

Entwicklung von selektiv exprimierbaren RNA (seRNA) Molekülen und Optimierung derselben für medizinische Anwendungen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Frederik Arnold Gerhard Rastfeld

aus

Duisburg

Bonn, September 2025

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachter/ Betreuer: PD Dr. Bernd Hoffmann

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höhfeld

Tag der Promotion: 05.12.2025

Erscheinungsjahr: 2026

Kurzfassung

In weiten Bereichen ist die Behandlung von Krebs noch immer mit großen Nebenwirkungen verbunden. Daher wird an gezielteren, weniger invasiven Therapiemethoden gearbeitet. Durch den erfolgreichen Einsatz von RNA bei der SARS-CoV-2 Impfung, wird großer Aufwand betrieben, RNA auch für Krebstherapien zu nutzen. Allerdings zögen einfache mRNAs als Therapeutikum bei der Behandlung von Krebs massive Nebenwirkungen nach sich, da sie nicht nur in Krebszellen, sondern auch in gesunden Zellen aktiv sind. Daher wurde in dieser Arbeit eine neuartige, selektiv exprimierbare RNA (seRNA) entwickelt. Diese setzt sich modular zusammen aus verschiedenen bereits bekannten RNA Elementen, die in der neuen Kombination eine erweiterte Funktionalität entwickeln. seRNAs beinhalten alle Elemente einer natürlichen mRNA, mit einigen zusätzlichen Modulen. Durch diese Module wird die Translation der seRNA unterdrückt. Stattdessen erfolgt die Translation über eine interne Ribosomenbindestelle (IRES), die durch Interaktion mit einem IRES-Blocker ebenfalls im Vollängen-RNA Molekül inhibiert wird. Werden nun seRNA Konstrukte in Zellen übertragen, verbleiben diese in gesunden Nicht-Zielzellen vollständig inaktiv. In Zielzellen wie Tumorzellen dagegen erfolgt eine Interaktion der seRNA über eine eingebaute Antisense-Sequenz mit einer zuvor definierten, Zielzell-spezifischen RNA. Diese Interaktion resultiert in einer dsRNA die effizient erkannt wird und einen partiellen Abbau der seRNA induziert. Die IRES innerhalb des verbleibenden Teils der seRNA wird aktiviert und zelltypspezifisch in die Lage versetzt, die kodierende Sequenz, beispielsweise ein therapeutisch aktives Protein, zu exprimieren.

In dieser Arbeit wurde der zugrundeliegende Aktivierungsmechanismus der seRNA experimentell nachgewiesen und die Funktionalität seRNA-kodierender Plasmide zunächst *in vitro* demonstriert. Durch Analysen der RNA Sekundärstruktur konnte dabei die spezifische Interaktion zwischen IRES-Blocker und IRES nachgewiesen werden. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die Wirksamkeit in einem *in vivo* Glioblastom Modell untersucht, wobei bereits durch einmalige Behandlung mit seRNA kodierenden Plasmiden eine Tumorremission von über 60% beobachtet werden konnte. Aufgrund insgesamt niedriger IRES-abhängiger Expressionsraten von seRNAs wurde anschließend die Transkription von seRNA kodierenden Plasmiden weiter analysiert und optimiert. Neben der Übertragung mittels Lipidnanopartikeln konnte ich in dieser Arbeit nachweisen, dass auch AAVs als virales Genübertragungsvehikel genutzt werden können, um seRNA Sequenzen zu übertragen. Hierbei bleibt die selektive Expression in Zielzellen unabhängig der eingesetzten Menge an AAVs erhalten. Da sowohl Plasmid- als auch AAV-kodierte seRNAs in der medizinischen Anwendung mit massiven Nachteilen verbunden sind, wurde durch mich die Technologie auch auf Ebene *in vitro* transkribierter seRNAs (IVT-seRNA) etabliert. Ihre Wirksamkeit konnte *in vitro* eindrucksvoll in verschiedenen Co-

Kulturmodellen demonstriert werden. Weitere Optimierung der IVT-seRNA gelang durch Anwendung von translational inaktiven 5'-Cap Strukturen und terminalen Hairpin Strukturen, die die Stabilität und Effektivität weiter erhöhen. Final konnte auch die Wirksamkeit von IVT-seRNA in einem primären Leberkrebs-Mausmodell nachgewiesen werden.

Diese Arbeit beschreibt damit die grundlegende Entwicklung, Funktionalitätsanalyse und Wirksamkeit der seRNA Expressionsplattform.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Medizinischer Hintergrund und klinische Relevanz	1
1.2 Gezieltes Targeting krankheitsassoziiierter Zelloberflächenmarker	3
1.2.1 Antikörpertherapien in der Krebstherapie.....	3
1.2.2 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate.....	5
1.3 Etablierte RNA-basierte Therapeutika	7
1.3.1 Der Mechanismus der RNA Interferenz und die Wirkung von siRNA Therapeutika	8
1.3.2 Antisense-Oligonukleotide	9
1.3.3 mRNA-basierte Impfstoffe	10
1.4 Neuartige RNA Therapieansätze zur Behandlung von Krebserkrankungen.....	11
1.5 Übertragung von Nukleinsäuren in Zellen.....	15
1.5.1 Lipofektion.....	16
1.5.2 Lipidnanopartikel.....	17
1.5.3 Virale Genübertragungssysteme	19
1.6 Konzept der selektiv exprimierbaren RNA	21
1.6.1 5'-Cap Struktur	24
1.6.2 5'-UTR und 3'-UTR	24
1.6.3 Antisense-Sequenz	25
1.6.4 IRES-Blocker Sequenz	25
1.6.5 RNase-Inhibitor.....	26
1.6.6 IRES	26
1.6.7 Effektor-Sequenz	28
1.6.8 Poly-A-Schwanz	28
1.7 Zielsetzung der Arbeit	30
2. Material und Methoden	31
2.1 seRNA Aufbau.....	31
2.2 Zellkultur.....	33
2.3 Transfektion.....	36
2.4 Durchflusszytometrie	37
2.5 Mikroskopie.....	37
2.6 Nano-DMS-MaP.....	38
2.7 quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion.....	39
2.8 Western Blot.....	40

2.9 Immunfluoreszenz Färbung.....	41
2.10 Minicircle	41
2.11 AAV Herstellung	42
2.12 Zellkern Isolation	42
2.13 <i>In vitro</i> Transkription	42
2.14 Co-Kultur Experimente	43
2.15 Analyse der 5'-Capping Effizienz mittels LC-MS	44
2.16 <i>In vivo</i> Modelle Tumorpräparation	45
2.17 Statistik und Darstellung	46
3. Ergebnisse.....	48
3.1 Entwicklung und <i>in vitro</i> Charakterisierung seRNA kodierender Plasmide zur gezielten Genexpression ausschließlich in Zielzellen.....	48
3.1.1 Bestimmung von Ziel- und Nichtzielzellen durch Analyse der Keratinexpression	48
3.1.2 Bestimmung der selektiven Expression eines seRNA kodierenden Plasmids vergleichend zu einem nicht-selektiven seRNA Kontrollplasmid	49
3.1.3 Analyse des seRNA Aktivierungsmechanismus durch partiellen Abbau des 5'seRNA Region in Zielzellen.....	51
3.1.4 Nachweis der Interaktion des IRES-Blockers mit der IRES	52
3.1.5 Analyse einer möglichen zellulären Immunantwort durch eine kurzzeitige partielle doppelsträngige RNA Struktur.....	53
3.1.6 Verwendung einer konstitutiv aktiven Caspase3 als Effektor in der seRNA	54
3.2 seRNA Anwendung in einem <i>in vivo</i> Glioblastoma Mausmodell	56
3.2.1 Charakterisierung des <i>in vivo</i> Glioblastommodells und Analyse der seRNA Wirksamkeit ..	56
3.2.2 Analyse der seRNA Biodistribution nach Behandlung im <i>in vivo</i> Glioblastommodell.....	58
3.3 Expressionserhöhung von seRNA kodierenden Plasmiden	59
3.3.1 Analyse der Ursache der reduzierten Expression seRNA kodierender Plasmide	60
3.3.2 Erhöhung der seRNA Expression durch Einsatz von AAVs	63
3.3.3 Analysen von Technologien zur Steigerung der seRNA Expression	65
3.4 seRNA Applikation als <i>in vitro</i> transkribierte RNA (IVT-seRNA)	69
3.4.1 Anwendung von IVT-seRNA ermöglicht zielzell-spezifische und präzise regulierbare Genexpression <i>in vitro</i>	69
3.4.2 IVT-seRNA ermöglicht hochselektive und starke Caspase3 Expression in Zielzellen in verschiedenen <i>in vitro</i> Co-Kulturmodellen.....	71
3.4.3 Etablierung von alternativen 5'-Cap-Strukturen und Vergleich alternativer IRES-Strukturen	75
3.4.4 Analyse der 5'Capping Effizienz und <i>in vitro</i> Stabilität von IVT-RNAs mit unterschiedlichen 5'-Cap Strukturen.....	76
3.4.5 Erhöhung der seRNA Expressionsstärke durch terminale Hairpin Strukturen.....	77

3.4.6 Entwicklung einer IVT-seRNA zur Behandlung des murinen hepatozellulären Karzinoms im <i>in vitro</i> Modell	80
3.5 <i>In vivo</i> Anwendung der IVT-seRNA.....	82
3.5.1 Funktionalitätsanalyse einer IVT-seRNA zur Behandlung des murinen hepatozellulären Karzinoms im TGF- α / <i>c-myc</i> Maus Modell	82
4. Diskussion.....	85
4.1 seRNA kodierende Plasmide	85
4.2 <i>In vitro</i> transkribierte seRNA	89
4.3 Potential und Herausforderungen der seRNA Plattform	92
4.4 Vergleich der seRNA mit ähnlichen Systemen	94
5. Ausblick.....	96
6. Appendix.....	98
7. Publikationsliste	103
8. Literaturverzeichnis.....	104
9. Danksagung	115

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb	Abbildung
ActD	Actinomycin D
ADAR	Engl. <i>adenosine deaminase acting on RNA</i>
ADC	Engl. <i>antibody drug conjugate</i> (Antikörper-Wirkstoff-Konjugate)
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
AG	Arbeitsgruppe
ANOVA	Varianzanalyse, engl. <i>analysis of variance</i>
AP ₃ G	P1-(5'-Adenosyl) P3-(5'-guanosyl) triphosphate (AP ₃ G)
ARCA	Engl. <i>Anti-Reverse Cap Analog</i>
arRNA	Engl. <i>adar recruiting RNA</i>
AS	Antisense-Sequenz
ASO	Antisense-Oligonukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
Ca-Caspase3	Konstitutiv aktive Caspase3
CAR-T	Chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen
circRNA	Engl. <i>circular RNA</i>
cLSM	Engl. <i>confocal laser scanning microscope</i>
CRISPR/ Cas	Engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated</i>
CrPV	Cricket-Paralyse-Virus
Ct	Eng. <i>cycle threshold</i>
CTP	Cytidintriphosphat

DCP2	Engl. <i>mRNA-decapping enzyme 2</i>
DMEM	Engl. <i>dulbeccos modified eagles media</i>
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DODMA	1,2-Dioleyloxy-3-dimethylaminopropane
DOPE	1,2-di-(9Z-octadecenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DSG-PEG2000	Distearoyl-rac-glycerol-PEG2K
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
dsRBD	Engl. <i>double stranded RNA binding domains</i>
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMA	Engl. <i>European Medicines Agency</i>
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
FBS	Engl. <i>fetal bovine serum</i>
FDA	Engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FGFR-1	Engl. <i>fibroblast growth factor receptor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GP3G	P1-(Guanosyl) P ³ -(5'-(guanosyl))triphosphate (GP ₃ G)
GRIA2	Glutamat Rezeptor alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate 2
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Histonacetyltransferase
HBSS	Engl. <i>hanks balanced salt solution</i>

HCC	Hepatozelluläres Karzinom, engl. <i>hepatocellular carcinoma</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDAC	Histondeacetylase
HER2	Humaner epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2
HGFR	Engl. <i>hepatocyte growth factor receptor</i>
HSL	Engl. <i>histon stem loop</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IB	IRES Blocker
IGR	Engl. <i>intergenic region</i>
IL18	Interleukin-18
IL1 β	Interleukin-1 beta
IL6	Interleukin-6
IRES	Engl. <i>internal ribosomal entry side</i> (interne Ribosomenbindestelle)
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
LC-MS	Engl. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LDL	Engl. <i>low density lipoprotein</i>
LEAPER	Engl. <i>leveraging endogenous ADAR for programmable editing of RNA</i>
LNP	Lipidnanopartikel
LRS	Engl. <i>large ribosomal subunit</i>
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
m ⁷ G	P ¹ -(5'-7-methyl-guanosyl) P ³ -(5'-(guanosyl))triphosphat (m ⁷ GP ₃ G)
mAb	Engl. <i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
mATP	N ¹ -Methyl-Adenosintriphosphat

MDA5	Engl. <i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MEM	Engl. <i>minimum essential media</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minuten
miRNA	Engl. <i>micro RNA</i>
MOI	Engl. <i>multiplicity of intensity</i>
mP-UTP	N1-Methylpseudouridintriphosphat
mRNA	Engl. <i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
Nano-DMS-MaP	Engl. <i>nanopore dimethylsulfate mutational profiling</i>
NPC	Engl. <i>nuclear core complex</i>
PAMPs	Engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	Engl. <i>programmed cell death protein 1</i>
PDI	Polydispersitätsindex
pDNA	Plasmid DNA
PEG	Polyethyleneglycol
PKR	Protein Kinase R
PLL	Poly-L-Lysin
P-UTP	Pseudouridintriphosphat
qRT-PCR	Quantitative <i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
RADAR	Engl. <i>RNA sensing using adenosine deaminases acting on RNA</i>
REPAIR	Engl. <i>RNA Editing for Programmable A to I Replacement</i>

RESTORE	Engl. <i>recruiting endogenous ADAR to specific transcripts for oligonucleotide-mediated RNA editing</i>
RI	RNase Inhibitor
RIG-1	Engl. <i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RISC	Engl. <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Engl. <i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
s.d.	Eng. <i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
seRNA	Selektiv exprimierbare RNA
siRNA	Engl. <i>small interfering RNA</i>
Smn	Engl. <i>survival motor neuron</i>
SRS	Engl. <i>small ribosomal subunit</i>
T-DM1	Trastuzumab-Emtansin
TGF α	Engl. <i>Transforming Growth Factor alpha</i>
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
tRNS	Transfer RNA
TrV	Transfektionsverstärker
TSA	Trichostatin A
uORF	Engl. <i>upstream open reading frame</i>
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
vgl.	vergleiche
VOI	Eng. <i>volume of interest</i>
xrRNA	Exoribonuklease-resistente RNA

z.B.	zum Beispiel
ZnCl_2	Zinkchlorid
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Medizinischer Hintergrund und klinische Relevanz

Krebserkrankungen stellen nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar[1]. In Deutschland ist Krebs die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf Erkrankungen[1]. Trotz bedeutender Fortschritte in der Diagnostik und der Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten für bestimmte Krebserkrankungen, wie Antikörpertherapien und verschiedenen neuen RNA Therapieansätzen, bleiben die Behandlungsmöglichkeiten für andere Tumorarten, sowie die Wahrscheinlichkeit einer Tumorremission vieler solider Tumore unbefriedigend.

Glioblastome gehören dabei zu den aggressivsten primären Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) und sind mit einer medianen Überlebenszeit nach Erstindikation von nur etwa 15 Monaten assoziiert[2]. Sie treten mit einer Inzidenz von etwa 3-5 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf und machen ca. 45-50% aller primären malignen ZNS-Tumore beim Erwachsenen aus[3]. Die etablierte Therapie umfasst die maximal mögliche chirurgische Resektion, gefolgt von einer kombinierenden Radiochemotherapie mit Temozolomid und anschließender Erhaltungskemotherapie[2]. Diese Behandlung zeigte sich als wirksamer als die alleinige Bestrahlung[2]. Dennoch kehren die Tumore nahezu immer zurück. Ein Grund dafür ist die ausgeprägte Invasivität der Tumorzellen in das umgebende Gehirngewebe, was eine vollständige Resektion unmöglich macht[4]. Zudem weist das Glioblastom eine hohe intratumorale Heterogenität in Bezug auf Oberflächenmarker und zahlreiche Resistenzmechanismen gegen zytotoxische Therapien auf[5]. Diese Schwierigkeiten bei der Behandlung unterstreichen die Notwendigkeit, neue, möglicherweise miteinander kombinierbare Therapieansätze zu entwickeln.

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist die häufigste primäre maligne Tumorerkrankung der Leber und stellt weltweit die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache dar[6]. Die Inzidenz des HCC variiert stark geografisch und spiegelt dabei vor allem die regionale Prävalenz chronischer Hepatitis-B und Hepatitis-C Infektionen wider, die weltweit als die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC gelten[7]. Das HCC wird häufig spät diagnostiziert, da frühe Stadien meist asymptomatisch verlaufen. Bei Diagnosestellung befinden sich viele Patienten bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, was die Prognose erheblich verschlechtert. Selbst mit modernen Therapiekonzepten liegt die 5 Jahres Überlebensrate daher bei weniger als 20%[7]. Die derzeitige Therapie des HCC orientiert sich am Stadium der Erkrankung und umfasst chirurgische Resektion, lokale Ablationsverfahren (z.B. Radiofrequenzablation), transarterielle Chemoembolisation sowie systemische Therapien, zu denen in den letzten Jahren auch verschiedene Antikörpertherapien wie Atezolizumab und Bevacizumab hinzugekommen sind[7, 8]. Allerdings sprechen viele Tumore nicht dauerhaft oder nur unzureichend

auf diese Behandlungen an, sodass ein erheblicher Bedarf an innovativen, gezielten und selektiv wirksamen Therapieansätzen besteht[7].

Allgemein bestehen klassische Tumorbehandlungen seit langem meist aus chirurgischer Resektion, Chemotherapie und Bestrahlung. Die operative Entfernung des Tumorgewebes ist dabei oft die erste Maßnahme, insbesondere bei gut lokalisierbaren Primärtumoren[9]. Jedoch ist nicht jedes Gewebe für eine operative Entfernung geeignet und es reicht, wenn nur wenige Tumorzellen bei der Entfernung übersehen werden, dass der Tumor später zurückkehrt. Ergänzend kommen meist zytotoxische Chemotherapeutika zum Einsatz, die systemisch auf sich schnell teilende Zellen wirken, jedoch auch auf schnell teilendes gesundes Gewebe wie das Knochenmark, die Darmschleimhaut oder Haarfollikel massiven Einfluss nehmen[10]. Daher sind die Nebenwirkungen von Chemotherapien beträchtlich[10]. Neben der Chemotherapie ist Bestrahlung eine klassische Krebstherapie, die kontinuierlich weiterentwickelt wird. Früher wurde großzügig bestrahlt und damit einhergehend auch viel gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen. Moderne Bestrahlungsmethoden werden stärker fokussiert und schädigen dadurch möglichst nur Tumorgewebe [11]. Ein Beispiel dafür ist die Protonentherapie[11]. Neue Therapieansätze, wie die lokale Hyperthermie mit magnetischen Nanopartikeln zielen ebenfalls darauf ab, die Tumorzellen gezielt thermisch zu schädigen, ohne systemische Toxizität zu verursachen[12]. Allerdings besteht weiterhin ein immenser Bedarf an zusätzlichen Therapien gegen eine Reihe verschiedener Krebserkrankungen, allen voran bei den schwer operativ zu entfernenden Tumoren[9].

In eine ähnliche Richtung gehen moderne Therapiemethoden, die versuchen Tumore selektiv über Oberflächenmoleküle anzusprechen. Beispiele dafür sind Antikörpertherapien, Antikörper-Wirkstoff-Konjugate und CAR-T Zelltherapien. Allerdings ist die Auswahl von Oberflächenmarkern, die nur bei Tumorzellen vorkommen, begrenzt. Außerdem sind Tumore sehr heterogen, daher reicht ein einziger Oberflächenmarker häufig nicht aus[13]. Während Antikörper-basierte Therapiemethoden versuchen selektiv Zelloberflächenmarker zu adressieren, gibt es auch „*small molecule drugs*“ die stattdessen versuchen Proteinveränderungen in Tumorzellen für die selektive Therapie zu nutzen. Sie binden zum Beispiel spezifisch an mutierte Kinasen oder andere onkogene Signalproteine wie B-Raf, EGFR oder ALK. Durch Blockierung der Funktion kann eine selektive Hemmung des Tumorwachstums erreicht werden[14]. Darüber hinaus gibt es die relativ neue Klasse der RNA-basierten Therapeutika, bei denen ebenfalls versucht wird RNA selektiv gegen Krebs einzusetzen. Gerade aufgrund der Möglichkeit, RNA-basierte Therapeutika über Lipidnanopartikel effizient in die Leber zu transportieren, wird das HCC zunehmend als Modell- und Zielerkrankung für neue Gen- und RNA-Technologien genutzt[15].

1.2 Gezieltes Targeting krankheitsassoziierter Zelloberflächenmarker

Etablierte Chemotherapien adressieren jede Zelle im Körper. Neben den RNA Therapien gibt es auch weitere neuere Therapieansätze, die versuchen gezielt erkrankte Zellen anzusprechen. So stellen Zelloberflächenstrukturen von Zellen oder Geweben zentrale Zielmoleküle für eine Vielzahl selektiver Therapieansätze dar, insbesondere in der Onkologie[13]. Da spezifische Oberflächenantigene häufig überexprimiert oder sogar manchmal ausschließlich auf pathogenen oder malignen Zellen vorkommen, eröffnen sie die Möglichkeiten zum gezielten Targeting. Insbesondere Antikörper-basierte Therapien sowie Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (*antibody drug conjugates*, ADCs) nutzen diese Selektivität, um gezielt Tumorzellen zu eliminieren und dabei gesundes Gewebe zu schonen[16].

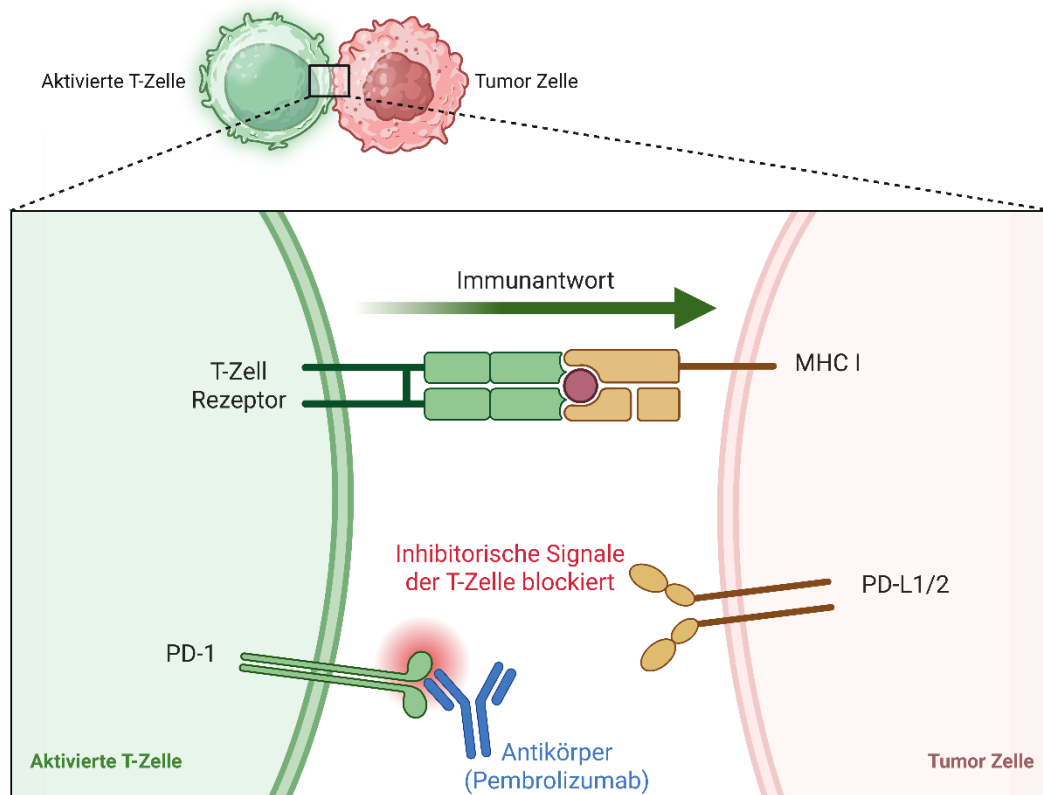
1.2.1 Antikörpertherapien in der Krebstherapie

Der medizinische Einsatz monoklonaler Antikörper (*monoclonal antibodies*, mAbs) hat die Krebstherapie deutlich weiterentwickelt. Aufgrund ihrer hohen Selektivität und spezifischen Bindungsfähigkeit zu definierten Zielstrukturen, z.B. Oberflächenantigenen von Krebszellen, ermöglichen sie eine gezielte Behandlung bei gleichzeitig reduzierten Nebenwirkungen im Vergleich zu konventionellen Chemotherapien[13]. Die therapeutische Wirkung von mAbs beruht auf unterschiedlichen Mechanismen. Häufig blockieren Antikörper spezifische Zelloberflächenrezeptoren oder Wachstumsfaktoren, die entscheidend für das Überleben und Wachstum der Tumorzellen sind. Ein Beispiel hierfür ist der Antikörper Trastuzumab, der selektiv an den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) bindet und dessen Aktivierung in HER2-positivem Brustkrebs verhindert[17].

Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die Antikörper vermittelte Aktivierung des Immunsystems. So können Antikörper natürliche Killerzellen, Makrophagen oder komplementabhängige zytotoxische Reaktionen gezielt auf Tumorzellen lenken. Diese sogenannte „Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität“ spielt beispielsweise bei Rituximab eine zentrale Rolle. Rituximab richtet sich gegen das CD20 Antigen auf der Oberfläche von B-Zellen und wird erfolgreich bei Non Hodgkin Lymphomen sowie chronisch lymphatischer Leukämie eingesetzt[18, 19].

Außerdem gibt es Antikörper, die Checkpoint Inhibitoren genannt werden. Diese Antikörper blockieren immunologische Kontrollpunkte und heben dadurch hemmende Signale im Immunsystem auf. Besonders bekannt ist der mAb Pembrolizumab (Keytruda). Dieses Blockbuster Medikament von Merck (USA) ist gegen den immunologischen Checkpoint PD-1 (*programmed cell death protein 1*) gerichtet. PD-1 ist ein Transmembranprotein der Immunglobulin Familie, das von T-Zellen und Pro-B-Zellen exprimiert wird[20]. Unter normalen physiologischen Bedingungen reguliert PD-1 das

Immunsystem. Bei einer Expression auf Krebszellen allerdings hilft er dabei, dass diese nicht vom Immunsystem detektiert werden[20]. Durch Blockade der PD-1/PD-L1/2-Achse ermöglicht Pembrolizumab eine effizientere Reaktivierung tumorspezifischer T-Zellen und induziert somit eine starke Immunantwort gegen den Tumor (Grafik 1) [18].

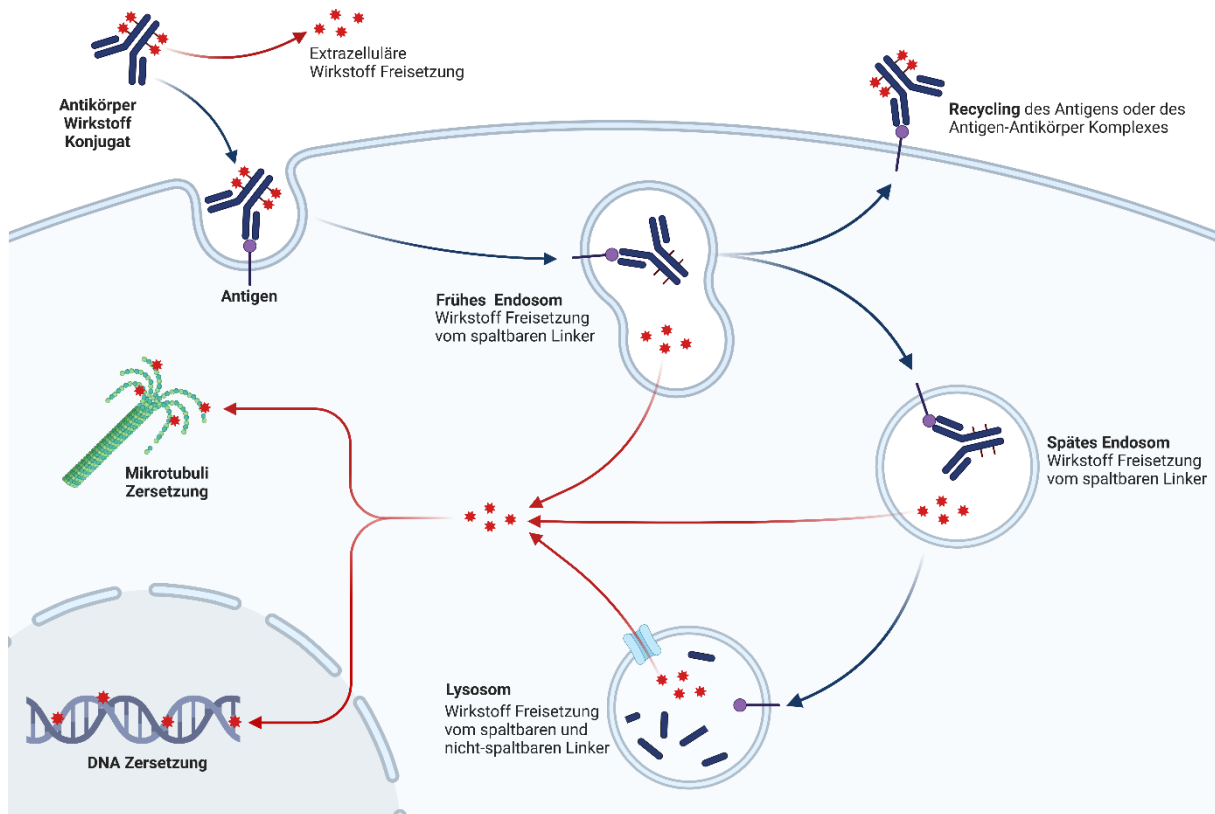


Grafik 1: Wirkmechanismus von Pembrolizumab. Dargestellt ist, wie der monoklonale Antikörper Pembrolizumab den immunologischen Rezeptor PD-1 bindet. Dies unterbindet die PD-1 Bindung mit PD-L1/2 und aktiviert so die Immunantwort. Erstellt mit BioRender.com. Grafik angelehnt an [21].

Trotz der Erfolge von Antikörpertherapien gibt es diesbezüglich auch Herausforderungen. Die Heterogenität der Antigenexpression innerhalb eines Tumors oder zwischen verschiedenen Patienten limitiert in manchen Fällen ihre Wirksamkeit. Zudem können Tumorzellen Resistenzmechanismen entwickeln, beispielsweise durch Antigenverlust, Modulation alternativer Signalwege oder immunologische Ausweich-Mechanismen[13]. Weiterhin sind bei Antikörpertherapien immunvermittelte Nebenwirkungen möglich[22].

1.2.2 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate

ADCs zeichnen sich durch die Spezifität mAbs in Kombination mit der hohen Wirksamkeit chemotherapeutischer Substanzen aus[23]. Sie sind aufgebaut aus einem tumorspezifischen Antikörper, einem Linker und einem zytotoxischen Molekül (sog. *Payload*)[23]. Der Antikörper dient als selektives Transportmittel, das die toxische Substanz spezifisch zu den Zielzellen dirigiert. Nach Bindung des ADC an das Zelloberflächenantigen erfolgt die Internalisierung. Je nach verwendetem Linker kann die Freigabe der toxischen Substanz extra- oder intrazellulär erfolgen[24]. So kann eine lokal begrenzte und zielgerichtete Wirkung erreicht werden, die gesundes Gewebe weitgehend schont (Grafik 2). Ein Beispiel für ein erfolgreiches ADC ist Trastuzumab-Emtansin (T-DM1), ein ADC gegen das HER2 Antigen, das speziell bei HER2 positivem metastasierten Brustkrebs angewandt wird. Der ADC besteht aus dem Antikörper Trastuzumab, einem Linker Deruxtecan, einem Topoisomerase-1 Inhibitor als Payload[25]. Deruxtecan ist membranpermeabel und kann nach intrazellulärer Freisetzung in benachbarte Zellen diffundieren, auch wenn diese das Zielantigen des Antikörpers nicht exprimieren[26]. Dies nennt man den sogenannten „Bystander effect“, der dabei helfen kann auch heterogene Tumore zu eliminieren[26]. Generell bestehen die zukünftigen Herausforderungen von ADCs neben der heterogenen Antigenexpression in der Entstehung von Resistenzen gegen die Zytostatika. Die Tumorzellen können Antigene herunter regulieren oder alternative Signalwege aktivieren.



Grafik 2: Wirkmechanismus eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugats. Der ADC bindet mit seinem Epitop an das entsprechende Antigen auf der Zielzelle. Er wird von der Zelle internalisiert und gelangt ins frühe Endosom. Dieses frühe Endosom entwickelt sich über das späte Endosom bis zum Lysosom, wo der ADC abgebaut wird. Je nach verwendetem Linker kann der Wirkstoff bei jedem Schritt freigesetzt werden: Extrazellulär oder während des frühen, späten Endosoms oder erst im Lysosom. Der freigesetzte „Payload“ sorgt je nach verwendetem Wirkstoff auf unterschiedliche Weise für einen kontrollierten Zelltod der Zielzelle. Abbildung erstellt mit BioRender.com. Grafik angelehnt an[24].

1.2.3 CAR-T Zelltherapie

Die CAR-T Zelltherapie (*chimeric antigen receptor T-cell therapy*) ist eine Form der adaptiven Zelltherapie, bei der T-Lymphozyten eines Patienten genetisch so verändert werden, dass sie einen chimären Antigenrezeptor (CAR) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Früher war die genetische Veränderung der T-Lymphozyten nur *ex vivo* möglich, inzwischen sogar *in vivo*[27]. Dieser CAR verleiht den T-Zellen die Fähigkeit, tumorassoziierte Antigene MHC (*major histocompatibility complex*) unabhängig zu erkennen und zu eliminieren[28]. Die Herstellung beginnt damit, dass Zellen aus dem Blut des Patienten entnommen werden und die T-Zellen isoliert werden. Die T-Zellen werden *in vitro* aktiviert und mithilfe viraler Vektoren so genetisch modifiziert, dass sie das CAR Konstrukt stabil exprimieren[28]. Dieses CAR Konstrukt besteht aus einer extrazellulären Bindedomäne, meist von einem mAb, einer Transmembrandomäne und einer Signaldomäne[28]. Anschließend können die so veränderten Zellen dem Patienten wieder verabreicht werden und erkennen nun den Tumor. Es gab schon über 200 klinische Tests verschiedener CAR-T Zelltherapieansätze, von denen eine Reihe meist aufgrund starker Nebenwirkungen durchfielen [28]. Einige Therapien wurden jedoch erfolgreich zugelassen. Zu den zukünftigen Herausforderungen gehören neben der heterogenen Antigenexpression vor allem die hohen Kosten, die mit CAR-T Zelltherapien verbunden sind.

1.3 Etablierte RNA-basierte Therapeutika

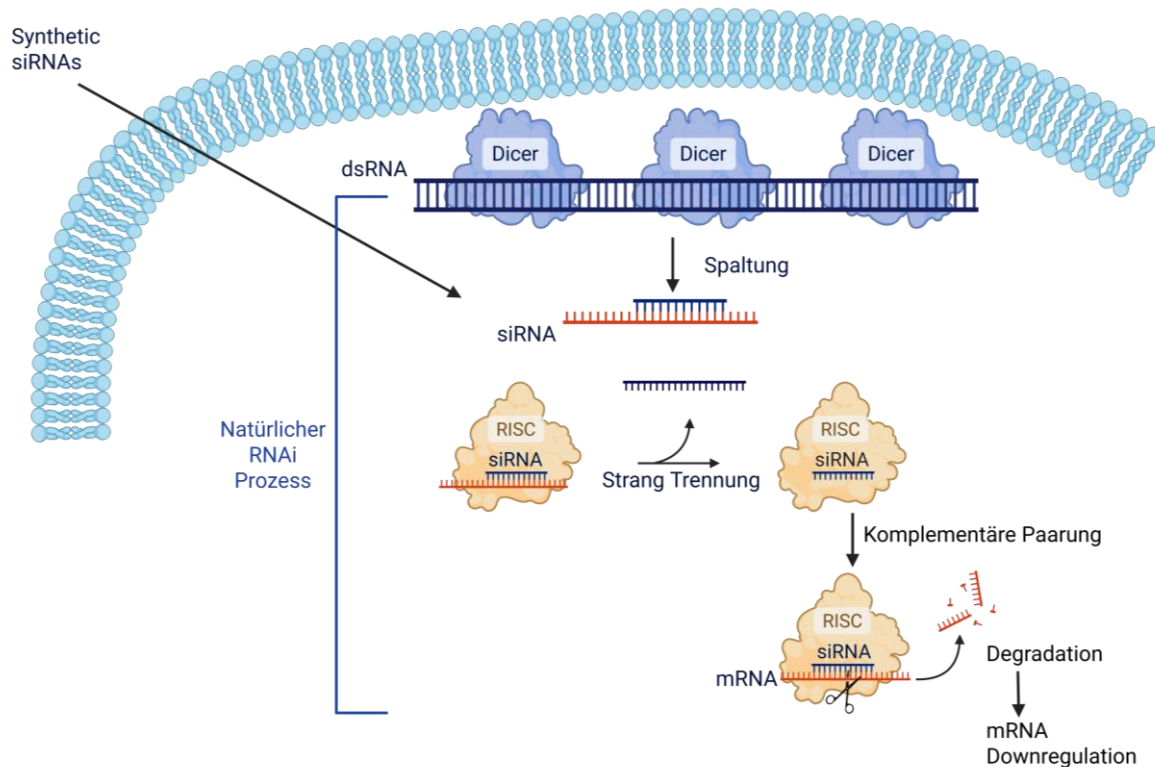
Die vorgestellten etablierten und innovativen Oberflächenmarker adressierenden Therapiemöglichkeiten haben gemeinsam, dass alle versuchen ihre Wirkung gezielt auf Krebszellen zu konzentrieren. Neben Oberflächenmarkern wird auch versucht intrazelluläre Motive zu nutzen, um gezielte Therapien zu entwickeln. Die Idee, Ribonukleinsäuren (RNA) als therapeutische Wirkstoffe zu nutzen, wurde bereits in den 1960er Jahren formuliert. Erste experimentelle Anwendungen von messenger-RNA (mRNA) begannen in den 1970er- und 1980er-Jahren, scheiterten jedoch zunächst an technischen Limitationen wie der geringen Stabilität, unzureichenden Translationsraten und ausgeprägten Immunreaktionen auf unmodifizierte RNA[29]. Ein zentraler Durchbruch gelang durch die Arbeiten von Kariko und Weissman, die 2005 zeigten, dass bestimmte modifizierte Nukleoside, insbesondere Pseudouridin, die angeborene Immunantwort auf synthetische mRNA signifikant verringern können[30]. Außerdem erhöhen diese RNA Modifikationen gleichzeitig die Translationseffizienz, wodurch insgesamt weniger RNA Menge eingesetzt werden muss[30]. Diese Erkenntnis stellte sich später als grundlegend für die Entwicklung klinisch einsetzbarer mRNA Therapeutika heraus und erhielt dafür den Nobelpreis 2023[31].

1.3.1 Der Mechanismus der RNA Interferenz und die Wirkung von siRNA Therapeutika

Während die mRNA Technologie stetig weiterentwickelt wurde, erfolgte die erste klinische Zulassung eines RNA-basierten Medikaments im Bereich der RNA Interferenz (RNAi). Das erste zugelassene RNAi Therapeutikum war Patisiran (Onpattro, Alnylam Pharmaceuticals), ein auf small interfering RNA (siRNA) basierendes Medikament zur Behandlung der hereditären Transthyretin-Amyloidose, das 2018 von der *Food and Drug Administration* (FDA) und *European Medicines Agency* (EMA) zugelassen wurde[32]. Patisiran nutzt gezielt den RNAi Mechanismus, um die Expression des Transthyretin in der Leber zu hemmen und so die Bildung krankheitsverursachender amyloider Ablagerungen zu verhindern.

Die RNAi ist ein hochkonservierter biologischer Mechanismus der posttranskriptionalen Genregulation in eukaryotischen Zellen. Dieser Prozess wurde erstmals bei *Caenorhabditis elegans* beschrieben[33] und dient unter physiologischen Bedingungen vor allem der Immunabwehr gegen virale RNA und der Kontrolle endogener Genexpression durch micro RNAs (miRNAs). Im Zentrum des RNAi Mechanismus steht die Erkennung und gezielte Degradation von mRNA durch kurze, komplementäre RNA Moleküle. Im natürlichen RNAi Mechanismus entsteht siRNA durch die Prozessierung von langen doppelsträngigen RNA (dsRNA) Vorläufern, entweder viraler Herkunft oder experimentell eingebracht. Diese dsRNA wird im Zytoplasma vom RNase3 Enzym Dicer erkannt und in kurze 21 – 23 Nukleotide lange siRNA-Duplexe zerschnitten[34]. Dabei erzeugt Dicer charakteristische, 2 Nukleotide lange Überhänge am 3'-Ende der Sequenz, die für die nachfolgende Erkennung durch den *RNA-induced silencing complex* (RISC) essentiell sind.

Therapeutisch wird dieser Mechanismus durch die synthetische Applikation von siRNAs ausgenutzt. Nach zellulärer Aufnahme gelangen die synthetischen siRNAs in das Zytoplasma, wo sie unabhängig von Dicer in den RNAi Wirkmechanismus eingeschleust werden[35]. Der siRNA Doppelstrang wird vom RISC Komplex aufgenommen und entwindet. Der sogenannte Passagierstrang (*passenger strand*) wird dabei entfernt und abgebaut, während der Leitstrang (*guide strand*) im Komplex verbleibt[36]. Der mit siRNA beladene RISC Komplex sucht im Zytoplasma nach weiterer komplementärer mRNA. Bei perfekter Basenpaarung vermittelt das Argonaute-2-Protein, die katalytische Komponente des Komplexes, einen präzisen Schnitt in der Ziel-mRNA[37]. Dies führt zur Degradation der mRNA und verhindert die Translation. Auf diesem Weg wird die Expression der entsprechenden RNA reduziert bis komplett verhindert (Grafik 3) [38].



Grafik 3: Zellulärer Mechanismus der RNA Interferenz. Lange doppelsträngige RNA (dsRNA) wird durch das Enzym Dicer in small interfering RNAs (siRNAs) gespalten. Diese siRNAs werden in den RISC Komplex eingebaut, wo die Stränge getrennt werden. Der RISC, beladen mit dem Leitstrang, bindet komplementäre mRNA, welche anschließend durch das Argonaute2-Protein im RISC gespalten wird, was zum mRNA Abbau und somit zur Herunterregulierung führt. Erstellt mit BioRender.com. Grafik angelehnt an [38].

1.3.2 Antisense-Oligonukleotide

Antisense-Oligonukleotide (ASOs) stellen eine Klasse synthetischer, meist einzelsträngiger Nukleinsäuren dar, die spezifisch an komplementäre RNA Sequenzen binden und so gezielt die Expression bestimmter Gene modulieren können. Je nach Design und chemischer Modifikation können ASOs verschiedene Wirkmechanismen entfalten: Sie blockieren die Translation, induzieren RNaseH sowie RNase3-vermittelten Abbau einer Ziel-mRNA oder beeinflussen das prä-mRNA Splicing, um so die Genexpression einzelner Proteine herunter zu regulieren. Klinisch zugelassen ist beispielsweise Nusinersen (Spinraza), das bei spinaler Muskelatrophie eingesetzt wird[39]. Die spinale Muskelatrophie ist ausgelöst durch eine Mutation des *smn1* Gens (*survival motor neuron*), die Patienten überleben nur dank einer geringen Produktion des *smn2* Gens[39]. Nusinersen beeinflusst das alternative Splicing des *smn2* Gens, so dass es funktionell in ein *smn1* Gen umgewandelt wird und somit die Produktion funktioneller SMN-Proteine steigert[40, 41]. Auch Mipomersen (Kynamro), das zur Behandlung der familiären Hypercholesterinämie dient, nutzt RNaseH vermittelten mRNA Abbau zur Reduktion von ApoB-100[42]. Somit erweitern ASOs das therapeutische Spektrum RNA-basierter

Arzneimittel, insbesondere für Erkrankungen die sich durch gezielte Modulation einzelner RNAs adressieren lassen.

1.3.3 mRNA-basierte Impfstoffe

mRNA-basierte Impfstoffe haben in den letzten Jahren, nicht zuletzt durch ihren erfolgreichen Einsatz gegen SARS-CoV-2, erhebliche Aufmerksamkeit erlangt. Sie repräsentieren eine neuartige Klasse von Vakzinen, die sich durch eine hohe Flexibilität, schnelle Herstellbarkeit und das Potential für eine präzise Antigenanpassung auszeichnen. Die Grundidee RNA-basierter Impfstoffe besteht darin, dem Körper genetische Baupläne in Form von mRNA zuzuführen, die anschließend in den Zellen das entsprechende Antigen exprimieren. Dies führt zu einer Immunantwort gegen das kodierte Antigen, ohne dass ein infektiöser Erreger oder rekombinantes Protein verabreicht werden muss[43]. mRNA Vakzine unterscheiden sich damit grundlegend von klassischen Impfstoffen, die meist abgeschwächte oder inaktivierte Pathogene oder deren Proteine enthalten. So wird im Unterschied zu klassischen Impfungen nicht das Antigen selbst verabreicht, sondern nur der Bauplan. Anschließend übernimmt die Zelle die Herstellung des Antigens selbst. Die Vorteile der mRNA Technologie liegen unter anderem in der schnelleren Anpassbarkeit an neue Pathogenvarianten, der einfacheren Herstellung in Zell-freien Systemen sowie in einem prinzipiell guten Sicherheitsprofil, da kein Risiko einer genomischen Integration besteht[44].

Die jüngste Zulassung mehrerer mRNA-Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 (BNT162b2 von BioNTech/Pfizer und mRNA-1273 von Moderna) hat den klinischen Nutzen dieser Technologie eindrucksvoll belegt[45, 46]. Darüber hinaus werden RNA Impfstoffe intensiv für weitere Indikationen untersucht, darunter gegen Influenza, den Zika-Virus oder Tollwut, aber auch im onkologischen Bereich, in Form von personalisierten Krebsimpfstoffen, die patientenspezifische Neoantigene kodieren[47]. Trotz dieser Erfolge bestehen weiterhin Herausforderungen, im Hinblick auf die gezielte Modulation der Immunantwort, um eine ausgewogene Balance zwischen Effizienz und Verträglichkeit zu gewährleisten[43]. Zudem bleibt die Problematik, dass auch RNA Impfstoffe gegen Krebserkrankungen das Immunsystem immer nur gegen Oberflächenmarker der entsprechenden Krebsarten trainieren können. Fehlen diese, oder sind unspezifisch, kann die Therapie nicht oder nur unter Inkaufnahme massiver Nebenwirkungen eingesetzt werden.

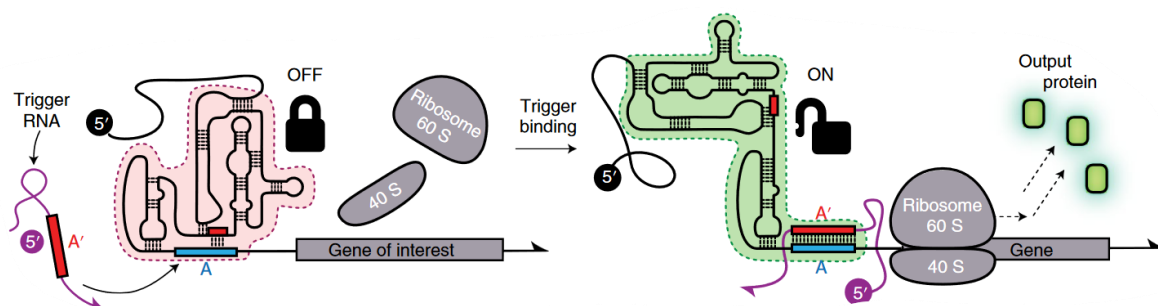
1.4 Neuartige RNA Therapieansätze zur Behandlung von Krebserkrankungen

Da RNA-basierte Therapien in Form von siRNAs, ASOs und mRNA Impfstoffen bereits in klinischen Anwendungen sind, besteht die Hoffnung die mRNA Therapie auch gegen weitere Erkrankungen, insbesondere Krebs, einsetzen zu können. Dies ist jedoch bis heute eine große Herausforderung. Bei siRNA- und ASO-basierten Therapien, werden die Mengen von endogenen RNA Transkripten lediglich herunter reguliert, sodass die resultierenden Proteinmengen ebenfalls reduziert sind. mRNA-basierte Impfstoffe sind die ersten RNA Therapien, bei denen wirklich mRNA verwendet wird, um kontrolliert Proteine, in dem Fall Antigene, von der Wirtszelle produzieren zu lassen. Anders als bei Infektionskrankheiten, bei denen Vakzin-mRNA gezielt eine Immunantwort gegen exogene Antigene auslösen soll, erfordert die Krebstherapie eine hochselektive Unterscheidung zwischen malignen und gesunden Zellen. Eine Aufgabe, die aufgrund der häufig nur geringen molekularen Unterschiede komplex ist[47]. Hinzu kommt, dass Tumore meist durch eine heterogene Zusammensetzung verschiedener Tumorzellen geprägt sind und sich dynamisch dem Selektionsdruck des Immunsystems oder von Therapien entziehen können[48].

Versuche die mRNA gezielt nur in Tumorgewebe zu übertragen, gestalten sich bis jetzt als schwierig. Lipidnanopartikel (LNPs) und virale Vektoren, auch mit zusätzlichen chemischen Modifikationen, um die Affinität zum Zielgewebe zu erhöhen, werden häufig unspezifisch von anderen Organen wie Leber oder Milz aufgenommen[15]. Gleichzeitig können Tumorzellen Mechanismen entwickeln, die die mRNA Translation herunterregulieren oder immunogene Signale unterdrücken, wodurch die Wirksamkeit einer mRNA-basierten Antitumorstrategie weiter limitiert wird[49]. Vor diesem Hintergrund hat sich ein neues, dynamisch wachsendes Forschungsfeld entwickelt, das innovative Strategien untersucht, um mRNA Wirkstoffe gezielt in Tumorzellen zu aktivieren. Etwa durch tumorspezifische Expressionskontrollen, RNA-Editing oder synthetische riboregulatorische Schalter. Dadurch soll die Präzision und Sicherheit von RNA-basierten Krebstherapien grundlegend verbessert werden.

Die sogenannte eToehold Technologie ist ein neuartiges RNA-basiertes Regulationssystem, das eine Steuerung der Proteinexpression in Abhängigkeit von spezifischen zellulären RNA Signaturen ermöglicht. Die zugrunde liegende Methode basiert auf synthetischen Toehold-Schaltern, die ursprünglich für bakterielle Systeme entwickelt wurden[50]. Diese Hairpin Strukturen blockieren die Ribosomen Bindungsstelle und das Startcodon, wodurch die Translation unterdrückt wird. Erst das Binden einer passenden Zielzell-eigenen Ziel-RNA löst die Struktur auf und ermöglicht die Translation des kodierten Gens selektiv in Zielzellen. Im eukaryotischen Kontext wurden diese Konstrukte weiterentwickelt. Bei den sogenannten eukaryotic Toeholds (eToeholds) enthalten die Schalter interne IRES-Sequenzen (*Internal Ribosomal Entry Side*, IRES), die eine 5'-Cap-unabhängige Translation

ermöglichen. In Abwesenheit der spezifischen Ziel-RNA bildet der eToehold eine translatorisch inaktive Schleife[51]. Ist allerdings die passende Ziel-mRNA vorhanden, wird die inhibierende Schleife aufgelöst und somit die Translation in eukaryotischen Zellen ermöglicht[51]. Ein weiteres Beispiel für die Anwendung von eToeholds ist die Entwicklung von Zellen, die auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA reagieren. In dieser Anwendung wurden eToeholds so konstruiert, dass sie die Expression von Luciferase induzieren, wenn sie mit SARS-CoV-2 spezifischen RNA Sequenzen in Kontakt kommen. Diese Zellen könnten als diagnostische Werkzeuge dienen, um das Vorhandensein des Virus in Proben nachzuweisen[52] (Grafik 4). Kritisch zur eToehold Technologie lässt sich hervorheben, dass diese nur nach Übertragung von eToehold-kodierender Plasmid-DNA (pDNA) verwendet wurde. Für eine medizinische Anwendung wäre die Übertragung als RNA notwendig. Außerdem sind die Expressionsstärken gering und die Entwicklung geeigneter Sequenzmotive aufwändig[51].

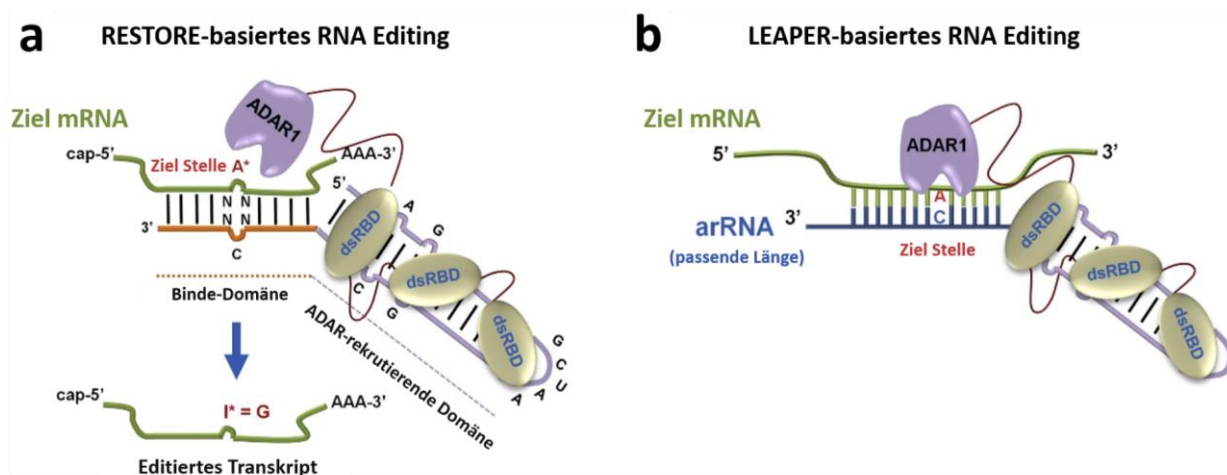


Grafik 4: Aktivierungsmechanismus der eToehold Technologie. In Abwesenheit der spezifischen Trigger-RNA bildet die synthetische eToehold mRNA eine stabile Sekundärstruktur (Hairpin), die die IRES Sekundärstruktur so verändern, dass diese inaktiviert ist. Bindet die komplementäre Ziel-RNA an die eToehold Region, wird die Hairpin Struktur aufgelöst und eine Translation durch Ribosomen kann beginnen. Grafik übernommen aus[51].

Ein weiterer vielversprechender Ansatz der RNA-basierten Therapie nutzt den natürlichen Mechanismus der Adenosin-Deaminasen, die auf mRNA wirken. Sogenannte ADAR Enzyme (*Adenosine Deaminases Acting on RNA*, ADAR). Diese Enzyme katalysieren die Deaminierung von Adenosin zu Inosin in dsRNA. Inosin ist ein Nukleosid, das strukturell Adenosin ähnelt, sich aber durch das Fehlen einer Aminogruppe unterscheidet. Bei der Translation wird Inosin von der zellulären Maschinerie wie Guanotin interpretiert. Somit lässt sich mithilfe von ADAR auf RNA Ebene gezielt eine Adenosin-zu-Guanotin Änderung herbeiführen, ohne das Genom direkt zu modifizieren[53]. Beim Menschen existieren hauptsächlich zwei aktive ADAR Isoformen, ADAR1 und ADAR2, während ADAR3 enzymatisch weitgehend inaktiv ist. ADAR1 tritt wiederum in zwei verschiedenen Varianten auf: Einer konstitutiven, im Zellkern lokalisierten Form (p110) und einer Interferon-induzierbaren, überwiegend zytoplasmatischen Form (p150)[54]. ADAR2 hingegen ist vor allem durch physiologische RNA-Editierungen wie etwa beim Glutamatrezeptor-Gen *gria2* (Glutamat Rezeptor AMPA 2) bekannt und wird vornehmlich im Gehirn exprimiert[53, 55]. Um die therapeutischen Potentiale dieser natürlichen RNA-Editierung zu nutzen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Technologien entwickelt, mit

denen die Aktivität der ADAR Enzyme künstlich auf ausgewählte RNA Moleküle gelenkt werden kann. Eine der bekanntesten Methoden, die RESTORE-Technologie, basiert auf chemisch modifizierten ASOs, die endogenes ADAR ebenfalls spezifisch an eine definierte Ziel-mRNA rekrutieren können. Dies erlaubt eine präzise Editierung der RNA ohne Einbringung exogener Enzyme oder genetischer Elemente und minimiert somit mögliche immunologische Risiken. RESTORE konnte bereits erfolgreich zur Korrektur krankheitsassoziierter RNA-Mutationen, wie z.B. beim α 1-Antitrypsin-Mangel, eingesetzt werden (Grafik 5a) [56].

Eine weitere Strategie, bekannt als LEAPER-Technologie (*Leveraging Endogenous ADAR for Programmable Editing of RNA*), verwendet speziell entworfene ADAR-rekrutierende RNAs (arRNAs). Diese arRNAs binden gezielt an eine Ziel-mRNA und bilden eine künstliche dsRNA Struktur, wodurch das endogen vorhandene ADAR1 aktiviert wird. Auf diese Weise konnten bereits in verschiedenen Modellsystemen pathogene RNA Mutationen effektiv korrigiert werden (Grafik 5b) [57].



Grafik 5: Programmierbare Systeme für ADAR-basiertes RNA Editing. (a) Die zielgerichtete RNA Editierung durch RESTORE erfolgt mittels chemisch modifizierten ASOs. Diese bestehen aus einer programmierbaren Binde-Domäne zur Erkennung der Ziel mRNA, sowie einer konstanten ADAR-rekrutierenden Domäne, die endogene ADAR1 oder ADAR2 Enzyme zum ASO:mRNA-Duplex leitet (hier exemplarisch nur ADAR1 dargestellt). Dies führt zu einer gezielten A-zu-I Editierung an der Ziel Stelle. (b) Die ADAR vermittelte RNA Editierung durch LEAPER basiert auf langen ADAR rekrutierenden RNAs (arRNAs), die mit der Ziel mRNA hybridisieren (z.B. über ein A-C Mismatch) und dadurch dsRNA bilden. Diese dient als Substrat zur Rekrutierung von endogenem ADAR1, das über drei dsRNA-Bindedomänen (dsRBDs) verfügt. Grafik modifiziert nach [58].

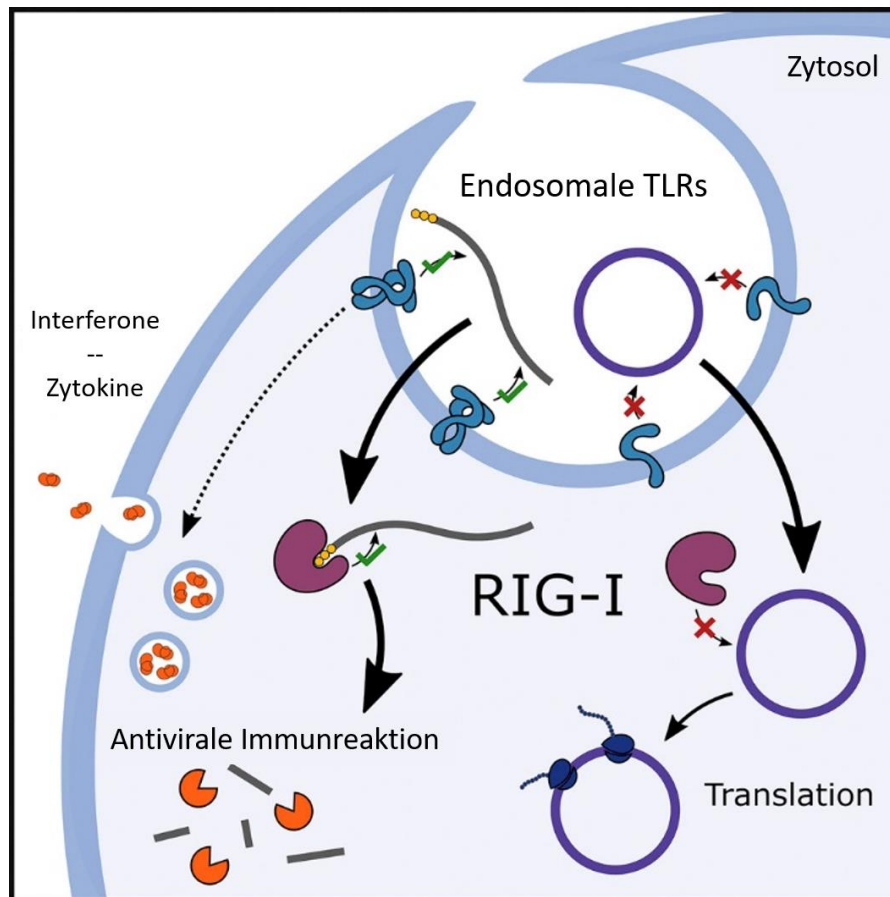
Darüber hinaus wurden auch proteinbasierte Ansätze entwickelt, bei denen katalytische ADAR2 Domänen mit programmierbaren RNA-bindenden Proteinen fusioniert wurden. Ein prominentes Beispiel ist das REPAIR-System (*RNA Editing for Programmable A to I Replacement*), das eine Kombination von dCas13-Proteinen mit der ADAR2-Deaminasedomäne darstellt. Dieses System erlaubt einen flexiblen und präzisen Adenosin-zu-Inosin Austausch, allerdings verbunden mit der Notwendigkeit, ein externes Protein in Zielzellen einzubringen, was gewisse Herausforderungen bezüglich Immunogenität und Off-Target Effekten mit sich bringen kann[59]. Obwohl die ADAR-

vermittelte RNA Editierung in präklinischen Modellen bereits Erfolge erzielt hat, bleiben Herausforderungen wie variierende Effizienzen je nach Zelltyp und RNA-Sequenz sowie unerwünschte Off-Target Editierungen bestehen. Zudem hängt die Effektivität dieses Ansatzes stark von der Verfügbarkeit und der zelltypspezifischen Aktivität der endogenen ADAR Enzyme ab[55]. Dennoch stellt die RNA-basierte ADAR Editierung einen innovativen therapeutischen Ansatz dar, der insbesondere bei der Therapie genetischer Erkrankungen oder von somatischen Mutationen in Tumoren zukünftig eine Rolle spielen könnte.

Circular RNAs (circRNAs) sind einzelsträngige, zirkuläre RNA Moleküle, die durch sogenanntes Back-Splicing entstehen, bei dem ein 5'-Splice-Donor rückwärts mit einem 3'-Splice Akzeptor verbunden wird[60]. Durch ihre geschlossene, ringförmige Struktur sind circRNAs außergewöhnlich resistent gegen enzymatischen Abbau durch Exonukleasen, wodurch sie eine längere Halbwertszeit besitzen als lineare RNAs[61]. Diese hohe Stabilität macht circRNAs besonders attraktiv für therapeutische Anwendungen, darunter gezielt auch in der Krebstherapie[60, 61]. CircRNAs erfüllen natürlicherweise vielfältige Funktionen innerhalb der Zelle, von denen insbesondere die sogenannte „Schwamm-Funktion“ klinisch relevant ist: Dabei binden circRNAs miRNAs und verhindern so deren Interaktion mit Ziel-mRNAs[62]. Ein Beispiel ist ciRS-7 (auch CDR1as genannt), das eine Vielzahl von Bindungsstellen für die tumorsuppressive miR-7 enthält und dadurch tumorfördernde Effekte ausüben kann[60, 62].

In der Onkologie gewinnen circRNAs zunehmend Bedeutung sowohl als Biomarker als auch als direkt therapeutische Werkzeuge. Die Entwicklung künstlicher circRNAs zeigt großes therapeutisches Potential. Insbesondere synthetische circRNAs, die tumorassoziierte Antigene kodieren, stellen vielversprechende neue Krebsimpfstoffplattformen dar. Erste präklinische Studien konnten belegen, dass solche circRNAs auch *in vivo* geringere Immunantworten produzieren als lineare mRNAs und das kodierte Protein stark exprimieren[63].

Trotz des hohen therapeutischen Potentials bestehen bei circRNA-basierten Ansätzen jedoch noch Herausforderungen: Insbesondere die effiziente und tumorspezifische Verabreichung der therapeutischen circRNAs *in vivo* stellt eine zentrale Hürde dar. Zudem bedarf es weitergehender Untersuchungen, um potentielle Off-Target Effekte oder unbeabsichtigte regulatorische Wechselwirkungen mit anderen RNAs auszuschließen (Grafik 6) [60].



Grafik 6: Übertragung einer circRNA in eine Zelle. Bei der endosomal Übertragung von (insbesondere ungecappten) linearen RNAs in die Zelle ist es möglich, dass diese zuerst von endosomalen Toll-like Rezeptoren (TLRs) im Endosom und anschließend von RIG-1-ähnlichen Rezeptoren im Zytoplasma erkannt werden und dadurch eine Antivirale Immunantwort in Form von Interferonen und Zytokinen auslösen. CircRNAs dagegen werden nicht von TLRs und RIG-1-ähnlichen Rezeptoren erkannt und können im Zytosol translatiert werden. Grafik modifiziert nach[63].

1.5 Übertragung von Nukleinsäuren in Zellen

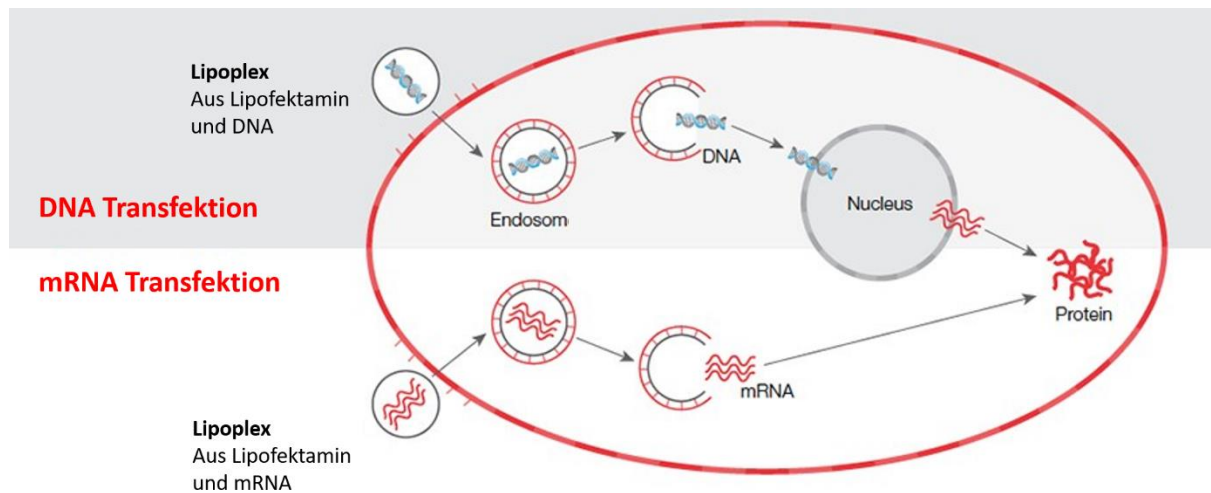
Ein zentrales Merkmal modernen RNA- und Antikörpertherapien ist ihre Fähigkeit zur gezielten, selektiven Wirkung auf definierte Zelltypen oder Gewebe. Dies ist der entscheidende Vorteil gegenüber der klassischen, unspezifisch wirkenden Chemotherapie. Diese Prinzipien der Selektivität gelten jedoch nicht unbedingt nur für die Wirkstoffkomponente selbst, sondern können auch beim Transportweg eine Rolle spielen, wie ein Therapeutikum in die Zielzelle gelangt. So ist insbesondere bei DNA- und RNA-Therapien die Wahl der geeigneten Übertragungs- bzw. Transfektionsmethode entscheidend für die Effizienz der gesamten Therapie. Dabei kann die gezielte Übertragung von Nukleinsäure nicht nur die Wirksamkeit, Sicherheit und Selektivität erhöhen. Darüber hinaus kann eine gezielte Übertragung auch noch die Menge an benötigtem Therapeutikum reduzieren, wenn eine möglichst große Menge im Zielgewebe wirkt und nicht nutzlos in anderen Geweben abgebaut wird. Heute stehen eine Vielzahl physikalischer, chemischer und biologischer Übertragungsmethoden zur

Verfügung. Von klassischer Lipofektion, über Lipidnanopartikel oder nanopartikuläre Trägersysteme bis hin zu viralen Vektoren. Diese Systeme unterscheiden sich nicht nur in ihrer Effizienz und Toxizität, sondern insbesondere auch in ihrer Fähigkeit, selektiv bestimmte Zelltypen oder Gewebe zu adressieren. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über etablierte und neuartige Methoden zur Übertragung biologisch aktiver Nukleinsäuren in Zellen und Gewebe.

1.5.1 Lipofektion

Die Lipofektion ist ein etabliertes chemisches Verfahren zur Übertragung von Nukleinsäuren in Zellkulturen durch kationische Lipide, die stabile Komplexe mit RNA oder DNA bilden[64]. Diese stabilen Komplexe aus kationischen Lipiden in Kombination mit DNA oder RNA werden Lipoplexe genannt. Diese Lipoplexe werden primär über endozytotische Mechanismen in die Zellen aufgenommen, insbesondere durch Clathrin-vermittelte Endozytose[65]. Nach Aufnahme in Endosomen ist die endosomale Freisetzung ein kritischer Schritt, bei dem die Nukleinsäuren aus dem Inneren des Endosoms in das Zytoplasma freigesetzt werden. Nur im Zytoplasma können die Nukleinsäure ihre Wirkung entfalten. Würden Sie weiter im Endosom bleiben würden die Wirkstoffe abgebaut und keine Expression würde stattfinden. Helferlipide fördern die Destabilisierung der endosomalen Membran und ermöglichen so die Freisetzung der Nukleinsäuren in das Zytoplasma[66]. Wird RNA übertragen, kann diese im Zytoplasma nach der endosomalen Freisetzung direkt translatiert werden. Wird DNA übertragen, muss diese zunächst in den Nukleus gelangen, wo sie transkribiert wird. Die von der pDNA im Zellkern transkribierte RNA wird anschließend ins Zytoplasma transportiert, wo sie ebenfalls translatiert wird.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde sowohl für DNA- als auch für RNA-Übertragung *in vitro* Lipofectamine3000 verwendet. Dieses ermöglicht zuverlässig hohe Transfektionseffizienzen, bei gleichzeitig geringer Toxizität. Für *in vivo* Anwendungen wurde ein Protokoll mit geringem Volumen entwickelt, um pDNA effizient zu übertragen[67].



Grafik 1: DNA und RNA Übertragung mittels Lipofectamin. Sowohl mRNA als auch DNA können mit Lipofectamin einen Komplex bilden, den sogenannten Lipoplex. Dieser wird von der Zelle mittels Endozytose aufgenommen. Durch endosomalen Freisetzung kann der Inhalt des Lipoplexes aus dem Endosom ins Zytosol gelangen. Die mRNA kann sofort translatiert werden, die DNA muss zunächst in den Zellkern transportiert werden. Die im Zellkern transkribierte mRNA ins Zytoplasma transportiert und dort translatiert werden. Grafik modifiziert nach [68].

1.5.2 Lipidnanopartikel

Während Lipofektionsreagenzien wie Lipofectamin *in vitro* eine einfache und effiziente Methode zur Nukleinsäureübertragung darstellen, zeigen die einfachen kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien *in vivo* meist unzureichende Übertragungseffizienzen. Daher werden für *in vivo* Anwendungen häufig für den spezifischen Anwendungsfall spezifische Lipidnanopartikel (LNPs) entwickelt. LNPs kombinieren die Vorteile lipophiler Formulierungen mit struktureller Stabilität und gezielter Steuerbarkeit. Im LNP ist wie bei der Lipofektion die mRNA geschützt vor enzymatischem Abbau oder einer Erkennung durch das Immunsystem. Große Aufmerksamkeit erhielten LNPs durch ihre Verwendung bei der Übertragung der mRNA Impfstoffe gegen SARS-CoV-2[69]. Die jeweilige Zusammensetzung ermöglicht *in vivo* eine kontrollierte Verteilung, etwa in bestimmte Organe oder Zelltypen. Dies ist besonders im Kontext systemischer RNA Therapien entscheidend. LNPs bestehen typischerweise aus vier Komponenten: Einem ionisierbaren Lipid, das die RNA bei saurem pH-Wert bindet und im physiologischen Milieu neutral bleibt[15]. Einem Helferlipid wie DSPC oder DOPE zur Membranstabilisierung[15]. Cholesterin wird als Strukturgeber und zur Stabilisierung verwendet[15]. PEGylierte (*polyethylene glycol*, PEG) Lipide werden verwendet, um die Partikelgröße zu steuern und um den LNP vor der Interaktion mit anderen Molekülen sterisch abzuschirmen[15]. Diese Zusammensetzung schützt die RNA vor Degradation und ermöglicht die endozytotische Aufnahme und die endosomale Freisetzung der Nukleinsäuren.

Der Lipoplex, bestehend aus LNPs und RNA lässt sich insbesondere durch Partikelgröße (*z-Average* in nm), Partikelladung (*Zeta-Potential*, in mV) und Polydispersitätsindex (PDI) charakterisieren. Der PDI ist dabei ein Maß für die Heterogenität des Lipoplexes. Die Bestimmung dieser Parameter ist für die medizinische Zulassung notwendig und kann sich entscheidend durch die Umgebungsbedingungen wie Umgebungstemperatur und Lagerungsdauer verändern[70]. Die Veränderung der Parameter beeinflusst wiederum deutlich die Übertragungsfähigkeiten des Lipoplex[70]. Als ein bekanntes Beispiel für diese Charakterisierung lässt sich die Standard LNP-Zusammensetzung für die BioNTech Impfung nennen. Diese besteht aus ionisierbarem Lipid (DLin-MC3-DMA), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC), Cholesterin und DMG-PEG2000 im Verhältnis 50:10:38,5:1,5 mol%[70]. Frisch hergestellt hat dieser LNP-mRNA Komplex im Durchschnitt einen PDI von 0,081, eine Partikelgröße von 112,2 nm und eine Ladung von -5,723 mV[70]. Ein weiteres wichtiges Maß ist die Einkapselungseffizienz, die angibt wieviel Prozent der mRNA im Lipoplex eingekapselt vorliegt. Diese lag bei 93,956%[70]. Während beispielsweise eine einwöchige konstante Lagerung des Lipoplexes keinen Einfluss auf diese Faktoren hatte, hatte die Lagerungstemperatur oder die Lichteinstrahlung einen massiven Einfluss auf die genannten Faktoren und analog auf die Übertragungseffizienz[70]. Hier war auffällig, dass die Lagerung bei -80 °C kaum besser war als die Lagerung bei Raumtemperatur[70]. Dagegen war die Proteinexpression nach der Lagerung bei -30 °C am effizientesten[70].

Im Falle der Impfung wird der LNP in den Muskel injiziert und verbleibt dort. Nach intravenöser Gabe dagegen gelangen viele LNPs bevorzugt in die Leber. Diese Aufnahme erfolgt dort unter anderem durch die Bindung von Apolipoprotein E aus dem Blut an die LNP Oberfläche und den anschließenden Import über LDL (*low density lipoprotein*) Rezeptoren die in großer Zahl auf Hepatozyten lokalisiert sind[71]. Die Zugabe von anderen Helferlipiden kann die Aufnahme des LNPs in andere Gewebe bewirken. So haben Dillard et al. gezeigt, dass die Zugabe von DOTAP die Aufnahme in die Lunge deutlich erhöht, während das Lipid 18PA die Aufnahme in die Milz erhöht[72]. Dabei bewirkt das Helferlipid nicht direkt die Aufnahme ins Zielgewebe. Die Lipidzusammensetzung hat stattdessen direkten Einfluss darauf, welche Proteine sich aus dem Blut an die LNPs anhaften. Diese Proteinzusammensetzung wiederum kann eine Aufnahme in jeweilige Gewebe bewirken[72]. Es gibt viele Unternehmen mit riesigen Lipid-Bibliotheken, die untersuchen welche zusätzlich beigemischten Lipide eine effiziente Aufnahme in Zielgewebe ermöglichen.

Zentral für eine erfolgreiche Übertragung mittels LNPs ist die endosomale Freisetzung, da die RNA nach endozytotischer Aufnahme meist im Endosom eingeschlossen bleibt und anschließend lysosomal abgebaut wird. Durch pH abhängige Protonierung der ionisierbaren Lipide destabilisieren LNPs die endosomale Membran, was eine kontrollierte Freisetzung der RNA ins Zytosol ermöglicht[73]. Die endosomale Freisetzung ist ein limitierender Faktor bei der Übertragung. Es wird vermutet, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz der RNA die endosomale Freisetzung überhaupt schafft.

Auch wenn Fortschritte bei der zielgerichteten Übertragung von LNPs gemacht wurden, bleibt es weiter schwierig den LNP bei systemischer Applikation gezielt in andere Gewebe als die Leber zu übertragen. Häufig gelangt ein großer Teil weiterhin in Nicht-Zielgewebe. Eine besondere Herausforderung ist die Nukleinsäureübertragung ins Gehirn, da dieses zusätzlich durch die Blut-Hirn-Schranke vor einer effizienten LNP Übertragung abgeschirmt ist.

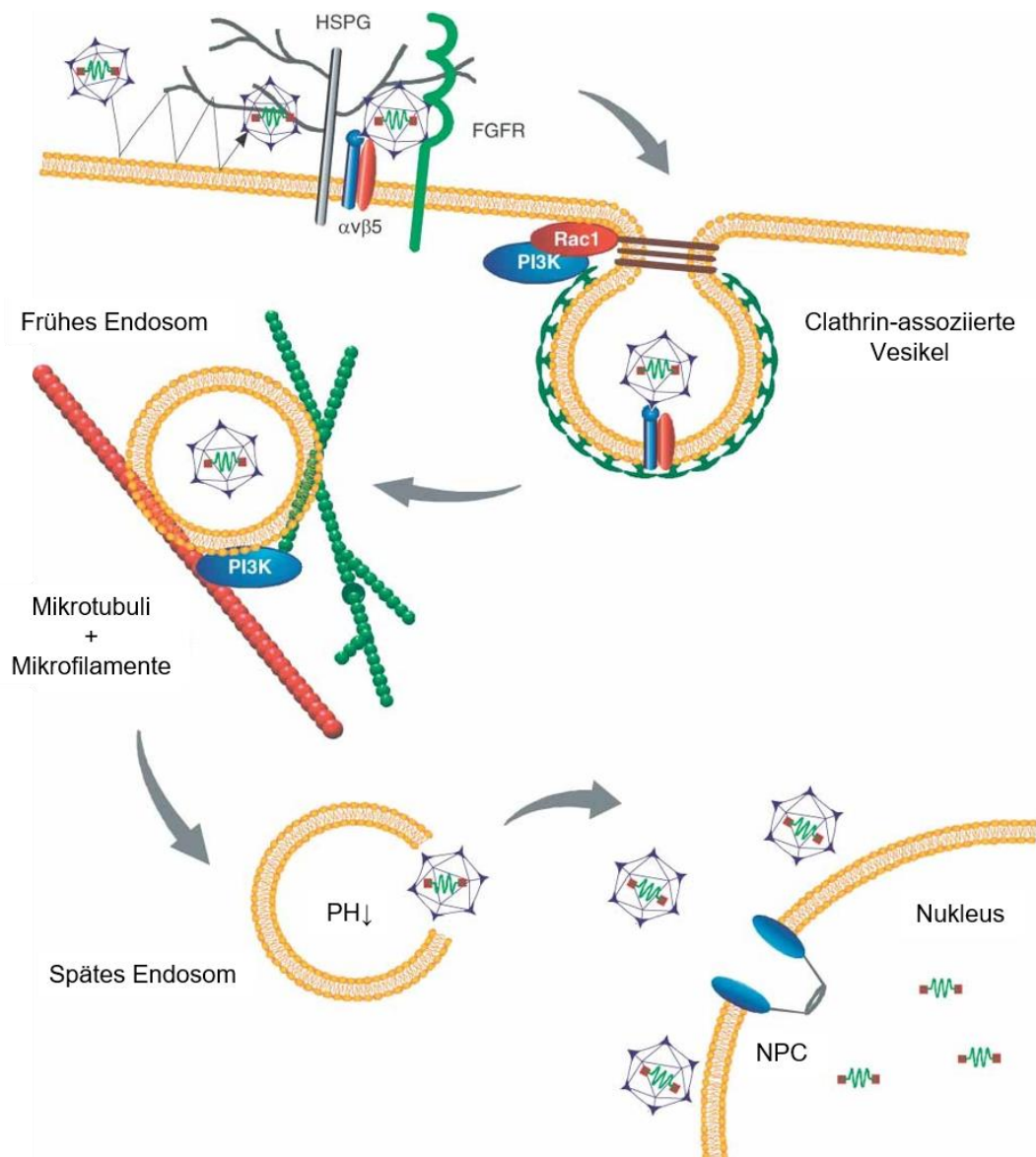
Um die LNPs bevorzugt in Zielzellen und Zielorgane zu übertragen, ist es weiterhin möglich, ihre Partikeloberfläche zu modifizieren. Hierzu können Liganden wie Peptide, Antikörperfragmente oder kleine Moleküle an LNPs gekoppelt werden, um gezielt Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen zu adressieren[74]. Häufig wird beispielsweise Folsäure als Ligand verwendet, um gezielt Zellen mit Folat-Rezeptoren auf der Oberfläche zu erreichen[67]. Dieser Rezeptor ist auf vielen Tumoren überexprimiert[67, 74].

1.5.3 Virale Genübertragungssysteme

Virale Vektoren sind ebenfalls effektive Werkzeuge zur effektiven Übertragung von Nukleinsäuren. Am häufigsten eingesetzt werden Adeno-assoziierte Viren (AAV), Lentiviren und Adenoviren. Ihre Wahl richtet sich nach der Zielzellart, dem gewünschten Expressionszeitraum und der Größe des zu transportierenden Konstrukts. AAVs wurden in den letzten Jahren besonders für *in vivo* Anwendungen getestet, da sie nicht stabil in die DNA integrieren und sich gewebespezifisch designen lassen[75]. Allerdings ist die Länge der Konstrukte, die sie übertragen können auf ca. 4,7 kb begrenzt[75].

Die Aufnahme von AAVs in Zellen erfolgt Serotyp-übergreifend überwiegend durch receptorvermittelte Endozytose. AAV Virionen kontaktieren mehrfach die Zellmembran, bevor es zur Internalisierung kommt (Grafik 8). Die initiale Bindung erfolgt an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) als primäre Rezeptoren. Diese Interaktion induziert reversible strukturelle Veränderungen im Kapsid, die den Zugang zu Ko-Rezeptoren ermöglichen[76]. Wichtig sind die Ko-Rezeptoren FGFR-1 (*fibroblast growth factor receptor 1*), HGFR (*hepatocyte growth factor receptor*) und der Laminin Rezeptor die den Kontakt von Virus und Zelle vermitteln[76]. Integrine hingegen vermitteln die Endozytose über Clathrin-assoziierte Vesikel und begünstigen darüber hinaus den Transport der virushaltigen Endosomen in Richtung Nukleus durch Zytoskelettveränderungen[76]. Innerhalb der Endosomen löst deren sinkender pH-Wert weitere Kapsidumstrukturierungen aus, insbesondere die Freilegung des VP1-N Terminus mit einer konservierten Phospholipase-A2 ähnlichen Domäne. Diese ist essentiell für die endosomale Freisetzung[76]. Es ist nicht abschließend geklärt, ob das Kapsid mit Konstrukt oder nur das Konstrukt in den Zellkern transportiert wird. Ist im Zellkern ein Helfer Virus vorhanden, kommt es zur Replikation und zur Genexpression der Sequenz[76]. Ein AAV mit sehr hohen

Transduktionseffizienzen ist der AAV2-VSSTSPR Serotyp[77]. Außerdem ist dieser Serotyp in der Lage, sein Konstrukt besonders schnell zu exprimieren[77]. Ursprünglich entwickelt wurde er, um schwer zu transduzierende Immunzellen zu erreichen[77].



Grafik 2: Darstellung der AAV2 Infektion. Nach mehrfachem Zellkontakt bindet der AAV2 an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) auf der Zellmembran. Diese primäre Anheftung wird vermutlich durch Korezeptoren wie FGFR1 und/oder HGFR verstärkt. Der anschließende Kontakt mit Integrinen vermittelt die Endozytose über Clathrin-assoziierte Vesikel. Gleichzeitig kommt es zu Umstrukturierungen des Zytoskeletts, die den gerichteten Transport der AAV-beinhalteten Endosomen in Richtung Nukleus ermöglichen. Der sinkende pH-Wert der Endosomen löst konformationelle Veränderungen in den AAV Kapsiden aus, die zur Freisetzung führen. Nach Eintritt in den Zellkern wird das AAV Genom entweder repliziert. NPC = Kernporenkomplex. Modifiziert nach[76].

Obwohl schon AAV basierte Medikamente zugelassen wurden[75], sind die Hoffnungen auf weitere AAV Therapien in letzter Zeit gesunken. Bei höheren systemischen AAV Applikationen kam es in verschiedenen klinischen Studien zu teils schweren Immunreaktionen, die mitunter tödlich verlaufen sind[78].

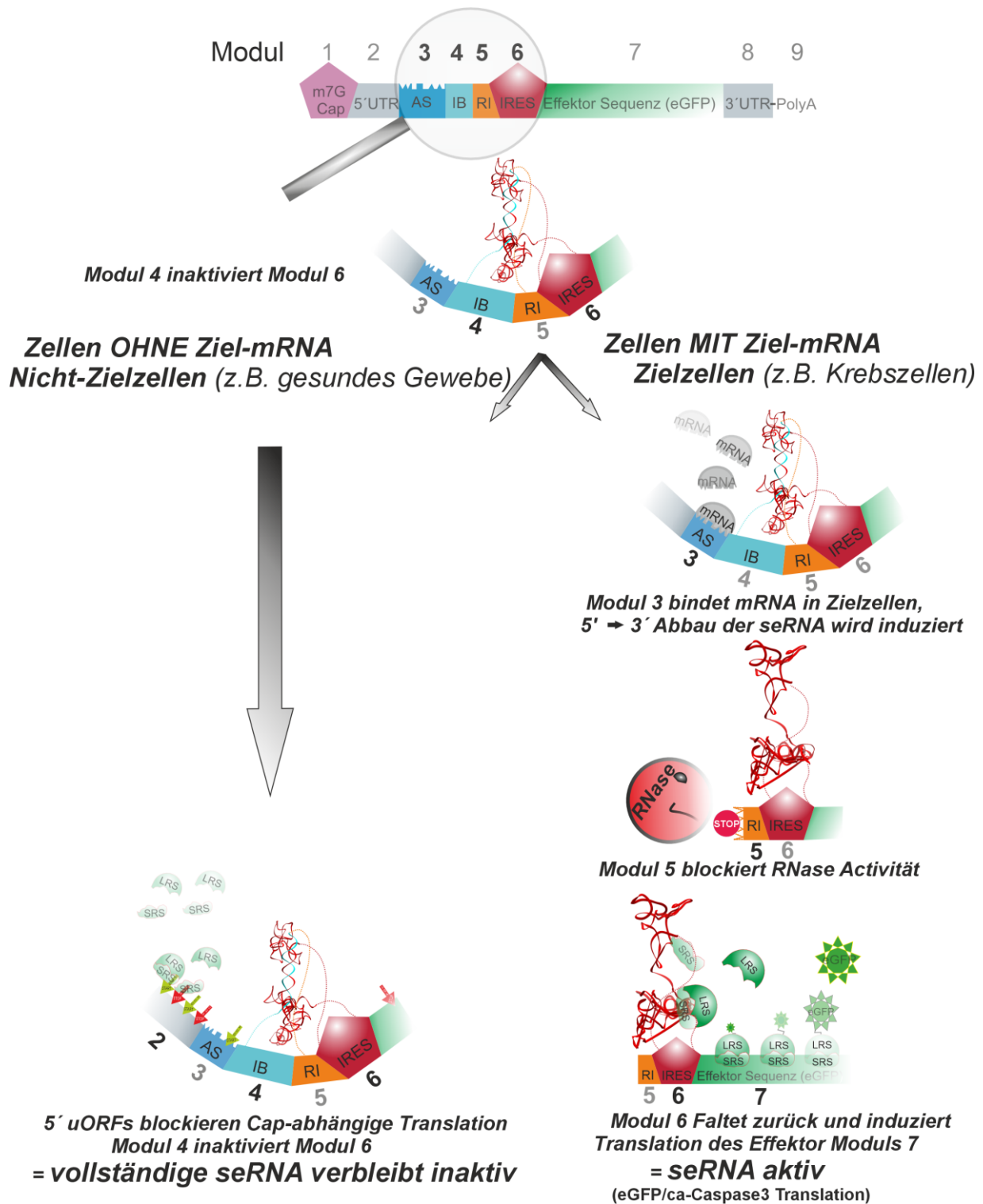
1.6 Konzept der selektiv exprimierbaren RNA

Nachdem sich wie zuvor erwähnt zunehmend die Grenzen für AAV basierte Therapien zeigen, liegt der Fokus heutzutage zunehmend mehr auf RNA-basierten Therapien. mRNA Impfungen haben sich bereits bewährt. Für eine Reihe weiterer Indikationen sind mRNA Therapien jedoch nicht das richtige Werkzeug, da neben kranken Zellen auch gesundes Gewebe adressiert wird. Wie bereits vorgestellt, gibt es bereits einige Techniken die versuchen RNA selektiv einzusetzen, um ausschließlich spezifische Zielzellen zu erreichen. Die selektiv exprimierbare RNA (seRNA) ist eine neu entwickelte Plattform Technik, die einige bereits länger bekannte RNA Aspekte kombiniert. Die neuartige Kombination der im Folgenden beschriebenen RNA Module ermöglicht eine selektive Expression der kodierten Sequenz ausschließlich im Zielgewebe, während die seRNA im gesunden Gewebe inaktiv bleibt. Damit kombinieren seRNAs die Vorteile der mRNA sowie der ASO Therapien: Mit ihr ist es möglich wie bei der mRNA Therapie ein definiertes Protein zu exprimieren, dies geschieht jedoch wie bei ASO nur unter der Bedingung, dass eine zuvor festgelegte Ziel-RNA in der Zelle vorliegt:

seRNAs nutzen ihren modularen Aufbau für die zelltypspezifische Genexpression[79]. Der Funktionsmechanismus basiert auf neun verschiedenen Modulen (Grafik 9): Der seRNA Aufbau umfasst eine 5'-Cap Struktur (Modul 1), eine 5'-untranslatierte Region (*untranslated region*, UTR, Modul 5), eine antisense Sequenz (AS, Modul 3), eine IRES-blockierende Sequenz (IB, Modul 4), eine RNase Inhibitor Sequenz (RI, Modul 5), eine interne Ribosomenbindestelle (*internal ribosomal entry site*, IRES, Modul 6), eine Effektor kodierende Sequenz (Modul 7), eine 3'-UTR (Modul 8) sowie einen Poly(A)-Schwanz (Modul 9). Diese einzelnen Bestandteile (Module) stellen klassische Bestandteile verschiedener RNAs dar und sind einzeln sehr gut charakterisiert. Doch durch ihre gezielte Kombination entsteht eine neue, zielzellspezifische Funktionalität.

Teil des 5'-UTR ist die antisense Sequenz (Modul 3). Diese wird so gewählt, dass sie komplementär zu einer ausgewählten Ziel-RNA ist. Diese Ziel-RNA wird in den Nicht-Zielzellen nicht exprimiert, in den Zielzellen dagegen schon. Außerdem beinhaltet die 5'-UTR mehrere kleine offene Leseraster (*upstream open reading frames*, uORFs) Diese uORFs entfernen weitgehend alle 5'-Cap-abhängig gebundenen ribosomalen Untereinheiten von der seRNA. Dieser Mechanismus, der auch in endogenen mRNAs beobachtet werden kann, ist bereits lange bekannt und gut untersucht[80, 81]. Zusätzlich wird die 5'-Cap-abhängige Translation durch ein Start Codon reduziert. Dieses initiiert die Translation in einem verschobenen Leseraster, das nicht dem des Effektors (Modul 7) entspricht. Da damit die 5'-Cap-abhängige Expression verhindert ist, können seRNAs nur über die IRES (Modul 6) translatiert werden. Wäre eine Translation über die IRES uneingeschränkt möglich, wäre die seRNA jedoch nicht selektiv. Daher beinhaltet die seRNA auch noch eine RNA Sequenz, den sogenannten IRES-Blocker (Modul 4), der die sensitive IRES Struktur bindet und damit ihre Struktur so verändert, dass eine

Ribosomenbindung nicht mehr möglich ist[82]. Solch ein unvollständiges Konstrukt würde nun in Nicht-Zielzellen inaktiv bleiben, in Zielzellen dagegen käme es zur Ziel-RNA Bindung mit anschließendem vollständigen seRNA Abbau. Um die aktivierte seRNA vor einem vollständigen Abbau zu schützen, sitzt vor der IRES ein RNase inhibierendes RNA Element[83], der sogenannte RNase Inhibitor (Modul 5). Dieses Element stellt eine RNA-Sekundärstruktur dar, die mit der für den Abbau verantwortlichen RNase Xrn1 interagiert und diese inhibiert. Abschließend beinhaltet die seRNA noch einen 3'-UTR (Modul 8) und einen Poly-A-Schwanz (Modul 9), die der seRNA Stabilität verleihen. Mit diesen Modulen ist die seRNA vollständig, und verbleibt in Nicht-Zielzellen inaktiv. In Zielzellen jedoch kommt es zum partiellen Abbau der die IRES Blockierung aufhebt und damit zur Aktivierung und der selektiven Genexpression[79]. Im folgenden Kapitel werden die einzelnen Module aus der sich die seRNA zusammensetzt näher erläutert.



Grafik 3: Funktionsmechanismus der seRNA. Die Aktivität von seRNA Molekülen beruht auf einer gezielten sense-antisense Interaktion. In Nicht-Zielzellen (links), die keine passende Ziel-mRNA exprimieren (z.B. Keratin13 als diagnostischen Marker für bestimmte Tumore), bleibt die seRNA inaktiv. Dies ist auf strukturelles Fehlfalten und damit Inaktivieren der IRES (*internal ribosomal entry site*, IRES) und eine durch offene Leseraster (*upstream open reading frames*, uORFs, grüne und rote Pfeile) zurückzuführen. In Zielzellen (z.B. Tumorzellen, rechts) kommt es durch die Bindung an die komplementäre Ziel-mRNA zu einer partiellen doppelsträngigen RNA, die einen partiellen Abbau durch RNasen nach sich zieht. Dieser Abbau stoppt am RNase Inhibitor (RI). Dies löst eine funktionelle Umfaltung aus, wodurch die interne Ribosomenbindestelle (IRES) freigelegt wird und eine effiziente Translation der Effektorsequenz ausschließlich in Zielzellen ermöglicht wird. UTR = untranslatierte

Region, AS = Antisense Sequenz, IB = IRES Blocker, SRS = kleine ribosomale Untereinheit (*small ribosomal subunit*), LRS = große ribosomale Untereinheit (*large ribosomal subunit*). Grafik modifiziert aus[79].

1.6.1 5'-Cap Struktur

Eukaryotische mRNAs tragen am 5'-Ende eine charakteristische Cap-Struktur, bestehen aus einem 7-Methylguanosin (m^7G), welches über eine 5'-5'-Triphosphatbrücke mit dem ersten Nukleotid verbunden ist. Diese sogenannte Cap-0 Struktur erfüllt wichtige Funktionen in der Stabilisierung der RNA, dem Schutz vor Exonukleasen und der Initiation der Translation[84]. Wird ein seRNA-kodierendes Plasmid in Zellen übertragen, wird unweigerlich auch diese 5'-Cap an die seRNA angefügt. Wird eine RNA dagegen in einer *in-vitro*-Transkription (IVT) Reaktion hergestellt, können auch andere 5'-Cap Strukturen verwendet werden. 5'-Cap Analoga können entweder enzymatisch nachträglich, oder während der Transkription in die IVT-RNA eingebaut werden. In der Praxis hat sich das Co-transkriptionelle Capping etabliert, da es effizient und skalierbar ist[85]. Bei der Entwicklung von 5'-Cap Analoga liegt der Fokus von Unternehmen meist auf einer hohen Stabilität und einer hohen Translationseffizienz. So ist ein gängiges Cap-Analog ARCA (Anti-Reverse Cap Analog), das durch Methylierung des 3'-OH verhindert, dass die Cap-Struktur in falscher Orientierung eingebaut wird. So wird sichergestellt, dass bis zu 80-90% der RNA korrekt gecappt ist, was die Translation verbessert[86]. Ein anderes modernes 5'-Cap Analog ist das CleanCap. Es zeigt eine noch höhere Translationseffizienz als das ARCA Cap und eine hohe Immunverträglichkeit und wird erfolgreich bei den mRNA Impfstoffen gegen SARS-CoV-2 eingesetzt[69].

Die seRNA wird allerdings nicht über die 5'-Cap exprimiert, sondern ausschließlich über die IRES Struktur. Daher wäre eine 5'-Cap erfolgsversprechend, die einer IVT-seRNA lediglich Stabilität verleiht, dabei aber wenig bis gar nicht die Bindung ribosomaler Untereinheiten initiiert. So könnte dann auch auf uORFs in der 5'-UTR verzichtet werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, auf eine 5'-Cap Struktur zu verzichten, und stattdessen Sekundärstrukturen zu nutzen, die der RNA Stabilität verleihen. Es ist gut beschrieben, dass Sekundärstrukturen wie terminale Hairpins die Stabilität von mRNA erhöhen können[87].

1.6.2 5'-UTR und 3'-UTR

Die 5'-UTR enthält bei RNAs typischerweise regulatorische Motive[88]. Das können beispielsweise uORFs, G-Quadruplexe oder Stem-Loops sein, die die Ribosomenaktivität und damit die Translationseffizienz regulieren[88]. Auch die Länge und Basenzusammensetzung beeinflusst die Translation, längere und GC-reiche Sequenzen senken die Effizienz[88]. Die 3'-UTR reicht vom

Stopcodon der Effektor-Sequenz bis zum Poly-A-Schwanz. Sie kann zum Beispiel AU-reiche Elemente enthalten, die die RNA Stabilität regulieren[89]. In der 3'-UTR Sequenz können Proteine binden, die ebenfalls die Stabilität und Translationseffizienz beeinflussen[89].

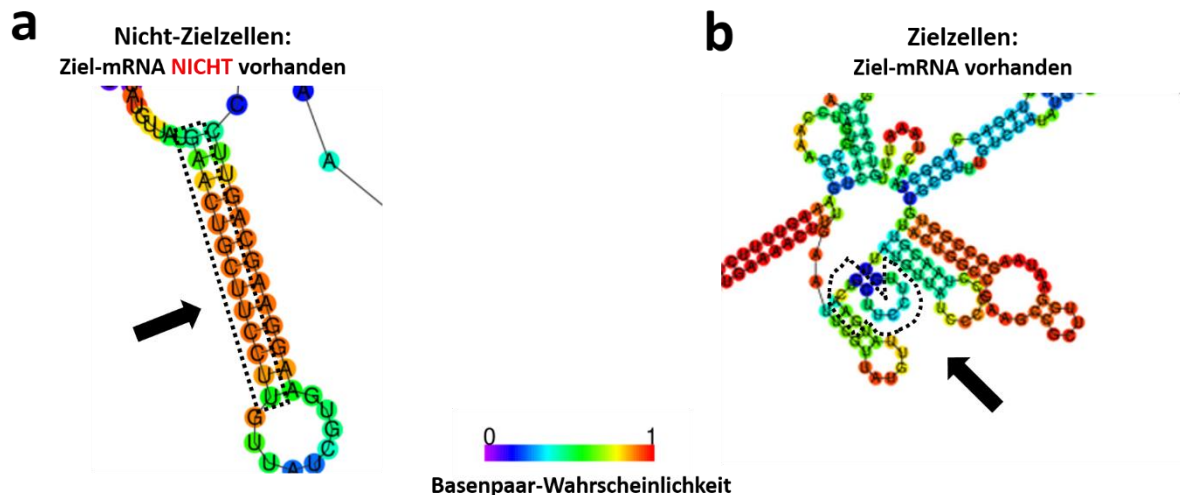
1.6.3 Antisense-Sequenz

Die Antisense Sequenz (AS) ist entscheidend für die Definition von Nicht-Zielzellen und Zielzellen. Die AS sollte so ausgewählt werden, dass die entsprechende revers komplementäre Ziel-RNA nur in den Zielzellen exprimiert wird und nicht in anderen Zellen in die die seRNA gelangen könnte. Wenn die AS in Zielzellen mit der Ziel-RNA interagiert, entsteht eine lange RNA mit begrenzten dsRNA Abschnitten. Wenn diese dsRNA Abschnitte eine gewisse Länge überschreiten, aktiviert dies zelluläre Abwehrmechanismen. dsRNA Bereiche werden effizient erkannt, insbesondere durch Enzyme der RNase-3 Familie, aber auch durch dsRNA Sensoren wie MDA5 (*melanoma differentiation-associated Protein 5*) und PKR (*protein kinase R*), die zu Inhibition der Translation oder RNA Abbau führen können[90]. Für die zelluläre Erkennung der dsRNA spielt die Länge eine wichtige Rolle[91]. Kurze dsRNAs mit einem offenen Ende werden schon ab einer Länge von etwa 20 bp über RIG-1 effizient erkannt [92]. Liegen die dsRNA Bereiche partiell in einer längeren RNA, ist die Erkennung für die Zelle schwieriger. So erkennt MDA5 beispielsweise erst dsRNA Sequenzen über 1000 bp sehr effizient [92]. Die Oligoadenylat-Synthetase 3 hat eine sehr hohe Affinität zu dsRNA und erkennt effizient Sequenzen ab 50 bp[91]. In dieser Arbeit wurden längere Antisense-Sequenzen verwendet mit etwa 625 bp. Es wurden bereits seRNAs mit einer Antisense-Sequenz Mindestlänge von 80 bp verwendet, die ebenfalls eine erfolgreiche Aktivierung zeigten. [79]. Darüber hinaus liegen in der Antisense-Sequenz uORFs, die 5'-Cap gebundene ribosomale Untereinheiten entfernen.

1.6.4 IRES-Blocker Sequenz

Der IRES-Blocker (IB) ist eine kurze Sequenz, die durch antisense Bindung die IRES inhibiert. Um die Bindung des IB an die IRES zu simulieren, können Programme wie Vienna RNAfold genutzt werden, um Vorhersagen über die Stabilität der Bindung treffen zu können. Der IB muss die IRES stabil genug binden, um die Struktur der IRES zu verändern. Jedoch darf der Blocker nicht zu lang und zu stark sein, damit keine Erkennung der kurzen dsRNA-Sequenz erfolgt, welches einen anschließendem RNase-Abbau nach sich zöge. Bereits kurze IB reichen aus, um eine relativ stabile doppelsträngige Struktur aus der ansonsten sehr flexiblen IRES zu formen (Grafik 10a). Bei Vorhandensein der Ziel-mRNA bindet diese die Antisense-Sequenz und zieht damit sterisch auch den IRES-Blocker aus der IRES (Grafik 10b). Anschließend würde es zum teilweisen RNase Abbau kommen, der auch den IRES-Blocker vollständig

entfernt. Die Sekundärstruktur Simulation zeigt, wie die EMCV IRES ohne den IB wieder sehr flexibel mit sich selbst wechselwirken kann.



Grafik 4: Beispiel für das Design eines IRES-Blockers. Beispielhaft wurde das Design für einen IRES-Blocker dargestellt, der die EMCV IRES inhibiert. Mithilfe des Simulationsprogramms Vienna RNAfold wurde die Veränderung der Sekundärstruktur simuliert[93]. (a) Die Situation ohne Ziel-mRNA: Eine Sequenz der EMCV IRES ist markiert durch den schwarzen Pfeil, umrandet durch die schwarzen Punkte. Die orange Farbe zeigt eine relativ hohe Basenpaarwahrscheinlichkeit an mit dem IRES-Blocker der gebunden ist. (b) Die Situation mit Ziel-mRNA: Die Ziel-mRNA hat die Antisense-Sequenz gebunden, dadurch ist eine lange stabile Sekundärstruktur entstanden (in diesem Bildausschnitt nicht dargestellt, anschließend würde der Abbau durch RNasen stattfinden). Schon diese Bindung der Ziel-mRNA an die Antisense-Sequenz reicht aus, um den IRES-Blocker aus der EMCV IRES sterisch zu entfernen. Markiert durch den schwarzen Pfeil ist die zuvor geblockte IRES Sequenz, wie diese flexibel mit sich selbst faltet.

1.6.5 RNase-Inhibitor

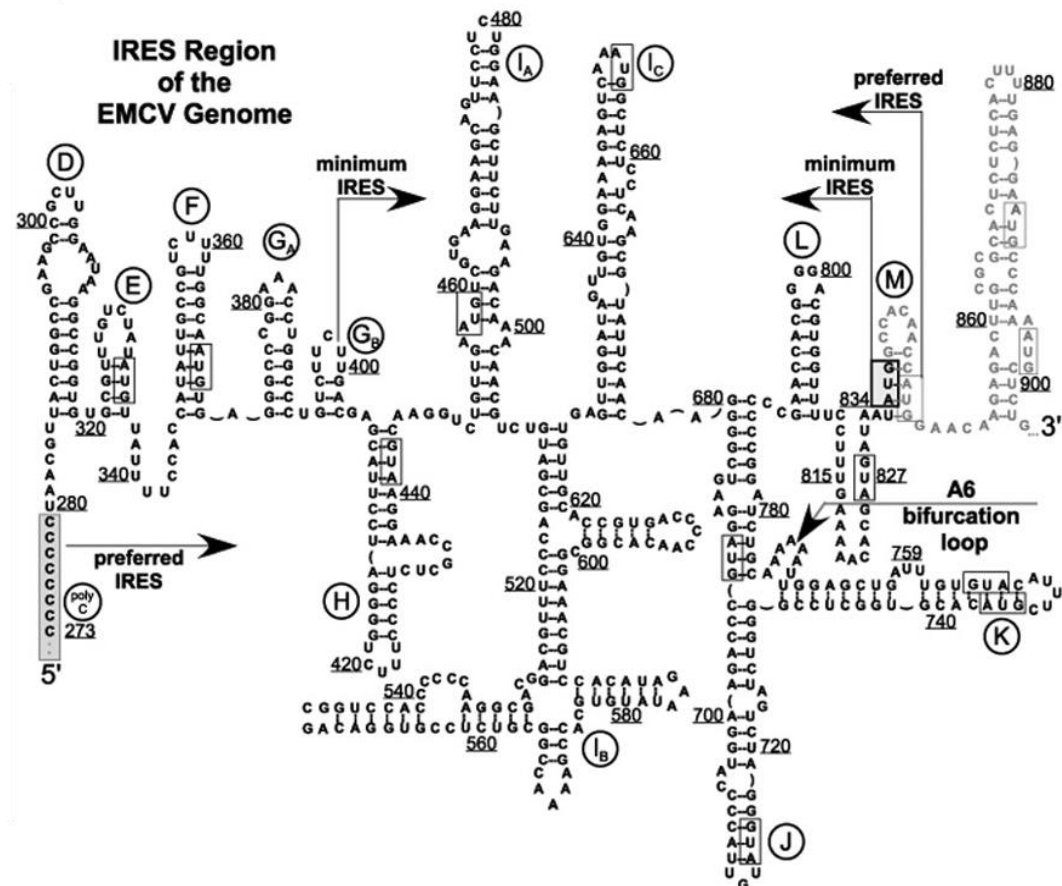
Der RNase-Inhibitor (RI) stammt aus dem Zika-Virus[83]. Der Zika Virus enthält zwei RNA-Elemente, xrRNA1 und xrRNA2 (*exoribonuclease-resistant RNAs*), die durch Pseudoknot und Loop-Faltung die zellulären 5'-3' Exoribonuklease Xrn1 effektiv blockieren. Beide Elemente wurden zusammen in der seRNA zur Blockierung der RNasen genutzt. Die xrRNAs sind mechanisch sehr stabil und bewirken einen Stopp der Exonuklease, während die nachgelagerte RNA intakt bleibt[94].

1.6.6 IRES

Die Translation eukaryotischer mRNAs erfolgt typischerweise 5'-Cap-abhängig, wobei die 5'-Cap Struktur (m7G) vom eIF4F Komplex erkannt wird, der anschließend die 40S-Untereinheit des Ribosoms zur mRNA rekrutiert. IRES Strukturen stellen eine 5'-Cap-unabhängige Alternative zur Translationsinitiation dar. Diese RNA-Strukturen ermöglichen eine direkte Rekrutierung der Ribosomen im Inneren der mRNA, unabhängig von der 5'-Cap Struktur. IRES Strukturen wurden

ursprünglich in viralen Genomen entdeckt und finden sich unter anderem in RNA Viren wie Picornaviren, Flaviviren und Hepaciviren. Sie finden sich jedoch auch in einigen eukaryotischen mRNAs, insbesondere solchen die unter Stressbedingungen oder während der Apoptose exprimiert werden[95].

IRES Strukturen bestehen aus komplex gefalteten RNA Domänen, die spezifische Wechselwirkungen mit Ribosomen oder Translationsfaktoren eingehen und so die Initiation der Translation ermöglichen. Besonders gut charakterisiert sind virale IRES Strukturen wie zum Beispiel die IRES des Encephalomyocarditis Virus (EMCV). Manche virale IRES Strukturen, wie die der Hepatitis-C-Virus (HCV), können sogar direkt mit der 40S-Untereinheit des Ribosoms interagieren, ohne zusätzliche Faktoren zu benötigen[96, 97]. In dieser Arbeit wurde für die seRNA die EMCV IRES verwendet, eine relativ große und im Vergleich zu anderen IRES Strukturen relativ stark exprimierende IRES (Grafik 11)[97, 98].



Grafik 5: Die IRES Struktur des Encephalomyocarditis virus (EMCV). Dargestellt ist die Sequenz und die Sekundärstruktur, basierend auf Vorhersagen von [99]. Es sind funktionelle Motive hervorgehoben, die für die bicistronische Expression wichtig sind. Abbildung übernommen aus[98].

Die Verwendung von IRES Strukturen in der seRNA bietet sich an, da die Funktionsweise von IRES Strukturen schon bei kleinsten strukturellen Veränderungen deutlich beeinträchtigt ist[82]. Bereits eine Basenänderung kann die Expression einer IRES deutlich reduzieren, bei mehreren Veränderungen ist

die Funktion einer IRES vollständig reduziert, wenn die Strukturveränderung in einer wichtigen Loop Struktur oder einem Pseudoknot liegt [97, 100].

1.6.7 Effektor-Sequenz

Die Effektor-Sequenz der IRES entspricht dem Protein von Interesse, welches in Zielzellen selektiv exprimiert wird. In dieser Arbeit handelt es sich dabei meistens um eGFP (*enhanced green fluorescent protein*). Durch die Expression von eGFP können Transfektionseffizienz der Konstrukte und auch feinste Unterschiede der Expressionsintensität sehr sensitiv mikroskopisch oder durchflusszytometrisch ausgewertet werden. Es ist jedoch theoretisch möglich jede beliebige Sequenz als Effektor-Sequenz zu verwenden. So könnte beispielsweise auch Luciferase verwendet werden, um in Tierversuchen die Expression des seRNA in verschiedenen Geweben effizient auszulesen. In der therapeutischen Anwendung kann die Sequenz von Proteinen oder Peptiden verwendet werden, welche die Zielzellen selektiv abtöten. In dieser Arbeit wurde dafür die ca-Caspase3 (*constitutive active Caspase3*) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Caspase3, die so verändert wurde, dass sie bei Expression immer aktiv ist und nicht erst von der Zelle durch Spaltung aktiviert werden muss[101]. Theoretisch könnten jedoch auch noch toxischere Moleküle als Effektor verwendet werden, die gegebenenfalls noch mehr Einfluss auf das umliegende Gewebe der Zielzelle haben.

1.6.8 Poly-A-Schwanz

Der Poly-A-Schwanz dient der Stabilität der RNA und sorgt für eine effiziente Translation[102]. Mit wenigen Ausnahmen wie zum Beispiel Histon RNAs, enden alle Protein kodierenden RNAs mit einem Poly-A-Schwanz. Wird die seRNA als seRNA kodierendes Plasmid übertragen, fügt die Zelle der seRNA einen Poly-A-Schwanz an. Wird die seRNA in einer IVT Reaktion hergestellt, gibt es zwei Möglichkeiten einen Poly-A-Schwanz hinzuzufügen. Entweder kann der Poly-A-Schwanz nach der eigentlichen IVT Reaktion enzymatisch dem RNA Molekül angehängen werden. Dabei ist der Nachteil, dass ein zusätzliches Enzym verwendet werden muss. Dies muss darüber hinaus unter alkalischen Bedingungen ablaufen, da die Poly(A) Polymerase ihre höchste Aktivität bei einem pH über 7,5 entwickelt. Da die mRNA sehr empfindlich ist, resultiert aus dem alkalischen Milieu eine RNA mit geringerer Qualität[103]. Unter Laborbedingungen zeigt ein enzymatisch angehängener Poly-A-Schwanz meist eine Länge von um die 150 Basenpaaren. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit seRNAs mit enzymatisch angehängenem Poly-A-Schwanz gearbeitet.

Ansonsten gibt es die Möglichkeit die Sequenz in das DNA Template der IVT Reaktion einzufügen, sodass die seRNA direkt polyadenyliert entsteht. Jedoch ist es schwierig Sequenzen von dieser Länge zu klonieren, das Maximum liegt bei etwa 120 Basenpaaren[103]. Eine Alternative dafür ist ein segmentierter Poly-A-Schwanz, bei dem Sequenzen von 40-60 Adenosinen unterbrochen werden durch einzelne Spacer-Sequenzen. Diese Konstrukte können gut kloniert werden, bei gleichbleibender mRNA Stabilität und Expression[103].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl klassische Behandlungsmethoden von Tumoren wie zum Beispiel die Bestrahlung effizienter und zielgerichteter geworden sind, ist die Krebstherapie immer noch mit großen Nebenwirkungen für Patienten verbunden. mRNA wurde in Impfungen das erste Mal sehr erfolgreich als Medikament verwendet. Für die systemische RNA Therapie darf die mRNA jedoch nur in Zielzellen ihre Wirkung entfalten, da sonst die gleichen Nebenwirkungen wie bei klassischen Chemotherapien auftreten würden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer weiteren RNA Plattform, welche es ermöglicht RNA selektiv in Zielzellen zu aktivieren, der seRNA.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das seRNA System funktional zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollte insbesondere die Interaktion des IRES-Blockers mit der IRES nachgewiesen werden. Weiterhin sollte eine seRNA induzierte Immunantwort ausgeschlossen werden. Für die Analyse der Funktionalität sollte eGFP als Effektor verwendet werden, doch anschließend sollte für den therapeutischen Einsatz der seRNA ein Apoptose-induzierender Effektor wie die Caspase3 eingesetzt werden. Ziel war es weiterhin, die Wirksamkeit der seRNA durch eine Erhöhung der Stabilität oder auch durch den Einsatz von Genexpression steigernder Substanzen zu erhöhen. Weiterhin sollte die seRNA in ihrem Aufbau weiterentwickelt und wenn möglich vereinfacht werden. Dafür sollten verschiedene seRNA Module, wie zum Beispiel die 5'-Cap Struktur, Stabilitäts-relevante Sekundärstrukturen oder andere IRES Elemente, kritisch analysiert und falls möglich verändert bzw. optimiert werden. Diese Ergebnisse sollten in der Zellkultur mit verschiedenen Zelltypen verifiziert werden, und anschließend auch in komplexen Co-Kulturmodellen bestätigt werden. Schließlich war es das Ziel die *in vitro* generierten Erkenntnisse auch auf *in vivo* Modelle zu übertragen, bei denen deutlich komplexere Übertragungstechniken angewandt werden müssen. Abschließend war es das Ziel, das seRNA Expressionssystem über verschiedene Vektorsysteme zu verifizieren und damit das System neben seRNA kodierenden Plasmiden auch auf AAVs und Minicircles zu übertragen. Schließlich sollte ein auf RNA-Ebene funktionales System, wenn möglich auch als *in vitro* transkribierte RNA übertragen werden können, um in der Gesamtheit der Techniken eine breite Anwendbarkeit der Plattformtechnologie auch in der Medizin zu ermöglichen. Ziel dieser Arbeit war es damit einen neuen Ansatz zu eröffnen, der RNA nicht nur effizient, sondern auch selektiv als Therapeutikum gegen Krebs, aber zukünftig auch gegen andere virale oder genetische Erkrankungen einsetzbar macht.

2. Material und Methoden

2.1 seRNA Aufbau

Für den Aufbau der seRNA wurde das Plasmid pmCherryC1 (Addgene) als Vektor-Rückgrat verwendet. Die Antisense-Sequenz gegen humanes Keratin 13 wurde aus dem Plasmid HK13deltaT.eGFP (bereitgestellt von Reinhard Windoffer, Aachen) mittels der Primer P1 und P2 amplifiziert (siehe Tabelle 1). Die IRES-Blocker Sequenz wurde mithilfe der Primerkombinationen P3 und P4 implementiert. Die RNase-Inhibitor Sequenz wurde gemäß dem DNA/RNA-Oligonukleotidsyntheseprotokoll von Eurofins Genomics in zwei Teilen generiert: mit den Primern P5 und P6 (Teil 1) sowie P7 und P8 (Teil 2). Die EMCV IRES wurde aus dem Plasmid pFR_wt (Prof. Palmenberg, Wisconsin, USA) mittels der Primer P9 und P10 isoliert. Die konstitutiv aktive Variante von Caspase3 wurde gemäß dieser Publikation kloniert[101]. Die terminalen Hairpins stammen ebenfalls aus einer früheren Publikation[87], die exakte Sequenz wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die AFP Sequenz wurde der Datenbank entnommen (NM_007423.4 Afp, organism=*mus musculus*, GeneID=11576). Ein 556 Basenpaar langer Abschnitt daraus wurde ergänzt durch uORFs. Diese Sequenz wurde anschließend bei Eurofins bestellt und die flankierenden Schnittstellen Age1-EcoR1 in das seRNA Konstrukt eingebaut. Alle Primer stammen von Eurofins Genomics. Die Restriktionsenzyme stammen alle von New England Biolabs.

Für das α -Actinin-eGFP Plasmid wurde die nicht-muskuläre α -Actinin Sequenz (ca. 2.800 bp, zur Verfügung gestellt von Dr. D. J. Kwiatkowski, Harvard Medical School), in das in dieser Arbeit ebenfalls als konventionelles Kontrollplasmid verwendete eGFP Plasmid pEGFP-N1 (4.733 bp, Clontech) hineinkloniert[104].

Tabelle 1: Informationen über die verwendeten Primer, die für den seRNA Aufbau verwendet wurden.

Primer	Sequenz	Restriktionsenzym
P1 hK13 antisense fw	CCGACCGTTGATGTCGGCCTCCACGCTCT	AgeI
P2 hK13 antisense rev	CCGGAATTCATGAGCCTCCGCCTGCAGAG	EcoRI
P3 IRES blocker 1 fw	CCGGAATTCGTTATGTTATGAACTGCTTCCTTCACGACATTCA ACAGACCTTGTTATGTTATTAATAAGTCAGGTCGGATCAAGCCA T	EcoRI
P4 IRES blocker 1 rev	CTAGTCTAGACATGGTTGTGGCCATATTATCATCGTGTTTTTC AAAGGAAAACACGT	XbaI
P5 RNase Inhibitor region part 1 fw	GAATTCGTTATGTTATGACCTTGCTCGTCAAGAAGACAGTTAT GTTATTAATAAGTCAGGTCGGATCAAGCCATAGTACGGAAAAA ACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTGC	EcoRI
P6 RNase Inhibitor region part 1 rev	GGCCGCACGTCCTTGGACGGGGCTCACAGGTAGCATAGTTTT TTCCGTACTATGGCTTGATCCGACCTGACTTTTAATAACATAAC TGTCTTCTTGACGAGCAAGGTCATAACATAACG	
P7 RNase Inhibitor region part 2 fw	GGCCGCTAAAAGAAGTCAGGCCATCACAAATGCCACAGCTTG AGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAAA AAAGTTATGTTATG	
P8 RNase Inhibitor region part 2 rev	GGATCCATAACATAACTTTTTTACACCTTCTCAGGTGGAGCTA CAGGCTGCACAGTTTACTCAAGCTGTGGCATTGTGATGGCCT GACTTCTTTTAGC	BamHI
P9 EMCV IRES fw	CGCGGATCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCG	BamHI
P10 EMCV IRES rev	CTAGTCTAGACATGGTTGTGGCCATATTATCATCGTGTTTTTC AAAGGAAAACACGT	XbaI

2.2 Zellkultur

Alle Zelltypen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ bei gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Kultivierung der verschiedenen Zelltypen wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Medien und Medienzusätze verwendet. Auch die Herkunft der Zelltypen ist angegeben. Es wurden für alle Kultivierungen 75 cm² Zellkulturflaschen (Falcon, Thermo Fisher) verwendet. Für manche Zelltypen wurden die Lochschalen im Vorhinein beschichtet (Tabelle 2). Dafür wurden die Substrate für 30 min bei 37 °C mit einer Fibronektin-Lösung von 0,01 mg/mL in steril-filtrierte Wasser beschichtet. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 90% passagiert, und wieder mit einer Dichte von etwa 20-50% ausplattiert. Dafür wurden die Zellen mit 3 mL einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS, Thermo Fisher) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 2-10 min mit einer Trypsin-/EDTA-Lösung (Gibco) inkubiert, bis alle Zellen abgelöst waren. Daraufhin wurde das Trypsin durch Zugabe von 6 mL serumhaltigem Medium abgestoppt und in ein 15 mL Zentrifugationsröhrchen (Falcon, Thermo Fisher) überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 200 x g für 3 min. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in neuem Medium aufgenommen. Die entsprechenden Mengen der Lösung (etwa 1:2 – 1:5 je nach Zellwachstum abhängig vom Zelltyp) wurden anschließend neu ausplattiert. Alle Arbeitsschritte wurden mit sterilen, auf 37 °C vorgewärmten Medien unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zur Untersuchung der pDNA Transkriptionsaktivität wurden verschiedene Substanzen eingesetzt. Trichostation A (TSA, Sigma Aldrich) wurde 3 Stunden nach der Transfektion in einer Endkonzentration von 350 ng/mL zugegeben. Alternativ wurden Romidepsin (10nM), MG149 (1,5 µM) oder C646 (1,5 µM) jeweils ebenfalls 3 Stunden nach der Transfektion als Endkonzentration in 500 µL Medium angewendet (alle Sigma Aldrich). Für die RNA Abbauanalysen wurde die RNA Synthese mit 16 µM Actinomycin D (Carl Roth) inhibiert. Die Chemikalien wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) gelöst. Als Transfektionsverstärker (TrV) kam der Nucleic Acid Transfection Enhancer (Invivogen/ Thermo Fisher) gemäß dem Herstellerprotokoll zum Einsatz.

Die Isolation der Neuronen wurde bereits zuvor beschrieben [105]. Zusammengefasst wurden die Embryonen (E18) von Wistar-Ratten am 18 Tag der Schwangerschaft präpariert. Das Cortex Gewebe wurde entnommen und in HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*, HBSS, Gibco) auf Eis zwischengelagert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Gewebe in doppeltem Volumen Neurobasal Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf 0,01% Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten 24-er Lochschalen (Falcon, Thermo Fisher) ausplattiert. Für die Beschichtung wurde PLL (Sigma Aldrich) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Substrat 4-mal mit kaltem PBS gewaschen. Das Medium der Neuronen wurde alle 2 Tage gewechselt, 11 Tage nach Isolation erfolgte die Behandlung.

Tabelle 2: Medien, Medienzusätze und Herkunft der verwendeten Zelltypen. Falls die Substrate für die Kultivierung beschichtet wurden, ist die verwendete Beschichtung mit angegeben.

Zelltyp	Herkunft	Medium	Mediumzusätze	Beschichtung
humane Vorhaut- Fibroblasten	ATCC	Dulbecco's Modified Eagle Medium GlutaMAX (Gibco)	1% Penicillin Streptomycin (Gibco) 10% fötales Rinderserum (Gibco)	Fibronektin (Sigma- Aldrich)
U-87 MG	CLS	Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma)	1% Penicillin Streptomycin (Gibco) 10% fötales Rinderserum (Gibco) 1% MEM 100x Nicht- essentielle Aminosäure-Lösung (Sigma Aldrich) 1% 100x L-Glutamin (Gibco)	Fibronektin (Sigma- Aldrich)
MCF-7	ATCC	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, GlutaMAX (Gibco)	1% Penicillin Streptomycin (Gibco) 10% fötales Rinderserum (Gibco) 1% MEM 100x Nicht- essentielle Aminosäure- Lösung(Sigma) 1% 100x Sodiumpyruvat (Gibco) 1% Insulin (2 mg/mL, Sigma Aldrich)	Fibronektin (Sigma- Aldrich)
86HG39	IBG-1, Forschungs- zentrum Jülich	Dulbecco's Modified Eagle Medium GlutaMAX (Gibco)	1% Penicillin Streptomycin (Gibco) 10% fötales Rinderserum (Gibco)	keine
SF188	Merck	Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma)	1% Penicillin Streptomycin (Gibco) 5% fötales Rinderserum (Gibco) 1% 100x L-Glutamin (Gibco)	keine

U251 MG	Merck	Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma)	1% Penicillin Streptomycin (Gibco) 10% fötales Rinderserum (Gibco) 1% MEM 100x Nicht-essentielle Aminosäure-Lösung(Sigma) 1% 100x L-Glutamin (Gibco)	keine
H2-35	AG Hildegard Büning, Medizinische Hochschule Hannover	Dulbecco's Modified Eagle Medium hoher Glucosegehalt (Gibco)	1% Penicillin Streptomycin (Gibco) 10% fötales Rinderserum (PanBiotech) 1% MEM 100x Nicht-essentielle Aminosäure-Lösung (Gibco) 1% 100x Sodiumpyruvat (PanBiotech)	keine
Hepa1-6	AG Hildegard Büning, Medizinische Hochschule Hannover	Dulbecco's Modified Eagle Medium hoher Glucosegehalt (Gibco)	1% Penicillin Streptomycin (Gibco) 10% fötales Rinderserum (PanBiotech) 1% MEM 100x Nicht-essentielle Aminosäure-Lösung(Gibco) 1% 100x Sodiumpyruvat (PanBiotech)	keine
Primäre embryonale Ratten-neuronen	Primärzell-isolation, Wistar-Ratten	Neurobasal Medium (Gibco)	2% B-27 (Gibco) 1% GlutaMAX (Gibco) 0,1% Gentamicin (Gibco)	Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich)

2.3 Transfektion

Für die *in vitro* Übertragung seRNA-kodierender Plasmide wurde Lipofectamine3000 (Invivogen/Thermo Fisher) mit 1 µg Plasmid DNA (pDNA) verwendet. Dabei wurden zwei Mikrozentrifugationsröhrchen (Eppendorf) verwendet: In beide wurden 25 µL OptiMEM (Gibco) vorgelegt. In das erste wurden 2 µL Lipofectamine3000 hinzugefügt, gemixt und für 5 min inkubiert. In das zweite Gefäß wurde 1 µL pDNA (1µg/µL) und 1 µL P3000 Reagenz hinzugefügt. Anschließend wurde Gefäß Nummer 2 in Gefäß Nummer 1 überführt. Nach 5 min wurde die Transfektionslösung zu den Zellen gegeben, bei denen kurz zuvor ein Mediumwechsel durchgeführt wurden war.

Die Partikelgröße, der Polydispersitätsindex und das Zeta-Potenzial der pDNA/Lipofectamine3000 Lipoplexe wurden mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) gemessen. Alle Messungen erfolgten bei RT und wurden mindestens dreimal wiederholt. Die Proben wurden vor der Messung in gereinigtem und steril filtriertem (0,1 µm sterile Acrodisc 25 mm Spritzenfilter, VWR) MilliQ Wasser verdünnt.

Für die *in vivo* Übertragung der pDNA im Glioblastommodell wurde ein Protokoll mit geringem Volumen entwickelt. Dafür wurde 2,5 µL P3000 Reagenz mit 2,5 µL Plasmidlösung (1 µg/µL) vermischt[67]. Nach 5 min Inkubationszeit wurde 5 µL Lipofectamine3000 hinzugefügt und durch mixen 30 Sekunden vermischt. Nach einer halben Stunde Inkubationszeit wurde dem Tier 4 µL der Lösung injiziert, was 1 µg pDNA entspricht.

Für die *in vitro* Übertragung von IVT-RNA wurden 2 Mikrozentrifugationsröhrchen mit je 25 µL OptiMEM vorbereitet. In das erste Gefäß wurden 2 µL Lipofectamine3000 hinzugefügt und gemixt. In das zweite Gefäß wurden 2 µg der RNA hinzugefügt und durch pipettieren vermischt. Die OptiMEM-RNA-Lösung wurde in das andere Gefäß überführt und durch pipettieren gemischt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die gesamte Lösung zu den Zellen gegeben, bei denen kurz zuvor ein Mediumwechsel durchgeführt worden war.

Für die Übertragung der RNA im HCC Mausmodell wurden LNPs formuliert. Dafür wurden 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE), 1,2-Dioleoyloxy-3-dimethylaminopropane (DODMA), Cholesterol und Distearoyl-rac-glycerol-PEG2K (DSG-PEG2000) (alle Avanti) in Chloroform (Merck) gelöst, LipidBrick (Polyplus/ Sartorius) in Ethanol p.a. (Merck). Die Lösungen wurden in braunen Vialen (VWR) gemischt und die Lösungen wurden unter Vakuum für eine Stunde evaporiert. Die getrockneten Inhaltsstoffe wurden in 1 mL Ethanol p.a. wiederaufgenommen und 1:1 mit Wasser verdünnt. In der Mischung lag folgende Verteilung der Inhaltsstoffe vor: DOPE 40 mol%, DODMA 20 mol%, Cholesterol 12,4 mol%, DSG-PEG2000 1 mol% und LipidBrick 16,6 mol%. Anschließend wurden 200 µL der Mischung mit einer SDS Gel-Ladespitze (Thermo Fisher) in ein neues Mikrozentrifugationsröhrchen mit 200 µL steril filtriertem Wasser gegeben, durch pipettieren

gemischt und 10 sec gemixt. Diese Mischung wurde auf einem -80 °C Kühlelement gelagert bis zur Anwendung im HCC Mausmodell.

2.4 Durchflusszytometrie

Die Transfektionseffizienz und Expressionsintensität der verschiedenen Konstrukte wurde mittels Durchflusszytometrie (CytoFLEX S Flow Cytometer, Beckman Coulter) bestimmt. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma Aldrich) abgelöst, die Reaktion anschließend mit Medium abgestoppt und Lösung in ein Mikrozentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (200 x g, 3 min) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 200 µL Medium aufgenommen und resuspendiert. Ohne Fixierung wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Es wurden immer mindestens 1×10^4 Zellen untersucht. Die Fluoreszenz wurde unter Verwendung geeigneter Filtereinstellungen und Laserstärke gemessen. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels der CytExpert (Beckman Coulter) Software. Dafür wurde das Gate auf eine Transfektionskontrolle gesetzt, ein Konstrukt ohne Fluoreszenzaktivität (MOCK). Die anderen Proben wurden mit dieser Probe verglichen (siehe Appendix Abbildung 1). Der *forward scatter* (Vorwärtsstreuung) wurde für die Analyse der Zellgröße und der *side scatter* (Seitwärtsstreuung) als Maß für die Granularität der Zelle. Der B525-40-A Filter wurde für die Analyse der eGFP Werte verwendet. Außerdem wurde der Y690-50 Filter-A für die Analyse von RFP exprimierenden Zellen oder für die angefärbten Neuronen verwendet.

2.5 Mikroskopie

Lebend Zell Analysen wurden 24 Stunden nach Plasmid- bzw. RNA-Übertragung bei 37 °C und 5% CO₂ im Phasenkontrast sowie mit Fluoreszenzanregung durchgeführt. Es wurde ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop (cLSM710, Carl Zeiss) verwendet, ausgestattet mit einem 488 nm Argon Laser und passenden Filtereinstellungen, um eGFP zu visualisieren. Um in der Co-Kultur Neuronen zu detektieren wurde ein Helium Neon Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm verwendet. Alle Aufnahmen transfizierter Zellen zeigten eine repräsentative Übersicht im Zentrum des jeweiligen Substrats und wurden mit einem EC Plan-Neofluar 10x/0.3 Ph1 Objektiv (Carl Zeiss) aufgenommen. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zur sowie die Nahaufnahmen der HFF/MCF-7 Co-Kultur wurden mit einem EC Plan-Neofluar 40x/1.3 Öl Ph3 Objektiv (Carl Zeiss) aufgenommen. Für sämtliche Experimente dieser Arbeit wurden die Mikroskop Einstellungen konstant gehalten. Maßstabsbalken wurden mithilfe der Software Fiji/ImageJ 1.54f eingefügt.

2.6 Nano-DMS-MaP

Für die Nano-DMS-Map Experimente wurden 1×10^6 HEK293 Zellen mit 600 ng pDNA, 100 μ L OptiMEM (Gibco) und 7,2 μ L Polyethylenimin (PEI MAX, MW 40.000; Polysciences) entsprechend den Herstellerangaben transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die chemische Modifikation der RNA durch Dimethylsulfat (DMS): Dazu wurden 500 μ L frisches Medium mit 100 mM oder 200 mM DMS tropfenweise zugegeben, sodass sich die Endkonzentration von 20mM bzw. 40 mM DMS in insgesamt 2,5 mM Medium ergab. Die Zellen wurden für 6 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert, Das Medium wurde sofort entfernt und die Reaktion durch vorsichtiges Waschen der Zellen mit 1 mL kaltem DPBS (Gibco) mit 10 μ L β -Mercaptothanol (14,3 M, Roth) gestoppt. Zur Kontrolle wurden zeitgleich Proben ohne DMS-Inkubation unter gleichen Bedingungen mitgezogen. Die RNA wurde anschließend mit Tri Reagent LS (Sigma Aldrich) nach Herstellerprotokoll extrahiert und in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Für die Entfernung von DNA Kontaminationen wurden 10 μ g RNA mit 1,5 μ L Turbo DNase (Thermo Fisher), 20 u RNasin und 10 μ L 10x Turbo DNase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 100 μ L 30 min bei 37 °C inkubiert. Die RNA wurde anschließend mit einem NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

Die reverse Transkription erfolgte mit MarathonRT29 und dem RT-Primer Universal_Rv AACAGCTCCTCGCCCTTGCTC. Für das seRNA-eGFP Vollängenkonstrukt wurden die Primer Selective_Fw GATGTCGGCCTCCACGCTC und Universal_Rv eingesetzt; für das verkürzte Kontrollkonstrukt seRNA Δ 3-5-eGFP wurden Non-Selective_Fw CGGTCGCCATGGTGAG und Universal_Rv verwendet. Die PCR-Amplifikation wurde mit 0,05 u PrimeSTAR GXL Polymerase (Takara Bioscience), 250 nM Primer, 200 μ M dNTPs und 1x GXL-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 μ L durchgeführt. Die Zyklusbedingungen waren: 2 min Initialdenaturierung bei 98 °C, 25 Zyklen mit 10 sec bei 98 °C, 15 sec bei 55 °C und 1 min bei 68 °C, gefolgt von einer finalen Elongation von 7 min bei 68 °C. Die Amplifikate wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und mittels Ethidiumbromid angefärbt.

Für die Nanopor Sequenzierung wurden 1 μ g RNA mit 0,96 mM dNTPs und 577 nM Primer in RNase-freiem Wasser auf 13 μ L aufgefüllt, 5 min bei 65 °C denaturiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Die reverse Transkription wurde durch Zugabe von 80 u MarathonRT, 8 u RNasin, 50 mM Tris-HCL (pH 8,5), 200 mM KCl, 20% Glycerin (v/v), 1 mM MnCl₂ und 5 mM DTT in einem Gesamtvolumen von 25 μ L eingeleitet und 6 Stunden bei 42 °C durchgeführt. Die cDNA wurde mithilfe des NucleoSpin Kits eluiert. Die DNA-Amplifikate wurden anschließend mit Mag-Bind TotalPure NGS Beads (Omega Bio-Tek) durch Zugabe des 0,7x Volumens aufgereinigt. 80 ng DNA pro Probe wurden für das Nanopore Native Ligation Barcoding (SQK-NBD114-96, Oxford Nanopore Technologies) gemäß Herstellerprotokoll aufbereitet. Es wurden 20 fmol Probe mit einem R10.4.1 Flow Cell (FLO-MIN114, Oxford Nanopore Technologies) auf dem MinION Mk1B-Sequenzierer analysiert und 20 Stunden mit MinKNOW v23.07.8 sequenziert.

Das Rohdaten-Basecalling erfolgte mit der Software Dorado v0.4.1 (Oxford Nanopore Technologies, Modell: dna_r10.4.1_e8.2_400bps_sup@v4.2.0 und dem Kit SQK-NBD114-96. Die Datei wurde entschlüsselt mit ‚dorado demux‘. Für das Alignment wurden die Reads mit LAST v.1419 auf die jeweilige Referenzsequenz ausgerichtet. Zunächst wurde die Transkriptreferenz ‚lastdp – uNEAR – R01‘ indiziert. Darauf folgte das Matrixtraining mit ‚last-train –Qo, dann das Alignment mit ‚lastal-Qkeep-m20-p(mismatch_matrix_file) last-split-m1‘. Die erzeugte .maf-Dateien wurden mittels ‚maf-convert sam‘ in das SAM-Format konvertiert. Anschließend erfolgte die Weiterverarbeitung mit Samtools v.1.12: Zunächst wurden Ergänzungen durchgeführt, dann die Datei in BAM konvertiert, sortiert und indexiert. Die finalen BAM-Dateien dienten als Grundlage für die Mutationsprofilanalyse.

Zur Ermittlung der DMS-induzierten Mutationen wurde RNAFramework v2.8.6 verwendet. Die Mutationen wurden mit rfcount (‚-mf mask_primers.csv –only-mut ‚G>Y;A>B;C>D;T>V‘ –eq 10 –q 16 –mm –nd –ni‘), gefolgt von einer Reaktivitätsnormalisierung mit rf-norm (‚-scoreMethod Siegfried –normMethod 2 –reactiveBases AC –maxUntreatedMut 0.2 –maxMutationRate 0.8 –norm.-independent‘). Die Korrelation der Reaktivitätsdaten zwischen biologischen Replikaten wurde mit rf-correlate berechnet. Für die Darstellung und Strukturvorhersage wurden die Reaktivitäten der Replikate mit rf-combine zusammengeführt. Die Visualisierung der Reaktivitätsdaten und Mutationsverteilungen erfolgte mithilfe der Python-Bibliothek plotly (v.4.14.3)[79]. Die Methodik ist hier näher erläutert[106].

2.7 quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion

Für die Analyse der Menge einer endogenen RNA, der RNA die von einer transfizierten pDNA exprimiert wurde oder einer direkt übertragenen RNA wurde die quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (*quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) durchgeführt. Sowohl bei Zellen als auch für Gewebe wurde dafür zu definierten Zeitpunkten die gesamte RNA mit dem RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) isoliert, unter Zuhilfenahme der Shredder Säulen (QIAGEN). Die cDNA Synthese erfolgte durch Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kits (QIAGEN). Für die quantitative Analyse wurden gleiche Mengen cDNA mit einem StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems/ Thermo Fisher) und TaqMan-Assay spezifischen Primern (Tabelle 3) sowie dem entsprechenden TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems/ Thermo Fisher) amplifiziert. Als endogenes Referenzgen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Das Auslesen der Ct-Werte erfolgte mittels der StepOne Software (Version 2.0.2). Die Keratin Amplifizierung erfolgte mit selbst designten Primern, die in der Region der endogenen Keratin mRNA binden in der auch die antisense-Sequenz der seRNA bindet. Diese Analyse erfolgte mithilfe des SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems/ Thermo Fisher). Der Vorwärts-Primer(ATGAGCCTCCGCCTGCAGA) und

Rückwärts-Primer (TGATGTCGGCCTCCACGCT) wurden so gewählt, dass das Amplifikat etwa 80 Basenpaare lang ist.

Zur Quantifizierung von seRNA pDNA nach *in vivo* Applikation wurde die gesamte DNA aus verschiedenen Mausgeweben mit dem QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die Bestimmung der Plasmidmengen erfolgte über qRT-PCR. Für jede Plasmidvariante wurde eine Kalibrierkurve anhand der Ct-Werte erstellt. Zur Korrektur unspezifischer Primerbindung wurden die Signalwerte unbehandelter Kontrolltiere von denen der behandelten Tiere subtrahiert. Die Berechnung der $\Delta\Delta C_t$ -Werte oder der absoluten RNA-Mengen erfolgte mithilfe von Excel (Microsoft). Halbwärtszeiten wurden berechnet wie zuvor beschrieben[107].

Tabelle 3: Verwendete TaqMan Sonden. Angegeben ist die detektierte DNA und der vom Hersteller verwendete Sonden Name. Außerdem ist angegeben für welche Spezies der Primer entwickelt und angewendet wurde.

TaqMan Sonde	Spezies
GAPDH, Hs02786624_g1, Thermo Fisher	human
GAPDH, Mm99999915_g1, Thermo Fisher	murin
eGFP, Mr04097229_mr, Thermo Fisher	keine
IL6, Hs00174131, Thermo Fisher	human
TNF α , Hs00174128, Thermo Fisher	human
IL18, Hs01038788_m1, Thermo Fisher	human
IL1 β , Hs01555410_m1, Thermo Fisher	human
AFP, Mm01351349_g1, Thermo Fisher	murin
Caspase3, Hs00234387_m1, Thermo Fisher	human

2.8 Western Blot

U87 Zielzellen und HFF Nicht-Zielzellen wurden in 6-er Lochschalen (Falcon/ Schremo Fisher) kultiviert und mit dem seRNA-ca-Caspase3-kodierenden Plasmid transfiziert. Nach dem Waschen mit 4 °C kaltem 1x PBS wurden die Zellen in 100 μ L RIPA Lysepuffer (Sigma Aldrich), ergänzt mit 1% Proteaseinhibitor (Sigma Aldrich), lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert und die Überstände mit 5x Lämmli-Probenpuffer (Bio-Rad) versetzt, anschließend für 5 min bei 95 °C erhitzt und auf ein 4% - 20%

Gradienten-Gel (Bio-Rad) aufgetragen. Die Proteine wurden für 2,5 Stunden bei 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Thermo Fisher) transferiert. Als konstitutiv exprimierter Vergleichsmarker wurde in Anti-Tubulin-Antikörper (Y1/2 clone, 1:500, MAB 1864, Merck Millipore) eingesetzt. Zur Detektion der aktivierten Caspase3 wurde ein Anti-cleaved-Caspase3 Antikörper (Asp175, Sigma Aldrich) verwendet. Die sekundären Antikörper (Anti-Ratte, A8438 und Anti-Kaninchen, A3687, beide Sigma Aldrich) waren mit alkalischer Phosphatase konjugiert und wurden mittels BCIP/NBT-Substratlösung (Sigma Aldrich) sichtbar gemacht.

2.9 Immunfluoreszenz Färbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf 35 mm Kulturschalen mit integriertem Glasboden (μ -dishes, Ibbidi) kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit jeweils 2 mL vorgewärmtem 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 500 μ L eiskaltem 100% Methanol für 20 min bei -20 °C. Danach wurden die Zellen mit 2 mL 1x PBS bei Raumtemperatur (RT) auf einem 2D-Schüttler für 5 min gewaschen. Die Proben wurden anschließend für 1 Stunde bei RT auf einem 2D-Schüttler mit 500 μ L Blockierungspuffer (1x PBS mit 5% Ziegenserum und 0,3% Triton X-100 (v/v)) blockiert. Der Pan-Keratin Antikörper (Maus monoklonal, konjugiert mit Alexa Fluor 488, C11, mAB#4545, Cell Signaling Technology) wurde im Verhältnis 1:1000 in Antikörperversperrpuffer (1x PBS mit 1% Rinderserumalbumin und 0,3% Triton X-100 (v/v)) verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf einem 2D-Schüttler inkubiert. Anschließend wurden alle Proben dreimal mit jeweils 1 mL 1x PBS für jeweils 5 min bei RT auf einem 2D-Schüttler gewaschen. Die Proben wurden danach entweder direkt mikroskopisch analysiert oder in PBS bei 4 °C gelagert.

2.10 Minicircle

Der seRNA-ca-Caspase3-Minicircle wurde von der Firma Plasmid Factory hergestellt. Der Minicircle war 3.276 Basenpaare lang und hatte eine Homogenität von 98,7% supercoiled DNA. Die verwendete Konzentration von 1 μ g/ μ L und der *Elution Buffer* (Qiagen) Puffer entsprachen den Bedingungen der anderen in dieser Arbeit verwendeten pDNAs. Der Minicircle wurde mit Lipofectamine3000, wie zuvor auch für die anderen pDNAs beschrieben. Nach Übertragung wurde zu definierten Zeitpunkten die Zellviabilität mithilfe des CellTiter-Glo 2.0 Assays (Promega) gemäß Herstellerprotokoll bestimmt. Zusammengefasst wurden dafür die Zellen von der Oberfläche abgelöst mithilfe einer 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung. Durch Zugabe der doppelten Menge serumhaltigen Mediums wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt. Nach Zentrifugation (200 x g, 3 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet im Puffer resuspendiert. Der Puffer lysiert die Zellen und verwendet das frei werdende ATP

zur Biolumineszenz der Luciferase. Daher erlaubt die Luciferaseaktivität einen Rückschluss auf die Menge des ATPs in der Zelle und somit auf die Zellvitalität. Das Zelllysate wurde auf eine 96-er Lochschale mit Glasboden schwarzen Wänden (Falcon/ Thermo Fisher) übertragen und die Luciferase Lumineszenz wurde mit einem Tecan i-control, 2.0.10.0, infinite M1000Pro (Tecan) ausgelesen.

2.11 AAV Herstellung

Die in dieser Arbeit verwendeten viralen Vektoren wurden von Elke Barczak und Prof. Dr. Hildegard Büning von der medizinischen Hochschule Hannover hergestellt. Es wurden Adeno-assoziierte Viren (AAVs) vom Serotyp VSSTSPR verwendet. Die Virensuspension wurde bei 4 °C aufgetaut und anschließend resuspendiert. Nach der festgelegten *Multiplicity of Intensity* (MOI) wurden die zu verwendenden Volumina berechnet und zu den Zellen gegeben, bei denen zuvor das Medium gewechselt worden war. Das eingesetzte Volumen berechnet sich nach der zu erzielenden MOI multipliziert mit der Zellzahl, dividiert durch den Virentiter (wie viele infektiöse Partikel in einem mL Virensuspension vorhanden sind).

2.12 Zellkern Isolation

Die subzelluläre Fraktionierung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt[77]. Kurz zusammengefasst wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS und dem jeweiligen Medium gewaschen, um membranassoziierte Vektorpartikel zu entfernen. Anschließend wurde das Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher) verwendet, um die nukleäre Fraktion zu isolieren. Aus dieser Fraktion wurde anschließend wie bereits beschrieben die DNA isoliert (siehe qRT-PCR).

2.13 *In vitro* Transkription

Die kodierenden Sequenzen wurden in den pBluescript SK-Vektor kloniert. Die Plasmide wurde linearisiert mit dem Restriktionsenzym BspQ1 (New England Biolabs) und dienten als template DNA für die *in vitro* Transkription (IVT). Die vollständige Linearisierung wurde überprüft durch das Auftragen der geschnittenen DNA auf ein 1 % Agarosegel, welches durch Ethidiumbromid angefärbt wurde. Die IVT wurde durchgeführt mit dem MEGAScript T7 Transkriptionskit (Invitrogen/ Thermo Fisher). Bei der Reaktion wurden je nach Bedarf 6 mM der 5'-Cap Strukturen verwendet: P1-(5'-Adenosyl) P3-(5'-guanosyl) triphosphate (AP3G, Jena Biosciences), P¹-(Guanosyl) P³-(5'-(guanosyl))triphosphate (GP3G, Jena Biosciences), 7-Methylguanosin (m7G, Jena Biosciences) oder P¹-(5'-(3'-O-methyl)-7-methyl-guanosyl) P³-(5'-(guanosyl))triphosphate (*anti reverse cap analog*, ARCA, Jena Biosciences) bei einer Verwendung von Guanosintriphosphat (GTP) mit 1,5 mM. Für ungecappte IVT RNA wurde eine GTP

Konzentration von 7,5 mM verwendet. Bei Bedarf wurde ein Poly-A-Schwanz durch das Tailing Kit (Invitrogen/ Thermo Fisher), entsprechend den Herstellerangaben, angehängt. Die Aufreinigung erfolgte durch Fällung mittels Lithium Chloride (Invitrogen/ Thermo Fisher) und anschließender Resuspendierung in Tris-EDTA Puffer (Invitrogen/ Thermo Fisher). Nach IVT-mRNA Herstellung und Aufreinigung wurde die RNA auf ein 1% Agarose Formaldehyd Gel mit Ethidiumbromid Färbung aufgetragen, um die RNA Integrität und Länge zu kontrollieren. Es wurden 9% 12,3 M Formaldehyd (Merck) im Gel verwendet. Als positive Kontrolle für die RNA-Transfektion wurde eine IVT-eGFP-mRNA verwendet, die aus der hier beschriebenen pSTIA120-pDNA transkribiert wurde[108].

2.14 Co-Kultur Experimente

Für die Co-Kultur von MCF-7 Brustkrebszellen mit humanen Vorhaut Fibroblasten wurden stabil NLS-RFP exprimierende MCF-7 Zellen und stabil zytoplasmatisches GFP exprimierende HFF Zellen verwendet. Zur Kultivierung wurden zunächst 9×10^4 HFF Zellen auf ein Fibronectin beschichtetes Glassubstrat (μ -Dish 35 mm, Ibidi) ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden $1,45 \times 10^5$ MCF-7 Zellen hinzugefügt. Als Medium wurde 1:1 Mischung der Zellkulturmedien der beiden Zelltypen verwendet. Weitere 24 Stunden später erfolgte die Transfektion mit 8 μ g seRNA-ca-Caspase3 unter Verwendung von 8 μ L Lipofectamine3000 in 1 mL Medium. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Zellviabilität anhand der fluoreszierenden Grün- und Rotflächen in konfokalen Aufnahmen quantifiziert. Ein Python-basiertes Softwaretool wurde zur Analyse des Farbbedeckungsgrades auf Grundlage der unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Zellen innerhalb eines Bildes verwendet. Dabei wurden beide Fluoreszenzkanäle (grün und rot) separat ausgewertet. Aus jedem Bild wurde unter Verwendung eines vordefinierten Grauwert-Schwellenwerts (1000) eine binäre Maske erstellt. Anschließend erfolgte eine Bildverarbeitung mittels morphologischen Schließens, gefolgt von morphologischem Öffnen, um die Zellbedeckung zu berechnen.

Für die Etablierung von Co-Kulturen wurden verschiedene Glioblastomzelllinien (86HG39, U251, SF188 und U87) stabil mit zytoplasmatischem eGFP markiert. Hierfür erfolgte eine Transduktion mit lentiviralen Partikeln (Amsbio), welche eGFP zusammen mit einem Neomycin Resistenzgen exprimieren. Die Transduktion wurde mit einer MOI (*Multiplicity of Intensity*) von 1 gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Selektion mit G418 (Sigma Aldrich) in jeweils angepassten Konzentrationen: 86HG39: 88 μ g/mL, U251: 800 μ g/mL, SF188: 850 μ g/mL und U87: 850 μ g/mL. Primäre kortikale Rattenneuronen wurden auf mit PLL beschichteten Substraten ausgesät (3×10^5 Zellen pro Ansatz in einer 24-er Zellkulturschale). Nach 24 Stunden wurden 3×10^4 eGFP markierte Glioblastomzellen hinzugegeben. Alle Zellen wurden in NB-Medium kultiviert. Weitere 24 Stunden später erfolgte die Transfektion der Co-Kulturen mit 2 μ g seRNA-ca-Caspase3 unter

Verwendung von Lipofectamine3000. Als Negativkontrolle wurde eine MOCK-RNA (aus dem nicht-fluoreszenten *Xenopus elongation factor 1 α* Gen) verwendet. 21 Stunden nach Transfektion und drei Stunden vor der mikroskopischen Analyse wurden die Mikrotubuli lebender Zellen mit SiR-Tubulin (Spirochrome) im Verhältnis 1:1000 rot angefärbt. Untransfizierte Kontrollkulturen wurden parallel unter denselben Bedingungen kultiviert und gefärbt. Zur Quantifizierung der Zelltötungseffizienz wurden die Co-Kulturen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Verglichen wurden die Zellzahlen zwischen MOCK-behandelten und seRNA-ca-Caspase3-behandelten Proben. Die Veränderung der Zellzahl in Prozent wurde als Maß für die Tötungseffizienz berechnet.

2.15 Analyse der 5'-Capping Effizienz mittels LC-MS

Dieser Versuch wurde von Dr. Phillipp Schmid und Dr. Hagen Richter bei WACKER Chemie in München durchgeführt. Zur Ermittlung der 5'-Capping Effizienz wurde eine Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) durchgeführt. Für die Analyse wurde eine IVT HCV-seRNA verwendet, die entweder mit m7G oder AP3G als 5'-Cap Struktur generiert wurde. Die IVT-RNAs wurden statt in TE Puffer für die Messung in steril filtriertem Wasser aufgenommen. Es wurde eine spezifische DNA Sonde verwendet, die nahe am 5'-Ende der mRNA bindet. Dies wurde im Hybridization Buffer durchgeführt (10x: 0,5 M Tris HCl pH 8,0, 1 M NaCl). 10 bis 15 μ g RNA wurden mit diesem Puffer (x1) und den DNA Oligonukleotiden (finale Konzentration 150 pmol) vermengt. Die Lösung wurde mit steril filtriertem Wasser auf 35 μ L aufgefüllt. Die Hybridisierung wurde im Thermocycler durchgeführt (2 min 92 °C, 2 min 65 °C, 2 min 55 °C, 2 min 40 °C). Anschließend wurde ein RNase H Verdau durchgeführt, um spezifisch den DNA-RNA Hybrid abzubauen. Der RNA Strang wird dabei abgebaut, während der DNA Strang intakt bleibt. Dafür wurden zu den 35 μ L hybridisierter RNA RNase H (finale Konzentration 25 Einheiten), Tris HCl pH 8,0 (finale Konzentration 50 mM) und 1x Verdau Puffer (10x: 0,75 M KCl, 3 mM MgCl₂, 0,1 M DTT, 0,05 M Tris HCl pH 8,0) hinzugegeben und anschließend mit sterilem Wasser aufgefüllt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 1 μ L 0,5 M EDTA abgestoppt. Die verbleibenden Fragmente sind vom Masse-Ladungs-Verhältnis gut charakterisiert, so kann zwischen gecappter und ungecappter RNA in der LC-MS unterschieden werden. Die LC-MS bestand aus einem UHPLC Agilent 1290 Infinity II gekoppelt mit einem Q-TOF Impact II (Bruker). Als Fließmittel wurde A: 7,5 mM Dibutylamin, 7,5 mM Hexafluorisopropanol in 1 L Wasser, B: Methanol verwendet. Dabei wurde als Säule PLRP-S Å 5 μ m 2,1 x 50 mm (Agilent), als Temperatur 65 °C und als Flussrate 0,3 mL/min angewandt. Die Messungen erfolgten im Negativ-Modus im Massenbereich von 350-3000 Da; 2 Hz unter Verwendung geeigneter Einstellungen für RNA-Proben. Die Analyse basierte auf dem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) der detektierten Fragmente.

2.16 *In vivo* Modelle Tumorpräparation

Für das Glioblastom Tumormodel wurden U87 Glioblastomzellen verwendet, sobald eine Konfluenz von 80% erreicht war. Hierbei wurden Substrate ohne Fibronectin Beschichtung verwendet. Eine Zelllösung mit 1×10^6 U87 Zellen in 20 μL 1x PBS wurde hergestellt und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Die maximale Lagerdauer betrug sechs Stunden. 30 min vor der Operation erhielten die männlichen immundefizienten Nacktmäuse (MRI-Foxn1nu/nu, Charles River Laboratories) eine subkutane Injektion von Carprofen (4 mg/kg, Rimadyl, Zoetis). Die Narkose wurde durch Inhalation von Isofluran eingeleitet. Mittels Mikroinjektor (SMARTouch, UMP3, WPI) und Mikrospritze (NanoFil 10 μL , WPI) wurden 4 μL der Zelllösung (insgesamt 2×10^5 U87 Zellen) in das Striatum der rechten Hirnhälfte injiziert. Die Koordinaten bezogen sich auf den Bregma-Punkt: 2,4 mm lateral, 0,5 mm rostral, 4 mm ventral. Die Spritze verblieb für fünf min an der Stelle und wurde anschließend langsam mit einer Geschwindigkeit von 1 mm pro 2 min entfernt. Nach der Operation erhielten die Tiere an zwei Folgetagen Carprofen zur Schmerzlinderung. Der Gesundheitszustand wurde täglich evaluiert. Zwei Tage nach der Tumoringjektion erfolgte die Injektion der seRNA-kodierenden Konstrukte bzw. der Kontrolllösungen. Die Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt: seRNA-ca-Caspase3, seRNA-eGFP Kontrollkonstrukt oder Natriumchlorid (NaCl). Die Injektion erfolgte in die identischen Koordinaten wie bei der Tumor Implantation. Zur intratumoralen Übertragung wurde Lipofectamin3000 verwendet, für das Protokoll mit reduziertem Volumen siehe Kapitel „Transfektion“. Die Transfektionslösung wurde für jedes Tier einzeln frisch hergestellt. Die Lösung wurde mit einer Rate von 0,24 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert. Die Experimente wurden in vier unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Die Magnetresonanztomographie (MRT) wurde an Tag 3, 7 und 14 nach der Behandlung durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte entweder an einem 9,4 Tesla Scanner (BioSpec 94/20, Bruker BioSpin) mit kryogener 1H-Oberflächenspule (CryoProbe, Bruker BioSpin) oder an einem 3 Tesla MRT-System (Achieva, Philips Healthcare) mit einer 8-Kanal Ratten Volumenspule (Rapid Biomedical). Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert, die Vitalparameter wurden mit einem angepassten System (Medres) überwacht. Nach der Lokalisierungssequenz wurden T2-gewichtete Aufnahmen erstellt. Für den 9,4T Bruker Scanner wurden folgende Parameter verwendet: Methode=RARE, RARE-Faktor=8, Repetitionszeit=5500 ms, Echozeit=10,833 ms, Matrix=256 x 256, Schichtdicke=0,5 mm, Durchschnitt=2. Für den 3 T-Scanner wurden folgende Parameter genutzt: Schichtdicke=0,5 mm, Modus=TSA, TSE-Faktor=5, Matrix=132 x 130, Echozeit=37 ms, Repetitionszeit=2794 ms. In beiden Fällen wurden 28 Schnitte pro Tier aufgenommen.

Nach dem letzten MRT wurden die Tiere durch Dekapitation entnommen. Die Gehirne wurden isoliert und bei -80 °C gelagert. Die Gewebe wurden in koronalen Schnitten mit je 20 μm Dicke (Leica CM3050) geschnitten. Für die Detektion proliferierender Zellen wurden die Schnitte gegen Ki68 (1:500, Kaninchen Polyklonal, ab15580, Abcam) gefärbt, mit einem sekundären Alexa Fluor 568-konjugierten

Antikörper (1:500, Invitrogen/ Thermo Fisher) visualisiert und mit Hoechst 33342 (1:500, Life Technologies) gegengefärbt. Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ-9000E) im Phasenkontrast. Repräsentative Aufnahmen wurden dokumentiert. Zur Bestimmung des Tumorumfanges wurden die MRT-Daten mit der Software VINCI 5.06 (Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, Köln) analysiert[109]. Für jedes Tier und jeden Messzeitpunkt wurden *Volumes of Interest* (VOIs) definiert, anhand derer die Tumorumfänge berechnet wurden.

Für das HCC Mausmodell wurden TGF α /c-myc Mäuse verwendet, die als sehr geeignet gelten um HCC gerichtete Therapien zu testen[110]. Die TGF α /c-myc bitransgenen Mäuse wurden ursprünglich erzeugt aus einer Kreuzung homozygoter Metallothionein/TGF α und Albumin/c-myc einzeltransgener Mäuse[111]. Die Mäuse erhielten flüssiges Zinkchlorid (ZnCl₂), um die Expression von TGF α (*Transforming Growth Factor alpha*) zu induzieren und dadurch das Tumorentstehen zu beschleunigen[110]. Das Körpergewicht der Mäuse wurde über das ganze Experiment dokumentiert. Die Tiere entwickelten nach 20 Wochen Tumorentstehen durch die Behandlung jeweils einen bis mehrere Tumore. Bei ausreichender Größe der Tumore erfolgte die Behandlung. Dafür wurden 20 μ g der RNA (1 μ g/ μ L) in 130 μ L 5% Glucose Lösung (Sigma Aldrich) verdünnt und bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 50 μ L der LNP Lösung (siehe Kapitel Transfektion) hinzugegeben und 10 sec gemischt. Die Lösung wurde 15 min inkubiert, 200 μ L wurden der Maus retroorbital injiziert. Die Behandlung wurde alle 2 Tage wiederholt, die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt. Das Tumorentstehen wurde durch MRT bestimmt. Nachdem das Experiment beendet wurde, wurden etwa 10 mg Gewebeproben von Tumor und gesundem Gewebe entnommen, in RNAlater Tissue Reagent (QAGEN) überführt und bis zur RNA Isolation bei -80 °C gelagert.

2.17 Statistik und Darstellung

Die Berechnungen wurden mit der mit GraphPad Prism (Version 9.1.2), Origin 2019 (32 Bit, OriginLab Corporation) und Excel (Microsoft) durchgeführt. Für die Normalverteilung wurde mittels D'Agostino- und Pearson-Test durchgeführt. Signifikanzunterschiede wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung (*analysis of variance*, ANOVA) analysiert. Für den Glioblastom Mausversuch wurde zusätzlich eine Greenhouse Geisser Korrektur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Box-Whisker-Plots dargestellt, die den Median, die Quartile, die Extremwerte sowie Einzelwerte für jeden Zeitpunkt zeigen. Für die Auswertung des HCC Mausmodells wurde eine Dosis-Wirkungs-Funktion (*dose-response-fit*) gezeichnet.

Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ (*) angenommen. Bei $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) wurde eine höhere Signifikanz dargestellt. Als s.d. ist die Standardabweichung (*standard deviation*) angegeben. Repräsentative Mikroskopie Aufnahmen wurden in drei oder mehr unabhängigen biologischen Replikaten verifiziert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch Origin, GraphPad Prism, BioRender (BioRender.com, Akademische Lizenz) und CorelDRAW (Version 25.0.0.230, Corel Corporation).

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung und *in vitro* Charakterisierung seRNA kodierender Plasmide zur gezielten Genexpression ausschließlich in Zielzellen

Einzelne in dieser Arbeit dargestellte Ergebnisse wurden durch Vorarbeiten Dritter sowie durch Beiträge externer Kooperationspartner ergänzt. Diese Arbeiten sind in den jeweiligen Abbildungsunterschriften explizit ausgewiesen. Im Folgenden werden die experimentellen Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung der selektiv exprimierten RNA (seRNA) vorgestellt. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass mRNA-basierte Therapeutika eine Genregulation und Genexpression *in vitro* und *in vivo* ermöglichen. Auch die einzelnen Module der seRNA wie IRES, 5'- und 3'-UTR oder die konstitutiv aktive Caspase3 sind bereits gut untersucht, jedoch noch nicht in ihrer neuen Kombination innerhalb eines seRNA Moleküls. In dieser neuen Anordnung soll die seRNA die Genexpression selektiv in ausgewählten Ziel-Zellen und Ziel-Geweben ermöglichen. Dabei standen durch promotionsrelevante Vorarbeiten bereits die verschiedenen seRNA Module und ihre Anordnung in seRNA kodierenden Plasmiden fest. Abb. 1a, sowie Abb. 2 und 3 sind Vorarbeiten Dritter, die freundlicherweise diese Arbeit vorbereitet haben.

Ziel der nachfolgenden Analysen war es, zunächst die Spezifität, Funktionalität und Wirksamkeit der seRNA *in vitro* zu untersuchen, anschließend auch *in vivo*. In einem ersten Schritt wurden hierfür seRNA kodierende Plasmide verwendet, um die eigentliche seRNA von den Zellen selbst exprimieren zu lassen. Im nachfolgenden Teil der Arbeit liegt der Fokus auf *in vitro* transkribierter seRNA.

3.1.1 Bestimmung von Ziel- und Nichtzielzellen durch Analyse der Keratinexpression

Die gezielte Aktivierung der seRNA erfordert die Interaktion der antisense-Sequenz der seRNA mit einer komplementären sense-RNA der Zielzelle. Um eine Expression in Nicht-Zielzellen zu vermeiden, ist es entscheidend, dass diese sense- bzw. Ziel-RNA ausschließlich in den Zielzellen exprimiert wird. Um spezifisch Glioblastom- und Brustkrebszellen zu erreichen, wurde als Target-RNA eine konservierte Keratin Sequenz gewählt.

Im Brustkrebszelltyp MCF-7 sowie in der Glioblastomzelllinie U87 konnte die Expression von Keratin mittels Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Als gesunde Nicht-Zielzellen dienten primäre Rattenneuronen für das Hirntumormodell sowie humane Fibroblasten für das Brustkrebsmodell. Beide Zelltypen zeigten in der Antikörperfärbung keine Keratinexpression (Abb. 1a).

Zur Validierung der Keratin Proteinexpression wurde ergänzend eine Quantifizierung der Keratin RNA durchgeführt. In den Zielzellen konnte dabei eine deutlich erhöhte Expression gegenüber den Nicht-Zielzellen nachgewiesen werden (Abb. 1b).

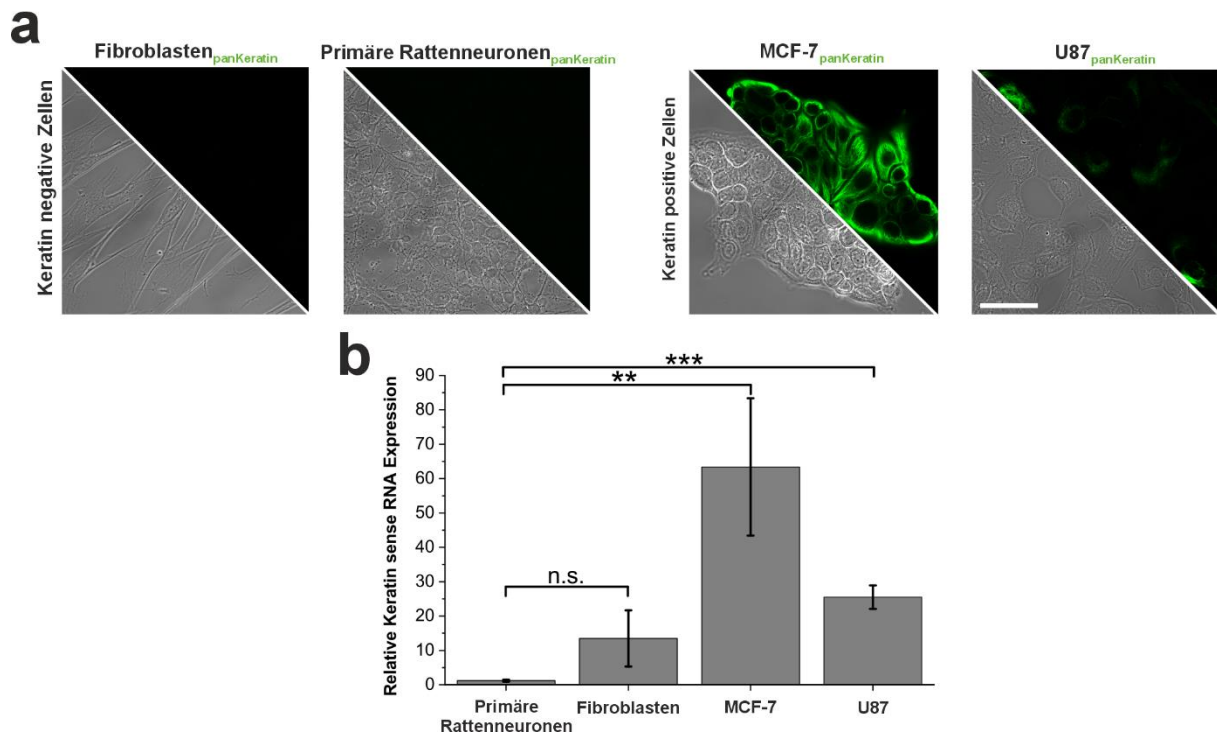


Abbildung 1: Keratinexpression in Ziel- und Nichtzielzellen. (a) Keratin Quantifizierung mittels eines panKeratin Antikörpers. Maßstabsbalken: 50 μ m. (b) Keratin Quantifizierung mittels qRT-PCR. Es wurden PCR-Primer verwendet die in dem Bereich der sense RNA binden, der auch von der antisense Sequenz der seRNA gebunden wird. Die Ergebnisse wurden normalisiert und relativ zu den primären Rattenneuronen dargestellt. n = 3. Die p-Werte wurden mittels einfaktorieller ANOVA durchgeführt.

3.1.2 Bestimmung der selektiven Expression eines seRNA kodierenden Plasmids vergleichend zu einem nicht-selektiven seRNA Kontrollplasmid

Um das seRNA kodierende Plasmid in den definierten Ziel- und Nicht-Zielzellen zu testen, wurde ein Kontrollplasmid generiert. Dabei handelt es sich um ein seRNA kodierendes Plasmid dem die regulatorischen Module 3-5 fehlen. Dieses Kontrollplasmid seRNA $_{\Delta 3-5}$ -eGFP diente damit als Positivkontrolle zur Bestimmung der bestmöglichen Transfektionseffizienz und zeigte durch das Fehlen der regulatorischen Module eine Expression sowohl in Nicht-Zielzellen als auch Zielzellen in einem Bereich von etwa 20% für die primären Rattenneuronen bis hin zu etwa 56% für die MCF-7 Brustkrebszellen (Abb. 2a).

Im Gegensatz dazu zeigte das seRNA kodierende Plasmid mit 1-2% eGFP positiven Zellen für die Nicht-Zielzellen eine Blockierung der seRNA Expression. In den Zielzellen dagegen wurden etwa 31% GFP-

positive MCF-7 Brustkrebszellen und etwa 22% GFP-positive U87 Glioblastomzellen bei der durchflusszytometrischen Untersuchung detektiert (Abb. 2b). Während das nicht-selektive Kontrollkonstrukt in allen Zelltypen Proteinexpression zeigt, bleibt das seRNA Konstrukt damit in den Nicht-Zielzellen blockiert. In den Zielzellen dagegen wird das selbe seRNA kodierende Plasmid signifikant stärker exprimiert, aber schwächer im Vergleich zum Kontrollkonstrukt (Abb. 2c). Die durchflusszytometrische Darstellung der eGFP Intensitäten bestätigte die visuellen Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und zeigte für das seRNA $_{\Delta 3-5}$ -eGFP Plasmid heterogene eGFP Expression in Glioblastomzellen und in Neuronen. Das seRNA-eGFP Plasmid dagegen wurde nur in den Glioblastom-Zielzellen exprimiert (Abb. 2d).

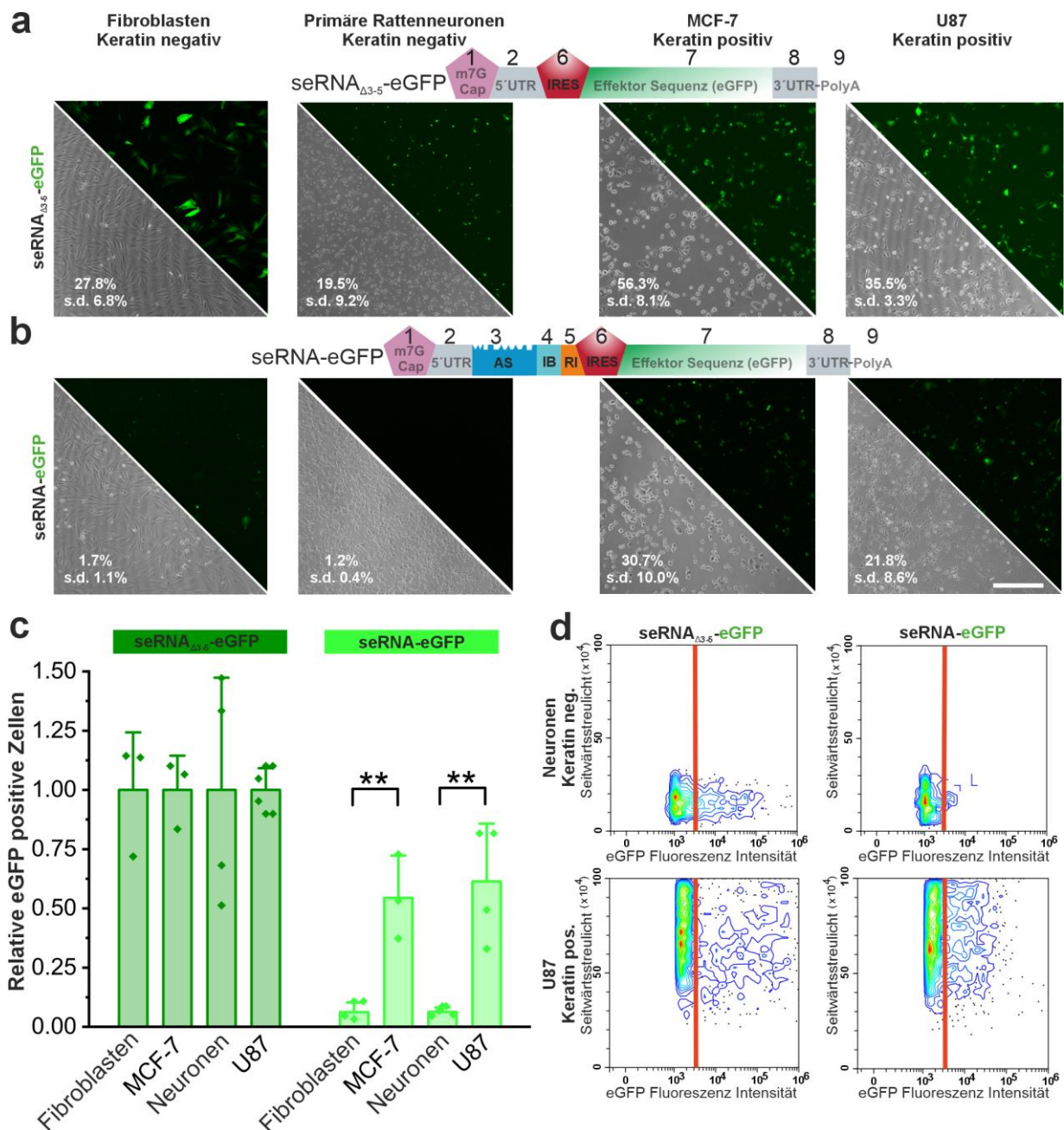


Abbildung 2: Zielgerichtete Aktivierung der seRNA. (a) Expression des nicht-selektiven Kontrollplasmids seRNA $_{\Delta 3-5}$ -eGFP mit den hier dargestellten Modulen in Ziel- und Nicht-Zielzellen. (b) Expression des oben

dargestellten seRNA-eGFP Plasmid in Ziel- und Nicht-Zielzellen. (a, b) Anteil GFP-positive Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt und sind als Prozentangaben mit Standardabweichung (s.d.) dargestellt. Maßstabsbalken: 200 μm . (c) Die Transfektionseffizienzen des seRNA-eGFP Expressionsplasmids wurden relativ zum seRNA $_{\Delta 3-5}$ -eGFP Kontrollplasmid dargestellt. $n=3$ (a-c). (d) Die eGFP Intensität wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt und die Verteilung wurde beispielhaft für beide gezeigten DNA-Expressionsplasmide in je einer Ziel- und Nichtzielzelle gezeigt. Die Rote Linie markiert den Schwellwert, der in einer unbehandelten Kontrolle bestimmt wurde. Diese Versuche wurden von Marco Hoffmann im IBI-2 durchgeführt.

3.1.3 Analyse des seRNA Aktivierungsmechanismus durch partiellen Abbau des 5'seRNA Region in Zielzellen

Die funktionelle Analyse der seRNA Aktivierung wurde in MCF-7 Zielzellen und HFF Nicht-Zielzellen durchgeführt. Das seRNA-eGFP Plasmid wurde in die Zellen übertragen und nach verschiedenen Zeitpunkten wurde mittels qRT-PCR simultan die Menge der antisense- und eGFP-Sequenzen quantifiziert (Abb. 3a). Es wurden stabile Mengen der Antisense Region und der eGFP Region über die gesamte Zeitspanne von 24 h in Nicht-Zielzellen beobachtet. Bis 8 h stieg die Menge beider Regionen in Nicht-Zielzellen an und blieb dann konstant, und zeigt somit das Vorliegen des Volllängen seRNAs in Nicht-Zielzellen. Im Gegensatz dazu wurden für die seRNA in Zielzellen abweichende Mengen der 5'-Region und der 3'-Region innerhalb der seRNA in der qRT-PCR Analyse detektiert. Während die Konzentration der eGFP Sequenz mit der Zeit ähnlich wie in den Nicht-Zielzellen Anstieg bis zum 8 h Messpunkt, konnte im Vergleich nur etwa 1% der Menge der eGFP-Region detektiert werden. Es zeigt sich ein massiver Abbau der seRNA 5'-Region in Zielzellen, während gleichzeitig die 3-Region stabil bleibt (Abb. 3b).

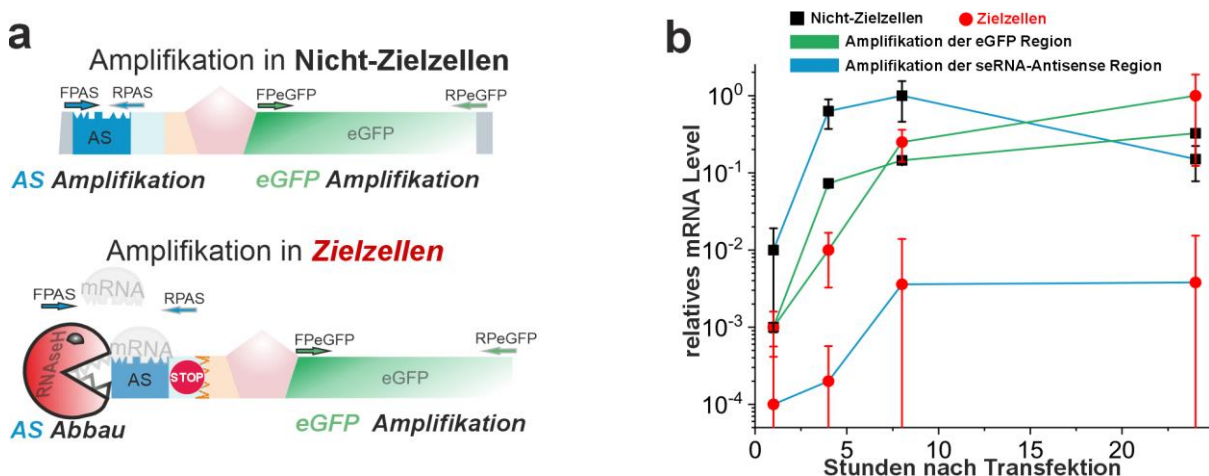


Abbildung 3: Selektiver Abbau der 5'seRNA Region in Zielzellen. (a) Schematische Darstellung des durchgeführten Experimentes. Nach Übertragung des seRNA-eGFP in Ziel und Nicht-Zielzellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten die Menge der eGFP Region und die Menge der antisense Region mittels qRT-PCR quantifiziert. (b) Quantifizierung der eGFP Region und der antisense Region in Ziel- und

Nichtzielzelle. Alle Werte wurden mit Standardabweichung (s.d.) dargestellt mit n=3-4 unabhängigen Experimenten. Dieser Versuch wurde von Marco Hoffmann im IBI-2 durchgeführt.

3.1.4 Nachweis der Interaktion des IRES-Blockers mit der IRES

Um die Hypothese der IRES Inhibierung zu bestätigen, sollte aufbauend auf den zuvor gezeigten Daten von M. Hoffmann die vorhergesagte Sekundärstruktur der seRNA mit der des Kontrollkonstrukts seRNA_{Δ3-5}-eGFP in vivo analysiert und verglichen werden. Zu diesem Zweck wurde die RNA Struktur nach Plasmid Übertragung in HEK293 Zielzellen mittels Nanopore-Dimethylsulfate-Mutational-Profiling (Nano-DMS-MaP) analysiert. Diese Technik ist besonders für den Vergleich von langen und sich sehr ähnlichen RNAs geeignet[106]. Die beiden biologischen Replikate wiesen eine sehr hohe Reproduzierbarkeit ($R^2=1,00$ für seRNA_{Δ3-5}-eGFP und $R^2=0,97$ für seRNA-eGFP) auf (Abb. 4a). Die detektierten Strukturen der IRES zeigten weitestgehend die kanonische Faltung der EMCV IRES. Allerdings war klar erkennbar, dass das selektive seRNA-eGFP Konstrukt Interaktionen zwischen dem IRES-Blocker und der IRES aufweist (Abb. 4b-c). Diese Interaktionen verändern die Struktur der EMCV IRES sichtbar. Die experimentellen Daten in vivo bestätigen damit die vorhergesagte sterische Veränderung mit einem vermutlichen Einfluss auf wichtige Domänen der IRES, die zur Inaktivierung derselben führen.

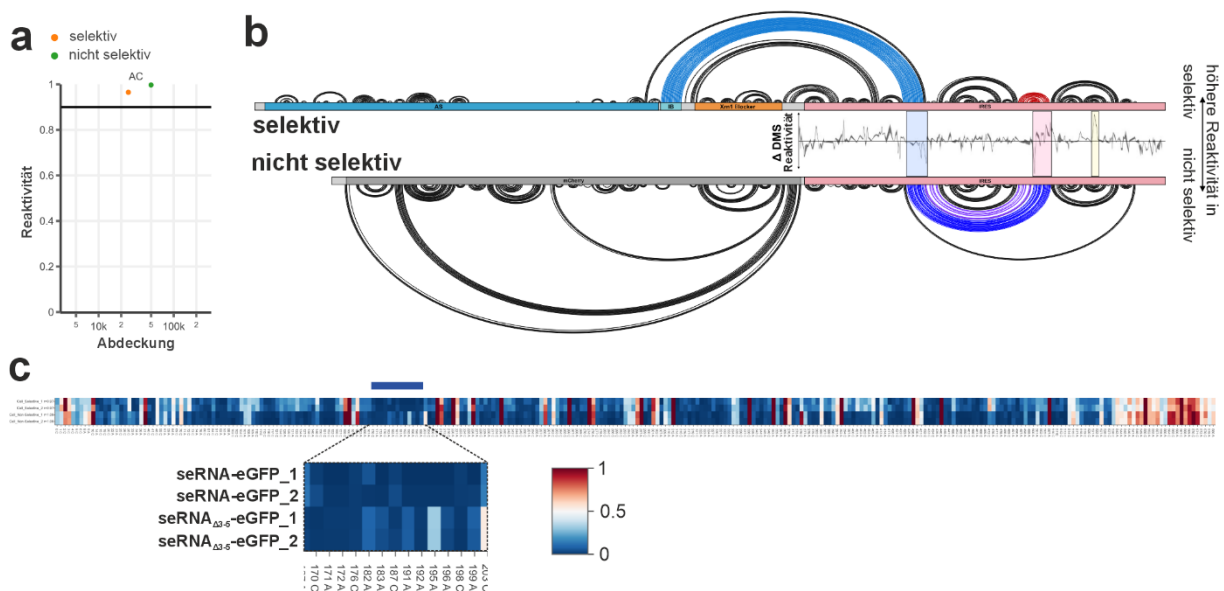


Abbildung 4: Intramolekulare Faltung der seRNA. (a) Korrelation zwischen DMS Reaktivität in biologischen Replikaten (Pearson-r) und Sequenz Überschneidung. Der orange Punkt zeigt seRNA-eGFP und der grüne Punkt zeigt seRNA_{Δ3-5}-eGFP. (b) Arc Plot der durch Dimethylsulfat (DMS) Reaktivität vorhergesagten Struktur des seRNA-eGFP Konstrukts (selektiv) und des seRNA_{Δ3-5}-eGFP Konstrukts (nicht selektiv) mit den ermittelten DMS Reaktivitäten. Der Durchschnitt ist durch die schwarze Linie, die Standardabweichung durch die graue Schattierung dargestellt. n=2. (c) Heatmap der DMS Reaktivitäten an A und C Basen der seRNA-eGFP und seRNA_{Δ3-5}-eGFP Konstrukte. Blue = 0; Weiß = 0,5;

Rot = 1. Diese Versuche wurden in Kooperation mit Redmond P. Smith, Anne-Sophie Gribling-Burrer und Patrick Bohn vom Helmholtz Institute for RNA-based Infection Research in Würzburg durchgeführt.

3.1.5 Analyse einer möglichen zellulären Immunantwort durch eine kurzzeitige partielle doppelsträngige RNA Struktur

Die seRNA Aktivierung basiert auf der kurzzeitigen Bildung einer doppelsträngigen RNA (dsRNA), sowie der Erkennung und dem Abbau dieser Struktur in der (Ziel-)Zelle. Es ist bekannt, dass stabile dsRNA von der Zelle über Toll-like Rezeptoren im Endosom und RIG-1 like Rezeptoren und MDA5 im Zytosol erkannt werden und zu einer angeborenen, intrazellulären Immunantwort durch Ausschüttung von Interleukin-6 (IL-6), Interferonen und anderen Immunmediatoren führen können[112, 113]. Sollte dieser Mechanismus auch für seRNA sense-antisense Interaktionen zum Tragen kommen, könnte diese Immunreaktion in den Zellen selbst, aber auch bei späteren Anwendungen im Tier zu Nebenwirkungen führen. Daher wurde die IL-6 Expression nach Übertragung der seRNA kodierenden Plasmide in Ziel- und Nicht-Zielzellen quantifiziert. Eine synthetische dsRNA mit vergleichbarer Länge zur seRNA antisense-Sequenz diente als Positivkontrolle. Die dsRNA führte zu einer starken IL-6 Immunantwort in Nicht-Zielzellen und einer noch stärkeren in Zielzellen, mit einem Faktor von etwa 1600 im Vergleich zu dem basalen IL-6 Level in untransfizierten Zellen (Abb. 5a). Im Gegensatz dazu verblieb die durch seRNA-eGFP mit antisense Sequenz exprimierte IL-6 Menge auf vergleichbarem Niveau wie nach Übertragung der verkürzten seRNA ohne antisense Sequenz, die als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Die partiell doppelsträngige RNA Sequenz führte somit zu keiner erhöhten IL-6 Expression.

Anschließend wurden neben IL-6 auch die Expressionen weiterer Immunmediatoren nach Übertragung der Konstrukte analysiert. Das aktive Zytokin IL-18 kann über einen Signalweg nach Aktivierung durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster in erhöhten Mengen gebildet werden[114]. Es konnte weder bei Übertragung einer seRNA, noch bei Übertragung der dsRNA Positivkontrolle eine deutliche Expression detektiert werden (Abb. 5b). IL1 β wird über den NF- κ B-Signalweg hochreguliert[115]. Nach der Übertragung der dsRNA war hier eine signifikante Expressionserhöhung von IL1 β festzustellen, die Transfektion von seRNA und seRNA $_{\Delta 3-5}$ zeigte hingegen keine Unterschiede in der IL1 β Expression. Die IL-6 Expression zeigte in wiederholten Messungen dieselben Expressionsmuster wie zuvor. Abgeglichen mit dem Kontrollplasmid ohne antisense Sequenz zeigte die dsRNA eine Expressionserhöhung um den Faktor von etwa 24. TNF α wird ebenfalls über den NF- κ B-Signalweg in seiner Expression aktiviert[116]. Für diesen Immunmediator konnte ebenfalls eine signifikante Expressionserhöhung um den Faktor 15 für die dsRNA-Positivkontrolle festgestellt werden, während auch hier die seRNA keine TNF α -Erhöhung im Vergleich zur seRNA $_{\Delta 3-5}$ -eGFP aufzeigte. Diese Daten zeigen damit auf, dass der vorhergesagte Aktivierungsmechanismus der seRNA trotz

kurzzeitigem Aufbau einer dsRNA Sequenz keine zelleigene Immunantwort induziert und damit mögliche Stresssignale allein durch den Aktivierungsmechanismus der seRNA ausgeschlossen werden können.

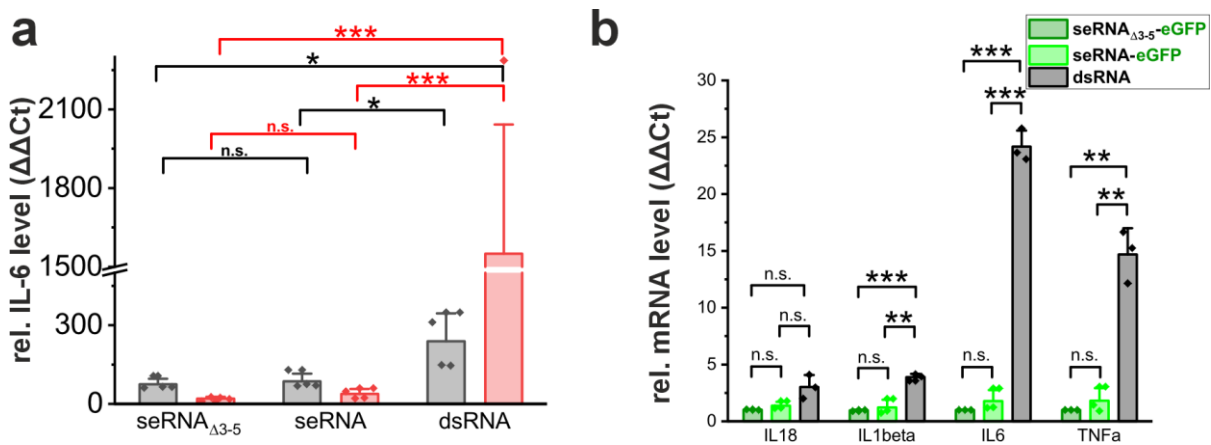


Abbildung 5: Zellulären Immunantwort nach Übertragung seRNA kodierender Plasmide. (a) Zytokin Expressionsanalyse 24 h nach Übertragung einer synthetischen doppelsträngigen RNA (dsRNA), des seRNA-eGFP kodierenden Plasmids und des verkürzten seRNA_{Δ3-5}-eGFP kodierenden Plasmids in Ziel- (rot, MCF-7) und Nicht-Zielzellen (grau, HFF). Die IL-6 Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und im Vergleich zu untransfizierten Zellen dargestellt. n = 4 (b) Ergänzend wurden weitere Immunmediatoren nach Übertragung der Konstrukte in Zielzellen überprüft (hier U87 Glioblastomzellen). Die Expressionen wurden abgeglichen mit den Ergebnissen des nicht-selektiven seRNA_{Δ3-5}-eGFP Kontrollkonstrukts. n = 3. Signifikanzlevel wurden mit dem einfaktoriellen ANOVA Test bestimmt. Die in Abbildungsteil a verwendeten Daten wurden bereits hier verwendet[117].

3.1.6 Verwendung einer konstitutiv aktiven Caspase3 als Effektor in der seRNA

Die seRNA-eGFP zeigte eine gezielte Genexpression ausschließlich in Zielzellen. Um die seRNA medizinisch nutzen zu können, wurde im nächsten Schritt der Effektor eGFP durch eine konstitutiv aktive Caspase3 ersetzt (ca-Caspase3). Analog zum nicht-selektiven Kontrollkonstrukt seRNA_{Δ3-5}-eGFP wurde auch für die ca-Caspase3 als Effektor ein nicht-selektives Kontrollkonstrukt designt, bei dem die regulatorischen Module fehlen (seRNA_{Δ3-5}-ca-Caspase3). Dieses Kontrollkonstrukt zeigte nach Übertragung als seRNA-Expressionsplasmid eine hohe Tötungseffizienz in den getesteten Zelltypen. In U87 Glioblastomzellen und primären Rattenneuronen wurden jeweils 90-100% aller transfizierten Zellen nach 24 h abgetötet. Hierbei wurde ein GFP-Expressionsplasmid als Positivkontrolle zur Ermittlung der bestmöglichen Transfektionseffizienz eingesetzt (Abb. 6a).

Im Gegensatz dazu zeigte das Volllängenkonstrukt seRNA-ca-Caspase3 keine Aktivität in den primären Rattenneuronen als Nicht-Zielzellen. In den U87 Glioblastomzellen die hier als Zielzellen verwendet wurden, war die Zelltötungseffizienz vergleichbar zum nicht-selektiven Konstrukt, was auf eine effiziente Aktivierung des Konstruktes hinwies (Abb. 6b). Ein Western Blot zeigte als Bestätigung 24 h

nach Plasmidübertragung die selektive ca-Caspase3 Proteinexpression ausschließlich in U87 Zielzellen, während kein Signal in Neuronen als Nicht-Zielzelle detektiert werden konnte (Abb. 6c). Um in diesem Versuchsdesign U87-Zelltyp-spezifische Effekte auszuschließen, wurden drei weitere Keratin13-positive Glioblastomzellen getestet (siehe Appendix Abbildung 2). 24 h nach Übertragung des seRNA-ca-Caspase3 kodierende Plasmid konnte für alle drei Zelltypen induzierte Apoptose morphologisch beobachtet werden. Im Vergleich zu den Transfektionseffizienzen des seRNA Δ_{3-5} -eGFP Konstrukts konnten relative Zelltötungseffizienzen von über 100% bei allen Zelltypen festgestellt werden (Abb. 6d).

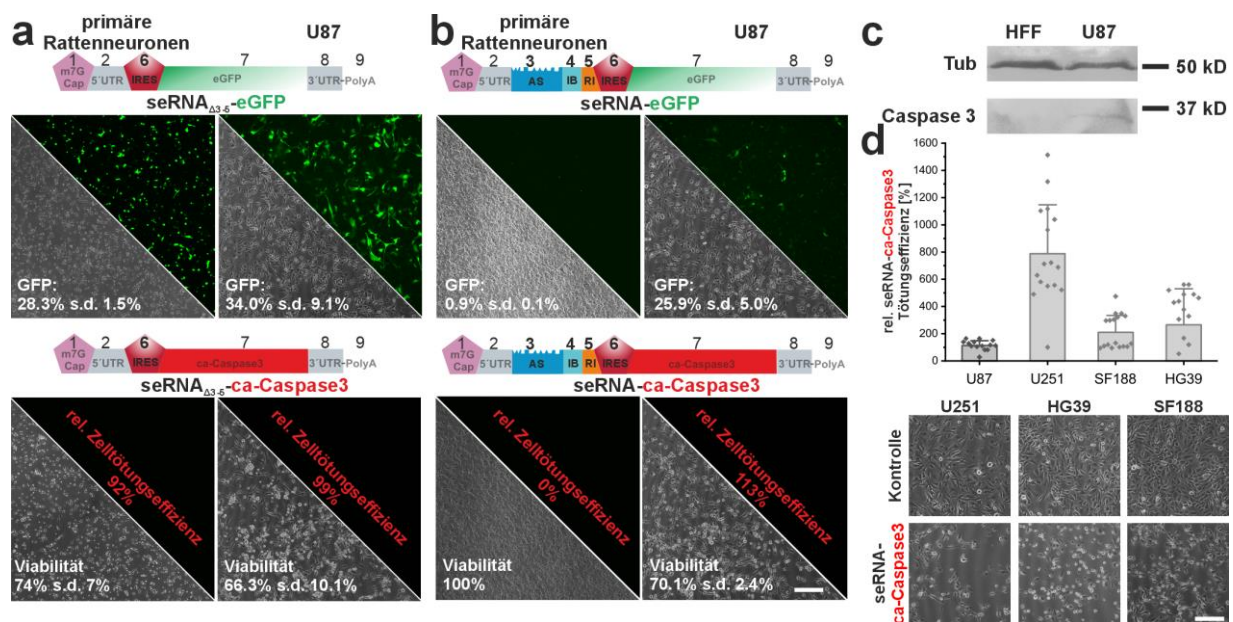


Abbildung 6: seRNA als therapeutische Anwendungsmethode zur Induktion eines selektiven Zelltods. (a) seRNA Δ_{3-5} und (b) seRNA Konstrukte mit entweder eGFP oder ca-Caspase3 wurden in primäre Neuronen als Nicht-Zielzelle und U87 Glioblastomzellen als Zielzelle übertragen. Die Expression wurde analysiert durch Mikroskopie und Durchflusszytometrie. n=3. (c) Nach Übertragung des seRNA-ca-Caspase3 Konstrukts wurde eine Western Blot Analyse von HFF und U87 Zellen durchgeführt um die Caspase 3 Proteinexpression zu untersuchen. Tubulin wurde als interne Kontrolle detektiert. (d) Die angegebenen humanen Glioblastomzelllinien wurden mit dem seRNA-ca-Caspase3 Konstrukt transfiziert. 24 h nach Übertragung wurden die Zelltötungseffizienz analysiert, sowohl durch Mikroskopie als auch durchflusszytometrisch. Angegeben ist die relative Tötungseffizienz basierend auf den durchflusszytometrisch bestimmten Transfektionseffizienzen die mit dem seRNA Δ_{3-5} -eGFP Konstrukt erreicht wurden. n= mindestens 10. Alle Maßstabsbalken entsprechen 200 μ m. Die in Abbildungsteil c verwendeten Daten wurden bereits hier verwendet [117].

3.2 seRNA Anwendung in einem *in vivo* Glioblastoma Mausmodell

Nachdem das therapeutische seRNA-ca-Caspase3 Konstrukt *in vitro* eine gute Selektivität in Kombination mit einer hohen Selektivität gezeigt hatte, sollte dies im nächsten Schritt auch *in vivo* verifiziert werden.

3.2.1 Charakterisierung des *in vivo* Glioblastommodells und Analyse der seRNA Wirksamkeit

Zur Untersuchung der seRNA Wirksamkeit wurde ein Glioblastommodell mit immundefizienten Mäusen gewählt. Humane U87 Glioblastomzellen wurden in Zusammenarbeit mit der Uniklinik Köln in das Striatum des Gehirns injiziert und dort zur Proliferation über einen Zeitraum von zwei Tagen belassen. Zwei Tage nach Injektion konnte ein mitotisch aktiver Hirntumor festgestellt werden, was durch Magnetresonanztomographie (MRT) und eine Ki-67-Immunfärbung bestätigt wurde (Abb. 7a, c). Die unabhängige Kontrollgruppe wurde entweder mit einer NaCl-Lösung oder dem seRNA-eGFP Vollängenkonstrukt behandelt. Die Injektionen erfolgten stereotaktisch direkt in das Tumorgewebe. Sowohl seRNA-eGFP oder NaCl-Lösung Injektionen zeigten keinen Einfluss auf das Tumorwachstum im zeitlichen Verlauf. Im Gegensatz dazu führte die Injektion des seRNA-ca-Caspase3 Konstrukts zu einer deutlich sichtbaren Reduktion der Tumorgroße. Dies wurde 3, 7 und 14 Tage nach Behandlung mittels nicht-invasiver MRT-Bildgebung nachgewiesen (Abb. 7b). Die MRT-Analyse zeigte eine kontinuierliche Schrumpfung des Tumors in der seRNA-ca-Caspase3 Gruppe (Abb. 7e). In der Kontrollgruppe blieb das Tumolvolumen über die Zeit stabil (Abb. 7d), $p=0,6231$. Bereits drei Tage nach Injektion war das Tumolvolumen in der mit dem Therapeutikum behandelten Gruppe signifikant verringert (Abb. 7f). Nach 14 Tagen konnte im Durchschnitt eine Schrumpfung des Hirntumors um mehr als 50% detektiert werden. Eine tägliche klinische Kontrolle ergab keine Hinweise auf zytotoxische Effekte oder Verhaltensauffälligkeiten bei den behandelten Tieren.

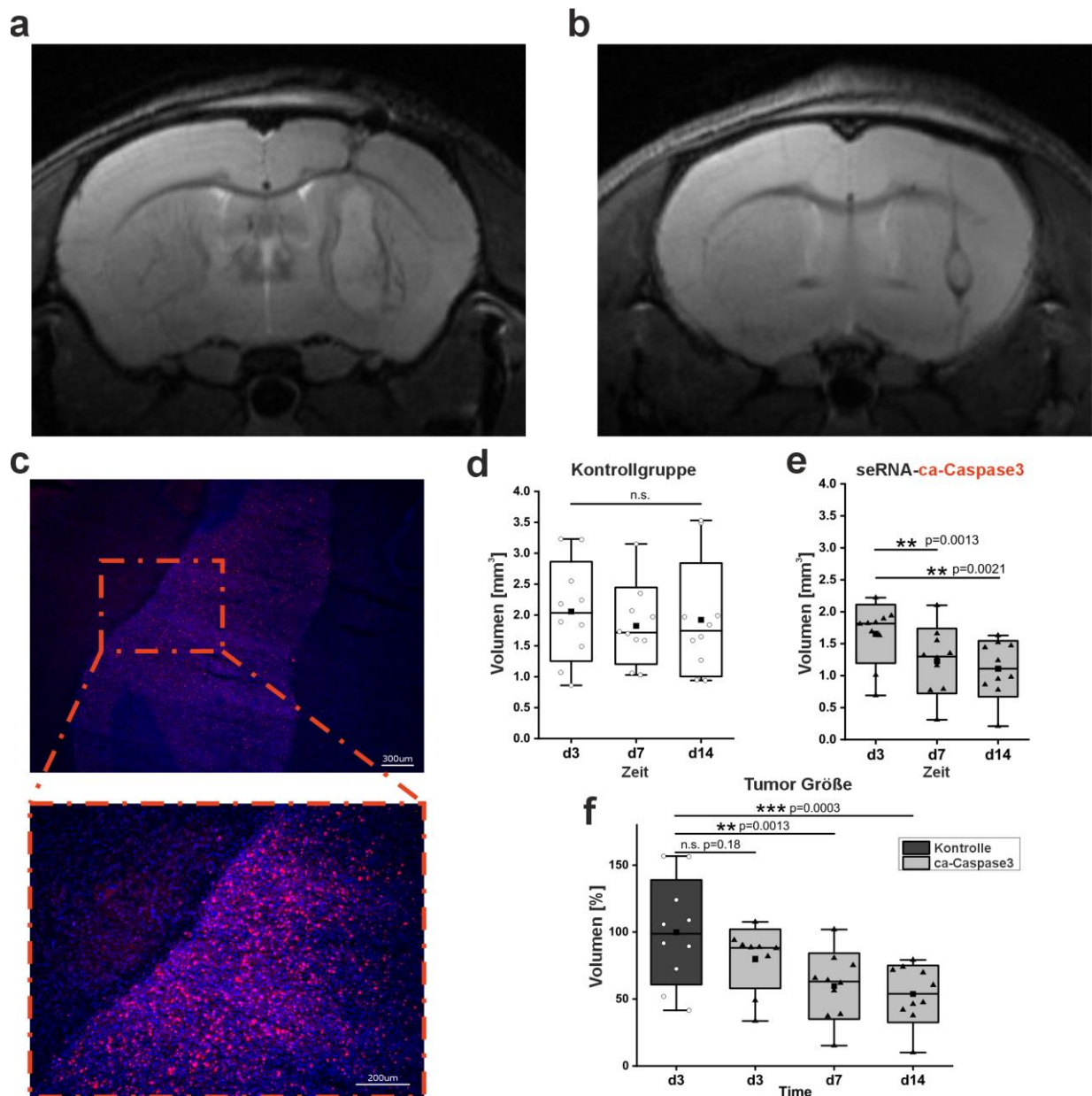


Abbildung 7: seRNA Behandlung von Mäusen mit induziertem Hirntumor. (a) Beispielhafte MRT-Aufnahme 14 Tage nach Behandlung mit dem therapeutisch inaktiven seRNA-eGFP kodierenden Plasmid. (b) Beispielhafte MRT-Aufnahme 14 Tage nach einmaliger Behandlung mit dem seRNA-ca-Caspase3 Konstrukt. (c) Analyse von Tumor und Tumoraktivität anhand der Ki-67-Immunoreaktivität. Der Maßstab des Übersichtsbildes entspricht 300 μm , der der Nahaufnahme 200 μm . (d) Anhand der MRT-Aufnahmen wurden die Tumervolumina untersucht der Kontrollgruppe (seRNA-eGFP oder NaCl) untersucht, (e) vergleichend zu den Tumervolumina der Tiere, die mit dem Therapeutikum behandelt wurden. Statistische Analysen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholungen über den Faktor Zeit durchgeführt ($p=0,5035$ für d, $p=0,0001$ für e). (f) Zum direkten Vergleich von Kontroll- und Therapiegruppe wurden die relativen Tumervolumina in Bezug auf Tag 3 der Kontrolltiere dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte ebenfalls durch einfaktorielle ANOVA. Die Boxplots zeigen alle Einzelwerte zu jedem Zeitpunkt; Mittelwerte als ausgefüllter Mittelpunkt, Mediane als Linie, Min/Max-Werte als Whisker und die Standardabweichung als Box dargestellt. Für d-f gilt $n=10$ pro Gruppe und Zeitpunkt aus insgesamt 4 unabhängigen Experimenten. Sylvie Krüger, Maria A. Rüger und Carina Stegmayr operierten die Tiere und führten die MRTs und die Antikörperfärbung im INM-4 und dem INM-3 vom Forschungszentrum Jülich durch.

3.2.2 Analyse der seRNA Biodistribution nach Behandlung im *in vivo* Glioblastommodell

Um Nebenwirkungen der seRNA zu vermeiden ist es wichtig, wie das seRNA kodierende Plasmid und die resultierende seRNA selber sich nach *in vivo* Behandlung im Körper verteilt und wie lange die Nukleinsäuren vorliegen. Zur Analyse der Biodistribution wurden 24 h nach Behandlung Gehirngewebeproben von Glioblastom tragenden Mäusen sowie von tumorfreien Kontrolltieren untersucht. Dabei wurde sowohl die Verteilung der seRNA kodierenden Plasmide als auch die transkribierten seRNA Mengen durch eine qRT-PCR quantifiziert. Nach intratumoraler Injektion fanden sich hohe Konzentrationen von Plasmid-DNA und resultierender seRNA in den untersuchten Gehirnen. Dies war unabhängig davon, ob es sich um das seRNA-eGFP oder das seRNA-ca-Caspase3 Konstrukt handelte. Die DNA-Konzentration nahm in der Tumorperipherie deutlich ab und war in der unbehandelten Gehirnhälfte nahezu nicht nachweisbar (Abb. 8a). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei tumorfreien Tieren eine deutlich weiterreichende Verteilung der Plasmid-DNA. Hier wurden hohe Konzentrationen sowohl an der Injektionsstelle als auch in der gegenüberliegenden Gehirnhälfte gemessen. Auch die RNA-Analyse bestätigte eine effiziente Transkription in Tumorzellen und Expression in diesen Tieren. Zu keinem Zeitpunkt konnten durch die seRNA-Behandlung toxische Effekte oder Verhaltensänderungen bei den Tieren äußerlich beobachtet werden.

Aufgrund der möglichen Diffusion der seRNA-Lipoplexe durch die Blut-Hirn-Schranke wurde zusätzlich geprüft, ob seRNA kodierende Plasmide oder seRNA in verschiedenen Organen der Mäuse nachweisbar waren. Zwei Tage nach Behandlung konnten hohe Mengen an Plasmid-DNA (Abb. 8b) und exprimierte seRNA (Abb. 8c) im Gehirn nachgewiesen werden. In keinem anderen untersuchten Organ war seRNA-basierte DNA oder RNA nachweisbar. Auch verlängerte Inkubationszeiten führten zu keiner Anreicherung in peripheren Organen. Im Gehirn waren sieben Tage nach Behandlung nur noch geringe Mengen von 147 fg an Plasmid-DNA nachweisbar.

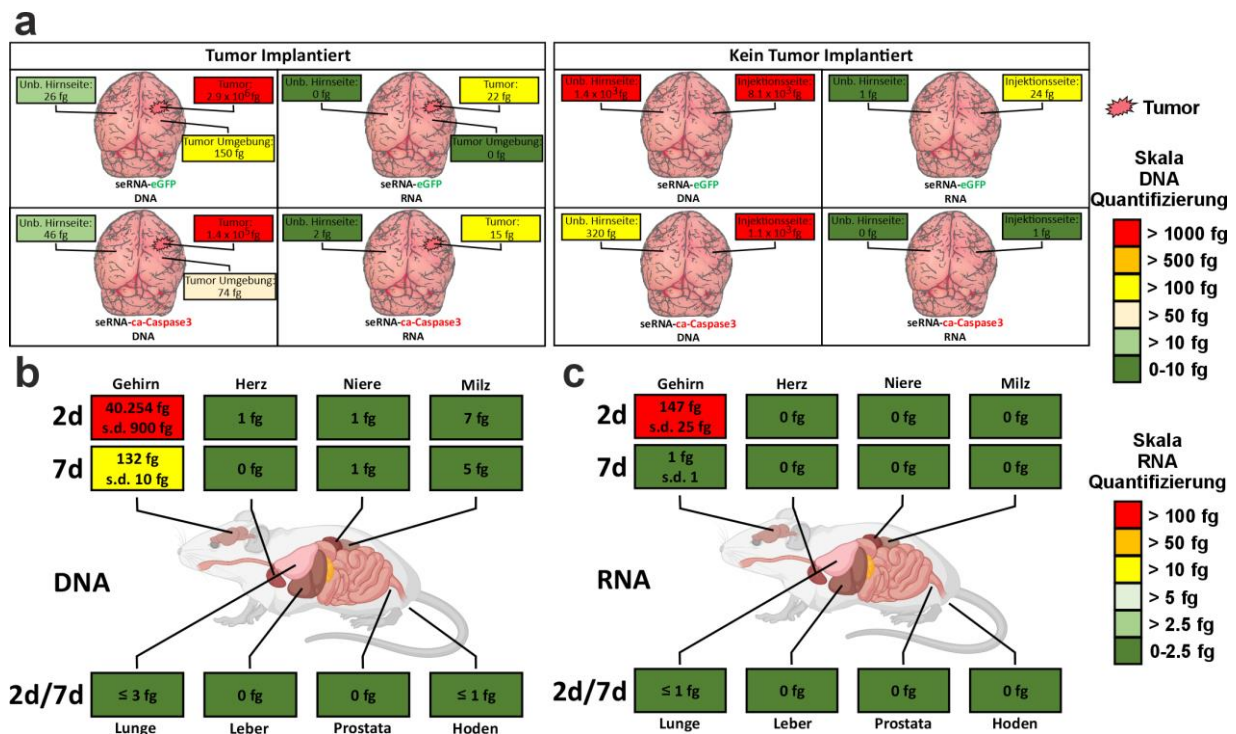


Abbildung 8: In vivo seRNA Biodistributionsanalyse. (a) Mäuse mit oder ohne frühe U87-Tumore (Tag 3) wurden mit seRNA kodierenden Plasmiden behandelt, die entweder GFP (obere Reihe) oder ca-Caspase3 (untere Reihe) als Effektor exprimierten. Zwei Tage später erfolgte die Entnahme von Gehirngewebe an den markierten Stellen zur Analyse von Plasmid-DNA sowie exprimierte seRNA. Dargestellt sind Einzeltiere aus einer Versuchsreihe. (b, c) qRT-PCR-Analysen wurden für die angegebenen Organe an Tag zwei und Tag sieben nach seRNA-ca-Caspase3 Übertragung ins Gehirn durchgeführt um übertragene Plasmide und resultierende seRNA nachzuweisen. Pro Zeitpunkt wurden vier behandelte und zwei unbehandelte Tiere analysiert. Wertem sind als Mittelwert angegeben. Für das Gehirn als einziges Organ mit nachweisbarer seRNA, zusätzlich mit Standardabweichung. Erstellt mit BioRender.com.

3.3 Expressionserhöhung von seRNA kodierenden Plasmiden

seRNA kodierende Plasmide zeigten selektive Funktionalität sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*. Dennoch liegt die EMCV IRES vermittelte seRNA Proteinexpression deutlich niedriger, als die Cap vermittelte Proteinexpression konventioneller Expressionsplasmide. Es ist gut beschrieben, dass IRES vermittelte Translation geringere Expressionsraten aufweist, als Cap vermittelte [118]. Da eine IRES Struktur für die Funktionalität der seRNA essentiell ist, ist es nicht möglich diese durch andere Cap Strukturen zu ersetzen. Dennoch erschien die seRNA-eGFP Expression aufgrund des Vergleichs mit dem seRNA_{Δ3-5'}-eGFP Konstrukt geringer als zu erwarten wäre. Daher wurden im folgenden Möglichkeiten untersucht, die zu einer weiteren Reduktion der Expression des seRNA-eGFP kodierenden Plasmids im Vergleich zu Kontrollplasmiden führen könnten. Dabei wurde der Übertragungsweg des pDNA-Lipofectamine3000 Lipoplexes auf dem gesamten Weg zu Expression analysiert, im Besonderen auf die Plasmidlänge im Vergleich, den Lipoplex, die Menge an in die Zelle übertragenem Plasmid und die resultierenden RNA Mengen.

3.3.1 Analyse der Ursache der reduzierten Expression seRNA kodierender Plasmide

Ähnlich zu vorher gezeigten Daten zeigte ein konventionelles eGFP Plasmid im Ziel- und Nichtzielzellen hohe Transfektionseffizienzen (49% in HFF und 66% in U87 Zellen, Abb. 9a). Im Gegensatz dazu führte das seRNA-eGFP Plasmid zu stabiler eGFP Expression ausschließlich in U87 Zielzellen (37%), während in HFF Zellen die Expression deutlich reduziert war (7%). Obwohl seRNA Konstrukte ihre zielzellspezifische Translation in Ziel- und Nicht-Zielzellen demonstrieren konnten, war die absolute Expressionsintensität in Zielzellen um 95% und in Nicht-Zielzellen sogar um 97% reduziert. Trotz identischer Übertragung war damit die seRNA-eGFP Expression in Zielzellen im Vergleich zum Kontrollkonstrukt deutlich reduziert. Dies könnte schlicht an einer reduzierten IRES Expression im Vergleich zur 5'-Cap Expression liegen, oder weitere Gründe haben. Um die Ursache zu klären, wurde zunächst die größere Länge der seRNA Plasmide untersucht. Doch auch das noch längere α -Actinin-eGFP Plasmid zeigte bei höherer Transfektionseffizienz hohe Expressionsintensitäten (Abb. 9b). Anschließend wurden die in Abb. 9a eingesetzten Lipoplexe hinsichtlich ihres Polydispersitätsindex (PDI), Partikelgröße und der Partikelladung untersucht. Dabei zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen dem konventionellen eGFP Plasmid und dem seRNA-eGFP Plasmid. Zur Validierung der Plasmidübertragung wurde 24 Stunden nach Transfektion die Gesamt-DNA von Zellen isoliert. Dabei wurden das eGFP Plasmid, das seRNA-eGFP Plasmid und auch das nicht-selektive seRNA _{Δ 3-5}-eGFP Plasmid verglichen. Interessanterweise lagen von allen Plasmiden vergleichbare Mengen in den Zellen vor (Abb. 9d). Somit scheint die Übertragung aller Plasmide gleich effizient abzulaufen und kein schneller Abbau induziert zu werden. Im nächsten Schritt wurden die aus der Übertragung resultierenden RNA-Mengen quantifiziert. Zwei Stunden nach Transfektion waren die RNA-Mengen aller Plasmide noch auf ähnlich niedrigem Niveau. Danach stiegen die eGFP-RNA Konzentrationen sowohl für das eGFP Plasmid, als für das seRNA _{Δ 3-5}-eGFP Plasmid deutlich an und erreichten nach etwa 24 Stunden stabile Werte. Diese hohen RNA Level blieben bei beiden Kontrollplasmiden über den gesamten Analysezeitraum von 72 Stunden nahezu konstant. Im Gegensatz dazu waren die eGFP-RNA Mengen nach Transfektion des seRNA-eGFP Plasmids deutlich reduziert. Die Ct-Werte lassen auf eine etwa 8- bis 16-fach geringere RNA-Menge schließen, wobei das Expressionsverhalten über die Zeit hinweg dem der Kontrollkonstrukte ähnelte (Abb. 9e). Als interne Kontrolle diente die stabile Expression der GAPDH-mRNA, die zum Vergleich der Konzentrationen ebenfalls dargestellt wurde. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden Langzeituntersuchungen mit den eGFP- und seRNA-eGFP Plasmiden durchgeführt. Dabei wurde bei jeder Passage ein Teil der Zellen zur RNA-Isolation und Quantifizierung verwendet. Über einen Zeitraum von ca. 60 Tagen konnte eine deutlich geringere RNA-Menge nach Transfer der seRNA-eGFP Plasmide im Vergleich zu den eGFP Plasmiden nachgewiesen werden (Abb. 9f). Dabei war der Rückgang der relative Rückgang der RNA

Transkripte bei der seRNA und dem eGFP Konstrukt über die Zeit vergleichbar. Dies deutet auf eine ähnliche Plasmid Stabilität und RNA Stabilität beider Konstrukte hin.

Die reduzierten RNA Level nach Transfektion der seRNA Volllängenkonstrukte könnte entweder auf eine verringerte Transkription oder auf eine verminderte RNA Stabilität zurückzuführen sein. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurde 24 Stunden nach Plasmidtransfer Actinomycin D (ActD) zur Inhibition der RNA Synthese eingesetzt. Als Kontrolle der erfolgreichen RNA Synthese Inhibition wurde das eGFP Plasmid übertragen und 30 min später ActD hinzugefügt. Bei dieser Kontrolle war die eGFP Proteinexpression über die Zeit vollständig unterdrückt. Eine bzw. 24 Stunden nach ActD Zugabe wurden die RNA Mengen mittels qRT-PCR bestimmt, um den Abbaugrad zu ermitteln. Nach Übertragung des eGFP Plasmids konnte kein signifikanter Unterschied der RNA Menge zwischen beiden Zeitpunkten festgestellt werden (Abb. 9g). Nach Übertragung des seRNA-eGFP Plasmids zeigte sich hingegen eine leichte Abnahme der RNA-Menge nach 24 Stunden, wobei die Reduktion um etwa ein Drittel statistisch nicht signifikant war. Dieser moderate potentielle Rückgang erklärt zudem nicht die drastisch niedrigere Expression, wie sie zuvor beobachtet wurde.

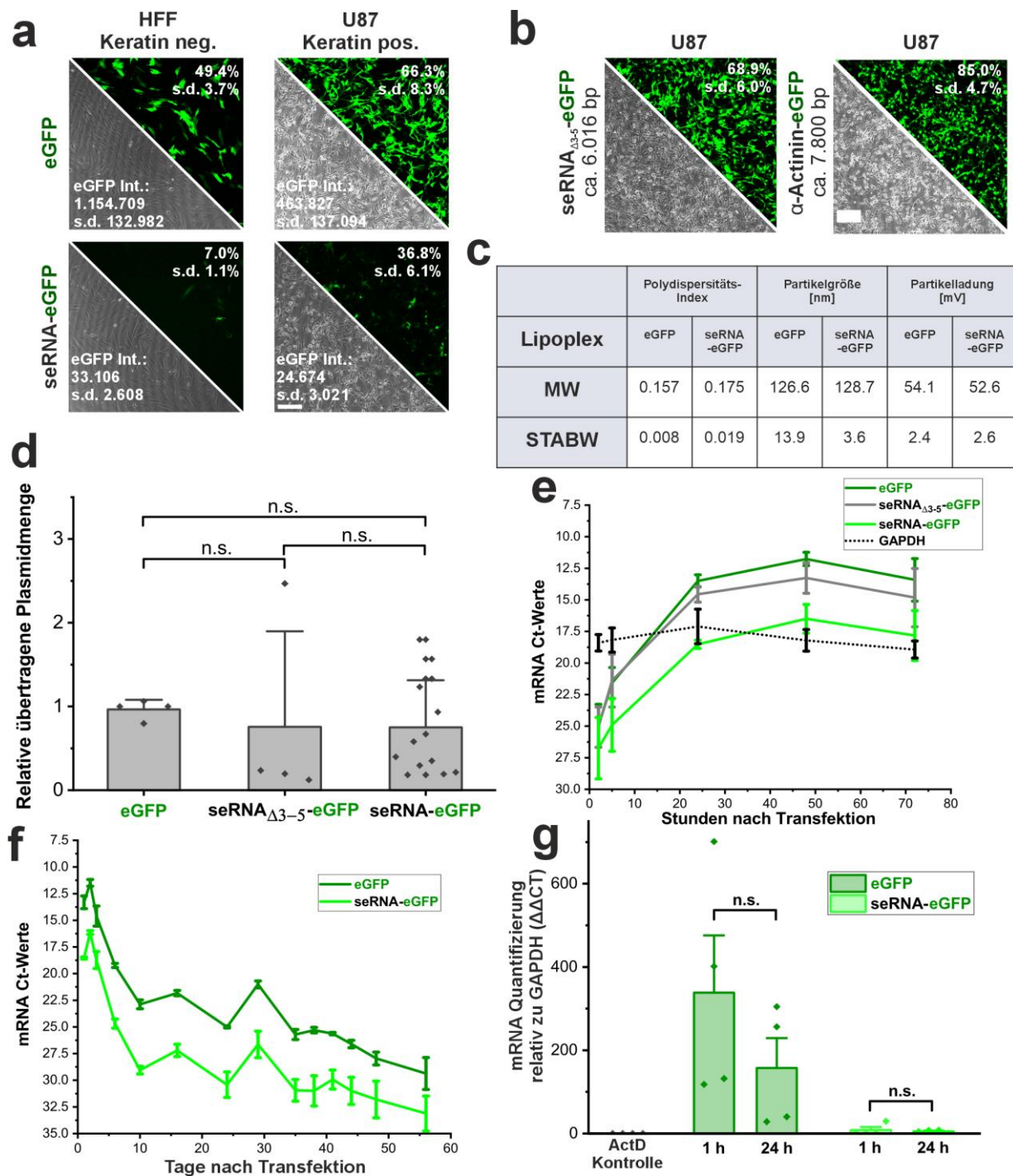


Abbildung 9: seRNA kodierende Plasmide exprimieren reduzierte RNA Mengen. (a) Funktionalität des seRNA-eGFP Plasmids im Vergleich zu einem konventionellen eGFP Plasmid 24 Stunden nach Transfektion in HFF als Nicht-Zielzellen und U87 Glioblastomzellen als Zielzellen. (b) Vergleich der Transfektionseffizienzen von seRNA-eGFP und einem deutlich längeren α -Actinin-eGFP Plasmid. (a, b) $n=4$ unabhängige Proben. Maßstabsbalken entsprechen 200 μm . (c) Analyse des Polydispersitätsindex, des z-Average als Maß für die Lipoplexgröße in nm und des Zeta Potential als Maß für die Ladung des Lipoplex in mV. Die Werte sind für das seRNA-eGFP Konstrukt und als Kontrolle für das eGFP Konstrukt im Lipoplex mit Lipofectamine3000 angegeben. $n=3$ unabhängige Proben. (d) qRT-PCR Quantifizierung des eGFP Plasmids, des Kontrollplasmids seRNA Δ_{3-5} -eGFP sowie des seRNA-eGFP Plasmids in U87 Zellen 24 Stunden nach Transfektion. (e) Ct-Werte der eGFP-RNA Expression der drei Plasmide nach Transfektion in U87 Zellen. Die RNA Expression wurde nach 2 h, 5 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Die Expression des Houskeeping Gens GAPDH ist in schwarz dargestellt. (f) Langzeit Stabilitätsanalyse der RNA nach Transfektion des eGFP und des seRNA-eGFP Plasmids. $n=3$ unabhängige Proben. (g)

Abbauanalyse der aus dem eGFP und dem seRNA-eGFP Plasmid transkribierten RNA eine bzw. 24 Stunden nach Inhibition der Transkription mittels Actinomycin D (ActD). Als Kontrolle der Transkriptionshemmung wurde ActD 30 min nach Transfektion des eGFP Plasmids hinzugegeben. n=4 unabhängige Proben. Die p-Werte wurden mittels einfaktorieller ANOVA berechnet. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die in Abbildungsteil a, b, d und e verwendeten Daten wurden ganz oder teilweise bereits hier verwendet[119].

3.3.2 Erhöhung der seRNA Expression durch Einsatz von AAVs

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) können sehr hohe Expressionsraten der übertragenen DNA bewirken. Daher wurde untersucht, ob seRNA die mittels AAVs übertragen wird, nicht nur stärker exprimiert wird, sondern auch weiterhin ihre Zielzell-Spezifität behält. Aufgrund der Größe der seRNA Konstrukte kam ein selbstkomplementärer AAV Serotyp (VSSTSPR) zum Einsatz. Zwei verschiedene *Multiplicities of Infection* (MOI; 10.000 und 50.000) wurden dabei mit der klassischen Lipofektion als Übertragungsweg der jeweiligen Plasmide verglichen. Die Transduktion mit beiden MOIs führte bei den Positivkontrollen (eGFP-AAV und seRNA_{Δ3-5}-eGFP-AAV) zu Anteilen GFP-positiver Zellen von über 95% (Abb. 10a). In allen Fällen lag die Transduktionseffizienz damit deutlich höher als bei der Plasmid-basierten Lipofektion. Interessanterweise zeigte das Volllängen seRNA-eGFP Konstrukt bei einer MOI von 10.000 zunächst eine geringere Effizienz als für Lipofektion. Durch Erhöhung auf eine MOI von 50.000 konnte die Effizienz jedoch um das 3-fache auf fast 55% gesteigert werden. Dies übertraf signifikant die Werte der Plasmid-Lipofektion. und unterstreicht das Potential von AAVs zur skalierbaren Steigerung der seRNA-Expression.

Um sicherzustellen, dass die Zielzell-Spezifität auch bei Einsatz von AAVs erhalten bleibt, wurde der Anteil GFP-positiver Zellen in HFF Nicht-Zielzellen nach Transduktion mit einer hohen MOI bestimmt. Bei den Positivkontrollen (eGFP-AAV und seRNA_{Δ3-5}-eGFP-AAV) zeigten sich hohe Anteile GFP-positiver Zellen von 60% bis nahezu 100% (Abb. 10b). Im Gegensatz dazu blieb beim Volllängen seRNA-eGFP Konstrukt die GFP Expression nahezu vollständig aus; lediglich 9% der Zellen wiesen eine sehr schwache Fluoreszenz auf. Somit blieb die seRNA Selektivität auch bei hohen MOIs und Einsatz von AAVs erhalten.

Insgesamt führte die Verwendung von AAVs zudem zu einer deutlich gesteigerten Expressionsintensität in GFP-positiven Zielzellen (Abb. 10a und c). Diese Intensitäten nahmen mit steigender MOI weiter zu und erreichten beim seRNA Volllängenkonstrukt (MOI 50.000) schließlich Werte, die zuvor nur bei Plasmid-basiertem Transfer der GFP-mRNA Kontrollkonstrukte beobachtet wurden. Dies belegt die gute Steuerbarkeit der seRNA Expressionstärke durch Variation der MOI beim Einsatz von AAVs.

Diese Korrelation konnte auch für niedrigere MOIs mit dem Kontrollkonstrukt $\text{seRNA}_{\Delta 3-5}$ -eGFP-AAV und dem seRNA -eGFP-AAV bestätigt werden. Neben der eGFP Intensität wurde hierbei zusätzlich die Menge an transfizierter AAV-DNA im Zellkern analysiert (Abb. 10d). Für beide Konstrukte zeigte sich ein vergleichbarer, nahezu linearer Anstieg der AAV-DNA mit steigenden MOIs von 1.000 bis 10.000. Während die GFP-Intensität für beide Konstrukte mit zunehmender MOI ebenfalls anstieg, verlief der Anstieg jedoch unterschiedlich steil: Beim Vollständigen seRNA Konstrukt lag die Intensität bei etwa einem Zehntel der Kontrolle und erreichte erst bei einer MOI von 10.000 ähnliche Werte, wie sie für das Kontrollkonstrukt bereits bei einer MOI von 1.000 beobachtet wurden.

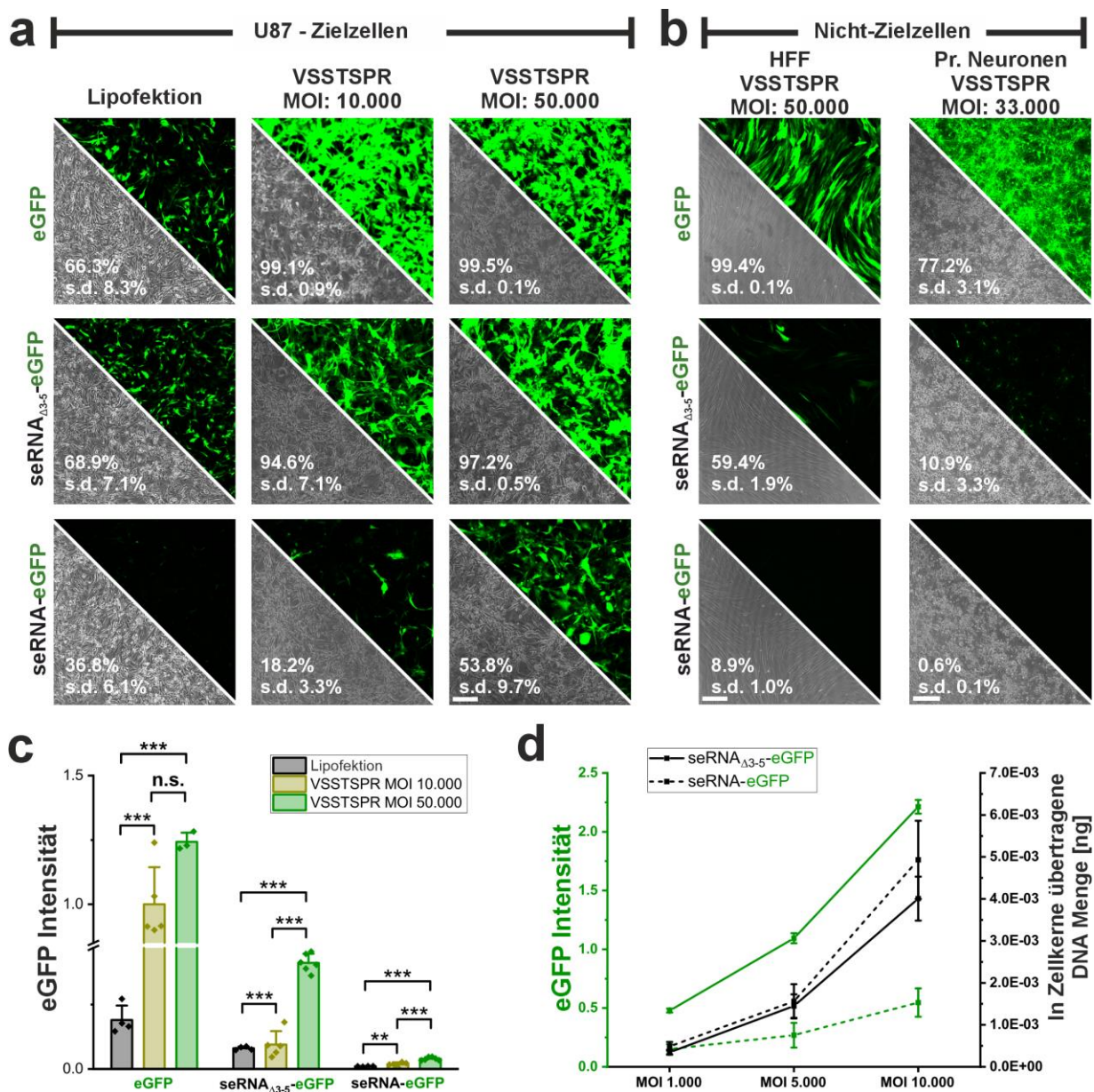


Abbildung 10: Erhöhung der DNA Übertragung steigert gleichermaßen die seRNA Expression. (a) Vergleich der Transfektionseffizienz zwischen Lipofektion und AAV-vermittelter Genübertragung (Serotyp VSSTSPR) für ein eGFP-Plasmid, ein nicht-selektives Kontrollkonstrukt ($\text{seRNA}_{\Delta 3-5}$ -eGFP) sowie das seRNA -eGFP Konstrukt in U87 Zielzellen. (b) Test der Selektivität von AAVs als Transduktionsvehikel für eGFP-Plasmid, $\text{seRNA}_{\Delta 3-5}$ -eGFP und seRNA -eGFP in den Nicht-Zielzellen HFF und primären

Rattenneuronen. **(a,b)** Gegeben sind die eGFP Transfektionseffizienzen aus $n =$ mindestens 3 unabhängigen Proben. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm . Für die Bildvergleiche zwischen Lipofektion und VSSTSPR wurden identische Lasereinstellungen, Pixelgrößen und Master-Gain-Werte verwendet. Die VSSTSPR-Aufnahmen wurden jedoch mit einer reduzierten Pixelverweilzeit (Pixel dwell time) von 0,39 μs (im Vergleich zu 1,58 μs bei Lipofektionsaufnahmen) erfasst. **(c)** Vergleich der eGFP Expressionsintensität nach Lipofektion bzw. AAV-Transfer von eGFP, seRNA $_{\Delta 3-5}$ -eGFP und seRNA-eGFP. $n = 3$ unabhängige Proben. Die p-Werte wurden mittels einfaktorieller ANOVA berechnet. **(d)** Analyse der eGFP Expressionsintensität im Vergleich zu der übertragenen DNA-Menge in den Zellkern nach Applikation verschiedener MOIs für das nicht-selektive seRNA $_{\Delta 3-5}$ -eGFP und das seRNA-eGFP Konstrukt. $n = 3$ unabhängige Proben. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die Konstrukte wurden von der Arbeitsgruppe von Hildegard Büning, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für experimentelle Hämatologie in die VSSTSPR Serotypen integriert und zur Verfügung gestellt. Die in Abbildungsteil a und c verwendeten Daten wurden bereits hier verwendet[119].

3.3.3 Analysen von Technologien zur Steigerung der seRNA Expression

AAVs konnten sowohl die seRNA Expressionsstärke als auch den Anteil erfolgreich transfizierter Zellen deutlich erhöhen. Aufgrund ihrer Immunogenität bestehen jedoch Einschränkungen für verschiedene medizinische Anwendungen. Daher wurde zunächst versucht, die Plasmid-basierte Expression mithilfe eines kommerziellen Transfektionsverstärkers (TrV) zu steigern. Dies führte zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz für die Kontrollplasmide (eGFP und seRNA $_{\Delta 3-5}$ -eGFP) ebenso wie für das Vollängen seRNA-eGFP Konstrukt. Dabei konnte eine Steigerung um mehr als 80% beobachtet werden (von 24 auf 44%, Abb. 11a). Während die erhöhte Transfektionseffizienz bei den Kontrollplasmiden auch mit leicht gesteigerten Expressionsintensitäten einherging, zeigte sich dieser Effekt bei seRNA-eGFP nicht (Abb. 11b).

Da die genaue Zusammensetzung des TrV für den Anwender unbekannt ist, wurden diese Versuche mit Trichostatin A (TSA), einem gut charakterisierten Transfektionsverstärker[120], wiederholt. TSA inhibiert Histon-Deacetylasen (HDAC) kann dadurch die Genexpression erhöhen. Hierdurch konnte nicht nur die Transfektionseffizienz des seRNA-eGFP Plasmids mehr als verdoppelt werden (Abb. 10c), sondern auch die Expressionsintensität stieg nahezu um das Vierfache an (Abb. 11d und e). Bei Romidepsin handelt es sich ebenfalls um einen HDAC Inhibitor, MG149 und C646 dagegen inhibieren Histon Acetyltransferasen (HAT) und gelten daher auch als potentielle Transfektionsverstärker. Von den zusätzlichen getesteten Expressionsverstärkern Romidepsin, MG149 und C646 zeigte allerdings nur Romidepsin einen vergleichbaren positiven Effekt auf die Expression, während die anderen keine Steigerung bewirkten (Abb. 11e).

Da Transfektionsverstärker in der Regel nicht für *in vivo* Anwendungen geeignet sind, wurde ergänzend untersucht, ob die Wirksamkeit von seRNA durch den Einsatz von DNA-Minicircles gesteigert werden kann. Für diese sind aufgrund ihrer reduzierten Größe erhöhte Expressionsraten beschrieben[121].

Dafür wurde ein seRNA-Minicircle eingesetzt, der anstelle von eGFP die konstitutiv aktive Caspase3 (ca-Caspase3) exprimierte. Bereits 48 Stunden nach Transfektion in U87 Glioblastomzellen konnte im Vergleich zum Standard seRNA-ca-Caspase3 Plasmid eine signifikant erhöhte Zelltötungseffizienz anhand von ATP-basierten Zellviabilitätstests festgestellt werden. Gleichzeitig konnten im Vergleich zum Standardplasmid verstärkte apoptotische morphologische Veränderungen in Form von Zellabrundung und starker Ablösung von der Oberfläche beobachtet werden (Abb. 11f und g).

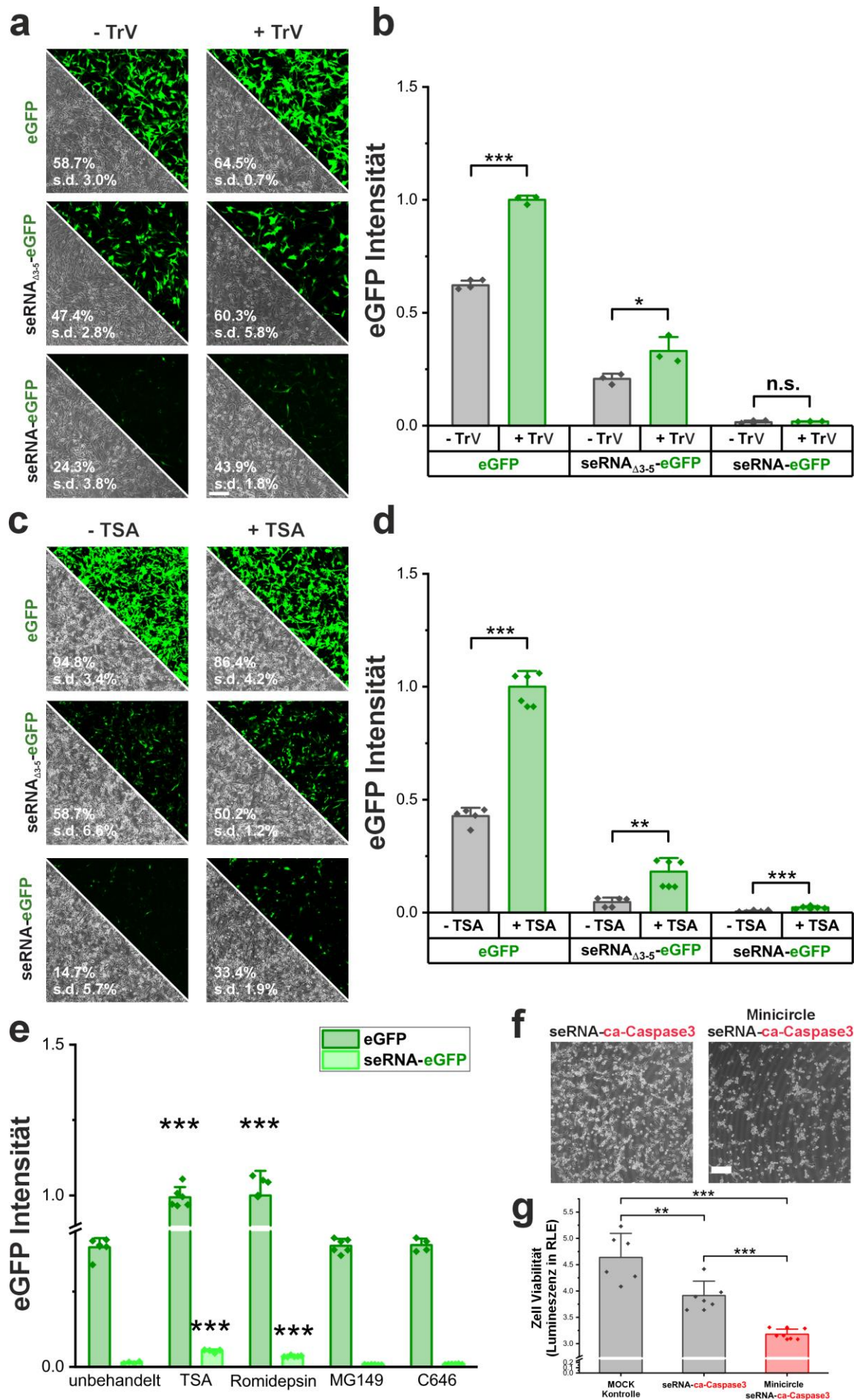


Abbildung 11: Techniken zur Steigerung der seRNA Expression. (a) Mikroskopische Aufnahmen von U87 Glioblastomzellen nach Transfektion mit eGFP-, seRNA Δ_{3-5} -eGFP und seRNA-eGFP kodierenden Plasmiden, jeweils mit oder ohne einem kommerziell erhältlichen Transfektions Verstärker (TrV). (b) Quantifizierung der resultierenden eGFP Expressionsintensität. n = 3 unabhängige Proben. (c) Mikroskopische Aufnahmen von U87 Zellen nach Transfektion mit und ohne Zugabe von Trichostatin A (TSA) als Transkriptionsverstärker. (d) Die resultierende eGFP Expressionsintensität. n = 5 unabhängige Proben. (e) Einfluss von HDAC- und HAT-Inhibitoren auf die Transkription des seRNA-eGFP und des eGFP kodierende Plasmid. (f) Vergleich des Standard seRNA-ca-Caspase3 Plasmids mit einem seRNA-ca-Caspase3-Minicircle Plasmid. (g) Zellviabilität 48 h nach Transfektion mit einem MOCK Kontrollplasmid, dem seRNA-ca-Caspase3 Plasmid oder dem seRNA-ca-Caspase3-Minicircle Plasmid. n = 6 unabhängige Proben. (a-g) Alle Maßstabsbalken entsprechen 200 μ m. Alle angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen. Alle p-Werte wurden mittels einfaktorieller ANOVA berechnet. Der Plasmid Minicircle wurde von der PlasmidFactory, Bielefeld produziert und zur Verfügung gestellt. Die in Abbildungsteil a und b verwendeten Daten wurden bereits hier verwendet[119].

3.4 seRNA Applikation als *in vitro* transkribierte RNA (IVT-seRNA)

seRNA kodierende Plasmide zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine zuverlässige, selektive, sichere und funktionelle Zielgenexpression. Als nächster Entwicklungsschritt bietet sich die direkte Anwendung der *in vitro* transkribierten seRNA (IVT-seRNA) anstelle der Plasmid-DNA an. Ein wesentlicher Vorteil dieser Strategie liegt darin, dass eine genomische Integration von DNA in transfizierte Zellen ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus eröffnet die direkte RNA-Anwendung erweiterte Gestaltungsmöglichkeiten beim Moleküldesign. So könnten beispielsweise chemisch modifizierte Nukleotide oder alternative 5'-Cap-Strukturen eingesetzt werden, um Stabilität, Translationseffizienz oder Immunogenität gezielt zu beeinflussen.

3.4.1 Anwendung von IVT-seRNA ermöglicht zielzell-spezifische und präzise regulierbare Genexpression *in vitro*

Analog zum verwendeten seRNA-eGFP kodierenden Plasmid wurde eine entsprechende *in vitro* transkribierte seRNA (IVT-seRNA) hergestellt. Diese enthielt eine standardmäßige 7-Methylguanosin (m7G) 5'-Cap-Struktur sowie einen etwa 150 Nukleotide langen Poly(A)-Schwanz. 2 µg der IVT-seRNA wurden in HFF-Zellen als Nicht-Zielzellen sowie in U87 Glioblastomzellen als Zielzellen übertragen. In der mikroskopischen Analyse 24 Stunden nach Transfektion zeigte sich wie zuvor für Plasmid-kodierter seRNA in HFF-Zellen nur eine geringe eGFP-Expression. Eine durchflusszytometrische Untersuchung zeigte jedoch in diesen Zellen für 28% eine schwache eGFP-Expression knapp oberhalb des Schwellwerts. Für positive Zellen war diese Expression sogar signifikant niedriger für eGFP-positive HFF Zellen nach seRNA-Plasmid Transfer. In den Zielzellen hingegen wiesen rund 98% der Zellen eine deutliche eGFP-Expression auf (Abb. 12a). Hier führte die IVT-seRNA zudem zu einer etwa fünfmal höheren eGFP-Expressionsintensität im Vergleich zum seRNA-kodierenden Plasmid (Abb. 12b). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zielzelselektivität der Genexpression auch bei Verwendung von IVT-seRNA vom Prinzip her erhalten bleibt. Gleichzeitig kann mit IVT-seRNA eine deutlich stärkere Expression in Zielzellen erreicht werden.

Im Hinblick auf die Expressionsstärke wurde anschließend untersucht, inwieweit sich die Genexpression durch die übertragene Menge an IVT-seRNA steuern lässt. Dazu wurden unterschiedliche RNA Mengen von 0,1 µg bis 2 µg in U87-Glioblastomzellen übertragen. Mit zunehmender RNA Menge stieg die eGFP-Expressionsintensität zunächst an und erreichte anschließend ein Plateau, ab dem keine weitere Steigerung durch zusätzliche RNA beobachtet werden

konnte. Parallel dazu nahm der Anteil eGFP-positiver Zellen mit steigender RNA-Menge zu, bis schließlich nahezu 100% der Zellen eGFP exprimierten (Abb. 12c). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Genexpression durch die Dosierung der IVT-seRNA gezielt regulieren lässt. Zudem wurden sehr hohe Transfektionseffizienzen erreicht, die mit Plasmid-DNA zuvor nicht erreicht werden konnten.

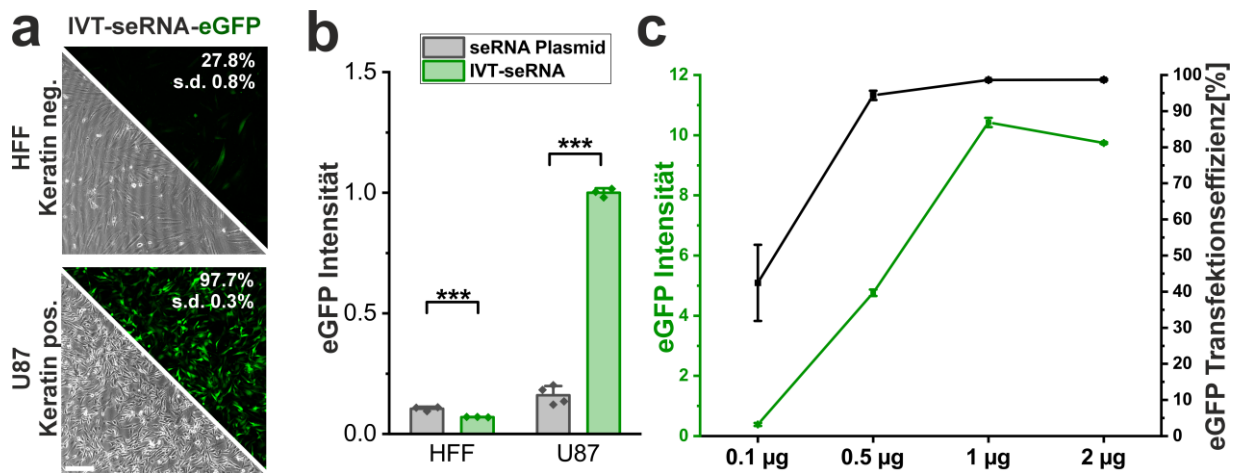


Abbildung 12: Anwendung von IVT-seRNA in Ziel- und Nicht-Zielzellen. (a) Mikroskopische Aufnahmen mit eGFP Transfektionseffizienzen in Prozent und (b) Quantifizierung der eGFP-Expressionsintensität des IVT-seRNA-eGFP Konstrukts in HFF Nicht-Zielzellen und U87-Zielzellen 24 h nach Übertragung. Zum Vergleich wurden die eGFP Intensitäten nach Übertragung des seRNA-eGFP kodierenden Plasmids dargestellt. Maßstabsbalken: 200 µm. p-Werte wurden mittels einfaktorieller ANOVA berechnet. (c) Dosisabhängige Expression von IVT-seRNA, dargestellt als eGFP Intensität und die Transfektionseffizienz in Prozent in U87 Zellen. Überall n = 3 unabhängige Proben.

3.4.2 IVT-seRNA ermöglicht hochselektive und starke Caspase3 Expression in Zielzellen in verschiedenen *in vitro* Co-Kulturmodellen

Nachdem die prinzipielle Funktionalität der IVT-seRNA erfolgreich demonstriert worden war, sollte im nächsten Schritt ihre therapeutische Wirksamkeit an Tumormodellen untersucht werden. Als vergleichende Kontrolle diente eine IVT-eGFP-mRNA ohne regulatorische Elemente. Diese führte zu einer Transfektionseffizienz von etwa 90% in primären Rattenneuronen und nahezu 100% in U87 Glioblastomzellen. Im Gegensatz dazu blieb die zuvor getestete seRNA-eGFP in den Neuronen funktionell inaktiv, während sie in U87 Zellen eine hohe Transfektionseffizienz von etwa 98% erreichte. Das entsprechende seRNA Konstrukt mit Caspase3 als Effektor (seRNA-ca-Caspase3) bestätigte die selektive Wirkung. In primären Neuronen wurde eine sehr geringe Zelltötungseffizienz von lediglich 6% beobachtet, während in U87-Zellen eine Zelltötungseffizienz von 91% erreicht wurde (Abb. 13a).

Nachdem die Selektivität der IVT-seRNA in Monokulturen erfolgreich demonstriert werden konnte, wurde die Funktionalität anschließend in verschiedenen Co-Kulturmodellen untersucht. Diese Modelle ermöglichen eine realitätsnähere Abbildung der *in vivo*-Situation, da unterschiedliche Zelltypen simultan behandelt und analysiert werden können. Zunächst wurde eine Co-Kultur aus MCF-7 Brustkrebszellen und HFF Fibroblasten etabliert. Die verwendeten MCF-7 Zellen exprimierten stabil im Zellkern lokalisiertes RFP, während die HFF-Zellen stabil ein zytoplasmatisches GFP exprimierten. Auf diese Weise konnten sie bei der mikroskopischen Analyse optimal analysiert werden. Die unbehandelte Kontrolle zeigte, dass beide Zelltypen mit hoher Viabilität koexistieren konnten. In der Kultur lagerten sich die MCF-7 Zellen in kompakten Clustern zwischen die fibrillären Strukturen der HFF Zellen ein. 24 Stunden nach Übertragung des IVT-seRNA-ca-Caspase3 Konstrukts war morphologisch eine deutliche Reduktion der MCF-7 Zellzahl erkennbar. In vergrößerten Aufnahmen zeigten sich aufgebrochene Kernmembranen der MCF-7 Zellen mit deutlich austretendem RFP als Hinweis auf apoptotische Prozesse. Nach 36 Stunden war nahezu kein Signal von MCF-7 Zellen mehr detektierbar, während die HFF-Zellen unbeeinträchtigt verblieben (Abb. 13b). Auch die Quantifizierung der Fluoreszenzabdeckung der Co-Kultur zeigte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Reduktion der Zielzellen, während die Nicht-Zielzellen vollständig unbeeinflusst blieben (Abb. 13c).

Anschließend wurden Co-Kulturen etabliert, um die Wirksamkeit der IVT-seRNA in *in vitro* Glioblastommodellen zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Glioblastomzelllinien (U87, U251, SF188 und 86HG39) stabil mit zytoplasmatischem eGFP markiert. Die primären Rattenneuronen wurden unmittelbar vor der mikroskopischen Analyse mit dem tubulinbindenden Farbstoff SiR-Tubulin rot gefärbt. Alle getesteten Glioblastomzelllinien zeigten eine stabile Koexistenz mit den Neuronen.

Eine ungewollte Mitfärbung der Tumorzellen durch den Tubulin-spezifischen Farbstoff war dabei nur minimal ausgeprägt. Nach Übertragung einer Kontroll-MOCK-mRNA konnte in allen Co-Kulturen eine hohe zelluläre Viabilität beobachtet werden (Abb. 13d). Im Gegensatz dazu waren 24 Stunden nach Transfektion der IVT-seRNA-ca-Caspase3 nahezu keine GFP-positiven Glioblastomzellen mehr detektierbar. Das neuronale Netzwerk blieb dabei in den Kulturen strukturell intakt. Lediglich in der Co-Kultur mit der Zelllinie U251 zeigte sich eine partielle Ausdünnung des Neuronennetzwerks. Die Zellzahlen der Co-Kulturen wurden weitergehend durchflusszytometrisch quantifiziert. Aus der prozentualen Veränderung der Zellzahlen gegenüber der mit MOCK mRNA transfizierten Kontrolle wurde die Zelltötungseffizienz ermittelt. Dieses zeigte eine effiziente Tötung von U87, 86HG39 und SF188 während die Neuronen in diesen Co-Kulturen sogar eine höhere Viabilität zeigten. Lediglich in der U251 Neuronen Co-Kultur konnte die visuelle Reduktion der Glioblastomzellen nicht durchflusszytometrisch bestätigt werden (Abb. 13e). Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die hohe Wirksamkeit und weiterbestehende hohe Selektivität der IVT-seRNA auch in verschiedensten Co-Kulturmodellen.

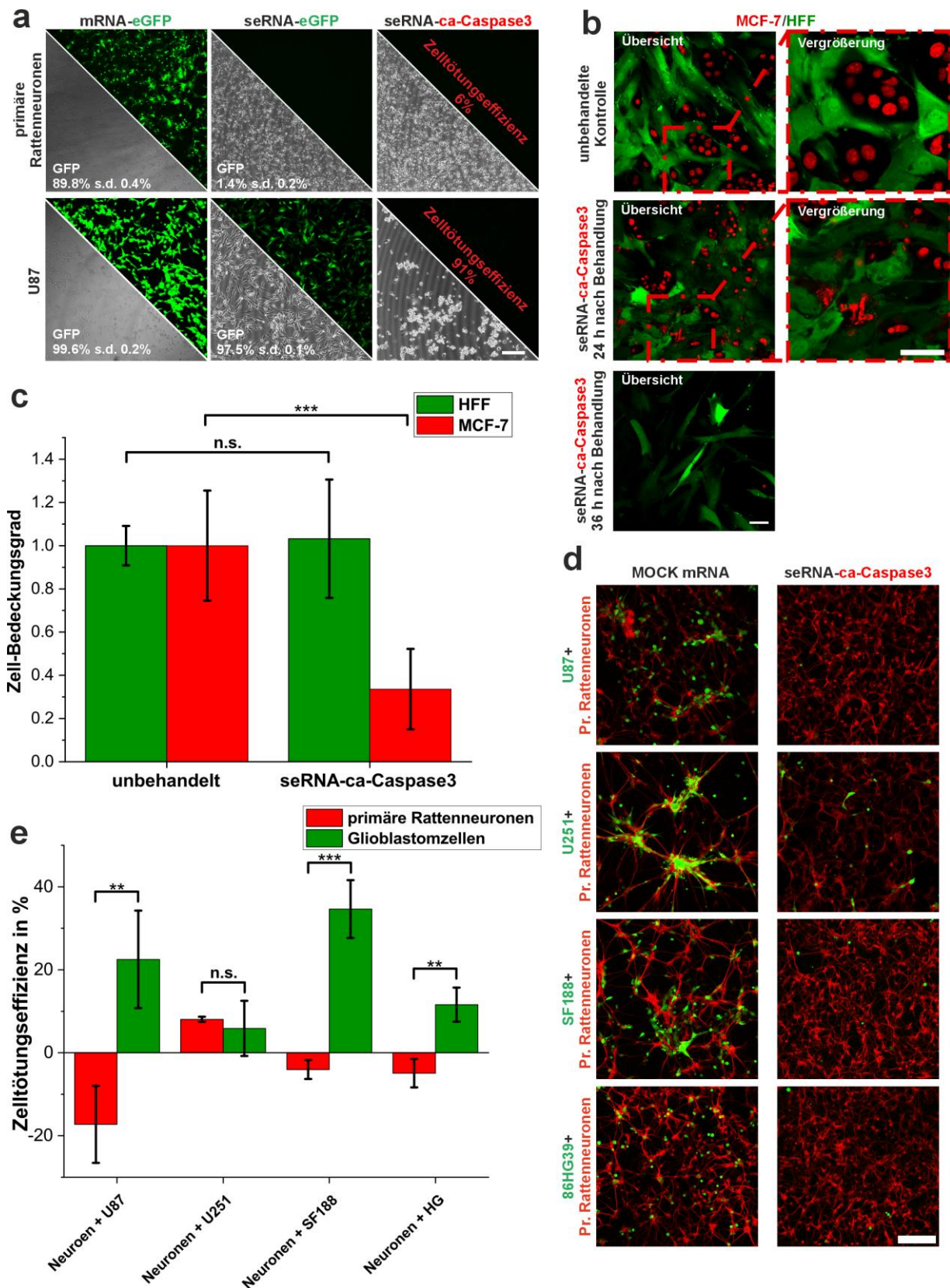


Abbildung 13: IVT-seRNA als therapeutische Behandlung um die selektive Apoptose von Krebszellen einzuleiten. (a) IVT-seRNA wurde sowohl in gesunde primäre Rattenneuronen als auch in U87 Glioblastomzellen übertragen. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Zusätzlich wurde die Zelltötungseffizienz analysiert. Als Kontrolle diente eine IVT-GFP-mRNA. (b) Zur Analyse der Zielzellselektivität wurde eine Co-Kultur etabliert, bestehend aus MCF-7 Brustkrebszellen, die stabil ein im Zellkern lokalisiertes RFP exprimieren, und HFF Zellen, die stabil ein

zytoplasmatisches GFP exprimieren. Die Co-Kulturen wurden unbehandelt sowie 24 und 36 h nach Übertragung des IVT-seRNA-ca-Caspase3 Konstrukts mikroskopisch analysiert. Von den durch die roten Kästen implizierten Regionen wurden Vergrößerungsaufnahmen dargestellt. **(c)** 24 Stunden nach Transfektion wurde die Zellviabilität anhand der grünen/roten Fluoreszenzabdeckung der HFF/MCF-7 Co-Kultur in konfokalen Bildern quantifiziert und normalisiert dargestellt. **(d)** Behandlung von Co-Kulturen aus primären Rattenneuronen und verschiedenen Glioblastomzelllinien. Die Tumorzellen exprimieren stabil zytoplasmatisches eGFP, während die Neuronen kurz vor der mikroskopischen Analyse mit einem Tubulin-erkennenden Farbstoff rot markiert wurden. Dargestellt sind jeweils Kontrollkulturen 24 h nach Transfektion mit einer MOCK-RNA sowie Kulturen nach Behandlung mit IVT-seRNA-ca-Caspase3. **(e)** Zur Quantifizierung der Zelltötungseffizienz der Glioblastom-Zielzellen und Neuronen als Nicht-Zielzellen wurden die Co-Kulturen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden die Zellzahlen der mit einer MOCK mRNA behandelten mit den seRNA-ca-Caspase3 behandelten Proben verglichen. Die prozentuale Veränderung der Zellzahl ist als Zelltötungseffizienz angegeben. **(a-e)** $n=3$, Alle Maßstabsbalken sind 200 μm , außer in b dort beträgt der Maßstabsbalken 50 μm . Die p-Werte wurden mittels einfaktorieller ANOVA berechnet.

3.4.3 Etablierung von alternativen 5'-Cap-Strukturen und Vergleich alternativer IRES-Strukturen

Nach erfolgreicher Validierung der Funktionalität der IVT-seRNA eröffneten sich neue Möglichkeiten zur gezielten Optimierung der seRNA-Struktur. Ein Ansatzpunkt ist die Modifikation der 5'-Cap-Struktur. Durch den Einsatz translational inaktiver 5'-Cap Analoga könnte die Konstruktion der seRNA deutlich vereinfacht werden, da auf zusätzliche untranslatierte offene Leserahmen (uORFs) zur Steuerung der Translation verzichtet werden könnte.

In einem ersten experimentellen Ansatz wurden daher zwei alternative, als nicht-funktional beschriebene Cap-Strukturen, AP3G und GP3G, in Kombination mit einer nicht-selektiven GFP-mRNA getestet. Die Kontrolle mit der standardmäßigen m7GP3G 5'-Cap führte in nahezu 100% der Zellen zu einer starken eGFP-Expression. Im Vergleich dazu zeigte die GP3G 5'-Cap eine Expression in etwa 87% der Zellen, allerdings mit rund 5-fach geringerer eGFP Intensität. Die AP3G 5'-Cap führte bei etwa 68% der Zellen zu messbarer eGFP-Expression, wobei die Signalintensität 99% gegenüber einer m7G Standard 5'-Cap reduziert war. Somit war die Expression vergleichbar mit einer nonsense-MOCK-RNA oder einer GFP-mRNA komplett ohne 5'-Cap (Abb. 14a, c). Somit konnte die translationale Inaktivität der AP3G 5'-Caps verifiziert werden.

Im nächsten Schritt wurden zusätzliche IRES-Elemente auf Ihre grundsätzliche Funktionalität hin untersucht. Ziel war es, Alternativen zur vergleichsweise großen EMCV IRES zu identifizieren, um kompaktere seRNA Konstrukte zu ermöglichen. Die getesteten IRES-Sequenzen wurden jeweils mit einer translational inaktiven AP3G 5'-Cap ausgestattet und die resultierende eGFP Expression wurde analysiert. Das Konstrukt mit der EMCV IRES diente als Referenz und führte zu nahezu 100% GFP-positiven Zellen. Die HCV IRES induzierte eine eGFP-Expression in etwa 93% der Zellen, allerdings mit einer etwa zehnfach geringeren Fluoreszenzintensität im Vergleich zur EMCV Variante. Die CrPV IRES aktivierte eGFP in rund 70% der Zellen, bei einer Signalintensität, die etwa der Hälfte der HCV IRES entsprach (Abb. 14b, c). Interessanterweise führte die EMCV IRES mit einer translational inaktiven AP3G Cap zu einer höheren eGFP Expression als mit der klassischen m7GPeG Cap. Bei der HCV IRES zeigte sich ein gegenläufiges Verhalten. Hier führte die Kombination mit der m7G Cap zu einer etwa vierfach höheren eGFP Expression im Vergleich zur AP3G Variante.

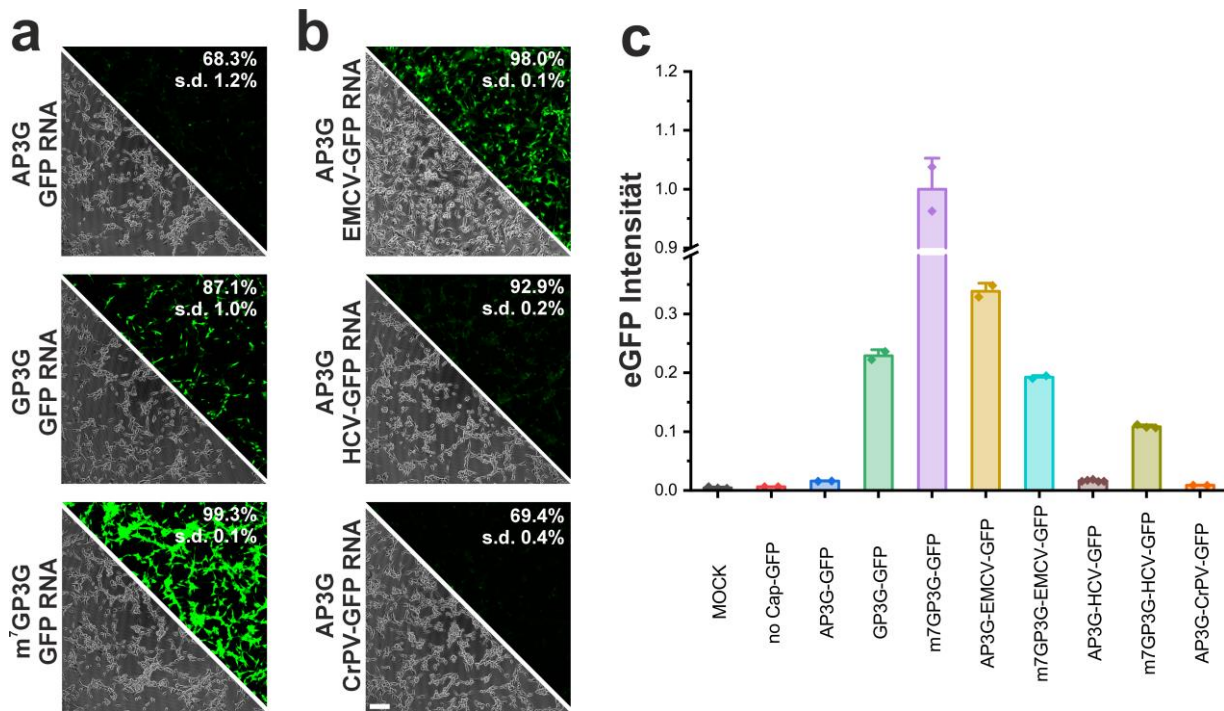


Abbildung 14: Einfluss verschiedener seRNA Cap Strukturen auf die Expression der IVT-RNA. (a) Mikroskopische Aufnahmen von U87 Glioblastom-Zellen, transfiziert mit nicht-selektiven eGFP-mRNAs, die unterschiedliche 5'-Cap-Strukturen beinhalten, und (b) mit verschiedenen IRES-Elementen in Kombination mit der AP3G-Cap Struktur. Maßstabsbalken: 200 μ m. (c) Darstellung der jeweiligen eGFP-Expressionsintensität. n=mindestens 2 unabhängige Proben.

3.4.4 Analyse der 5'Capping Effizienz und *in vitro* Stabilität von IVT-RNAs mit unterschiedlichen 5'-Cap Strukturen

Die RNA Konstrukte mit translational inaktiver Ap3G 5'-Cap Struktur zeigten eine reduzierte eGFP-Expression. Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf eine ineffiziente Capping Reaktion oder eine verringerte Stabilität der RNA zurückzuführen ist, sondern wirklich auf die translationale Inaktivität, wurden gezielte Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Zur Analyse der Capping Effizienz wurde ein HCV-eGFP Konstrukt mit entweder der standardmäßigen m7GP3G Cap oder einer AP3G Cap *in vitro* transkribiert und mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Capping Effizienz bei beiden Varianten vergleichbar hoch war, mit Werten von über 95% (Abb. 15a). Im nächsten Schritt wurde der Abbau der eGFP-mRNA mit unterschiedlichen 5'Cap Strukturen nach Übertragung in humane U87 Glioblastomzellen mittels qRT-PCR analysiert. Das Konstrukt ohne 5'Cap Struktur zeigte dabei einen deutlich beschleunigten RNA Abbau. Im Gegensatz dazu verlief der Abbau bei den mit ARCA-, m7P3G oder AP3G 5'-Caps ausgestatteten RNAs sehr ähnlich. Zwischen diesen Varianten konnten keine Stabilitätsunterschiede beobachtet werden (Abb. 15b). Während die verschiedenen Cap Strukturen bei einer Halbwertszeit von etwa 35 min lagen, konnte für die RNA ohne 5'-Cap Struktur eine Halbwertszeit von 23 min

berechnet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die reduzierte Translationseffizienz der AP3G Cap RNAs nicht auf eine verminderte Stabilität zurückzuführen ist, sondern durch die translational inaktive Cap-Struktur selbst bedingt ist und sich somit sehr gut für die seRNA eignet.

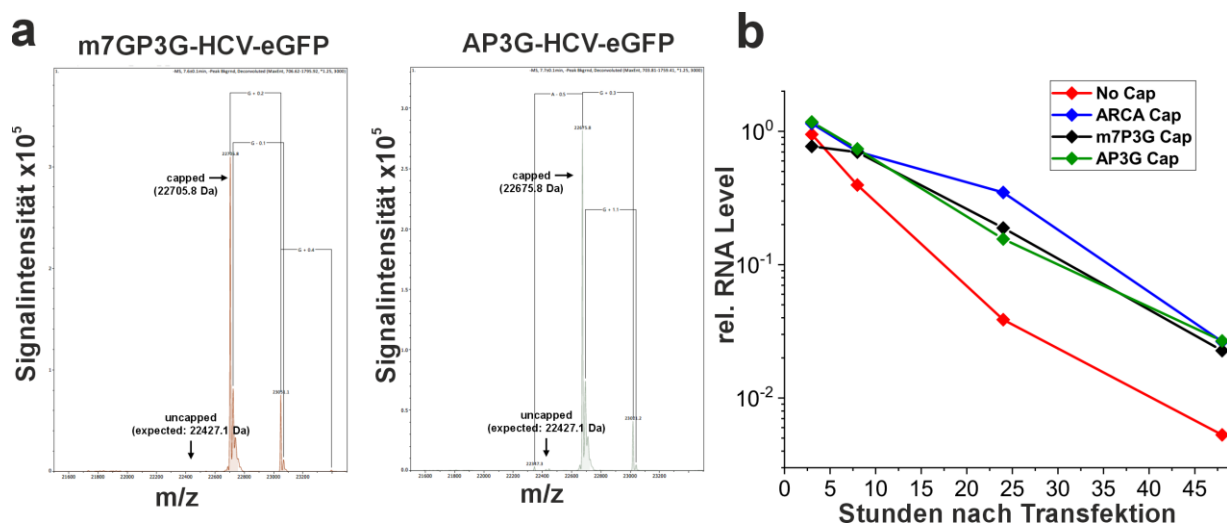


Abbildung 15: 5'Capping Effizienz mit der AP3G Cap und Vergleich der RNA Stabilität verschiedener Caps *in vitro*. (a) Die 5'-Capping Effizienz wurde analysiert mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS). Dafür wurde das HCV-eGFP Konstrukt mit der Standard m7GP3G Cap mit der translational inaktiven AP3G Cap verglichen. Auf der y-Achse ist die Signalintensität angegeben ($\times 10^5$), auf der x-Achse ist das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) der gemessenen Moleküle dargestellt. (b) Die Stabilität von GFP mRNAs mit verschiedenen 5'-Caps wurde nach Übertragung in humane U87 Glioblastomzellen untersucht. Vergleichen wurde eine GFP RNA ohne Cap in rot, eine mit dem ARCA CAP (Anti-Reverse Cap Analog) in blau, die Standard m7GP3G Cap in schwarz und die translational inaktive AP3G Cap in grün. Die Konstrukte wurden übertragen und die Menge der verbleibenden RNAs wurde nach 4, 24 und 48 Stunden quantifiziert. Versuchsteil a wurde von Dr. Philipp Schmid und Dr. Hagen Richter bei WACKER Chemie durchgeführt.

3.4.5 Erhöhung der seRNA Expressionsstärke durch terminale Hairpin Strukturen

Eine weitere Möglichkeit die Expression von IVT-RNA zu erhöhen, ist die Verwendung von terminalen Hairpin Strukturen[87]. 5' terminale Stem-Loop Strukturen werden beispielsweise von *Escherichia coli* statt einer 5'-Cap verwendet, um das 5'-Ende von RNAs vor dem Abbau von Exonukleasen zu schützen[122]. Bei Hairpin Strukturen handelt es sich um Sekundärstrukturen die am 5'-RNA Ende eine Stem-Loop Struktur formen, die aus einigen sich bindenden Basen bestehen. An diesen Strukturen haben Exonukleasen Probleme einen Abbau der RNA zu initiieren[123]. Um zu analysieren, ob terminale Hairpin Strukturen auch verwendet werden können, um die Expression einer seRNA zu erhöhen, wurden die gleichen Hairpin Strukturen genutzt wie in der Publikation von Solodushko und Fourty (2023). Für den Test wurden verschiedene Kombinationen aus seRNA und Hairpin Strukturen untersucht. Der Einbau eines Hairpins am 5'-Ende führte im Vergleich zu einer seRNA ohne 5'-Cap oder

Poly(A)-Tail zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz von 88% auf 92% (Abb. 16a). Ein terminaler Hairpin am 3'-Ende der seRNA-eGFP führte zu einer Transfektionseffizienz von 97%, ebenso wie die Kombination von terminalen Hairpins an beiden Enden. Bezüglich der eGFP Expressionsstärke ergab sich ein ähnliches Bild: Die seRNA mit einem 5'-Hairpin zeigte nur eine geringfügig erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zur seRNA-eGFP mit beiden offenen Enden. Hingegen führte ein Hairpin am 3'-Ende zu einer etwa verdoppelten eGFP Expression. Die seRNA mit Hairpins an beiden Enden erzielte die mit Abstand höchste Expressionsstärke (Abb. 16b).

Zur Untersuchung des Einflusses terminaler Hairpins auf die Stabilität der seRNA-eGFP wurden die verschiedenen Konstrukte in U87 Glioblastomzellen übertragen. Nach 24 und 48 Stunden wurde die verbleibende Menge an zellulärer RNA quantifiziert. Bereits nach 24 Stunden zeigte das Konstrukt mit Hairpins an beiden Enden (5'- und 3'-Terminus) die höchste Stabilität. Die geringste verbleibende RNA-Menge wurde beim Konstrukt mit einem einzelnen Hairpin am 3'-Ende nachgewiesen. Auch nach 48 Stunden war die RNA-Stabilität beim Konstrukt mit doppeltem Hairpin am höchsten. Die seRNA-eGFP ohne Hairpins wies eine nur geringfügig geringere Restmenge auf. Die Konstrukte mit nur einem einzelnen Hairpin – entweder am 5'- oder 3'-Ende – zeigten hingegen geringere RNA-Mengen im Vergleich (Abb. 16c).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die in den Zellen beobachtete eGFP Expression nicht eindeutig mit der intrazellulären Stabilität der jeweiligen seRNA Konstrukte korrelierte. Auffällig war jedoch, dass das Konstrukt mit beidseitigen terminalen Hairpins die höchste Transfektionseffizienz und eGFP Expressionsstärke, sowie über beide Zeitpunkte hinweg die höchste Stabilität aufwies.

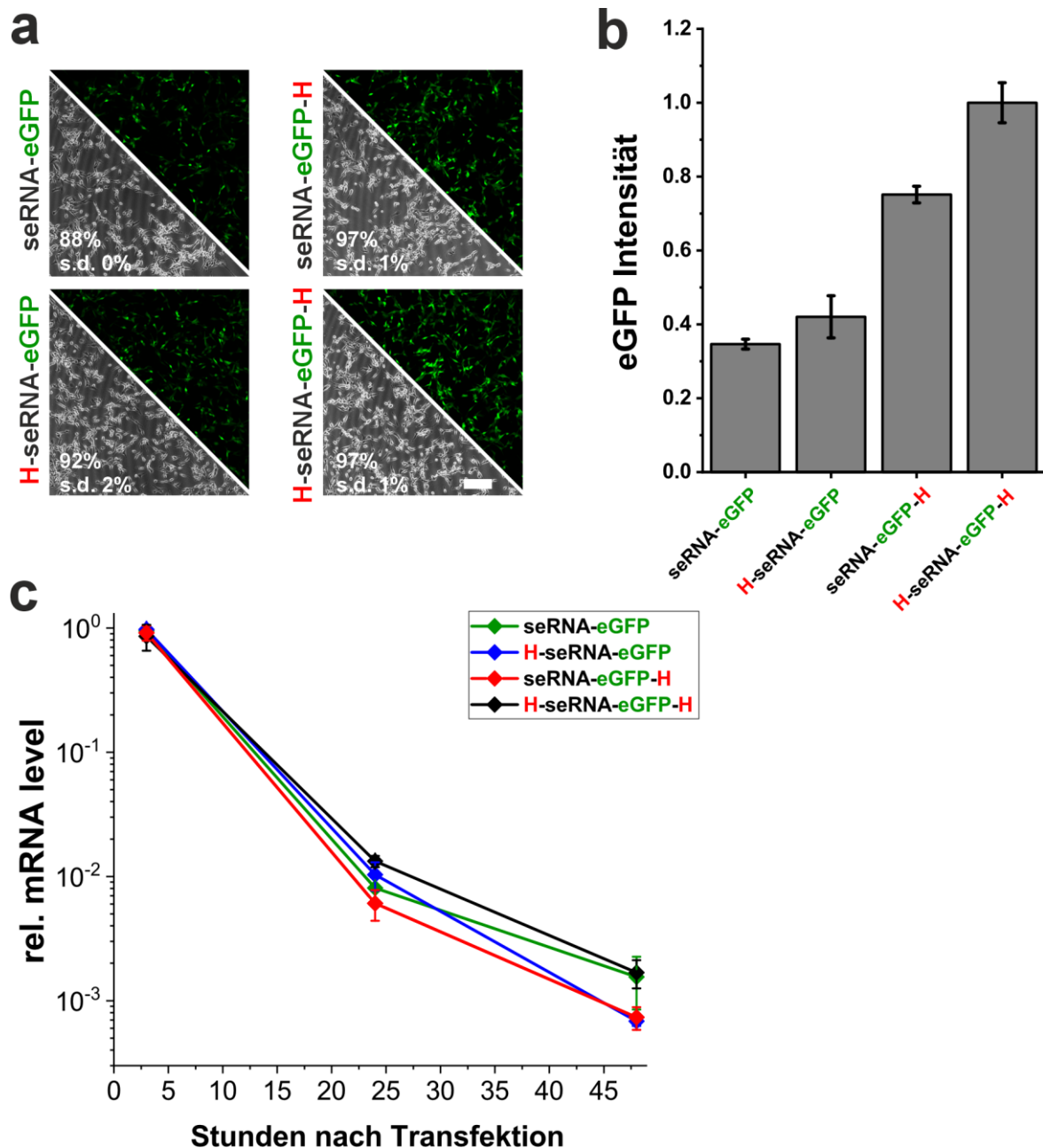


Abbildung 16: Expressionserhöhung der seRNA mithilfe terminaler Hairpin Strukturen. (a) Das seRNA-eGFP wurde vorne und/oder hinten mit terminalen Hairpin Strukturen ausgestattet und in U87 Glioblastomzellen übertragen. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen 24 Stunden nach Transfektion, gegeben sind die durchflusszytometrisch ermittelten eGFP Transfektionseffizienzen in Prozent. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m. (b) Die eGFP Intensitätsstärken der Hairpin Konstrukte wurden durchflusszytometrisch ermittelt. (a, b) $n = 2$ (ohne Hairpin) -3 (Hairpin Kombinationen) unabhängige Proben. (c) Die Stabilität des eGFP-seRNA Konstrukts mit verschiedenen terminalen Hairpin Kombinationen wurde nach Übertragung in humane U87 Glioblastomzellen untersucht. Die Konstrukte wurden übertragen und die Menge der verbleibenden RNAs wurde nach 4, 24 und 48 Stunden quantifiziert. $n = 2$ unabhängige Proben.

3.4.6 Entwicklung einer IVT-seRNA zur Behandlung des murinen hepatozellulären Karzinoms im *in vitro* Modell

In den vorangegangenen Versuchen wurde eine seRNA sowohl für ein Glioblastom- als auch für ein Brustkrebsmodell entwickelt. Um die seRNA Technologie darüber hinaus als Plattform zu etablieren, wurde im nächsten Schritt eine IVT-seRNA für ein neues therapeutisches Ziel konzipiert. Die Lebererkrankungen eignen sich hierfür besonders, da die Übertragung von RNA in dieses Organ mittels Lipidnanopartikeln am einfachsten und effizientesten möglich ist[71]. Aus diesem Grund wurde eine seRNA gegen das hepatozelluläre Karzinom (HCC) entwickelt, wobei zunächst der Fokus auf einer Anwendung im Mausmodell lag. Hierfür musste zunächst eine geeignete Target-RNA identifiziert werden, um Ziel- und Nicht-Zielzellen unterscheiden zu können. Die Alpha-1-Fetoprotein (AFP) RNA erwies sich dabei als kaum detektierbar in der gesunden murinen Hepatozytenzelllinie H2-35. In der murinen Hepatom Zelllinie Hepa1-6 dagegen konnte eine mehr als 100.000-fach höhere Expression festgestellt werden (Abb. 17a).

Da AFP als geeignete Target-RNA identifiziert wurde, wurde eine seRNA-eGFP konstruiert mit AFP als antisense-Sequenz. Aufgrund der Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen in denen beidseitige Hairpin Strukturen eine stabilisierende Wirkung zeigten und die Expression erhöhten, wurde diese seRNA-eGFP zusätzlich mit terminalen Hairpins am 5' und 3'-Ende ausgestattet. In H2-35 Nicht-Zielzellen lag die Transfektionseffizienz bei 18%, wobei die Expressionsintensität sehr gering war und visuell mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht zu detektieren war. In den Hepa1-6 Zielzelle hingegen konnte durchflusszytometrisch bei 71% der Zellen eine eGFP Expression nachgewiesen werden, die auch mikroskopisch eine höhere Expressionsintensität zeigte (Abb. 17b). Die gleiche seRNA mit einer ca-Caspase3 als Effektor Sequenz führte in den Nicht-Zielzellen zu einer Zelltötungseffizienz von 15%. Demgegenüber zeigte die seRNA-ca-Caspase3 24 Stunden nach einmaliger Übertragung eine Zelltötungseffizienz von 55% in den Zielzellen. Damit konnte gezeigt werden, dass die seRNA-Technologie auch für ein murines hepatozelluläres Karzinom Modell adaptiert werden kann und eine hohe Selektivität und Wirksamkeit gegenüber den Zielzellen aufweist.

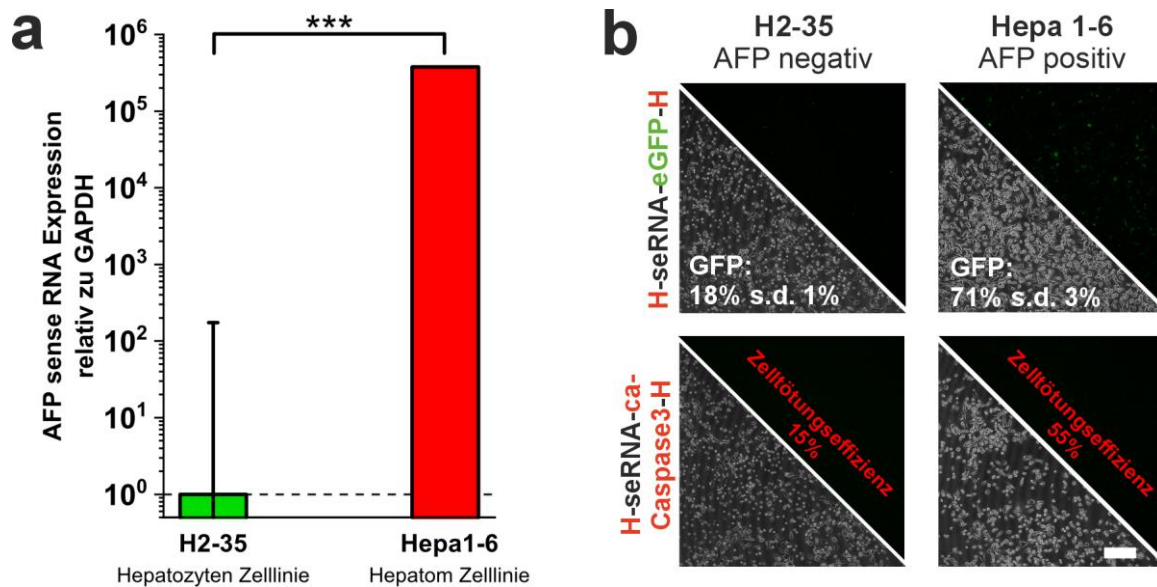


Abbildung 17: Anwendung des seRNA Modells auf das murine hepatozelluläre Karzinom. (a) Relative Quantifizierung der AFP Expression in H2-35 Hepatozyten Zelllinie als Nicht-Zielzellen und Hepa1-6 Hepatom Zelllinie als Zielzellen relativ zu GAPDH. n= 3 unabhängige Proben. p-Werte wurden mittels einfaktorieller ANOVA berechnet. (b) Expression des seRNA-eGFP mit einer terminalen Hairpin Struktur an beiden Enden sowie einer AFP antisense-Sequenz in Ziel- (Hepa1-6) und Nicht-Zielzellen (H2-35). Der Anteil GFP-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ist als Prozentangaben mit Standardabweichung (s.d.) dargestellt. Das identische Konstrukt mit einer ca-Caspase3 als Effektor wurde ebenfalls analysiert, die Zellzahlen 24 h nach Übertragung wurden durchflusszytometrisch bestimmt und die daraus berechnete Zelltötungseffizienz wurde dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

3.5 *In vivo* Anwendung der IVT-seRNA

Die vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse unterstreichen das Potential der IVT-seRNA-Technologie als zielgerichtete, selektive HCC Therapie, die gesundes Gewebe weitgehend schont. Um den tatsächlichen therapeutischen Nutzen und die Übertragbarkeit dieser Strategie unter physiologischen Bedingungen zu überprüfen, wurden im Anschluss *in vivo* Studien initiiert. Diese sollen zeigen, ob sich die hohe Spezifität und Wirksamkeit der HCC IVT-seRNA auch in Mäusen als komplexem Organismus bestätigen lassen.

3.5.1 Funktionalitätsanalyse einer IVT-seRNA zur Behandlung des murinen hepatozellulären Karzinoms im TGF- α /*c-myc* Maus Modell

Um eine bestmögliche Aussagekraft durch das gewählte Tiermodell zu erhalten, wurde ein genetisches Mausmodell mit immun-kompetenten Mäusen gewählt. Dieses Modell ermöglicht die Entstehung natürlicher, primärer Lebertumore nach der Gabe von Zinkchlorid (ZnCl_2) zur Induktion des *tumor growth factors alpha* (TGF α) über das Trinkwasser innerhalb von 16-20 Wochen[110]. Das Mausmodell entstand durch die Kreuzung von metallothionein/TGF α und albumin/*c-myc*- Transgenen Mäusen und die wachsenden hepatozellulären Karzinome bilden histopathologisch und molekular viele Merkmale des menschlichen HCC nach[110]. Zunächst wurde im Anschluss das TGF- α /*c-myc* Mausmodell daraufhin untersucht, ob in den Tumoren AFP exprimiert wird. Nach Tumorinduktion entwickeln diese Mäuse eine unterschiedliche Anzahl hepatozellulärer Karzinome variabler Größe. Aus insgesamt sechs Tieren wurden neun Proben aus gesundem Lebergewebe sowie 28 unabhängige Tumorproben entnommen und mittels qRT-PCR auf die AFP Expression analysiert. Dabei zeigte sich, dass in gesundem Lebergewebe kaum AFP exprimiert wurde, In den Tumorproben hingegen war die AFP Expression heterogen. Einige Tumore wiesen eine sehr hohe AFP-Expression auf, während in anderen die Werte mit denen des gesunden Gewebes vergleichbar waren. Im Mittel lag die AFP Expression in den Tumoren höher als in der gesunden Leber, der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 18a).

Nach Bildung der Tumore mit einer Mindestgröße von 3 mm wurden die Tiere über einen Zeitraum von 28 Tagen insgesamt neunmal behandelt. In der Kontrollgruppe, die entweder mit NaCl oder PBS behandelt wurde, zeigte sich nach 22 Tagen ein relatives Tumolvolumen von 400%. Bei Tieren, die stattdessen mit einer Nonsense MOCK mRNA behandelt wurden, nahm das relative Tumolvolumen im Mittel lediglich auf etwa 180% zu. Wurden die Tiere hingegen mit der seRNA-ca-Caspase3 behandelt,

konnte das Tumorwachstum deutlich gehemmt werden. Hier wuchsen die Tumore im Mittel nur auf etwa 150% relatives Tumolvolumen. Insgesamt konnte die seRNA-Behandlung somit das Tumorwachstum verlangsamen, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 18b).

Allerdings wies nicht jeder Tumor eine hohe AFP Expression auf (Abb. 18a). Um einen möglichen direkten Zusammenhang zwischen der AFP Expression und der Tumorentwicklung während der Behandlung herzustellen, wurde das relative Tumorwachstum mit der jeweiligen AFP Expression des Tumors korreliert. Dabei zeigte sich, dass Tumore mit einer geringeren AFP Expression nach 28 Tagen ein stärkeres Wachstum von bis zu fast 500% aufwiesen (Abb. 18c). Im Gegensatz dazu nahm das relative Tumolvolumen mit steigender AFP Expression ab, bis zu einer Tumorverkleinerung über den gesamten Analysezeitraum bei sehr hoher AFP Expression. Dieser Zusammenhang wurde anschließend mithilfe einer Dosis-Wirkungs-Kurve (*dose-response curve*) analysiert. Eine solche Kurve beschreibt, wie stark eine biologische Antwort (hier: die Hemmung des Tumorwachstums) in Abhängigkeit von der „Dosis“ eines Faktors (in diesem Fall der endogenen AFP Expression) ausfällt. Die hier beobachtete abnehmende Kurve belegt, dass eine höhere AFP Expression im Tumor mit einer stärkeren Wirkung der seRNA Therapie und damit einem geringeren relativen Tumorwachstum assoziiert ist. Zum Vergleich wurden ebenfalls die AFP Expressionen und die relativen Tumorwachstumsraten der Tiere dargestellt, die mit einer MOCK RNA behandelt worden waren (Abb. 18d). Hier zeigte sich eine entgegengesetzte Kurve.

Insgesamt verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Wirksamkeit der seRNA Therapie in diesem Modell eng von der Target-RNA Expression im Tumor abhängt und ein Tumorreduzierender Effekt der IVT-seRNA im HCC Modell beobachtet werden konnte.

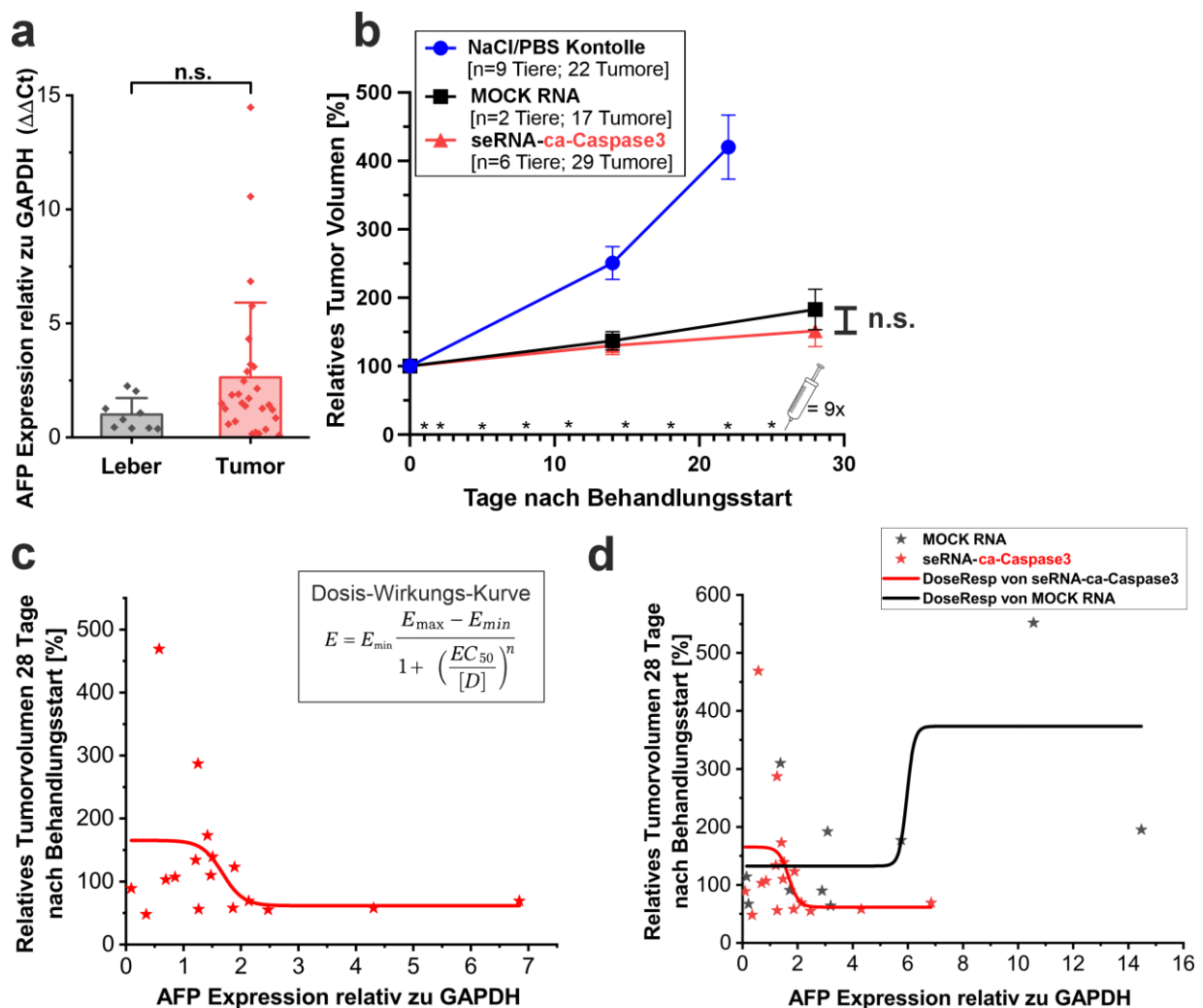


Abbildung 18: IVT-seRNA Funktionalitätsanalyse im *in vivo* TGF- α /c-myc Maus Modell. (a) Relative Quantifizierung der AFP Expression relativ zu GAPDH in gesundem Lebergewebe der TGF- α /c-myc Mäuse, sowie aus Leber Karzinomen. Analysiert wurden 9 gesunde Leberproben und 28 Leber Karzinome aus insgesamt 6 Tieren. (b) Relatives Tumorwachstum von TGF- α /c-myc Mäusen. In blau ist die Entwicklung von NaCl/PBS Kontroll-Tumoren, in schwarz ist die Entwicklung nach MOCK mRNA Übertragung und in rot ist die Entwicklung nach seRNA-ca-Caspase3 dargestellt. Behandelt wurde 9 mal über einen Zeitraum von 28 Tagen, die Daten für die NaCl/ PBS Kontroll-Tiere wurden aus einer separaten Versuchsreihe entnommen und wurden zum letzten Mal nach 22 Tagen analysiert. (c) Dargestellt wurde der Zusammenhang zwischen dem relativen Tumorum Volumen am Tag 28 nach Behandlungsbeginn und der AFP Expression des jeweiligen Tumors. Zusätzlich wurde eine nichtlineare Regressionskurve basierend auf der Dosis-Wirkungs-Kurve (Dose-Response-Funktion) angepasst. Für diese gilt E =beobachtete Wirkung (Response), E_{min} =minimale Wirkung, E_{max} =maximale Wirkung, EC_{50} =Konzentration, bei der 50% der maximalen Wirkung erreicht werden, $[D]$ =Konzentration oder Dosis des Wirkstoffs (hier AFP), n =Hill-Koeffizient (Steilheit der Kurve). (d) Dargestellt wie in Abbildung (c), ergänzt um die Datenpunkte nach MOCK mRNA Übertragung, sowie die entsprechende nichtlineare Anpassung mittels Dose-Response-Funktion (schwarz). Alle p-Werte wurden mittels einfaktorieller ANOVA berechnet. Die Aufzucht, Behandlung und Tumorum Volumenbestimmung fand im Universitätsklinikum Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Albrecht Piiper statt und wurde von Jan Klug durchgeführt.

4. Diskussion

Während der SARS-CoV-2 Pandemie wurde zum ersten Mal ein mRNA Therapeutikum zugelassen[124]. Seitdem wird intensiv daran gearbeitet weitere mRNA-basierte Medikamente abseits von Impfstoffen auf den Markt zu bringen. Ein Problem dabei ist jedoch, dass mRNA in jeder Zelle aktiv ist in die sie gelangt. Es ist damit eine Methode erforderlich, die eine spezifische Wirkung ausschließlich in erkranktem Gewebe erlaubt. In dieser Arbeit konnte die seRNA als neue Methode für eine selektive Genexpression vorgestellt werden. Die selektive Expression konnte als pDNA und als IVT-seRNA übertragen und die selektive Expression werden. Anschließend gelang es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die selektive Expression zu analysieren. Dies wurde beispielhaft in mehreren Modellen demonstriert. *In vitro* wurde die seRNA im Glioblastom-Modell, im Brustkrebsmodell und im HCC Modell erfolgreich appliziert. *In vivo* wurde die seRNA im Glioblastom- und im HCC Modell angewendet. Darüber hinaus wurden eine Reihe Optimierungen und Modifikationen etabliert, die bei zukünftigen seRNA Anwendungen eine spezifische Anpassung ermöglichen.

4.1 seRNA kodierende Plasmide

Die erste Anwendung der seRNA erfolgte durch seRNA kodierende Plasmide. Die Übertragung der pDNA erfolgt in alle Zellen, so wird die seRNA auch in allen Zellen exprimiert. Die seRNA interagiert über ihre Antisense-Sequenz mit der Ziel-mRNA, die nur in den Zielzellen vorliegt. So wird der partielle Abbau in Zielzellen aktiviert, der die Inhibierung der IRES aufhebt. Anschließend wird die seRNA in Zielzellen exprimiert, während sie in Nicht-Zielzellen inaktiv verbleibt und mit der Zeit abgebaut wird. Dieser Aktivierungsmechanismus konnte durch den Abbau des seRNA 5'-Endes in Zielzellen bestätigt werden. In Nicht-Zielzellen blieben identische seRNA Konstrukte vollständig intakt. Auch die Wechselwirkung des IRES-Blockers mit der IRES konnte durch Nano-DMS-MaP erfolgreich nachgewiesen werden.

In den ersten entwickelten seRNAs wurde Keratin als Antisense-Sequenz eingesetzt. Auf diesem Weg sollten insbesondere Glioblastomzellen adressiert werden. Keratin wird häufig in metastasierenden Tumoren im Hirn, aber auch in Tumoren in anderen Körperregionen exprimiert[125]. Für die erste Charakterisierung der seRNA hat die Keratin Antisense-Sequenz erfolgreiche Resultate erzielt. Doch da viele verschiedene Zelltypen im Organismus viele verschiedene, sich ähnelnde Keratine produzieren[126], wäre für zukünftige systemische Glioblastom- oder Brustkrebsbehandlungen eine Antisense-Sequenz erfolgsversprechender, die nur in der Zielzelle exprimiert wird und nicht in anderen Geweben. Entsprechende Daten über das Tumor Transkriptom liegen beispielsweise im *Human Protein Atlas* vor[127]. Die Antisense-Sequenz der seRNA kann beliebig ausgetauscht werden, sodass sich die Zielzelle je nach Anwendungsfall verändert. So ist in dieser Arbeit beispielsweise auch eine seRNA

gegen die Ziel-mRNA AFP erfolgreich eingesetzt worden. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob die Länge der Antisense-Sequenz noch verkürzt werden kann. Es wurden bereits Antisense-Sequenz Längen von 80 bp bis etwa 625 bp getestet[79]. Doch es wäre möglich, dass auch bei der Anwendung noch kürzerer Antisense-Sequenzen eine erfolgreiche Aktivierung durch RNase H und RNase 3 ermöglicht [128, 129]. Es ist schwierig zu analysieren, durch welchen Mechanismus der Abbau der dsRNA Sequenz der seRNA induziert wird. Es gibt kaum effiziente Mutanten oder Inhibitoren einzelner RNasen oder anderer Enzyme die für die Erkennung relevant sind. Bisherige Analysen legen nahe, dass RNase H in den Abbau involviert ist, zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte dies jedoch nicht[79]. Vermutlich spielen auch einzelne Sequenzmotive der Antisense-Sequenz bei der Erkennung eine Rolle[130]. Dies könnte dazu führen, dass die unterschiedliche Antisense-Sequenzen zu unterschiedlich starken Aktivierungen der seRNA führen. Daher müssen zukünftig neben unterschiedlicher Antisense-Sequenz Längen auch unterschiedliche darin enthaltene Sequenzmotive und die daran bindenden zellulären Proteine weiter untersucht werden.

Die effiziente Blockierung der IRES Aktivität der seRNA ist essentiell für ihre selektive Expression ausschließlich in Zielzellen. IRES Strukturen sind noch nicht vollständig verstanden. Die Bandbreite von verschiedenen IRES Strukturen ist sehr groß und sehr heterogen in ihrer Funktionsweise. Ihre Gemeinsamkeit besteht in ihrer strukturellen Flexibilität und ihrer Fähigkeit die 5'-Cap unabhängige Translation von RNAs einzuleiten[131]. Bereits minimale Veränderung der IRES Struktur kann die Fähigkeit der Translationsinitiation massiv reduzieren[82, 97, 100]. Für die seRNA wurde die EMCV IRES verwendet. Diese IRES ist im Vergleich zu anderen sehr groß und sehr expressionsstark[97]. Zukünftig ist auch die Verwendung kleinerer IRES Strukturen vielversprechend, da besser vorausgesagt werden kann, welche Region der IRES essentiell für die Translationsinitiation ist. So beinhaltet beispielsweise die CrPV IRES eine sogenannte *intergenic region* (IGR)[132]. Diese ist essentiell für die Ribosomenbindung. Wird nur diese eine Struktur verändert, ist die gesamte IRES Funktionalität beschädigt[132]. Die verwendeten IRES-Blocker stellten komplementäre Sequenzen zu ausgewählten Regionen der IRES dar. So wurde die IRES Struktur verändert und inhibiert. Die in dieser Arbeit verwendeten IRES-Blocker hatten alle eine Länge von ca. 21 bp. Zukünftig wäre es interessant variierende Längen auszutesten. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass der Blocker nicht zu lang sein darf, um keinen RNA Abbau durch eine zu lange dsRNA Sequenz der seRNA durch IRES-Blocker und IRES Interaktion zu induzieren. Die Sequenz darf allerdings auch nicht zu kurz sein, da Computersimulationen vermuten lassen, dass eine gewisse Länge benötigt wird, um die IRES Struktur entsprechend zu verändern. Möglicherweise könnte die Verwendung von zwei Blockern in einem seRNA Molekül zu einer noch effizienteren Inhibierung führen. Die Verwendung eines solchen

„Doppelblockers“ in der Sequenz, bei der die zwei Blocker durch eine kurze nicht kodierende Basenabfolge getrennt sind, könnten direkt zwei Domänen der IRES Struktur verändern.

Angeborene Immunantworten können die Wirksamkeit verschiedener Medikamente erheblich beeinträchtigen. Insbesondere bei der Verwendung viraler Strukturen wie der IRES oder des RNase Inhibitors könnten diese als Pathogen-assoziierte Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) erkannt werden. Diese PAMPs könnten bei der Übertragung mittels LNPs im Endosom über Toll-like Rezeptoren oder im Zytoplasma über RIG-1 ähnliche Rezeptoren eine Reaktion des angeborenen Immunsystems auslösen[133]. Darüber hinaus entsteht sowohl bei der Interaktion zwischen IRES-Blocker und der IRES, als auch bei der Interaktion zwischen Antisense-Sequenz und Ziel-mRNA zeitweise eine dsRNA Struktur. Diese dsRNA Struktur könnte ebenfalls eine zelluläre Immunreaktion hervorrufen[133]. In dieser Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Übertragung des seRNA-eGFP Plasmids keine detektierbare Immunantwort auslöste (vgl. 3.1.5). Dabei war es nicht relevant, ob das Konstrukt in Nicht-Zielzellen oder Zielzellen übertragen wurde. Darüber hinaus zeigte auch die Behandlung der Mäuse mit seRNA kodierenden Plasmide keine Immunreaktion oder andere Beeinträchtigungen[79].

Im Vergleich zu konventionellen eGFP Expressionsplasmiden zeigt das seRNA-eGFP Plasmid eine deutlich schwächere Expression (vgl. 3.3.1). Es ist gut beschrieben, dass IRES induzierte Translation schwächer ist als die 5'-Cap induzierte Translation. Dies gilt auch für die EMCV IRES, obwohl Ihre Expression im Vergleich zu anderen IRES Strukturen stärker ist[97, 134]. Um zu überprüfen, ob es weitere Ursachen für den Expressionsverlust des seRNA Plasmids gegenüber des eGFP Plasmids gibt, wurden einige Versuche durchgeführt. Es ist bekannt, dass längere Plasmide eine schwächere Expression in der Zelle zeigen[135]. Doch es zeigte sich, dass die Länge von seRNA Plasmiden nicht die Ursache des Expressionsverlusts darstellten. Auch die Übertragung in die Zelle mittels Lipofectamin funktionierte vergleichbar zu anderen Plasmiden. Darüber hinaus zeigten seRNA Plasmide keinen beschleunigten Abbau in der Zelle (vgl. 3.3.1). Als entscheidenden Unterschied konnte die transkribierte RNA Menge ausgemacht werden. Die seRNA Stabilität, auch über längere Zeit, entsprach der anderer RNAs. Somit ist der Grund für die schwächere Expression, dass seRNA Plasmide deutlich schwächer transkribiert werden im Vergleich zu anderen Plasmiden. Zusammen mit der schwächeren Translation der IRES ergibt sich dann das Bild der reduzierten Proteinexpression. Die Ursache für die schwächere Transkription von seRNA kodierenden Plasmiden konnte nicht endgültig festgestellt werden. Sowohl beim eGFP Plasmid, dem seRNA_{Δ3-5}-eGFP Plasmid und dem seRNA Plasmid wurde der gleiche Enhancer, Promotor, 3'-UTR und Poly-A-Terminator verwendet. Daher könnte die Ursache der schwächeren Transkription durch die zusätzlichen Module, die teilweise viralen Ursprungs sind, begründet sein. Es ist wahrscheinlich, dass das seRNA Plasmid in der Zelle stärker erkannt wird, und dadurch mit Histonen interagiert. Diese können das Plasmid modifizieren und so die Transkription

inhibieren[136]. So können übertragene Plasmide Heterochromatin-ähnliche Modifikationen von der Zelle erhalten, sodass weniger Transkription stattfindet[136]. Nur ein geringerer Teil des übertragenen Plasmids liegt dann im euchromatischen, besser transkribierbaren Zustand vor[136]. Minicircle DNA liegt mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit als Euchromatin vor[136]. Dies wird dadurch bestätigt, dass die seRNA als Minicircle deutlich effizienter wirkte (vgl. 3.3.3). Grundsätzlich wirken Histondeacetylasen (HDAC) Chromatin verdichtend und damit reduzierend auf die Transkription[136]. Daher wurden HDAC Inhibitoren wie Trichostatin A (TSA) und Romidepsin verwendet, um zu analysieren ob die Expression seRNA kodierender Plasmide steigt. Für TSA und Romidepsin konnte eine Erhöhung der Expression festgestellt werden. Allerdings könnte die Expression auch dadurch beeinflusst werden, dass TSA einen Zellzyklus-Arrest einleitet[137], was gegebenenfalls expressionsverstärkend wirken könnte. MG149 und C646 wurden verwendet, da sie Histon Acetyltransferasen (HATs) inhibieren[138]. HATs acetylieren die DNA und wirken somit auch transkriptionsfördernd[138]. Hier konnte keine Erhöhung der Expression festgestellt werden. Zusammenfassend kann nicht endgültig bestätigt werden, dass übertragenes seRNA-eGFP Plasmid mehr als andere Plasmide als Heterochromatin verpackt und somit herunter reguliert wird. Die durchgeführten Versuche weisen aber in diese Richtung. Um dies zweifelsfrei nachzuweisen, müsste zukünftig eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt werden. Darüber hinaus ist es bekannt, dass uORFs im 5'-UTR die Translation reduzieren können[139]. Doch die Verwendung von uORFs ist essentiell für die Funktionalität seRNA kodierender Plasmide und somit kann auf die Verwendung von uORFs an dieser Stelle nicht verzichtet werden.

Durch die Transduktion mit AAVs kann die übertragene pDNA Menge skaliert werden. Es ist möglich größere Mengen zu übertragen, wodurch auch die Genexpression der seRNA ansteigt (vgl. 3.3.2). Die Selektivität der seRNA bleibt dabei vollständig erhalten. Außerdem haben AAVs den Vorteil, dass sie bevorzugt spezifische Rezeptoren binden, und bei richtiger Kombination schon eine Vorselektion der Zielzelle zusätzlich zur seRNA ermöglichen. Allerdings kam es in der klinischen Anwendung von AAVs zuletzt immer wieder zu starken Immunreaktionen[78]. Daher wird eine weitere klinische Erprobung häufig kritisch betrachtet. Abgesehen davon fällt die Immunantwort auf den in dieser Arbeit verwendeten VSSTSPR Serotyp vergleichsweise gering aus[140]. Nichtsdestotrotz sind Medikamente die mittels AAV2 übertragen werden bereits in der klinischen Anwendung, daher ist der erfolgreiche Einsatz einer von AAVs übertragenen seRNA vielversprechend[141].

4.2 *In vitro* transkribierte seRNA

Bei medizinischer Anwendung von pDNA, entweder durch LNPs oder durch AAVs übertragen, besteht immer eine sehr geringe Möglichkeit für Veränderungen des Genoms[142]. Daher ist die Übertragung von RNA eleganter, da diese nicht ins Genom eingebaut werden kann. Darüber hinaus lässt sich die Expression sehr gut steuern, ähnlich wie bei der Verwendung von AAVs. Mit steigender RNA Menge geht weitestgehend auch eine linear steigende Genexpression einher (vgl. 3.4.1). Neben den allgemeinen Vorteilen bietet die Anwendung von IVT-seRNA gegenüber seRNA kodierenden Plasmiden noch seRNA-spezifische Vorteile. So können während der Herstellung andere 5'-Cap Strukturen als das von der Zelle selber angehangene m7G Cap integriert werden. Dies erlaubt die Verwendung translational inaktiver 5'-Caps. Allerdings sind auf dem Markt nur wenige nicht-funktionale 5'-Cap Analoga verfügbar, kommerzielle Entwicklungen konzentrieren sich vielmehr auf 5'-Cap Strukturen, die eine besonders hohe Translationseffizienz ermöglichen. Für die Anwendung in der seRNA wurde zunächst das GP3G Cap getestet. Eigentlich ist in der Literatur beschrieben, dass dieses Cap nur 5,6 % so effizient translatiert, wie das m7G Cap[143]. Im nachfolgenden Test zeigte die GP3G allerdings eine relativ starke Translation. Vermutlich wurde das GP3G-Cap in der Zelle nachträglich methyliert, sodass daraus eine stark translatierende m7G Cap Struktur entstand[144]. Ein weiteres kommerziell verfügbares Cap ist das AP3G Cap, welches laut Literatur nur 3% der Translationseffizienz eines m7G Cap initiiert[143]. Im nachfolgenden Test konnte unter Verwendung eines AP3G Caps tatsächlich eine fast vollständig inhibierte Translation nachgewiesen werden (vgl. 3.4.3). Die Translation war lediglich geringfügig stärker als die Expression, die bei Verwendung einer mRNA ohne Cap nachweisbar ist. In der Literatur war jedoch aufgeführt, dass das AP3G 5'-Cap nur eine Capping Effizienz von 43% Prozent erreicht[143]. Damit wäre vermutlich die RNA Stabilität zu gering und darüber hinaus könnte das offene 5'-Ende bei mehr als 50% der seRNA eine Immunreaktion nach sich ziehen. Bei Überprüfung der Capping Effizienz der AP3G Cap konnte aber mittels LC-MS eine erfolgreiche Integration bei mehr als 95% der IVT-seRNA Moleküle festgestellt werden (vgl. 3.4.4). Darüber hinaus weist das AP3G Cap eine hohe Stabilität gegenüber dem humanen DCP2 Decapping Enzym (*mRNA-decapping enzyme 2*, DCP2) und ist stabiler als beispielsweise die m7G Cap[143]. Das Dcp2 Enzym spaltet spezifisch methylierte 5'-Caps, die an RNAs angehangen sind[145]. Dies ist eine Erklärung, warum 48 Stunden nach Übertragung von RNAs mit verschiedenen 5'-Caps die RNA mit der AP3G Cap die höchste Stabilität zeigte. Es wäre interessant zu sehen, wie die Stabilitäten der verschiedenen RNAs sich im längeren Zeithorizont entwickeln, *in vitro* und vor allem *in vivo*. Die Verwendung von translational inaktiven 5'-Caps macht die Verwendung von uORFs und der Leserasterverschiebung im 5'-UTR der seRNA obsolet, die zuvor verwendet wurden, um die 5'-Cap abhängige Translation zu inhibieren. Dies vereinfacht die seRNA und den seRNA Ausbau. Außerdem kann das Fehlen der uORFs im 5'UTR die Translation erhöhen[139].

IRES Elemente entfalten ihre Funktion maßgeblich über komplexe, definierte Sekundär- und Tertiärstrukturen. Diese sind für die Interaktion mit ribosomalen Untereinheiten und anderen Faktoren essentiell[146]. Doch wie zuvor erwähnt ist die IRES Faltung sehr sensitiv. Nicht nur der IRES-Blocker, auch andere Aspekte haben einen großen Einfluss auf die Faltung und damit die Translationseffizienz der IRES. Erstaunlich ist beispielsweise, dass sogar der 3'-UTR einer IRES einen großen Einfluss auf die Faltung hat, obwohl dieser in der Basenabfolge deutlich entfernt liegt[147]. Außerdem unterscheiden sich die Faltung von IRES Strukturen, je nachdem ob sie in einer Zelle von einer übertragenen RNA exprimiert werden, oder ob sie als IVT-RNA direkt in die Zelle übertragen werden[147]. Die grobe Struktur ist gleich, jedoch unterscheiden sich die Zugänglichkeit und die RNA-Protein oder RNA-RNA Interaktionen einzelner Domänen[147]. Dies wird in Bezug auf die IRES Strukturen auch als ‚Nukleare Erfahrung‘ beschrieben, die IVT-RNAs gegenüber in der Zelle produzierter RNA fehlt[148]. Der genaue Mechanismus dahinter ist unklar, aber es ist zu beobachten, dass IRES Strukturen unterschiedlich exprimieren, wenn sie ins Zytoplasma übertragen werden oder aus dem Zellkern kommen[148]. Möglicherweise fehlen der IVT-RNA nötige Modifikationen oder Zellkern-eigene RNA bindende Proteine[148]. Dies ist auch ein Beleg dafür, warum es nicht möglich ist die seRNA in Hochdurchsatz-Verfahren in *in-vitro*-Zelllysaten zu testen. Dies wäre zwar deutlich schneller und maschinell auslesbar, verglichen mit der händischen Transfektion und Analyse der seRNA in verschiedene Zelltypen. Jedoch liegen nur in Zellen reale Bedingungen von Proteinen, pH-Werten Bindungsfaktoren, anderen RNAs usw. vor[147]. Eine wichtige Rolle nehmen dabei auch *IRES trans-acting factors* (ITAFs) ein, regulatorische Proteine die die IRES Translation regulieren[149]. Verschiedene Zelltypen exprimieren verschiedene ITAFs, dies beeinflusst bis zu einem bestimmten Grad die IRES Aktivität je nach Zelltyp[148]. Zusätzlich finden in Zellen Nukleotid Modifikationen statt wie zum Beispiel die Methylierung von Adenosin[149]. Das entstehende N⁶-methyladenosine (m⁶A) reguliert ebenfalls die Cap-unabhängige Translation[149]. Zusammenfassend verdeutlichen die dargelegten Aspekte die hohe strukturelle und funktionelle Komplexität von IRES Elementen. Es gibt hilfreiche Ansätze die Sekundärstruktur vorherzusagen wie zum Beispiel die ViennaRNA RNAfold Software, aber die IRES beinhaltenden RNAs müssen zwingend in verschiedenen Zelltypen getestet werden, um klare Aussagen treffen zu können.

Modifizierte Nukleotide tragen entscheidend dazu bei, dass RNAs effizienter exprimiert werden, die Stabilität erhöht wird und keine Immunreaktion stattfindet[30]. Ist die RNA von Interesse allerdings über eine IRES exprimiert, wird die Anwendung von modifizierten Nukleotiden jedoch deutlich erschwert. Modifizierte Nukleotide verändern die Flexibilität von RNA Strukturen[150]. Es gibt nicht viel Literatur über die Verwendung von modifizierten Nukleotiden in RNAs die IRES Strukturen beinhalten. In circRNAs beispielsweise, die nur über eine IRES Struktur exprimiert werden, wird höchstens 5% eines Nukleotids mit einem modifizierten ersetzt[151]. In der Literatur finden sich kaum

belastbare Daten zur Verwendung höherer Mengen modifizierter Nukleotide in Kombination mit IRES Strukturen, sowie dem damit einhergehenden Verlust der IRES Aktivität. Lediglich Thess et al. zeigten, dass durch die Anwendung von Pseudouridin die Translation einer EMCV IRES vollständig inhibiert wird (Supplementary Figure S7b)[152]. Meine Experimente zeigten ebenfalls, dass durch die Verwendung von verschiedenen modifizierten Nukleotiden in unterschiedlichen Mengen die IRES Aktivität der seRNA erheblich reduziert wird (siehe Appendix Abbildung 3). Somit wäre die Verwendung von modifizierten Nukleotiden in der seRNA höchstens eingeschränkt möglich. Zukünftige Analysen werden zeigen, ob es beispielsweise möglich ist, modifizierte Nukleotide im Poly-A-Schwanz der seRNA zu nutzen, und ob dies die Stabilität und Expression der seRNA verbessern könnte. Bei allen seRNA Modulen bei denen die Faltung der Sekundärstruktur essentiell ist, ist die Verwendung von modifizierten Nukleotiden wahrscheinlich nicht möglich.

Sekundärstrukturen können die Stabilität von RNAs erhöhen. So hat beispielsweise CureVac in seinem SARS-CoV-2 Impfstoffkandidaten einen Histon Stem Loop (HSL) zur Stabilisation der RNA verwendet[153]. In diesem RNA-Impfstoffkandidaten wurden keine modifizierten Nukleotide verwendet, daher sollte hier unter anderem der HSL-Loop für die nötige Stabilität sorgen. Auch die seRNA konnte durch die Verwendung von terminalen Hairpins erfolgreich die Stabilität und die Expressionsintensität erhöhen (vgl. 3.4.5). Diese seRNA konnte sogar im Tierversuch einen Effekt erzielen, obwohl bei der systemischen *in vivo* Applikation die RNA vermutlich weitaus schneller abgebaut wird als in der *in vitro* Anwendung. Dennoch zeigt es, dass sogar ohne 5'-Cap, Poly-A-schwanz und modifizierte Nukleotide der RNA eine erstaunlich hohe Stabilität verliehen werden konnte.

Die seRNA konnte im HCC Tierversuch das durchschnittliche Wachstum der Tumore nur im geringen, nicht signifikanten Maße reduzieren. Wichtig bei der Betrachtung dieser Ergebnisse ist jedoch, dass die Expression der Ziel-mRNA AFP im Allgemeinen nicht sehr hoch ist und zudem deutlich zwischen den Tumoren variiert. Wenn daher das Wachstum des Tumors während der Behandlung mit der Menge an exprimierter Ziel-mRNA ins Verhältnis gesetzt wird, zeigt sich ein deutlich reduzierender Effekt der H-seRNA-ca-Caspase3-H auf das Tumorwachstum. Der Effekt verhielt sich sogar gegenläufig zum Ziel-mRNA und Tumorwachstum Verhältnis in Tumoren, die mit therapeutisch inaktiven Kontroll-seRNAs behandelt wurden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Ziel-RNA spezifische Aktivierung auch *in vivo* funktioniert und zudem nur geringe Konzentrationen der Ziel-RNA, zumindest für die hier verwendete AFP-mRNA notwendig sind. Für zukünftige Versuche in diesem HCC Modell, sollten nach Möglichkeit jedoch Ziel-mRNAs verwendet werden die im Tumor stärker exprimiert werden als AFP.

4.3 Potential und Herausforderungen der seRNA Plattform

Es konnte gezeigt werden, dass mit der seRNA Plattform sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine gezielte und selektive Genexpression in Zielzellen erreicht werden kann. Trotz der vielversprechenden Ansätze befindet sich die seRNA Plattform noch in einem frühen Entwicklungsstadium der präklinischen Forschung. Vor einer klinischen Anwendung muss noch eine Reihe von Fragestellungen geklärt und verschiedene Herausforderungen überwunden werden. So ist es beispielsweise noch nicht geklärt, wie viel Ziel-mRNA in der Zielzelle vorliegen muss, um die seRNA zu aktivieren. Es ist noch nicht gelungen über verschiedene Zielzellen hinweg eindeutige RNA Mengenangaben herauszufinden, die für die Aktivierung erforderlich sind. Darüber hinaus ist die Kinetik der seRNA unklar. Kommt es ab einem bestimmten Level an Ziel-mRNA zu einer Aktivierung aller seRNA Moleküle in der Zielzelle, oder steigt mit zunehmendem Ziel-mRNA Level der prozentuale Anteil an in der Zelle aktivierten seRNA Molekülen in der Zelle? Diese Fragen sind noch offen, haben aber zweifellos großen Einfluss bei der seRNA Applikation.

Eine große Herausforderung ist die *in vivo* Übertragung der seRNA. Während *in vitro* die Übertragung mittels Lipofectamin gute Ergebnisse liefert, ist die systemische *in vivo* Applikation weitaus komplexer. Mit bisher etablierten LNP Übertragungsmethoden sind lediglich Milz und Leber effizient erreichbar[71]. Zukünftig könnte auch die Lunge durch LNPs gut behandelbar sein, entweder durch systemische Applikation oder durch Inhalation von LNPs in Pulverform[72, 154]. Andere Gewebe oder Organe sind deutlich schwerer zu adressieren. Die Behandlung von Glioblastomen ist im Rahmen von Operationen möglich. Im Rahmen einer systemischen Applikation müsste erst die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden. Vermutlich muss für jedes Zielgewebe eine individuelle LNP Mischung entwickelt werden, die dann auch für den klinischen Kontext eigens charakterisiert werden muss.

Die IRES Aktivität wird in nicht Zielzellen durch den IRES-Blocker blockiert. Es ist zu beobachten, dass es teilweise trotz Blockierung noch zu einer schwachen Hintergrund Expression in Nicht-Zielzellen kommen kann, hier „Leakiness“ genannt (vgl. z.B. 3.4.1). Die Expressionsintensität ist weitaus schwächer als in Zielzellen, doch der prozentuale Anteil an Zellen der schwach exprimiert kann signifikant sein. Die Ursachen dafür sind noch nicht endgültig verstanden. Eine Möglichkeit ist, dass die IRES nicht vollständig inhibiert ist. Gerade die EMCV IRES ist sehr groß und kann möglicherweise durch eine kleine Blocker Sequenz nicht immer vollständig blockiert werden. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob ein „Doppelblocker“ (siehe oben) die Blockierung verbessert. Darüber hinaus sollen weitere IRES Strukturen getestet werden. Kleinere IRES Strukturen, die nur über eine Domäne an Ribosomen binden können sollten effizienter zu blockieren sein, exprimieren aber auch schwächer. Vermutlich trägt auch eine translationale Heterogenität dazu bei. Manche Zelllinien exprimieren stärker als andere, und dies zeigt sich vor allem bei IRES initiiert Translation. Ribosomen

unterscheiden sich untereinander durch ihre ribosomalen Proteine[155]. Dadurch translatiert nicht jedes Ribosom jede RNA, sondern manche RNAs können nur durch spezielle Ribosomen translatiert werden[155]. Dies unterstreicht wie wichtig es ist, jede seRNA in verschiedenen Ziel- und Nicht-Zielzellen zu testen und in Zukunft die Bibliothek an verschiedenen zur Verfügung stehenden IRES-Blockern und IRES Strukturen noch zu erweitern.

In der Theorie sind unzählige Anwendungen der seRNA denkbar, doch in der Praxis sind durch die genannten Herausforderungen in der Anwendung Grenzen gesetzt. Es gab bereits Ansätze die seRNA Technologie mit der CRISPR/Cas9 Technologie zu kombinieren, oder die seRNA zu nutzen, um selektiv Zellen ein Antigen (zum Beispiel ein Masern-assoziiertes Antigen gegen das bereits Antikörper bestehen) zu exprimieren, wodurch die Zelle effizient vom Immunsystem erkannt werden würde (Daten nicht gezeigt). Doch diese eleganten, aber hochkomplexen Ansätze erfordern zunächst noch ein besseres Verständnis und eine Optimierung der seRNA. Zudem sollte für diese Anwendungsbereiche auch die Expressionsstärke der seRNA Technologie noch weiter erhöht werden. Wenn die seRNA als Technik weiter verbessert wurde, können solche Ansetze jedoch zukünftig völlig neue medizinische Möglichkeiten bieten.

Der modulare seRNA Aufbau ermöglicht die einfache Anpassung an eine Reihe von unterschiedlichen Anwendungen. Durch einen einfachen Austausch der Antisense-Sequenz kann eine andere Zielzelle anvisiert werden. Genauso kann durch eine veränderte Effektor Sequenz ein anderes Protein von Interesse in der Zielzelle exprimiert werden. Um die Anwendbarkeit für biotechnologische und medizinische Zwecke zu demonstrieren, wurde zunächst eine konstitutiv aktive Caspase3 verwendet. Diese ca-Caspase3 zeigte eindrucksvoll die Induktion der Apoptose. So konnten auch bei Verwendung des seRNA-ca-Caspase3 kodierenden Plasmids relative Zelltötungseffizienzen von über 100% erreicht werden (vgl. 3.1.6). Für eine vollständige Tumorremission müsste allerdings zwingend eine Mehrfachbehandlung stattfinden. Zukünftig könnte, je nach Anwendung, möglicherweise auch die Anwendung noch toxischerer Effektoren vielversprechend sein. So könnten als Effektoren beispielsweise Pseudomonas Endotoxin A oder Shiga-Toxine getestet werden. Denkbar wären auch Effektoren, die durch eine selbstverstärkende Wirkung Nachbarzellen der anvisierten Zielzelle beeinflussen. So könnte ein „*bystander effect*“ generiert werden, ähnlich der Anwendung von Deruxtecan in ADCs (vgl. 1.2.2). Vielversprechend wären auch bakterielle Peptidtoxine wie zum Beispiel Microcysteine[156]. Trotz Verwendung dieser toxischen Substanzen verspricht die seRNA Therapie deutlich geringere Nebenwirkungen als klassische Zytostatika, da nur das Zielgewebe adressiert wird. Denkbar wäre auch eine Kombination von der seRNA mit klassischen Zytostatika, um eine noch effizientere Tumorentfernung zu ermöglichen.

4.4 Vergleich der seRNA mit ähnlichen Systemen

Auch durch das Adressieren von spezifischen Oberflächenrezeptoren können Zielzellen erkannt und gezielt behandelt werden. Es gibt viele Ansätze, die auf diesem Konzept basieren[157]. Häufig fehlen allerdings spezifische Oberflächenstrukturen auf den Zielzellen[158]. Insbesondere bei Tumorstammzellen fehlen häufig einheitliche Oberflächenmarker. Auch in den übrigen Tumorzellen gibt es häufig nicht einen generellen Zielzell-eigenen Oberflächenmarker, sondern die Marker sind heterogen[158]. Der seRNA Ansatz greift die Idee auf einen spezifischen Baustein zu verwenden, um nur auf krankes Gewebe zu wirken, aber verwendet dafür keinen Oberflächenmarker, sondern eine Zielzell-eigene RNA. Dies verschiebt die spezifische Erkennung vom Äußeren der Zelle ins Innere, wodurch möglicherweise eine bessere Erkennung der Zielstrukturen möglich ist. Zukünftig könnte möglicherweise auch eine Kombinationstherapie aus Oberflächenmarker erkennender Therapie und seRNA möglich sein, um eine vollständige Erkennung aller Tumorzellen zu ermöglichen.

Der verwendete IRES-Blocker verändert die Struktur der IRES, um diese zu inhibieren. In Zielzellen wird diese reversible Blockierung aufgehoben und es kommt zur Expression. Dieser Mechanismus ist ähnlich zu den bereits beschriebenen eToehold Elementen[51]. Während die Funktion von eToehold Sequenzen auf stabilen in die IRES eingebrachten Sequenzen beruhen, die feinstimmig in die IRES eingebracht werden müssen, ist in der seRNA der IRES-Blocker ein eigenes Modul, welches die IRES von außerhalb bindet. Dabei konnten bei der Verwendung verschiedener IRES-Blocker bis jetzt kaum Unterschiede erkannt werden. Dies spricht für eine robuste Blockierung der IRES in der inaktiven seRNA. Bei der IRES Blockierung im eToehold System scheinen minimale Veränderungen der Blockierung große Veränderungen in der IRES Expression zu haben[51]. Ein Vorteil der seRNA besteht in der Anpassbarkeit durch die modulare Bauweise. Durch Austausch der Antisense-Sequenz kann die anvisierte Zielzelle verändert werden. eToehold Elemente können zwar auch für die Verwendung in anderen Zielzellen angepasst werden. Dies ist allerdings deutlich aufwendiger, da gleichzeitig die in die IRES eingebrachte Sequenz neu erstellt und justiert werden muss. Die seRNA wurde schon erfolgreich *in vivo* angewendet, während die Anwendung von eToehold Systemen *in vivo* noch aussteht. Der entscheidende Vorteil der seRNA besteht aber darin, dass schon nachgewiesen werden konnte, dass die Möglichkeit der Anwendung als IVT-seRNA besteht. Bei den eToehold Motiven ist das bis jetzt noch nicht gelungen.

Das ADAR System kommt ohne IRES aus, ist aber in seiner Funktion auch ähnlich zur seRNA. Das klassische ADAR System erlaubt den Basenaustausch in einer Ziel mRNA. Wird das ADAR Modell leicht angepasst, wird daraus das sogenannte RADAR[159]. Dabei handelt es sich um ein RNA Molekül, das zunächst in der Zelle inaktiv verbleibt[159]. Folgt aber eine Interaktion mit einer spezifischen Ziel-mRNA, bildet sich eine dsRNA die das Enzym ADAR1 aktiviert. ADAR bewirkt den charakteristischen A-

zu-I austauscht, wodurch aus einem Stopp Codon (UAG) ein Tryptophan Codon (UIG, gelesen UGG) wird und die kodierende Sequenz exprimiert werden kann[159]. Für dieses System ist es essentiell, dass in der Zielzelle das ADAR Enzym vorhanden ist, sonst müsste das Enzym zusammen mit dem Konstrukt in die Zielzelle übertragen werden. Dies ist bei der seRNA nicht nötig. Ein seRNA Molekül reicht alleine aus und ist auf keine Aktivierungsenzyme angewiesen die zusätzlich eingebracht werden müssten. Das RADAR System ist ein elegantes System, der seRNA ähnlich durch die translationsbasierte Kontrolle und die Anpassbarkeit. Welches System die besseren Therapieerfolge liefert, wird sich in der Zukunft herausstellen.

Ob die seRNA als Plattformtechnologie neue Perspektiven in der Behandlung von Krebs eröffnen wird, kann derzeit noch nicht gesagt werden. In dieser Arbeit wurden einige Proof-of-Concept Daten dargelegt, die die generelle Wirksamkeit von seRNA in verschiedenen Behandlungsansätzen darlegt. Vornehmlich weitere *in vivo* Modelle sind nötig, um die seRNA weiter zu verstehen und zu optimieren. Insbesondere die Behandlung alternativer Glioblastom Tiermodelle ist relevant, da das in dieser Arbeit verwendete U87 Glioblastom Modell scharfe Tumorgrenzen bildet und dadurch ein nicht-invasives Wachstumsverhalten abbildet[160]. Häufig kommen aber Glioblastome vor, die sehr aggressiv wachsen und dabei keine scharfen Grenzen zeigen, sondern in das gesunde Gewebe hineinwachsen. Weitere Studien zur Behandlung vollständig etablierter Tumoren, sowie wiederholte Applikationen in Kombination mit einer verlängerten Beobachtungszeit werden zusätzlich helfen das Potential seRNA basierter Therapeutika zu verifizieren. Im Besonderen die Anwendung auf weitere Indikationen und auch die Optimierung der Übertragung sind spannende und vielversprechende Projekte. Vielversprechend sind auch die *in vitro* Behandlung von Patientenbiopsien, um die seRNA unter realen Bedingungen zu erproben. Die in dieser Arbeit dargelegten Grundlagen unterstreichen das zukünftige Potential der seRNA für vielfältige medizinische Anwendungen in den Bereichen Onkologie, Virologie und genetischen Erkrankungen.

5. Ausblick

In dieser Arbeit wird die grundlegende Funktionalität und Wirksamkeit der seRNA Technologie demonstriert. Aufgrund der Neuartigkeit der Technologie sind darauf aufbauend jedoch noch eine Reihe weiterer Untersuchungen und Entwicklungen bis zu einer umfassenden therapeutischen Verwendung nötig. Durch ein besseres Verständnis der Interaktion von IRES-Blocker und IRES kann zukünftig sicherlich die Spezifität weiter erhöht werden. Welche IRES verwendet wird, und von welchem Blocker sie am besten inhibiert werden kann, bietet vermutlich das größte Verbesserungspotential. Daher könnte es sich lohnen sich für diese Optimierung ein Arbeitsablauf aufzubauen, der mit einem Hochdurchsatz-Screening eine hohe Zahl verschiedener Blocker automatisiert entwirft, anwendet, in Zellen überträgt und ausließt. Durch eine hohe Zahl an Daten könnte anschließend ein maschinelles Lernprogramm verbesserte Blockervarianten vorschlagen.

Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt, der eine tiefergehende Analyse benötigt, ist die exakte Erkennungsuntersuchung des sense-antisense Doppelstrangs in der Zelle. Hier spielen speziell Aspekte der Mindestlänge der Antisense-Moduls, möglicher Sequenzmotive innerhalb dieser Sequenz zur optimalen Erkennung der dsRNA sowie der involvierten Proteine und RNasen eine wichtige Rolle.

Bezüglich seRNA Effizienz und Stabilität bietet diese Arbeit schon einige vielversprechende Ansätze auf die zurückgegriffen werden kann. Doch die Testung weiterer translational inaktiver 5'-Caps sowie die Nutzung der seRNA als zirkuläre RNA wären sehr interessant. Gerade im Bereich von IVT-RNA sind die in dieser Arbeit durchgeführten Ansätze zur Stabilitätserhöhung der seRNA mittels Einsatz chemisch modifizierter Nukleotide noch deutlich erweiterbar. Unterschiedliche Konzentrationen sowie weitere modifizierte Nukleotide können und müssen für jede zum Einsatz angedachte IRES getestet werden.

Durch Anpassung der Antisense-Sequenzen können zukünftig zudem nicht nur weitere Krebsarten adressiert werden. Auch für genetische Erkrankungen, diagnostische Anwendungen und virale Erkrankungen könnten seRNAs entwickelt werden. Gerade Virus befallene Zellen sind vielversprechende Ziele, da die viral exprimierten RNA optimale Zielsequenzen für die seRNA Technologie darstellen. Weitere Überlegungen gehen in Richtung von Autoimmunerkrankungen, bei denen durch die seRNA Technologie spezifische Subklassen von B-Zellen gezielt entfernt, oder aber spezifische Zellen der zellulären Immunantwort gezielt aktiviert werden können.

Um heterogene Tumore effizient auszuschalten, könnte zudem eine Mixtur von seRNAs mit verschiedenen Antisense-Sequenzen genutzt werden. So könnten möglicherweise auch Tumorstammzellen zusammen mit den anderen Tumorzellen eliminiert werden. Viele medizinische Anwendungen versprechen eine höhere Wirksamkeit durch eine Personalisierung für den jeweiligen

Patienten. Dies wäre auch für das seRNA System denkbar. Durch Biopsien entnommenes Patientengewebe könnte untersucht werden, um die spezifischen hochexprimierten Ziel-mRNAs herauszufinden, die eine optimale seRNA Aktivierung versprechen. Möglicherweise muss dann keine eigene seRNA für den Patienten designt werden, sondern es könnte möglich sein die ein bis zwei am besten geeigneten seRNAs aus verschiedenen zur Auswahl stehenden Kandidaten auszuwählen und zu applizieren. Dies könnte die Kosten einer personalisierten Therapie reduzieren, die bei eigens hergestellten Therapeutika ansonsten immens wären. In diesem Zusammenhang ist im Besonderen auch ein Ansatz von Interesse, bei der nicht zwei einzelne seRNAs gleichzeitig übertragen werden, sondern eine Aktivierung des gleichen seRNA Moleküls durch zwei verschiedene Ziel-RNA-Sequenzen erfolgt. Dieser sogenannte „or“-Ansatz sollte durch Kombination zweier Antisense-Sequenzen im gleichen Moleküle möglich sein.

Um das Potential der seRNA voll auszuschöpfen ist zudem eine ausgefeilte Übertragung der wichtigste Parameter. Dieser Aspekt stellt für die gesamte Pharmabranche momentan eine besondere Herausforderung dar. Hierbei ist es entscheidend, dass die seRNA gezielt ihr Zielgewebe erreicht und dort von den Zellen aufgenommen werden kann. Für die systemische RNA Übertragung gibt es zwar viele Ansätze, jedoch kaum fertige Systeme mit klinischer Zulassung und gleichzeitig geringer Toxizität. Deren Entwicklung ist für alle RNA Therapien entscheidend.

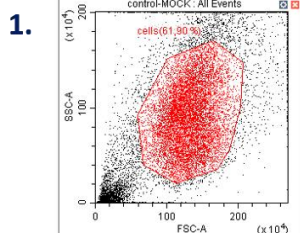
6. Appendix

6.1 Gating Strategie

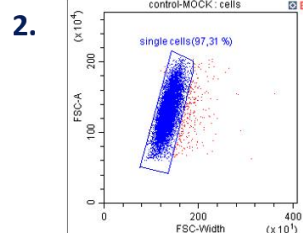
Gating Strategie



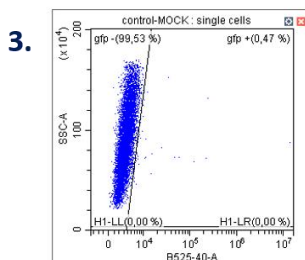
➤ Beispiel für ein eGFP Konstrukt in U87 Zielzellen



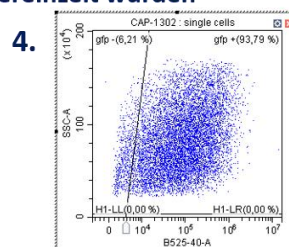
In einem ersten Gate werden alle lebenden Zellen einer MOCK-behandelten Kontrolle oder einer unbehandelten Kontrolle erfasst



In einem zweiten Gate werden alle Einzelzellen erfasst
-> Dieser Schritt ist nicht essentiell notwendig wenn die Zellen gut vereinzelt wurden

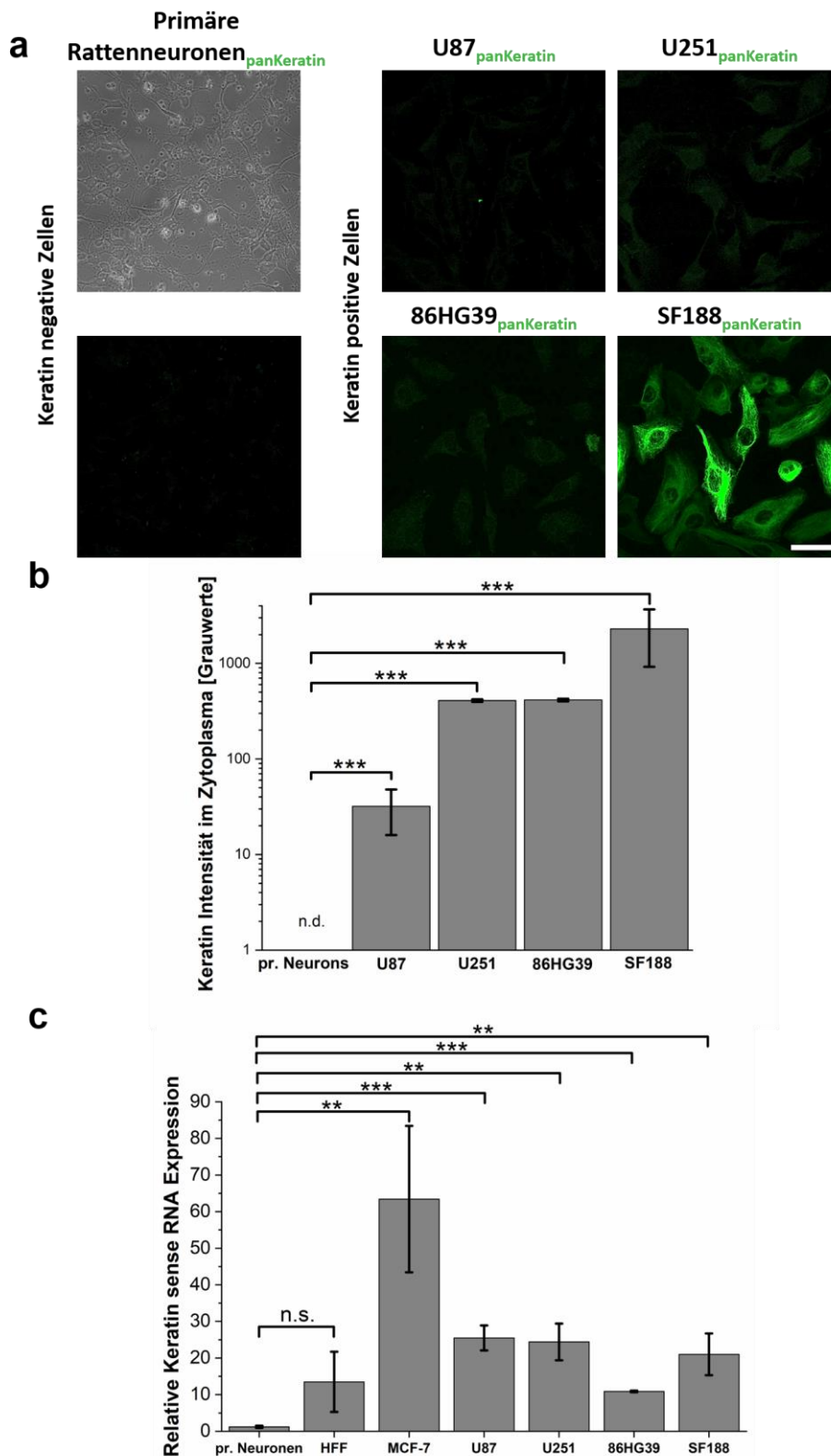


In einem dritten Gate werden eGFP positive Zellen von eGFP negativen Zellen getrennt



Repräsentatives Ergebnis einer eGFP positiven Kontrolle mit dieser Gating Strategie. eGFP positive Zellen wurden ausgewertet anhand ihrer Menge in Prozent und ihrer eGFP Expressionsintensität zusammen mit den mikroskopischen Abbildungen.

6.2. Expression der sense Keratin RNA in Glioblastomzellen

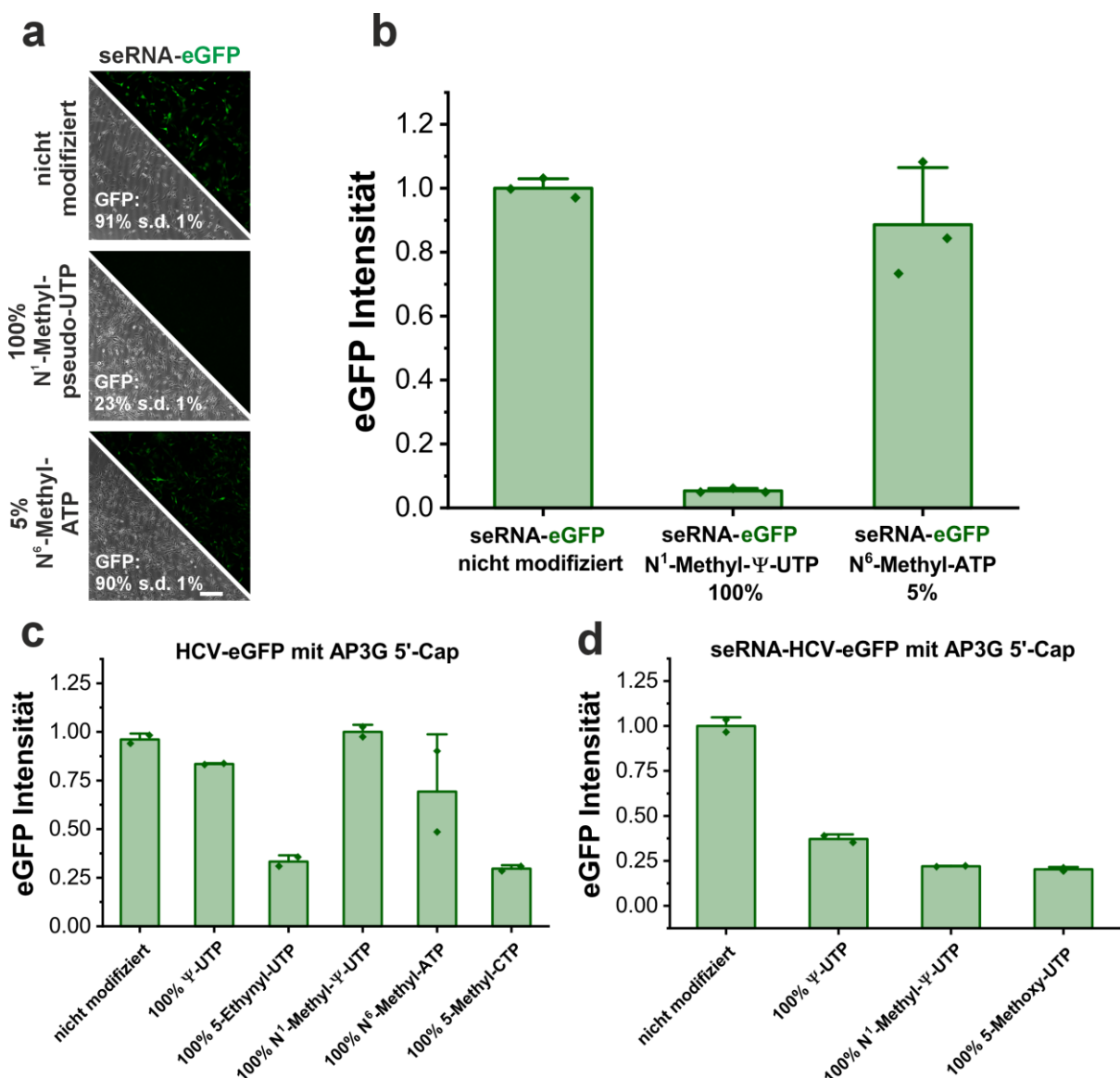


Appendix Abbildung 2: Analyse der Keratin sense Expression auf Protein- und RNA-Ebene. (a) Die angegebenen Zelllinien wurden gegen pan-Keratin gefärbt. Primäre Neuronen dienen als Zelltyp ohne Keratin-Expression. Nach 24-stündiger Kultivierung erfolgte die Färbung wie zuvor beschrieben. Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden mittels Konfokalmikroskopie mit den entsprechenden Filtereinstellungen und einem 40x EX Plan Neofluar/Ph3-Objektiv (Carl Zeiss) angefertigt. Zur besseren Sichtbarkeit sind die

Neuronen zusätzlich im Phasenkontrast dargestellt. Für alle Mikroskopaufnahmen wurden identische Einstellungen verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm . **(b)** Die Keratin-Fluoreszenzintensitäten wurden mithilfe eines Python Programms ausgewertet. Hierbei wurde die zytoplasmatische Fluoreszenzintensität gemessen und als mittlere Grauwertintensität pro Bild mit Standardabweichung angegeben. Für jede Zelllinie wurden 10 Bilder aus drei unabhängigen Färbungen analysiert. **(c)** Die Keratin-sense-RNA Level wurden wie zuvor beschrieben mittels qRT-PCR quantifiziert wobei Primer verwendet wurden, die in der Sense-Antisense Interaktionsregion binden. Für jede Zelllinie wurde die gleiche Gesamtmenge an RNA analysiert. Die Ergebnisse wurden relativ zu primären Neuronen normalisiert und mit Standardabweichung angegeben. $n = 3$ unabhängige Proben.

6.3 Verwendung modifizierter Nukleotide in der IVT-seRNA

Es wurde analysiert ob in der IVT-seRNA modifizierte Nukleotide verwendet werden können. Bei Verwendung von 100% Methyl-Pseudo-UTP (mP-UTP) verlor die EMCV IRES ihre Funktionalität (Appendix Abb. 1a, b). Wie in der Literatur beschrieben behält die EMCV IRES ihre Funktion bei Ersatz von 5% ATP durch Methyl-ATP (mATP)[151]. Interessanterweise ist verliert die IRES des HCV-eGFP Konstrukt nicht ihre Funktionalität bei Verwendung von 100% modifiziertem UTP (Appendix Abb. 1c). Eine HCV beinhaltende seRNA-eGFP wird jedoch deutlich schwächer Exprimiert bei Verwendung von modifizierten Nukleotiden (Appendix Abb. 1d). Die Verwendung von geringeren Anteilen modifizierten Nukleotiden in der seRNA-HCV-eGFP blockiert zwar nicht vollständig die Expression der IRES, reduziert diese aber deutlich (Daten nicht gezeigt).



Appendix Abbildung 3: Verwendung von modifizierten Nukleinsäuren in der IVT-seRNA zerstört ihre translationale Funktion. (a) Mikroskopische Darstellung und Expressionsstärke (b) des EMCV IRES beinhaltenden seRNA-eGFP Konstrukts in U87 Glioblastom Zellen. Die Verwendung von modifizierten Nukleotiden ist in der Abbildung angegeben, die Transfektionseffizienz ist mit Standardabweichung

(s.d.) dargestellt. $n = 3$ unabhängige Proben. Der Maßstabsbalken entspricht $200\ \mu\text{m}$. **(c)** eGFP Expressionsintensität eines nicht selektiven HCV-eGFP Kontrollkonstrukts mit AP3G Cap. Es wurden verschiedene modifizierte Nukleotide getestet, diese sind in der Abbildung angegeben. $n = 2$ unabhängige Proben. **(d)** eGFP Expressionsintensität eines HCV beinhalteten seRNA-eGFP Konstrukt mit AP3G Cap ausgestattet. Es wurden verschiedene modifizierte Nukleotide getestet, diese sind in der Abbildung angegeben. $n = 2$ unabhängige Proben. Alle verwendeten modifizierten Nukleotide stammen von Jena Biosciences, außer 5-Ethynyl-UTP von Basedick. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen den Konzentrationen die bei nicht modifizierten Nukleotiden angewandt wurden.

7. Publikationsliste

Rastfeld, F., Hoffmann, M., Krüger, S., Bohn, P., Gribling Burrer, A.-S., Wagner, L., Hersch, N., Stegmayr, C., Lövenich, L., Gerlach, S., Köninger, D., Hoffmann, C., Walter, H. L., Wiedermann, D., Manoharan, H., Fink, G. R., Merkel, R., Bohlen, H., Smyth, R. P., Rueger, M. A. & Hoffmann, B. Selectively expressed RNA molecules as a versatile tool for functionalized cell targeting. *Nat Commun* **16**, 420 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-55547-6>

8. Literaturverzeichnis

1. Kniter, M., *Krebsbericht 2025*, in *Kreis Unna*. 2025.
2. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
3. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018*. Neuro Oncol, 2021. **23**(12 Suppl 2): p. iii1-iii105.
4. Winkler, F., et al., *Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis*. Glia, 2009. **57**(12): p. 1306-15.
5. Smerdi, D., et al., *Overcoming Resistance to Temozolomide in Glioblastoma: A Scoping Review of Preclinical and Clinical Data*. Life (Basel), 2024. **14**(6).
6. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
7. Llovet, J.M., et al., *Hepatocellular carcinoma*. Nature Reviews Disease Primers, 2021. **7**(1): p. 6.
8. Finn, R.S., et al., *Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma*. N Engl J Med, 2020. **382**(20): p. 1894-1905.
9. Siegel, R.L., A.N. Giaquinto, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2024*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2024. **74**(1): p. 12-49.
10. Tacar, O., P. Srimornsak, and C.R. Dass, *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. J Pharm Pharmacol, 2013. **65**(2): p. 157-70.
11. Baskar, R., et al., *Cancer and radiation therapy: current advances and future directions*. Int J Med Sci, 2012. **9**(3): p. 193-9.
12. Thiesen, B. and A. Jordan, *Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia*. International Journal of Hyperthermia, 2008. **24**(6): p. 467-474.
13. Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, *Antibody therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 278-87.
14. Zhong, L., et al., *Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021. **6**(1): p. 201.
15. Hou, X., et al., *Lipid nanoparticles for mRNA delivery*. Nature Reviews Materials, 2021. **6**(12): p. 1078-1094.
16. Chau, C.H., P.S. Steeg, and W.D. Figg, *Antibody–drug conjugates for cancer*. The Lancet, 2019. **394**(10200): p. 793-804.

17. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med, 2007. **357**(1): p. 39-51.
18. Cartron, G., et al., *Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene*. Blood, 2002. **99**(3): p. 754-8.
19. Leandro, M. and D.A. Isenberg, *Rituximab – The first twenty years*. Lupus, 2021. **30**(3): p. 371-377.
20. Han, Y., D. Liu, and L. Li, *PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer*. Am J Cancer Res, 2020. **10**(3): p. 727-742.
21. Ribas, A., *Tumor immunotherapy directed at PD-1*. N Engl J Med, 2012. **366**(26): p. 2517-9.
22. Postow, M.A., R. Sidlow, and M.D. Hellmann, *Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade*. N Engl J Med, 2018. **378**(2): p. 158-168.
23. Chau, C.H., P.S. Steeg, and W.D. Figg, *Antibody-drug conjugates for cancer*. The Lancet, 2019. **394**(10200): p. 793-804.
24. Van Epps, H.A. and P.D. Senter, *Breaking up is hard to do*. Nature Chemical Biology, 2019. **15**(10): p. 934-935.
25. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates*. Nature Reviews Drug Discovery, 2017. **16**(5): p. 315-337.
26. Modi, S., et al., *Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer*. N Engl J Med, 2022. **387**(1): p. 9-20.
27. Hamilton, J.R., et al., *In vivo human T cell engineering with enveloped delivery vehicles*. Nature Biotechnology, 2024. **42**(11): p. 1684-1692.
28. Hartmann, J., et al., *Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts*. EMBO Mol Med, 2017. **9**(9): p. 1183-1197.
29. Van Tendeloo, V.F., P. Ponsaerts, and Z.N. Berneman, *mRNA-based gene transfer as a tool for gene and cell therapy*. Curr Opin Mol Ther, 2007. **9**(5): p. 423-31.
30. Karikó, K., et al., *Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 165-75.
31. Katalin Karikó – Facts – 2023. Nobel Prize Outreach 2025. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2023/kariko/facts/>.
32. Adams, D., et al., *Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis*. N Engl J Med, 2018. **379**(1): p. 11-21.
33. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-811.
34. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-366.

35. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-498.
36. Hammond, S.M., et al., *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-296.
37. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
38. Bumcrot, D., et al., *RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(12): p. 711-9.
39. Zhang, X., et al., *Adverse events of nusinersen: a real-world drug safety surveillance study based on the FDA adverse event reporting system (FAERS) database*. Expert Opin Drug Saf, 2024: p. 1-8.
40. Finkel, R.S., et al., *Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy*. N Engl J Med, 2017. **377**(18): p. 1723-1732.
41. Hua, Y., et al., *Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model*. Genes Dev, 2010. **24**(15): p. 1634-44.
42. Raal, F.J., et al., *Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2010. **375**(9719): p. 998-1006.
43. Pardi, N., et al., *mRNA vaccines — a new era in vaccinology*. Nature Reviews Drug Discovery, 2018. **17**(4): p. 261-279.
44. Sahin, U., K. Karikó, and Ö. Türeci, *mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs*. Nature Reviews Drug Discovery, 2014. **13**(10): p. 759-780.
45. Polack Fernando, P., et al., *Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine*. New England Journal of Medicine, 2020. **383**(27): p. 2603-2615.
46. Baden Lindsey, R., et al., *Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine*. New England Journal of Medicine, 2021. **384**(5): p. 403-416.
47. Sahin, U. and Ö. Türeci, *Personalized vaccines for cancer immunotherapy*. Science, 2018. **359**(6382): p. 1355-1360.
48. Dagogo-Jack, I. and A.T. Shaw, *Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(2): p. 81-94.
49. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. Nature, 2017. **541**(7637): p. 321-330.
50. Green, A.A., et al., *Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression*. Cell, 2014. **159**(4): p. 925-39.

51. Zhao, E.M., et al., *RNA-responsive elements for eukaryotic translational control*. Nature Biotechnology, 2022. **40**(4): p. 539-545.
52. Geraldi, A., N.N.T. Puspaningsih, and F. Khairunnisa, *Update on the Development of Toehold Switch-Based Approach for Molecular Diagnostic Tests of COVID-19*. J Nucleic Acids, 2022. **2022**: p. 7130061.
53. Nishikura, K., *A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(2): p. 83-96.
54. Zambrano-Mila, M.S., et al., *Dissecting the basis for differential substrate specificity of ADAR1 and ADAR2*. Nature Communications, 2023. **14**(1): p. 8212.
55. Eisenberg, E. and E.Y. Levanon, *A-to-I RNA editing - immune protector and transcriptome diversifier*. Nat Rev Genet, 2018. **19**(8): p. 473-490.
56. Merkle, T., et al., *Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides*. Nat Biotechnol, 2019. **37**(2): p. 133-138.
57. Qu, L., et al., *Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs*. Nature Biotechnology, 2019. **37**(9): p. 1059-1069.
58. Aquino-Jarquín, G., *Novel Engineered Programmable Systems for ADAR-Mediated RNA Editing*. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2020. **19**: p. 1065-1072.
59. Cox, D.B.T., et al., *RNA editing with CRISPR-Cas13*. Science, 2017. **358**(6366): p. 1019-1027.
60. Kristensen, L.S., et al., *The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs*. Nature Reviews Genetics, 2019. **20**(11): p. 675-691.
61. Niu, D., Y. Wu, and J. Lian, *Circular RNA vaccine in disease prevention and treatment*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023. **8**(1): p. 341.
62. Hansen, T.B., et al., *Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 384-388.
63. Wesselhoeft, R.A., et al., *RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo*. Mol Cell, 2019. **74**(3): p. 508-520.e4.
64. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
65. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 1): p. 159-69.
66. Zuhorn, I.S. and D. Hoekstra, *On the Mechanism of Cationic Amphiphile-mediated Transfection. To Fuse or not to Fuse: Is that the Question?* The Journal of Membrane Biology, 2002. **189**(3): p. 167-179.
67. Hoffmann, M., et al., *PEGylation and folic-acid functionalization of cationic lipoplexes-Improved nucleic acid transfer into cancer cells*. Front Bioeng Biotechnol, 2022. **10**: p. 1066887.

68. Scientific, T.F. *Neurobiology Transfection Guide*. 2025 [26.07.2025]; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/cell-culture-learning-center/cell-culture-resource-library/cell-culture-transfection-application-notes/neurobiology-transfection-guide.html>.
69. Sahin, U., et al., *COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses*. Nature, 2020. **586**(7830): p. 594-599.
70. Kamiya, M., et al., *Stability Study of mRNA-Lipid Nanoparticles Exposed to Various Conditions Based on the Evaluation between Physicochemical Properties and Their Relation with Protein Expression Ability*. Pharmaceutics, 2022. **14**(11).
71. Kulkarni, J.A., P.R. Cullis, and R. van der Meel, *Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility*. Nucleic Acid Ther, 2018. **28**(3): p. 146-157.
72. Dilliard, S.A., Q. Cheng, and D.J. Siegwart, *On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021. **118**(52): p. e2109256118.
73. Sahay, G., D.Y. Alakhova, and A.V. Kabanov, *Endocytosis of nanomedicines*. J Control Release, 2010. **145**(3): p. 182-95.
74. Leamon, C.P. and P.S. Low, *Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery*. Drug Discov Today, 2001. **6**(1): p. 44-51.
75. Wang, D., P.W.L. Tai, and G. Gao, *Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(5): p. 358-378.
76. Büning, H., et al., *Recent developments in adeno-associated virus vector technology*. The Journal of Gene Medicine, 2008. **10**(7): p. 717-733.
77. Rossi, A., et al., *Vector uncoating limits adeno-associated viral vector-mediated transduction of human dendritic cells and vector immunogenicity*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 3631.
78. Kachanov, A., et al., *The menace of severe adverse events and deaths associated with viral gene therapy and its potential solution*. Med Res Rev, 2024. **44**(5): p. 2112-2193.
79. Rastfeld, F., et al., *Selectively expressed RNA molecules as a versatile tool for functionalized cell targeting*. Nature Communications, 2025. **16**(1): p. 420.
80. Hinnebusch, A.G., *Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(20): p. 6442-6.
81. Vatter, K.M. and R.C. Wek, *Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11269-74.
82. Martínez-Salas, E., M.P. Regalado, and E. Domingo, *Identification of an essential region for internal initiation of translation in the aphthovirus internal ribosome entry site and implications for viral evolution*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 992-8.

83. Gokhale, N.S. and S.M. Horner, *Knotty Zika Virus Blocks Exonuclease to Produce Subgenomic Flaviviral RNAs*. Cell Host Microbe, 2017. **21**(1): p. 1-2.
84. Galloway, A. and V.H. Cowling, *mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate*. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2019. **1862**(3): p. 270-279.
85. Henderson, J.M., et al., *Cap 1 Messenger RNA Synthesis with Co-transcriptional CleanCap® Analog by In Vitro Transcription*. Current Protocols, 2021. **1**(2): p. e39.
86. Stepinski, J., et al., *Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG*. Rna, 2001. **7**(10): p. 1486-95.
87. Solodushko, V. and B. Fouty, *Terminal hairpins improve protein expression in IRES-initiated mRNA in the absence of a cap and polyadenylated tail*. Gene Therapy, 2023. **30**(7): p. 620-627.
88. Leppek, K., R. Das, and M. Barna, *Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(3): p. 158-174.
89. Barrett, L.W., S. Fletcher, and S.D. Wilton, *Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(21): p. 3613-34.
90. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
91. Wang, Y., et al., *Length dependent activation of OAS proteins by dsRNA*. Cytokine, 2020. **126**: p. 154867.
92. Luecke, S., et al., *cGAS is activated by DNA in a length-dependent manner*. EMBO reports, 2017. **18**(10): p. 1707-1715-1715.
93. Lorenz, R., et al., *ViennaRNA Package 2.0*. Algorithms for Molecular Biology, 2011. **6**(1): p. 26.
94. Zhao, M. and M.T. Woodside, *Mechanical strength of RNA knot in Zika virus protects against cellular defenses*. Nature Chemical Biology, 2021. **17**(9): p. 975-981.
95. Bushell, M., et al., *Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated gene expression during apoptosis*. Mol Cell, 2006. **23**(3): p. 401-12.
96. Kieft, J.S., et al., *Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA*. Rna, 2001. **7**(2): p. 194-206.
97. Matsuda, D. and V.P. Mauro, *Base pairing between hepatitis C virus RNA and 18S rRNA is required for IRES-dependent translation initiation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(43): p. 15385-9.
98. Bochkov, Y.A. and A.C. Palmenberg, *Translational Efficiency of EMCV IRES in Bicistronic Vectors is Dependent Upon IRES Sequence and Gene Location*. BioTechniques, 2006. **41**(3): p. 283-292.

99. Palmenberg, A.C. and J.-Y. Sgro, *Topological Organization of Picornaviral Genomes: Statistical Prediction of RNA Structural Signals*. Seminars in Virology, 1997. **8**(3): p. 231-241.
100. Ruehle, M.D., et al., *A dynamic RNA loop in an IRES affects multiple steps of elongation factor-mediated translation initiation*. eLife, 2015. **4**: p. e08146.
101. Srinivasula, S.M., et al., *Generation of Constitutively Active Recombinant Caspases-3 and -6 by Rearrangement of Their Subunits **. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(17): p. 10107-10111.
102. Sachs, A., *The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA*. Current Opinion in Cell Biology, 1990. **2**(6): p. 1092-1098.
103. Trepotec, Z., et al., *Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life*. Rna, 2019. **25**(4): p. 507-518.
104. Hersch, N., et al., *The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening*. Biol Open, 2013. **2**(3): p. 351-61.
105. Maybeck, V., et al., *An evaluation of extracellular MEA versus optogenetic stimulation of cortical neurons*. Biomedical Physics & Engineering Express, 2016. **2**(5): p. 055017.
106. Bohn, P., et al., *Nano-DMS-MaP allows isoform-specific RNA structure determination*. Nature Methods, 2023. **20**(6): p. 849-859.
107. Chen, C.Y.A., N. Ezzeddine, and A.B. Shyu, *Chapter 17 Messenger RNA Half-Life Measurements in Mammalian Cells*, in *Methods in Enzymology*. 2008, Academic Press. p. 335-357.
108. Croce, S., et al., *Chemoenzymatic Preparation of Functional Click-Labeled Messenger RNA*. ChemBioChem, 2020. **21**(11): p. 1641-1646.
109. Vollmar, C., P.A. Winkler, and S. Noachtar, *Visualization of subdural electrodes*. AJNR Am J Neuroradiol, 2003. **24**(8): p. 1727-8.
110. Haupenthal, J., et al., *Reduced Efficacy of the Plk1 Inhibitor BI 2536 on the Progression of Hepatocellular Carcinoma due to Low Intratumoral Drug Levels*. Neoplasia, 2012. **14**(5): p. 410-IN10.
111. Murakami, H., et al., *Transgenic Mouse Model for Synergistic Effects of Nuclear Oncogenes and Growth Factors in Tumorigenesis: Interaction of c-myc and Transforming Growth Factor α in Hepatic Oncogenesis*. Cancer Research, 1993. **53**(8): p. 1719-1723.
112. Saito, T. and M. Gale, Jr., *Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1523-7.
113. de Bouteiller, O., et al., *Recognition of Double-stranded RNA by Human Toll-like Receptor 3 and Downstream Receptor Signaling Requires Multimerization and an Acidic pH**. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(46): p. 38133-38145.

114. Dinarello, C., et al., *Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein*. Frontiers in Immunology, 2013. **Volume 4 - 2013**.
115. Zhukova, J.V., et al., *Molecular mechanisms of regulation of IL-1 and its receptors*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2024. **80**: p. 59-71.
116. Akhter, N., et al. *Endoplasmic Reticulum Stress Promotes the Expression of TNF- α in THP-1 Cells by Mechanisms Involving ROS/CHOP/HIF-1 α and MAPK/NF- κ B Pathways*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**, DOI: 10.3390/ijms242015186.
117. Rastfeld, F., *Analyse der Autoimmunantwort selektiv exprimierter RNA-Moleküle (seRNA) nach Transfektion in tierische Zellen, Bachelorarbeit*. 2019, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
118. Koch, A., et al., *Quantifying the dynamics of IRES and cap translation with single-molecule resolution in live cells*. Nat Struct Mol Biol, 2020. **27**(12): p. 1095-1104.
119. Rastfeld, F., *Entwicklung und Charakterisierung gezielter und steuerbarer Genexpression von selektiv exprimierbaren RNA (seRNA)-Molekülen für therapeutische Anwendungen, Masterarbeit*. 2022, RWTH Aachen.
120. Stewart, W.C., et al., *STAT 5 activators can replace the requirement of FBS in the adipogenesis of 3T3-L1 cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **324**(1): p. 355-359.
121. Kobelt, D., et al., *Performance of high quality minicircle DNA for in vitro and in vivo gene transfer*. Mol Biotechnol, 2013. **53**(1): p. 80-9.
122. Emory, S.A., P. Bouvet, and J.G. Belasco, *A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in Escherichia coli*. Genes Dev, 1992. **6**(1): p. 135-48.
123. Houseley, J. and D. Tollervey, *The many pathways of RNA degradation*. Cell, 2009. **136**(4): p. 763-76.
124. Lamb, Y.N., *BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval*. Drugs, 2021. **81**(4): p. 495-501.
125. Li, Q., et al., *Keratin 13 expression reprograms bone and brain metastases of human prostate cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(51): p. 84645-84657.
126. Chu, P.G. and L.M. Weiss, *Keratin expression in human tissues and neoplasms*. Histopathology, 2002. **40**(5): p. 403-39.
127. Uhlen, M., et al., *A pathology atlas of the human cancer transcriptome*. Science, 2017. **357**(6352): p. eaan2507.
128. Altuvia, Y., et al., *In vivo cleavage rules and target repertoire of RNase III in Escherichia coli*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(19): p. 10380-10394.
129. Lima, W.F., et al., *Human RNase H1 discriminates between subtle variations in the structure of the heteroduplex substrate*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(1): p. 83-91.

130. Wang, L., et al., *Noncoding RNA danger motifs bridge innate and adaptive immunity and are potent adjuvants for vaccination*. J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1175-84.
131. Lozano, G., R. Francisco-Velilla, and E. Martinez-Salas, *Ribosome-dependent conformational flexibility changes and RNA dynamics of IRES domains revealed by differential SHAPE*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 5545.
132. Landry, D.M., M.I. Hertz, and S.R. Thompson, *RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs*. Genes Dev, 2009. **23**(23): p. 2753-64.
133. Wicherska-Pawłowska, K., T. Wróbel, and J. Rybka, *Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(24).
134. Shen, C.R., et al., *Differential bicistronic gene translation mediated by the internal ribosome entry site element of encephalomyocarditis virus*. Biomed J, 2021. **44**(6 Suppl 1): p. S54-s62.
135. Ribeiro, S., et al., *Plasmid DNA size does affect nonviral gene delivery efficiency in stem cells*. Cell Reprogram, 2012. **14**(2): p. 130-7.
136. Riu, E., et al., *Histone Modifications are Associated with the Persistence or Silencing of Vector-mediated Transgene Expression In Vivo*. Molecular Therapy, 2007. **15**(7): p. 1348-1355.
137. Yamashita, Y., et al., *Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells*. Int J Cancer, 2003. **103**(5): p. 572-6.
138. Bowers, E.M., et al., *Virtual Ligand Screening of the p300/CBP Histone Acetyltransferase: Identification of a Selective Small Molecule Inhibitor*. Chemistry & Biology, 2010. **17**(5): p. 471-482.
139. Zhang, J. and Y. Shi, *An upstream open reading frame (5'-uORF) links oxidative stress to translational control of ALCAT1 through phosphorylation of eIF2 α* . Free Radical Biology and Medicine, 2024. **214**: p. 129-136.
140. Bentler, M., et al., *Modifying immune responses to adeno-associated virus vectors by capsid engineering*. Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 2023. **30**: p. 576-592.
141. Tai, C.H., et al., *Long-term efficacy and safety of eladocogene exuparvovec in patients with AADC deficiency*. Mol Ther, 2022. **30**(2): p. 509-518.
142. Prazeres Duarte Miguel, F. and A. Monteiro Gabriel, *Plasmid Biopharmaceuticals*. Microbiology Spectrum, 2014. **2**(6): p. 10.1128/microbiolspec.plas-0022-2014.
143. Shanmugasundaram, M., A. Senthilvelan, and A.R. Kore, *Recent Advances in Modified Cap Analogs: Synthesis, Biochemical Properties, and mRNA Based Vaccines*. The Chemical Record, 2022. **22**(8): p. e202200005.

144. Wen, Y. and A.J. Shatkin, *Cap methyltransferase selective binding and methylation of GpppG-RNA are stimulated by importin-alpha*. Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 2944-9.
145. Wang, Z., et al., *The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12663-8.
146. Plank, T.D. and J.S. Kieft, *The structures of nonprotein-coding RNAs that drive internal ribosome entry site function*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. **3**(2): p. 195-212.
147. Diaz-Toledano, R., G. Lozano, and E. Martinez-Salas, *In-cell SHAPE uncovers dynamic interactions between the untranslated regions of the foot-and-mouth disease virus RNA*. Nucleic Acids Research, 2017. **45**(3): p. 1416-1432.
148. Yang, Y. and Z. Wang, *IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome*. J Mol Cell Biol, 2019. **11**(10): p. 911-919.
149. Marques, R., R. Lacerda, and L. Romão, *Internal Ribosome Entry Site (IRES)-Mediated Translation and Its Potential for Novel mRNA-Based Therapy Development*. Biomedicines, 2022. **10**(8).
150. deLorimier, E., et al., *Pseudouridine Modification Inhibits Muscleblind-like 1 (MBNL1) Binding to CCUG Repeats and Minimally Structured RNA through Reduced RNA Flexibility*. J Biol Chem, 2017. **292**(10): p. 4350-4357.
151. Chen, R., et al., *Engineering circular RNA for enhanced protein production*. Nature Biotechnology, 2023. **41**(2): p. 262-272.
152. Thess, A., et al., *Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals*. Molecular Therapy, 2015. **23**(9): p. 1456-1464.
153. Gebre, M.S., et al., *Optimization of non-coding regions for a non-modified mRNA COVID-19 vaccine*. Nature, 2022. **601**(7893): p. 410-414.
154. Carneiro, S.P., et al., *Shaping the future from the small scale: dry powder inhalation of CRISPR-Cas9 lipid nanoparticles for the treatment of lung diseases*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2023. **20**(4): p. 471-487.
155. Shi, Z., et al., *Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide*. Molecular Cell, 2017. **67**(1): p. 71-83.e7.
156. McLellan, N.L. and R.A. Manderville, *Toxic mechanisms of microcystins in mammals*. Toxicol Res (Camb), 2017. **6**(4): p. 391-405.
157. Zola, H., et al., *CD molecules 2006--human cell differentiation molecules*. J Immunol Methods, 2007. **319**(1-2): p. 1-5.
158. Liu, Y. and H. Wang, *Biomarkers and targeted therapy for cancer stem cells*. Trends Pharmacol Sci, 2024. **45**(1): p. 56-66.

159. Kaseniit, K.E., et al., *Modular, programmable RNA sensing using ADAR editing in living cells*. Nature Biotechnology, 2023. **41**(4): p. 482-487.
160. Lenting, K., et al., *Glioma: experimental models and reality*. Acta Neuropathol, 2017. **133**(2): p. 263-282.

9. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Merkel bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat im Institut für biologische Informationsprozesse 2 (IBI-2) im Forschungszentrum Jülich zu promovieren. Vielen Dank, dass Sie sich stets umgehend Zeit genommen haben, wenn es etwas zu besprechen gab.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Bernd Hoffmann, der mir die Möglichkeit gegeben hat in diesem Thema, das mich schon seit meiner Bachelorarbeit fasziniert, meine Doktorarbeit anzufertigen. Du hattest immer eine offene Tür, eine positive Einstellung und gute Laune, wodurch auch in Phasen, in denen nicht alles reibungslos verlief, eine angenehme Arbeitsatmosphäre gewährleistet war. Ohne Dich wäre meine Arbeit und unsere Publikation in dieser Form niemals möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der seRNA Arbeitsgruppe bedanken: Sylvie Krüger, Sven Gerlach, Laura Wagner, Nils Hersch, Hajaani Manoharan, Dr. Lukas Lövenich, Martin Chilaj, Simone Stiefel, Moritz Walkenbach. Dabei gilt mein besonderer Dank für wissenschaftliche Vorarbeiten Dr. Marco Hoffmann.

Bei Herrn Prof. Dr. Jörg Höhfeld bedanke ich mich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens. Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Maja Köhn und Herrn Prof. Dr. Günter Mayer für die Prüfung meiner Arbeit bedanken.

Vielen Dank an Georg Dreissen für die Unterstützung bei der Auswertung von mikroskopischen Daten durch Softwareanalysen.

Ich möchte mich bei allen Kooperationspartnern bedanken, durch deren Hilfe diese Arbeit so vielseitig und umfassend wurde. Vielen Dank an Dr. Philipp Schmid und Dr. Hagen Richter (WACKER Chemie), Jan Henrik Klug und PD Dr. Dr. Albrecht Piiper (Uniklinik der Goethe Universität Frankfurt), Elke Barczak und Prof. Dr. Hildegard Büning (Medizinische Hochschule Hannover), Patrick Bohn, Dr. Anne-Sophie Gribbling-Burrer, Prof. Dr. Redmond P. Smyth (Helmholtz-Institut für RNA-basierte Infektionsforschung) und Dr. Carina Stegmayr (INM-4, Forschungszentrum Jülich), Dr. Helene L. Walter und Prof. Dr. Gereon R. Fink (INM-3, Forschungszentrum Jülich und Universität Köln).

Vielen Dank an meine Bürokollegen für die alltägliche gegenseitige Hilfestellungen Eric Platz-Baudin, Till Gronemann und Daniel Köninger und an alle anderen Kollegen des IBI-2.