

RNA-Interferenz

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man einen Mechanismus eukaryontischer Zellen, bei welchem die Expression eines Zielgens durch eine *small interfering RNA* (siRNA) supprimiert wird.¹⁻⁴ Evolutionär handelt es sich dabei um einen Schutzmechanismus des Immunsystems gegen Viren oder Transposons: Gelangt eine lange, doppelsträngige RNA (dsRNA) in eine eukaryontische Zelle, so wird diese durch das *RNase III Enzym* Dicer^{5, 6} in kleine RNA-Duplexe von 21 bis 23 Nukleotiden (nt) zerschnitten (siRNAs).^{5, 7} Anschließend werden diese Dicer-siRNA Komplexe durch das zelluläre Protein *transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) zum *RNA-induced silencing complex* (RISC) transferiert.^{8, 9} Nachfolgend wird der siRNA-Strang mit der schwächeren Bindungsenergie des 5'-Endes in den RISC-Komplex inkorporiert.¹⁰ Dabei sollte es sich um den *Antisense*-Strang der siRNA handeln, da dieser den RISC-Komplex über eine exakte Sequenzerkennung zur komplementären Ziel-mRNA führt.¹¹ Anschließend wird die Ziel-mRNA durch eine katalytische Untereinheit von RISC, *Argonaute 2* (Ago2), gespalten. Hierbei spielt die sog. *Piwi*-Domäne von Ago2 eine wesentliche Rolle,¹² da diese eine *RNase H-like* Endonuklease Aktivität besitzt, welche eine einzelne Phosphodiesterbindung im Rückgrad der Ziel-mRNA spalten kann.¹³

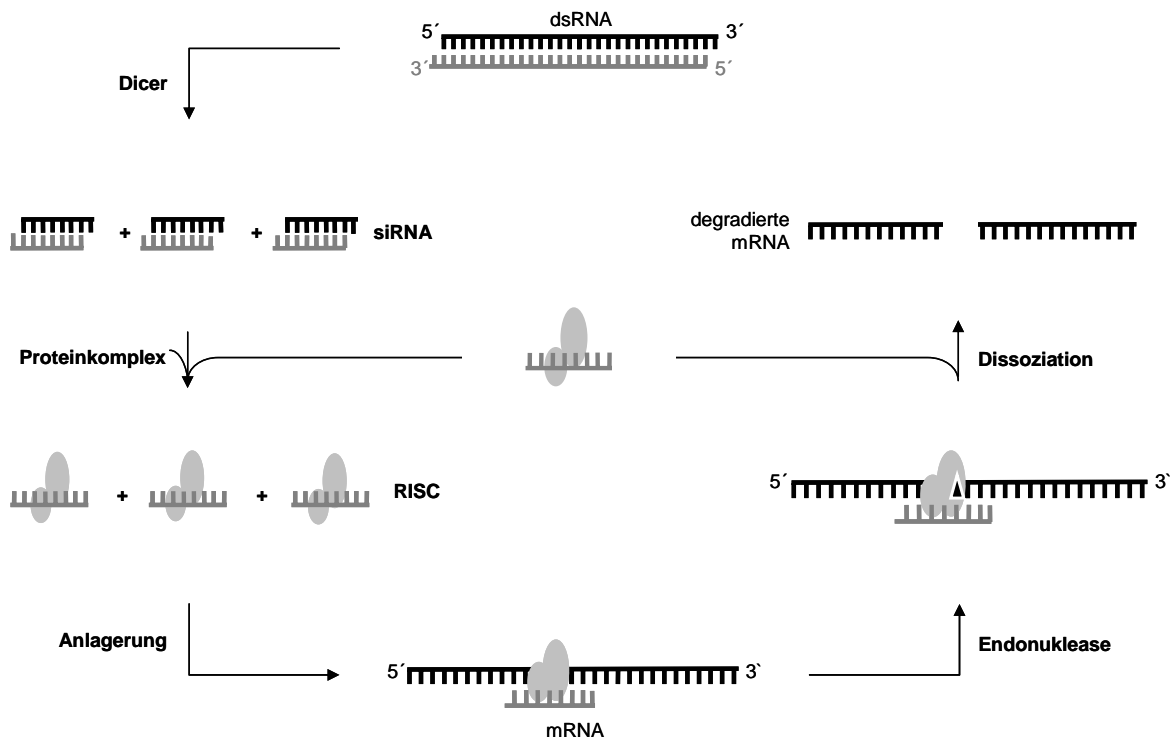


Abbildung 1: Schema der RNA-Interferenz.¹⁴ dsRNA wird durch Dicer in 21 bis 23 nt große siRNA-Duplexe zerschnitten. Der Strang mit der geringeren Bindungsenergie am 5'-Ende wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert. RISC wird durch den siRNA-Strang zur komplementären mRNA geführt und zerschneidet diese durch eine Endonuklease-Aktivität (schwarzes Dreieck). Nachdem die homologe mRNA degradiert wurde, löst sich der RISC wieder und durchläuft einen neuen Zyklus.

Alternative Wirkmechanismen

Neben dieser klassischen Variante, welche auch als post-transkriptionelle Expressions-Inhibition beschrieben wird,¹ kann die RNAi Maschinerie noch auf transkriptioneller¹⁵ und translationeller Ebene wirken.¹⁶ Der Mechanismus des *RNAi-induced transcriptional silencing* (RITS) ist noch nicht vollständig geklärt. In humanen Zellen können siRNAs, welche gegen eine Promotor-Sequenz gerichtet sind, die Transkription des Zielgens supprimieren. Dabei werden sowohl die DNA der Zielsequenz als auch Histone methyliert.^{15, 17} Unklar dabei ist, wie die siRNA aus dem Zytoplasma in den Zellkern gelangt. Es wird vermutet, dass ein aktiver Mechanismus für diesen Transport verantwortlich ist. Weiterhin könnte die siRNA während der Zellteilung in den Zellkern gelangen.¹⁸ Als Ursache der Translations-Inhibition wird eine fehlerhafte *Watson-Crick* Basenpaarung zwischen siRNA und Ziel-mRNA diskutiert (sog. *mismatch*).¹⁹ Die aktuelle Hypothese besagt, dass diese *mismatch* siRNAs zusammen mit einem Ago-Protein an der 3' untranslatierten Region (UTR) der mRNA binden. Aufgrund der fehlerhaften Basenpaarung kommt es jedoch nicht zur Spaltung der mRNA,^{20, 21} sondern zur Blockade der Translation. Zum anderen induziert dieser siRNA-Ago-Komplex eine frühzeitige Dissoziation der translatierenden Ribosomen von der mRNA, so dass es zum Abbruch der Translation kommt.¹⁶

Die Anwendung der RNAi *in vitro*

Die Art der Applikation von siRNAs ist für deren Effekt von großer Bedeutung. Im Laufe der letzten 10 Jahre wurden diverse Methoden für den Einsatz der RNAi *in vitro* etabliert. Dabei unterscheidet man prinzipiell zwischen *transienter*, *stabiler*, *konditioneller* und *induzierbarer* RNA-Interferenz. Dieses Kapitel soll einen kleinen Überblick über das Design von siRNAs und die derzeit verfügbaren

Systeme verschaffen sowie ihre Vor- und Nachteile diskutieren.

Design von siRNAs

Aufgrund empirischer Studien wurden vor ca. 6 Jahren Empfehlungen für das Design von siRNAs entwickelt; diese basieren auf strukturellen Eigenschaften und dienen als erste Orientierung. Demnach sollte jede siRNA zwischen 21 und 23 nt lang sein,²⁰ über einen Guanin/Cytosin-Gehalt von kleiner als 50 % verfügen,¹⁴ am 3'-Ende ein di-Nukleotid-(UU)-Überhang aufweisen²⁰ und möglichst innerhalb der ersten 100 bp *downstream* vom Startkodon nach zwei Adeninen liegen, wobei dieser letzte Punkt umstritten ist.¹⁴ Mittlerweile wurden diese Empfehlungen verfeinert:

(1) Da die Thermodynamik der siRNA eine wesentliche Rolle spielt, sollte das 3'-Ende der siRNA (Position 15 - 19 des *Sense* Strangs) mindestens ein Adenin/Uracil-Basenpaar (bp) aufweisen, um die Bindungsenergie in diesem Bereich zu senken und die Effektivität der siRNA zu erhöhen.^{22, 23} Aus dem gleichen Grund sollte das 5'-Ende der siRNA (Position 1 des *Sense* Strangs) ein Guanin/Cytosin-bp aufweisen.²³

(2) Weiterhin sollte an Position 3 des *Sense*-Strangs ein Adenin und an Position 13 des *Sense*-Strangs ein Guanin vorliegen; die Position 19 des *Sense*-Strangs sollte hingegen *kein* Guanin oder Cytosin aufweisen.²² Generell sollte das letzte Drittel des *Sense*-Strangs (Position 14 - 19) reichhaltig an Adenin und Uracil sein.²³

(3) Besonders wichtig scheint ein Uracil an Position 10 des *Sense*-Strangs zu sein, da die Ziel-mRNA an Position 10 zerschnitten wird und RISC - wie viele Endonukleasen²⁴ - bevorzugt 3' nach Uracil schneidet.²²

(4) Letztlich sollte bei der Auswahl der Sequenz darauf geachtet werden, dass weder Palindrome noch Wiederholungen stark vertreten sind. Diese

würden die Faltung von sekundären Strukturen begünstigen und somit die Konzentration an verfügbarer siRNA reduzieren.²² Zudem sollten Guanin/Cytosin-haltige Bereiche auf der gesamten siRNA vermieden werden.²³ Um unspezifischen Effekten vorzubeugen, sollten Homologien zwischen der ermittelten Sequenz der siRNA und anderen Genen ausgeschlossen werden.

Transiente RNA-Interferenz

Bei der *transienten* RNAi werden siRNAs durch spezielle Transfektionsreagenzien in die Zellen eingeschleust.¹⁴ Die Herstellung der siRNAs kann dabei durch drei verschiedene Methoden erfolgen. Bei der einfachsten und schnellsten Methode wird die siRNA durch chemische Synthese hergestellt (synthetische siRNAs).²⁵ Der Vorteil liegt darin, dass die so hergestellten siRNAs hochgradig rein sind. Jedoch ist die Synthese kostenintensiv, weshalb sich die Herstellung durch *in vitro* Transkription etabliert hat. Dabei werden von Oligonukleotiden ausgehend kleine RNA-Fragmente synthetisiert; diese lagern sich anschließend zu dsRNA zusammen und werden über eine RNase zur nativen siRNA prozessiert.²⁶ Für beide Methoden muss die Sequenz einer funktionierenden siRNA bekannt sein. Andernfalls bietet sich die enzymatische Synthese eines siRNA-Pools an. Dabei werden lange dsRNA-Fragmente durch das Enzym Dicer in multiple und speziell gegen das Zielgen gerichtete siRNAs geschnitten (di-siRNAs).²⁷ Die Transfektion dieser di-siRNAs führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Suppression des Zielgens, wobei es aufgrund der vielen unterschiedlichen siRNAs zu unspezifischen Effekten kommen kann (siehe Kapitel 0). Ein genereller Nachteil der *transienten* RNAi ist die nur temporäre Suppression des Zielgens, welche – abhängig von der siRNA und der Halbwertszeit des Zielproteins²⁸ – in der Regel zwischen 3 und 5 Tagen liegt.²⁹ Primär ist dieser Effekt auf die

Proliferation der Zellen zurückzuführen, da mit jeder Zellteilung die Menge an verfügbaren siRNAs halbiert wird.³⁰ Der Abbau von siRNAs durch zytoplasmatische RNasen ist in diesem Zusammenhang von sekundärer Bedeutung, weshalb auch chemische Modifikationen³¹⁻³³ das Zeitfenster der Suppression nur bedingt verlängern können.

Stabile RNA Interferenz

Bei der *stabilen* RNAi wird ein Vorläufermolekül der siRNA direkt in der Zelle exprimiert, welches als sog. *short-hairpin* RNA (shRNA) bezeichnet wird.³⁴ Die Matrize für das ca. 50 nt lange Molekül setzt sich aus dem *Sense*-Strang einer siRNA und dem reversen Komplement zusammen, welche durch einen 8 nt langen *Spacer* voneinander getrennt werden.³⁵ Wird diese lineare Matrize transkribiert, kommt es aufgrund der intramolekularen Komplementarität des Moleküls zur spontanen Ausbildung einer zweidimensionalen Haarnadel-Struktur, welche anschließend durch Dicer zu siRNAs prozessiert wird.³⁶ Die Transkription erfolgt dabei durch die RNA-Polymerase III (Pol III) und wird durch ein Poly-Thymin-Signal (T5) terminiert.^{34, 37} Aus diesem Grund muss die Matrize unter die Kontrolle eines Pol III Promotors gestellt und am 3'-Ende durch ein T5-Signal flankiert werden.³⁸ Der Transfer dieser Konstrukte in die Zelle erfolgt nach Klonierung mit Hilfe von Plasmiden^{39, 40} oder viralen Vektoren.^{41, 42} Der Vorteil dieser Systeme liegt in der permanenten Expression der shRNA bzw. siRNA, wodurch eine kontinuierliche Suppression des Zielgens erreicht werden kann. Nachteilig könnte sich hingegen eine *Übersättigung* der Zelle durch siRNAs auswirken, da diese zur Auslösung von unspezifischen Effekten führen kann (siehe Kapitel 0).⁴³

Konditionelle und induzierbare RNA

Interferenz

Bei der *konditionellen* bzw. *induzierbaren* RNAi lässt sich die Expression einer shRNA zu einem definierten Zeitpunkt anschalten. In der Regel wird dies durch eine Modifikation des Pol III Promotors erreicht, wobei Elemente des Cre/LoxP bzw. Tetrazyklin-Systems in die Promotor-Sequenz eingebaut werden.

Bei dem Cre/loxP-System handelt es sich um ein Rekombinationssystem, durch welches DNA-Sequenzen gezielt entfernt werden können. Es besteht aus kleinen DNA-Fragmenten (sog. loxP-sites), welche durch das Enzym Cre-Rekombinase (*cyclization recombination*) miteinander rekombiniert werden können. Die dazwischen liegende DNA-Sequenz wird dabei deletiert.⁴⁴ Die Bereitstellung der Cre-Rekombinase erfolgt durch einen Expressionsvektor, welcher je nach Fragestellung über einen konstitutiven⁴⁵ oder induzierbaren⁴⁶ Promotor verfügt. Dieses System nutzt man bei der *konditionellen* RNAi, indem in die Promotor-Sequenz ein mit loxP-Sites flankiertes (*gefloxtes*) DNA-Fragment eingebaut wird. Nach Integration der *gefloxten* DNA verliert der Promotor seine Aktivität, weshalb eine Transkription der shRNA ausbleibt. Durch die Cre-vermittelte Rekombination der beiden loxP-sites wird das *gefloxte* Fragment deletiert, wodurch der Promotor seine Aktivität zurück erlangt und nachfolgend die shRNA transkribiert wird.⁴⁵⁻⁴⁸ Weiterhin wurden Varianten beschrieben, bei denen das *gefloxte* Segment entweder zwischen Transkriptionsstartstelle und shRNA-Matrize⁴⁹ oder direkt in die *spacer*-Region einer shRNA-Matrize integriert wurde.^{50, 51}

Neben diesen *konditionellen* Systemen wurden *induzierbare* Systeme beschrieben, durch welche die Expression einer shRNA sowohl ein- als auch wieder ausgeschaltet werden kann. In den meisten Fällen basieren diese Systeme auf dem Tetrazyklin-

System (Tet-System),⁵² wobei zwischen dem Tet^{ON} und Tet^{OFF} System unterschieden wird. Bei dem Tet^{ON}-System bindet ein Tetrazyklin-Repressor (Tet^R) an die Sequenz eines Tetrazyklin-Operators (TetO), welcher in die Pol III Promotor-Region des shRNA-Expressionskonstruktes integriert wurde. Es kommt zur physikalischen Blockade von Pol III, wodurch die Expression der shRNA nicht mehr erfolgen kann – das System ist *ausgeschaltet*. In der Gegenwart des Tetrazyklin-Antibiotikums Doxyzyklin (Dox) ändert der Tet^R seine Konformation und löst sich vom TetO, so dass es zur Pol III vermittelten Expression der shRNA kommt – das System ist *angeschaltet*.⁵³⁻⁵⁶ Somit ist es möglich, die Expression der shRNA durch die Applikation von Doxyzyklin zu kontrollieren. Bei Tet^{OFF}-Systemen wird hingegen die Expression der shRNA in Gegenwart von Doxyzyklin verhindert.⁵⁷

Wenn siRNAs die Zelle verwirren –

Off-Target Effects

Je komplexer ein System ist, desto anfälliger ist es auch für Fehler. Das ist bei der RNA Interferenz nicht anders; speziell unter dem Aspekt, dass siRNAs in fundamentale Regulationsmechanismen der Zelle eingreifen. So kann beispielsweise vorgestellte Mechanismus der „Translations-Inhibition“ auch unspezifische Effekte, sog. *off-target effects*, hervorrufen. Dies ist der Fall, wenn ein *mismatch* zwischen siRNA und Ziel-mRNA auftritt. So wurde beschrieben, dass eine Übereinstimmung von 11 - 15 aufeinander folgenden Nukleotiden bereits ausreichen, um eine unspezifische Gen-Suppression zu induzieren.⁵⁸ Die gleiche Studie berichtet jedoch von einer parallelen Reduktion des korrespondierenden mRNA-Levels.⁵⁸ Somit bleibt zu diskutieren, ob sich dieser durch *mismatch* siRNA hervorgerufene *off-target effect* tatsächlich bzw. ausschließlich auf translationaler Ebene manifestiert.

Weitaus besser beschrieben ist ein *off-target effect*, welcher mit der Aktivierung des Interferon-Systems einhergeht.^{43, 59, 60} Dabei handelt es sich um eine Antwort des Immunsystems, welche u.a. durch das Eindringen von doppelsträngiger RNA (z.B. ein Virus) in eukaryontische Zellen induziert wird. Über die Aktivierung der RNA-abhängigen Proteinkinase (PKR) und Phosphorylierung des Translationsfaktors *eukaryontischer Initiationsfaktor 2* (eIF2) wird die Proteinbiosynthese unspezifisch inhibiert.⁶¹ Zusätzlich wird die Ribonuklease L (RNase L) über die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS) stimuliert, was zu einem unspezifischen Abbau von RNA führt.⁶² Die dsRNA induzierte Interferonantwort führt zu einer Stimulation der Apoptose.⁶³ Zunächst ist man davon ausgegangen, dass siRNAs aufgrund ihrer Länge nicht in der Lage sind, eine Interferon-Antwort auszulösen.^{7, 64} Mit der Zeit wurde jedoch das Gegenteil belegt.^{43, 60, 65}

Die Ursachen für diese unspezifischen Effekte sind noch nicht vollständig geklärt. Als wichtiger Faktor wird in diesem Zusammenhang das Design der siRNA (siehe 0) und die Überprüfung möglicher Homologien zu anderen Sequenzen angesehen. Weiterhin sollte darauf geachtet werden, dass die Endkonzentration der siRNA *in vitro* und *in vivo* möglichst gering ist; zudem sollte die Methode des Transfers optimiert worden sein.⁶⁶

Ein weiterer *off-target effect* könnte durch Inkorporation des *Sense*-Strangs in den RISC-Komplex verursacht werden (vgl. Kapitel 0). In ersten Untersuchungen wurden deshalb siRNAs durch *locked nucleic acid* (LNA)⁶⁷ chemisch modifiziert (siLNAs).³² Dabei werden das 2'-Sauerstoffatom und 4'-Kohlenstoffatom des Ribonukleotids durch eine Methylenbrücke miteinander verbunden; als Folge kommt es zur signifikanten Erhöhung der Bindungsenergie des jeweiligen Nukleotids. Durch die Modifikation der siRNA am 5'-Ende des *Sense*-Strangs kann die

Inkorporation in den RISC-Komplex deutlich vermindert werden. Zudem geht man davon aus, dass ein LNA-modifizierter siRNA-Strang die Aktivität von RISC negativ beeinflusst. Somit kann ein unspezifischer Abbau von mRNA durch eine ungewollte Inkorporation des *falschen* Strangs deutlich reduziert werden.³² Eine andere Strategie wird beim Einsatz von *Duplex*-siRNAs verfolgt. Dabei handelt es sich um siRNAs, bei denen *beide* Stränge (*Sense und Antisense*) gegen die komplementäre Ziel-mRNA gerichtet sind. Der Aufbau dieser *Duplex*-siRNAs ist partiell palindromisch oder partiell komplementär; zudem verfügen sie über die charakteristischen 3'-überhängenden Enden und weisen eine den siRNAs ähnliche Stabilität auf. Da jeder Strang einer *Duplex*-siRNA für ein anderes Zielgen kodieren kann, können mit dieser Methode zwei verschiedene Gene parallel ausschalten werden.⁶⁸

RNAi goes *in vivo* – Mausmodelle auf dem Vormarsch

Seit der Entdeckung der RNAi im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* durch Andrew Fire (1998)¹ hat sich diese Technologie rasant weiterentwickelt. So ist es bereits drei Jahre später (2001) zum Durchbruch gekommen, als die Arbeitsgruppe um Thomas Tuschl die Anwendung der RNAi in humanen Zellen demonstrierte.⁷ Ein weiteres Jahr später (2002) wurden durch David Lewis erste *in vivo* Untersuchungen in der Maus durchgeführt. Dabei injizierte Lewis ein Luciferase (*luc*) exprimierendes Plasmid zusammen mit synthetischen *luc*-siRNAs in die Schwanzvene der Maus. Nach 24 Stunden untersuchte er die Expression von *luc* in verschiedenen Organen und fand dabei eine *luc*-Suppression von bis zu 90 %.⁶⁹ Somit war der Grundstein für die RNA Interferenz *in vivo* gelegt. In den folgenden Jahren wurde an Mäusen und Ratten gezeigt, dass durch intravenöse⁷⁰⁻⁷⁴ oder intraperitoneale^{75, 76} Injektion

von siRNAs eine systematische Suppression des jeweiligen Zielgens in verschiedenen Organen erreicht werden kann. Die Effizienz der siRNAs konnte dabei durch chemische Modifikationen,⁷⁷ den Einschluss in und Transfer durch Liposomen,⁷² sowie durch parallele Injektion mit Transfektionsreagenzien^{73, 76} verbessert werden. Auch im Bereich der lokalen Applikation entwickelte sich die Methodik rasch weiter; so wurden siRNAs beispielsweise direkt hinter das Auge,⁷⁸ in das Gehirn⁷⁷ oder die Nase⁷⁹ appliziert, sowie durch Elektroporation in Muskelgewebe,⁸⁰ in Embryonen⁸¹ und in die Niere⁸² eingebracht. Eine Verbesserung der Transferrate und der Effizienz konnte durch den viralen Transfer von shRNA-Konstrukten erreicht werden.⁸³⁻⁸⁵

Die erste auf RNAi basierende Mausmutante wurde im Jahre 2002 von Hidetoshi Hasuwa beschrieben.⁸⁶ Seitdem wurden ca. 20 verschiedene Modelle etabliert, wobei für die Generierung transgener Mäuse die pronukleare Injektion von DNA-Konstrukten,⁸⁶ Infektion von Zygoten⁸³ oder ES-Zellen⁴⁷ mit lentiviralen Vektoren, zufällige Integration in ES-Zellen,⁸⁷ sowie gezielter *knock-in* eines DNA-Konstruktes in ES-Zellen durch einen Rekombinase-vermittelten Kassetten Austausch⁸⁸ oder homologe Rekombination⁴⁸ zum Einsatz kamen. Diese Mausmutanten basieren auf der Integration von shRNA-Expressionskonstrukten, wobei diese zufällig (bei pronuklearer Injektion, viraler Infektion und zufälliger Integration) oder gezielt (bei Rekombinase-vermitteltem Kassetten Austausch oder homologer Rekombination) erfolgen kann.

Wie bereits für die Anwendung der RNAi *in vitro* beschrieben, kann die Expression der shRNA durch unterschiedliche Promotoren erfolgen. Für die *in vivo* Applikation wurden konstitutive⁸⁶ und konditionelle (Cre/loxP)⁴⁸ Promotoren beschrieben. Bisher wurde dabei die für die Aktivierung des Cre/loxP-Systems erforderliche Cre-Rekombinase

lediglich unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors gestellt;^{46, 49} die Verwendung einer gewebespezifischen Cre-Rekombinase wurde hingegen noch nicht beschrieben. Die Verwendung eines Tet-induzierbaren Pol III Promotors *in vivo* wurde bisher nur in einer Arbeit beschrieben.⁸⁹

Literaturverzeichnis

1. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11 (1998).
2. Hutvagner, G. & Zamore, P. D. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12, 225-32 (2002).
3. Sharp, P. A. RNA interference--2001. *Genes Dev* 15, 485-90 (2001).
4. Waterhouse, P. M., Wang, M. B. & Lough, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-42 (2001).
5. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-6 (2001).
6. Ketting, R. F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-9 (2001).
7. Elbashir, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8 (2001).
8. Chendrimada, T. P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-4 (2005).
9. Haase, A. D. et al. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6, 961-7 (2005).
10. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. & Tuschl, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-74 (2002).
11. Chiu, Y. L. & Rana, T. M. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* 10, 549-61 (2002).
12. Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q. & Hannon, G. J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 2733-42 (2002).
13. Kim, K., Lee, Y. S. & Carthew, R. W. Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *Rna* 13, 22-9 (2007).
14. Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. & Tuschl, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213 (2002).
15. Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E. & Looney, D. J. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305, 1289-92 (2004).
16. Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J. & Sharp, P. A. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21, 533-42 (2006).
17. Morris, K. V. siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code. *Cell Mol Life Sci* 62, 3057-66 (2005).
18. Kawasaki, H., Taira, K. & Morris, K. V. siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle* 4, 442-8 (2005).
19. Doench, J. G., Petersen, C. P. & Sharp, P. A. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17, 438-42 (2003).
20. Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-88 (2001).
21. Martinez, L. A. et al. Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14849-54 (2002).
22. Reynolds, A. et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326-30 (2004).
23. Ui-Tei, K. et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32, 936-48 (2004).
24. Donis-Keller, H. Site specific enzymatic cleavage of RNA. *Nucleic Acids Res* 7, 179-92 (1979).
25. Micura, R. Small interfering RNAs and their chemical synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 2265-9 (2002).
26. Yu, J. Y., DeRuiter, S. L. & Turner, D. L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6047-52 (2002).
27. Provost, P. et al. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo J* 21, 5864-74 (2002).
28. Medema, R. H. Optimizing RNA interference for application in mammalian cells. *Biochem J* 380, 593-603 (2004).
29. Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E. & Prydz, H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30, 1757-66 (2002).
30. Maliyekkel, A., Davis, B. M. & Roninson, I. B. Cell cycle arrest drastically extends the duration of gene silencing after transient expression of short hairpin RNA. *Cell Cycle* 5, 2390-5 (2006).
31. Czauderna, F. et al. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31, 2705-16 (2003).
32. Elmen, J. et al. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 33, 439-47 (2005).
33. Braasch, D. A. et al. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42, 7967-75 (2003).

34. Kunath, T. et al. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol* 21, 559-61 (2003).
35. Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. & Conklin, D. S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-58 (2002).
36. Kawasaki, H. & Taira, K. Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res* 31, 700-7 (2003).
37. Paul, C. P., Good, P. D., Winer, I. & Engelke, D. R. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20, 505-8 (2002).
38. Tuschl, T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 20, 446-8 (2002).
39. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-3 (2002).
40. Sui, G. et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5515-20 (2002).
41. Devroe, E. & Silver, P. A. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* 2, 15 (2002).
42. Sliva, K. & Schmierle, B. S. Stable integration of a functional shRNA expression cassette into the murine leukemia virus genome. *Virology* 351, 218-25 (2006).
43. Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L. & Iggo, R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34, 263-4 (2003).
44. Tronche, F., Casanova, E., Turiault, M., Sahly, I. & Kellendonk, C. When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett* 529, 116-21 (2002).
45. Tiscornia, G., Tergaonkar, V., Galimi, F. & Verma, I. M. CRE recombinase-inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7347-51 (2004).
46. Coumoul, X., Li, W., Wang, R. H. & Deng, C. Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res* 32, e85 (2004).
47. Ventura, A. et al. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10380-5 (2004).
48. Oberdoerffer, P. et al. Efficiency of RNA interference in the mouse hematopoietic system varies between cell types and developmental stages. *Mol Cell Biol* 25, 3896-905 (2005).
49. Chang, H. S., Lin, C. H., Chen, Y. C. & Yu, W. C. Using siRNA technique to generate transgenic animals with spatiotemporal and conditional gene knockdown. *Am J Pathol* 165, 1535-41 (2004).
50. Kasim, V., Miyagishi, M. & Taira, K. Control of siRNA expression using the Cre-loxP recombination system. *Nucleic Acids Res* 32, e66 (2004).
51. Fritsch, L. et al. Conditional gene knock-down by CRE-dependent short interfering RNAs. *EMBO Rep* 5, 178-82 (2004).
52. Freundlieb, S., Schirra-Muller, C. & Bujard, H. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med* 1, 4-12 (1999).
53. van de Wetering, M. et al. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* 4, 609-15 (2003).
54. Matsukura, S., Jones, P. A. & Takai, D. Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res* 31, e77 (2003).
55. Czauderna, F. et al. Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res* 31, e127 (2003).
56. Kuninger, D. et al. Gene disruption by regulated short interfering RNA expression, using a two-adenovirus system. *Hum Gene Ther* 15, 1287-92 (2004).
57. Raoul, C., Barker, S. D. & Aebischer, P. Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther* 13, 487-95 (2006).
58. Jackson, A. L. et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635-7 (2003).
59. Hornung, V. et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11, 263-70 (2005).
60. Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. & Williams, B. R. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5, 834-9 (2003).
61. Levin, D. & London, I. M. Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1121-5 (1978).
62. Pandey, M., Bajaj, G. D. & Rath, P. C. Induction of the interferon-inducible RNA-degrading enzyme, RNase L, by stress-inducing agents in the human cervical carcinoma cells. *RNA Biol* 1, 21-7 (2004).
63. Gil, J. & Esteban, M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5, 107-14 (2000).
64. Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. & Morgan, R. A. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9742-7 (2001).
65. Judge, A. D. et al. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23, 457-62 (2005).

66. Aigner, A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol* 124, 12-25 (2006).
67. Kauppinen, S., Vester, B. & Wengel, J. Locked nucleic acid: high-affinity targeting of complementary RNA for RNomics. *Handb Exp Pharmacol*, 405-22 (2006).
68. Hossbach, M., Gruber, J., Osborn, M., Weber, K. & Tuschl, T. Gene silencing with siRNA duplexes composed of target-mRNA-complementary and partially palindromic or partially complementary single-stranded siRNAs. *RNA Biol* 3, 82-9 (2006).
69. Lewis, D. L., Hagstrom, J. E., Loomis, A. G., Wolff, J. A. & Herweijer, H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32, 107-8 (2002).
70. McCaffrey, A. P. et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 21, 639-44 (2003).
71. Song, E. et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9, 347-51 (2003).
72. Morrissey, D. V. et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23, 1002-7 (2005).
73. Hassan, A. et al. Small interfering RNA-mediated functional silencing of vasopressin V2 receptors in the mouse kidney. *Physiol Genomics* 21, 382-8 (2005).
74. Soutschek, J. et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-8 (2004).
75. Sorensen, D. R., Leirdal, M. & Sioud, M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 327, 761-6 (2003).
76. Verma, U. N., Surabhi, R. M., Schmaltieg, A., Becerra, C. & Gaynor, R. B. Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 9, 1291-300 (2003).
77. Dorn, G. et al. siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res* 32, e49 (2004).
78. Reich, S. J. et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 9, 210-6 (2003).
79. Zhang, X. et al. Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J Biol Chem* 279, 10677-84 (2004).
80. Golzio, M., Mazzolini, L., Moller, P., Rols, M. P. & Teissie, J. Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery. *Gene Ther* 12, 246-51 (2005).
81. Bai, J. et al. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* 6, 1277-83 (2003).
82. Takabatake, Y. et al. Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease. *Gene Ther* 12, 965-73 (2005).
83. Rubinson, D. A. et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33, 401-6 (2003).
84. Hommel, J. D., Sears, R. M., Georgescu, D., Simmons, D. L. & DiLeone, R. J. Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9, 1539-44 (2003).
85. Krom, Y. D., Fallaux, F. J., Que, I., Lowik, C. & van Dijk, K. W. Efficient in vivo knock-down of estrogen receptor alpha: application of recombinant adenovirus vectors for delivery of short hairpin RNA. *BMC Biotechnol* 6, 11 (2006).
86. Hasuwa, H., Kaseda, K., Einarsdottir, T. & Okabe, M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 532, 227-30 (2002).
87. Carmell, M. A., Zhang, L., Conklin, D. S., Hannon, G. J. & Rosenquist, T. A. Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol* 10, 91-2 (2003).
88. Seibler, J. et al. Single copy shRNA configuration for ubiquitous gene knockdown in mice. *Nucleic Acids Res* 33, e67 (2005).
89. Seibler, J. et al. Reversible gene knockdown in mice using a tight, inducible shRNA expression system. *Nucleic Acids Res* (2007).

Kommentare und/oder Anregungen bitte per Email an webmaster@boris-thurisch.de schicken.