

V. Thesen

A. Thesen zu Mechanismus und Funktion endogener antisense RNA

Wie könnte basierend auf den vorliegenden Ergebnissen ein Modell zur Funktionsweise von endogener antisense RNA aussehen?

A. 1. Verstärkung der Translation durch endogene antisense RNA

Es ist beispielsweise möglich, dass endogene antisense RNA-Transkripte der internen Amplifikation des Signals zur Proteinsynthese dienen. Hierbei wäre denkbar, dass eine RNA-abhängige RNA-Polymerase komplementär an der sense RNA einen antisense Strang synthetisiert. Bei diesem Prozess würden die nachgewiesenen RNA-Duplexe entstehen (vgl. Kapitel IV. B. 4 Seite 58). Teilen sich diese beiden Stränge abermals und es erfolgt eine erneute "RNA-Replikation" beider Nukleinsäurestränge, würde es zu einem exponentiellen Anstieg des Signals zur Translation eines Proteins kommen. Die Hypothese der "RNA-Replikation" und der damit verbundenen Entwindung des Moleküls würde auch einen Hinweis darauf geben, warum der Nachweis von RNA-Duplexen experimentell so schwierig zu führen ist. Weitere Argumente für diese Hypothese ist zum einen die Tatsache, dass insgesamt zu über 80% der Sequenz des $\beta 1$ -adrenergen Rezeptors endogene antisense RNA nachgewiesen wurde und diese zur sense RNA vollständig komplementär war.

In dem hier beschriebenen hypothetischen Modell müsste das wertvolle "Original des genetischen Speichers DNA" weniger häufig transkribiert werden, um die gleiche Menge an Protein zu translatieren. Die Transkription ist ein aufwendiger Prozess, bei welchem jedes Mal die DNA in der "Transkriptionsblase" entwunden, von der RNA-Polymerase gelesen und nachfolgend wieder in die Doppelhelixstruktur verwunden wird. Ein Prozess an dem viele Enzyme und Transkriptionsfaktoren beteiligt sind und der damit auch störanfällig ist. Möglicherweise hätte daher die antisense RNA-abhängige mRNA-Synthese Vorteile hinsichtlich des Auftretens von Mutationen in der DNA. Bei an der Zellmembran in großer Anzahl vorkommenden Proteinen, deren Anzahl in Abhängigkeit von den extrazellulären Verhältnissen hoch reguliert ist und daher hoch volatil ist, hätte dies theoretisch enorme Vorteile. Nicht bei jeder Änderung müsste aufwendig und risikoreich (Mutationen) der "kostbare Original-Speicher DNA" transkribiert werden. Zudem entfielen das aufwendige posttranskriptionale Prozessing der mRNA in diesem Fall. Es würde bereits eine gewisse Anzahl von "billigen RNA-Kopien" existieren, aus welchen in sehr kurzer Zeit durch

Generierung von Kopien der Kopien eine immense Anzahl von translatierbaren mRNA-Molekülen entstehen könnte. Damit würde die endogene antisense RNA als "Amplifikator der molekularen Signals zur Proteinsynthese" fungieren und gleichzeitig zu einer "Entlastung der Transkription der DNA" beitragen.

Diese Amplifikation des genetischen Signals könnte dabei durchaus erst im Zytoplasma erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die endogene antisense RNA polyadenyliert ist (vgl. Kapitel IV. B. 3 Seite 57), was als Hinweis auf einen Transport ins Zytoplasma gewertet werden kann. Darüber hinaus konnte endogene antisense RNA in dieser Arbeit tatsächlich im Nukleus und im Zytoplasma nachgewiesen werden (vgl. Kapitel IV. C. 2 Seite 61).

Das grundsätzliche Prinzip der Verstärkung des genetischen Signals ist dabei nicht neu. Es erfolgt beispielsweise bereits über die Bindung mehrerer Ribosomen an eine mRNA. An einem solchen Polysom entstehen nach Transkription einer einzigen mRNA mehrere Kopien des gleichen Proteins.

Aber nicht nur eine Verstärkung des genetischen Signals ist durch endogene antisense RNA vorstellbar.

A. 2. Inhibition der Translation durch endogene antisense RNA / RNA-Interferenz

Als *RNA Interference* (RNAi) wird der Mechanismus bezeichnet, welcher erstmals beobachtet wurde, nachdem doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* injiziert wurde und zu einer spezifischen Inhibition von Genen führte, welche in ihrer Sequenz zu dieser dsRNA hohe Komplementarität aufwiesen [Fire *et al.* 1998]. Dabei kommt es offenbar zunächst zu einer Spaltung dieser dsRNA in Fragmente einer Länge zwischen 21 bis 26 Nukleotiden, den so genannte short interfering RNAs (siRNA) [Bernstein *et al.* 2001a, Grishok *et al.* 2001, Hannon *et al.* 2002, Hutvagner *et al.* 2002] (vgl. Kapitel I. C. 4 Seite 14 in der Einleitung). Die Assoziation von siRNA mit RISC ermöglicht es über Watson-Crick Basenpaarungen, mRNA als homologe Sequenzen der siRNA zu identifizieren und deren Degradation bzw. Inhibition zu vermitteln [Hammond *et al.* 2000, Bernstein *et al.* 2001, Hutvagner *et al.* 2002, Hannon *et al.* 2002].

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen RNA-Duplexe (vgl. Kapitel IV. B. 4 Seite 58) könnten möglicherweise endogene Formen der beschriebenen dsRNA-Strukturen darstellen. Die RNA-Duplexe wären dann das Substrat des Dicer-Enzyms und würden in kurze RNA-Fragmente gespalten werden. Jeweils der antisense Strang könnte nun mit der komplementären mRNA durch Ausbildung kurzer doppelsträngiger RNA-Abschnitte zur Inhibition der Proteinsynthese führen, wie in den Arbeiten zum Mechanismus der RNA-Interferenz bereits postuliert wurde [Hammond

et al. 2000, Bernstein *et al.* 2001, Hutvagner *et al.* 2002, Hannon *et al.* 2002].

Somit würde endogene antisense RNA sowohl als Amplifikator des genetischen Signals als auch über den Mechanismus der RNA-Interferenz als Inhibitor bei der Signaltransduktion von der DNA zum Protein fungieren.

A. 3. Schutzfunktion

Eine weitere theoretische Überlegung ist, dass im Zytosol vorhandene antisense RNA-Moleküle gerade translatierte mRNA Moleküle "auffangen" und vor Degradation schützen. Über komplementäre Basenpaarung mit der sense RNA würde es zur Bildung eines sense-antisense Duplexes kommen, welcher weniger Nukleasen-sensibel sein könnte. Damit käme man gleichzeitig einer Antwort auf die Frage näher, wie es der Zelle gelingt, fremde z.B. virale RNA, welche in die Zelle eingedrungen ist, von eigener RNA zu unterscheiden. Virale RNA besteht aus den gleichen molekularen Bestandteilen, wie die eigene RNA. Wie können Nukleasen diese chemisch gleichen Stoffe unterscheiden? Es ist bekannt, dass Nukleasen bevorzugt einzelsträngige RNA degradieren, doppelsträngige DNA und RNA jedoch relativ resistent gegen ihren Abbau sind. Möglicherweise ist die antisense RNA eine Art Schutz und gleichzeitig Erkennungsstelle für eigene RNA. Nur Transkripte, welche zellintern transkribiert wurden, besitzen eine antisense RNA, können RNA-RNA Duplexe bilden und sind vor der Degradation durch Nukleasen geschützt. Damit hätte die endogene antisense RNA formal die Funktion einer Art "posttranskriptionalen Immunsystems". Sie würde dann quantitativ theoretisch jeweils im Verhältnis von 1:1 mit der sense RNA vorkommen. Um diese Hypothesen zu bestätigen sind jedoch umfangreiche weitere Untersuchungen notwendig.

A. 4. Evolutionärer Vorteil

Auch aus evolutionärer Sicht wäre die Amplifikation des genetischen Signals sinnvoll. "Fehler" oder "Modifikationen" bei der "Transkription der mRNA" oder "RNA-Replikation" würden in veränderten Proteinen resultieren, doch deren Funktionsfähigkeit könnte zunächst einmal erprobt werden. Neben den mutierten Transkripten würde innerhalb einer Zelle auch immer gleichzeitig der Wildtyp existieren, sodass eine Mutation im "Ribotyp" nicht fatal oder letal für die Zelle enden muss. Die Zelle mit diesen veränderten Proteinen wäre der natürlichen Auslese ausgesetzt, ohne dass sich die veränderte Gensequenz schon in der Vererbungslinie manifestiert hätte. Nachfolgende Mechanismen könnten dann je nach Bewährung der Veränderung dafür sorgen, dass sie in die Sequenz der DNA übernommen wird [Herbert *et al.* 1999], auf Nachbarzellen übertragen bzw. im ganzen Organismus verteilt werden.

Dass eine solche Übernahme von Gensequenzen von RNA in DNA möglich ist, vermuten bereits Rich und Herbert. Auch sie postulieren, dass die verschiedenen Ribotypen, welche einem Genotyp entstammen können, auf der Basis des Phänotyps, den sie hervorrufen, Angriffspunkte für die natürliche Selektion seien. Aus evolutionärer Sicht wäre diese Selektion widersinnig, so vermuten sie weiter, würden die erfolgreichen Ribotypen nicht auch weitervererbt, also in DNA umgeschrieben werden [Herbert *et al.* 1999]. RNA-abhängige RNA-Polymerasen sind bei Viren weit verbreitet [Castro *et al.* 2005, Ogino *et al.* 2004, Moradpour *et al.* 2004, Kukkonen *et al.* 2004] und offenbar auch bei Hefen nachweisbar [Laurila *et al.* 2005]. Ein Nachweis bei Eukaryonten gelang allerdings bisher nicht.

Dass die Ausbreitung von sense-antisense RNA-Duplexen innerhalb eines Organismus möglich ist, zeigten Untersuchungen an *Caenorhabditis elegans*. Doppelsträngige RNA verbreiteten sich innerhalb des Organismus und führten zu einer systemischen Inhibition der Genexpression [Timmons *et al.* 1998, Winston *et al.* 2002].

B. Thesen zur klinischen Relevanz der Ergebnisse

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz korreliert der Schweregrad der Erkrankung eng mit dem Abfallen der Dichte der β_1 -adrenergen Rezeptoren und deren Funktion [Brown *et al.* 1992]. Daher ist es aus klinischer Perspektive wichtig, den Mechanismus der Downregulation des β_1 -adrenergen Rezeptors noch besser zu verstehen. Die Entdeckung von endogener antisense RNA beim β_1 -adrenergen Rezeptor und ihre Rolle bei der Regulation der Genexpression liefert hierzu einen Beitrag.

B. 1. Erste klinische Studien basieren auf antisense Technologie

Dieser Beitrag gewinnt in sofern an Bedeutung als dass bereits klinische Studien basierend auf der antisense Technologie durchgeführt werden. Hier konzentrierte man sich zunächst auf die Suche nach neuen therapeutischen Strategien gegen Erkrankungen wie AIDS [Akhtar *et al.* 1996] oder Krebs [Dachs *et al.* 1997, Wagner RW *et al.* 1994, Crooke *et al.* 1992, 1998] und genetische Erkrankungen [Yla *et al.* 1997].

In Deutschland wird beispielsweise die Wirksamkeit und Sicherheit der systemischen Anwendung eines Antisense-Oligonukleotids gegen TGF- β in der 2005 angelaufenen AP-12009-G004 Phase I Studie (multinationale, multizentrische, offene, aktiv kontrollierte, randomisierte Parallelgruppen-Dosisfindungsstudie) bei Patienten mit Rezidiven hoch maligner Gliome an vier deutschen Zentren geprüft (Berlin, Ulm, München, Münster). Es soll der zielgerichteten Behand-

lung besonders bösartiger Tumore, wie dem Pankreaskarzinom, dem malignen Melanom und malignen Gliom dienen. Diese Tumore produzieren in hohem Maße das Protein TGF- β 2 (transforming growth factor-beta2), welches das Immunsystem schwächt und die Infiltrationstendenz der Tumorzellen verstärkt.

Weitere Phase I Studien prüfen Wirksamkeit und Pharmakokinetik beispielsweise des Bcl-2-Antisense Oligonukleotids (G3139, Genasense) bei Patienten mit non-Hodgkin Lymphomen [Waters *et al.* 2000], Prostatakarzinomen [Tolcher *et al.* 2004, Chi *et al.* 2001], Mammakarzinomen [Marshall *et al.* 2004], kleinzelligen Bronchialkarzinomen [Rudin *et al.* 2004], akuter Leukämie (AML, ALL) [Marcucci *et al.* 2003] sowie die Wirkung der Proteinkinase-C-alpha (PKC) Antisense Oligonukleotide bei Patienten mit non-Hodgkin Lymphomen [Rao *et al.* 2004], Ovarialkarzinomen (Phase II Studie von Aprinocarsen) [Advani *et al.* 2004] und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen [Villalona-Calero *et al.* 2004].

Diese Studien belegen den grundsätzlichen klinischen Nutzen der antisense Technologie auf dem Gebiet der Onkologie.

B. 2. Neue Strategien zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei Herzinsuffizienz

Auch im Bereich der β_1 -Blockade sucht man nach neuen therapeutischen Herangehensweisen über die antisense Technologie. In Untersuchungen am Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass die antisense Technik zu einer effektiven Downregulation des β_1 -adrenergen Rezeptorproteins führen kann. Nach einer einzigen intravenösen Injektion von β_1 -adrenergen Rezeptor antisense Oligonukleotiden war der Blutdruck bei spontan hypertensiven Ratten signifikant reduziert (38 \pm 5 mm Hg, P<0.05). Der antihypertensive Effekt konnte durch die Applikation der Oligonukleotide mit kationischen Liposomen (DOTAP/DOPE) verbessert werden. Der Effekt war 20 bis 33 Tage nachweisbar (P<0.05) und war spezifisch für den β_1 -adrenergen Rezeptor [Zhang *et al.* 2000].

Auch wenn die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht bis ins Detail verstanden sind, wird dennoch in der Erforschung der Anwendung gentherapeutischer Strategien großes Potential für die Entwicklung neuer Therapien der Herzinsuffizienz gesehen [Hata *et al.* 2004].

Die antisense Technik könnte verschiedene Vorteile gegenüber der herkömmlichen Betablockade bergen. Zum einen ist die Spezifität der antisense Technologie sehr groß, da sie auf der der Sequenz der Nukleinsäure beruht. Zum anderen haben antisense Oligonukleotide eine geringe Wahrscheinlichkeit Nebenwirkungen im ZNS zu verursachen, da diese hoch polaren Moleküle die Blut-Hirn-Schranke schwerlich passieren können [Agrawal *et al.* 1991]. Als limitierende

Hauptnebenwirkung von Bcl-2 AO G3139 (Genta, San Diego, CA) wurde bislang eine reversible Thrombozytopenie beschrieben, welche offenbar mit dem Thioatgehalt der Oligonukleotide zusammenhängt beschrieben [Cotter *et al.* 1999].

In bisherigen klinischen Studien auf dem Gebiet der Onkologie erfolgte die Applikation von antisense Oligonukleotiden als intravenöse Infusion über bis zu drei Wochen [Advani *et al.* 2004; Morris *et al.* 2002]. In anderen Modellsystemen wurde dagegen beobachtet, dass durch die einmalige Applikation von antisense Molekülen Langzeiteffekte erreicht werden können [Gyurko *et al.* 1997]. Diese beruhen offenbar zum einen auf einer verlängerten Halbwertszeit von chemisch modifizierten Oligonukleotiden. Hier wurden im Tierversuch Halbwertszeiten von 20 bis 50 Stunden nach der intravenösen Applikation von Oligonukleotiden dokumentiert [Zhang *et al.* 1995, Iversen *et al.* 1991]. Zum anderen liegen die Langzeiteffekte der antisense Inhibition vermutlich in deren Eigenschaft, nicht über den Mechanismus kompetitiver Antagonisten, sondern auf anderem Wege zu einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion zu führen [Zhang *et al.* 2000]. Weitere Vor- und Nachteile der antisense Inhibition wurden an anderer Stelle umfassend zusammengefasst [Stein *et al.* 1993].

Die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) hat 1998 Fomivirsen (Vitravene®) als erstes und bisher einziges Antisense-Oligonukleotid für die intravitreale Injektion bei Zytomegalievirus (CMV)-Retinitis bei AIDS-Patienten zugelassen. Weitere Medikamente, die auf diesem Prinzip beruhen, sind bereits in der klinischen Erprobung. Beispielsweise wird die Wirksamkeit und Sicherheit der systemischen Anwendung eines Antisense-Oligonukleotids gegen TGF- β in der AP-12009-G004 Studie bei Patienten mit Rezidiven hoch maligner Gliome unter anderem an vier deutschen Zentren geprüft.

Um das therapeutische Potential von antisense Oligonukleotiden weiter zu evaluieren bedarf es weiterer umfangreicher *in vitro* und *in vivo* Studien.