-SR	TNPO3	NM_012470	AAGACCUUCUCUAAUCCUAUGA	ORF	I
FT2				AAGUGGUCAUCCUUAUCUACAG	ORF	I
FU1	Importin beta 1 IMB1; IPOB	KPNB1	NM_002265	CAGAACAACUAGGAGUUCUCG	ORF	I
FU2				AAGUGGAGUGUGCAGCGAUGC	3'UTR	I
FW1	Transportin	TNPO1	NM_002270 NM_153188	CAGACACGUACCUAGGCAUUA	ORF	I
FW2				CAGUACAACUCCAAUCCUACUGG	3'UTR	I
FX1	GW182	TNRC6A	NM_014494 NM_020847	CAGCAGGGUCGACUUCUUGUGU	ORF	I
FX2				CAGACUCACCGACCGGACCUCA	3'UTR	I
JA1	P15-2	NXT2	NM_018698	UAGUGAGUCCAGGUAUAUAUGU	ORF	I
JA2				CACAUGAUCUUGGUACUAACAUA	3'UTR	I
JG1	Magoh	MAGOH	NM_002370	AAGAGAAUAUUGACGACGAGUA	ORF	I
JG2				GAUCCAGAGGCUUACGAGUAUU	ORF	I
JI1	MGC117332	RNPS1	NM_006711 NM_080594	AAGGCUAUGCGUACGUAAGAUUU	ORF	A
JI2				AAGCUCAUCCGUUUCGUGUUUCU	3'UTR	A
JK1	eIF4E-BP1	EIF4EBP1	NM_004095	AAGGGAUCUGCCACCAUUCGCG	ORF	A
JK2				CAUCGUGUGGAGCAUACCAAGG	3'UTR	A
JS1	Npw38BP	WBP11	NM_016312	UGGGACGGAGAUCAUCAUCC	ORF	I
JS2				UCCCACUGACCUAAACUUUCAGU	3'UTR	I
JT1	Npw38	PQBP1	NM_001032383 NM_001032382 NM_001032385 NM_001032381 NM_001032384 / NM_005710	GCCGAGGACUAUGACGAUGAUCC	ORF	I
JT2				UAAAAGCUUUCUGGUGAUCCUCC	3'UTR	I
JU1	hPRP22	DDX8	NM_004941	UGCCAGCCUGAUUACUGUUAUGC	ORF	I
JU2				CUCAACUCGACUCUCAUUUCUUC	3'UTR	I

siRNA-ID	Protein Name	Offizielles Gen-Symbol	Accession Nummer(n)	mRNA Ziel-Sequenz (23mer, 5'-3')	siRNA Ziel-Region	Syn.
JW1	hPRP19	PRPF19	NM_014502	GGGCACGGAUGUCCAGAUCUACA	ORF	
JW2	PRPF19	PRPF19	NM_014502	UGGGACAUUCACAUCUUUCACU	3'UTR	
JX1	hCLF1	CRNKL1	NM_016652	AAGAAGGAAGUUUGACUAAAUGC	ORF	
JX2	hCLF1	CRNKL1	NM_016652	CUCCAGAGUGGUUGAGUUUGUAA	3'UTR	
KA1	FKJ10290	RBM22	NM_018047	GAGGAGAGGAAUGUCCAUAUCAGA	ORF	
KA2	FKJ10290	RBM22	NM_018047	AUGGAGCUGUGUACCAUCGAGA	3'UTR	
KC1	KIAA0560	AQR	NM_014691	UUCAAUCAGAAGAGCAAAUAACC	3'UTR	
KC2	KIAA0560	AQR	NM_014691	AAGAAGAGGACAGAAUAUCUGG	3'UTR	
KD1	Cyp-E	PPIE	NM_006112 / NM_203456	CGGGACCAGGUCUACUAUCCAUG	ORF	
KD2	Cyp-E	PPIE	NM_203457	AAGCAGCAUUUGGGAUAUGUGCC	3'UTR	
KE1	PPlase-like1	PPIL1	NM_016059	AUGAACCAUAAGUCUGCUUCUUG	3'UTR	
KE2	PPlase-like1	PPIL1	NM_016059	UGUCAGCCUCUUAACUCUGUGC	3'UTR	
KF1	DDX35	DHX35	NM_021931	UGGGACACGGUUGUUUACAACC	ORF	
KF2	DDX35	DHX35	NM_021931	UAGCAGAGGAUUUGUGUUUCACA	3'UTR	
KJ1	PRP16	DHX38	NM_014003	AGAGAACACCUUGAUCAAUAUCA	ORF	
KJ2	PRP16	DHX38	NM_014003	GCGGACAAAGCCUUUCAUCUGA	3'UTR	
KK1	CDC5	CDC5L	NM_001253	AAGGAACUCUACAUAAGAUUUC	ORF	
KK2	CDC5	CDC5L	NM_001253	AAGGCUGAAACUGAUUUUAUCU	3'UTR	
KN1	SPF27	BCAS2	NM_005872	UCGCAGAUACCGACCUACUAAGA	ORF	
KN2	SPF27	BCAS2	NM_005872	AAGACAGUGACUGUACAGUUUUC	3'UTR	
KR1	PRL1	PLRG1	NM_002669	UGGAGAAGCAAACAGUGAAAU	ORF	
KR2	PRL1	PLRG1	NM_002669	CAGUCUGAAAGUCGAUUACUAAC	ORF	
KS1	hSYF1	XAB2	NM_020196	GCGGAACCAAUUCUCUGUCAAAU	ORF	
KS2	hSYF1	XAB2	NM_020196	CAGCUACGUUUGUACAUCAAAA	3'UTR	
KT1	hISY1	KIAA1160	NM_020701	CUGCAGGCCCAAGUGAGAAGC	ORF	
KT2	hISY1	KIAA1160	NM_020701	AGGGGAGAGAAUCAAUAGUGG	3'UTR	
KU1	SKIP	SNW1	NM_012245	AAAGACAAGAGUAGCCUUAGAAA	ORF	
KU2	SKIIP	SNW1	NM_012245	AGGCACAGGUCUCUCCAAAGUGA	3'UTR	
KW1	GCIP p29	SYF2	NM_015484	AUGCAGAUUCGACUACAUAUAU	ORF	
KW2	CCNDP1	SYF2	NM_207170	GUGGAGCUAUCCUCCAUAGUCU	3'UTR	
KX1	MGC23918	CCDC12	NM_144716	AAGACCAAGCAUCUCAGAGAAGA	ORF	
KX2	MGC23918	CCDC12	NM_144716	CUGCCCAUCAAGUCUGAAACCCC	3'UTR	
NA1	G10	BUD31	NM_003910	CAGCAGAGAACUCUAUGAAUAUU	ORF	
NA2	EDG-2	BUD31	NM_003910	GAGCCAACAUCUGGAUGAAUUAUA	ORF	
NC1	CCAP2	HSPC148	NM_016403	AGGGAUCGUCCAACCCGAGAACA	ORF	
NC2	AD-002	HSPC148	NM_016403	UUGAUAAUGGACUUGGGAAUAGG	3'UTR	
ND1	β -catenin like1	CTNNBL1	NM_030877	CGGCCGCUAUCGGGAAGAAGAAA	ORF	
ND2	β -catenin like1	CTNNBL1	NM_030877	AGGAUCAGUUUCACACAACUCU	3'UTR	
NE1	PPP1CA	PPP1CA	NM_002708 / NM_206873	AAGAGACGCUACAACAUAACAACU	ORF	
NE2	PPP1CA	PPP1CA	NM_001008709	AUGGAUUGAUUGUACAGAAAUCA	3'UTR	
NF1	CCAP1	HSPA8	NM_006597	AAGGCAGCGUGCCAUGACAAAAG	ORF	
NF2	hsp 73	HSPA8	NM_153201	AAGACCUA AAAUUCGUAGCAAAU	3'UTR	

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Reinhard Lührmann und Prof. Dr. Thomas Tuschl, die mir die Arbeit in zwei sehr interessanten Themengebieten ermöglichten und hervorragende Arbeitsbedingungen bereitstellten.

Prof. Dr. Albrecht Bindereif danke ich für die Übernahme der universitären Betreuung meiner Doktorarbeit.

Prof. Dr. Klaus Weber und Prof. Dr. Mary Osborne danke ich für die gastfreundliche Aufnahme in ihrer Abteilung und die fortwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Reinhard Rauhut möchte ich herzlich danken, mir den Sprung von Gießen nach Göttingen schmackhaft und möglich gemacht zu haben.

Jens Harborth und Sayda Elbashir danke ich für die gute und frohe Zusammenarbeit zu jeder Stunde des Tages und in der Nacht beim siRNA „Transfizieren ohne Ende“ (S.E.).

Der ganzen ehemaligen Abteilung 090 für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere auch Heinz-Jürgen Dehne, Jürgen Schünemann und Alexander Zimek.

Jens Gruber danke ich herzlich für die relaxte Arbeitsatmosphäre und den „anderen Blick auf die Dinge“ des Laboralltags.

Der RNAi-Starter Truppe aus dem Labor 115b sei gedankt: Tilman Achsel für den guten Beginn bei den „Lührmännern“ und die sehr gute Einführung in die Arbeit mit RNAi. Dierk Ingelfinger für ein jederzeit offenes Ohr, und für viele fruchtbare und anregende Diskussionen abseits des Mainstream. Dies war eine echte Bereicherung. Nina Schaffert danke ich für klare Worte, beispielhaftes zielorientiertes Arbeiten und viel Ermutigung.

Dem erweiterten „RNAi-Team“ mit Ira Lemm, Rebecca Mathew, Regina Hecker, Annemarie Schultz und Nick Watkins sei gedankt für die anregenden Diskussionen, neuen Ideen und die gegenseitige Unterstützung.

Uschi Drössler und Gertrud Nowak für das fröhliche Lachen um die Ecke und immer einem großen Vorrat an Pipetten-Spitzen, Flaschen, Wasser u.v.m..

Bei Patrizia Fabrizio möchte ich mich für die Einführung in Geheimnisse des RNase Protection Assay und die zahlreichen Diskussionen bedanken.

Cindy Will sei Dank gesagt, für die gute Zusammenarbeit, die lehrreichen Diskussionen und die „office-X-mas-parties“.

Tomma Eisbein, Irene Öchsner, Gabi Heyne, Marion Kilian, Heike Behr danke ich sehr für die tatkräftige und kompetente Hilfe und das nette Miteinander.

Juliane Moses sei Dank für jedes erste „Guten Morgen“ des Tages in der Abteilung und jede Hilfe, wo sonst niemand weiter wusste.

Heiko Manninga danke ich für die jahrelange Begeleitung im Tusch-Lab. Außerdem danke ich ihm für den weltbesten Braten aus dem „BBQ Smoker“. Dem Rest des ehemaligen IT-Teams Winfried Lendeckel, Jutta Meyer, Agnieszka Patkoniwa, Marianna Lagos-Quintana, Xavier Martinez, Abdullah Yalcin danke ich vor allem für die freundliche Aufnahme und Unterstützung zu Beginn dieser Arbeit.

Für seinen hilfsbereiten Einsatz zu jeder Zeit, den täglichen „wunderschönen guten Morgen“ und die besondere Unterstützung in der Endphase dieser Arbeit, danke ich Jochen Deckert herzlich.

Klaus Harthmut gilt mein Dank für die Bereicherung des Laboralltags durch Querdenken und seinen österreichischen Akzent. Außerdem danke ich für sein engagierte Hilfe bei der Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen und für manches Fahrradrennen.

Michael Gote, Marc Schneider und Andreas Kuhn danke ich für konsequent: 11:30 Uhr !

Mein ganz besonderer Dank geht an Uta für ihre Unterstützung bei allen Auf's und Abs, und für ihre ausdauernde Geduld.

PUBLIKATIONEN

- 2006 Trippe R, Guschina E, **Hossbach M**, Urlaub H, Lührmann R, Benecke BJ.
Identification, cloning, and functional analysis of the human U6 snRNA-specific terminal uridylyl transferase. *RNA*. 2006 Aug;12(8): 1494-504. Epub 2006 Jun 21.
- 2006 **Hossbach M**, Gruber J, Osborn M, Weber K and Tuschl T.
Gene silencing with siRNA duplexes composed of target-mRNA-complementary and partially palindromic or partially complementary single-stranded siRNAs. *RNAbiology*. 2006 April/May/June; 3 (2): 82-89
- 2004 Watkins NJ, Lemm I, Ingelfinger D, Schneider C, **Hossbach M**, Urlaub H, Lührmann R.
Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol Cell*. 2004 Dec 3; 16(5): 789-98.
- 2004 Schaffert N, **Hossbach M**, Heintzmann R, Achsel T, Lührmann R.
RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *EMBO J*. 2004 Aug 4; 23(15): 3000-9. Epub 2004 Jul 15.
- 2004 Yuan B, Latek R, **Hossbach M**, Tuschl T, Lewitter F.
siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 1; 32 (Web Server issue): W130-4.
- 2004 Will CL, Schneider C, **Hossbach M**, Urlaub H, Rauhut R, Elbashir S, Tuschl T, Lührmann R.
The human 18S U11/U12 snRNP contains a set of novel proteins not found in the U2-dependent spliceosome. *RNA*. 2004 Jun;10(6): 929-41.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten 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.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Göttingen, den 11.09.2008