
4. Diskussion

Der erstmalige Nachweis von natürlicher Antisense-RNA für zwei kardiale Gene (α -MyHC und TnI) steht in Einklang mit systematischen Untersuchungen von Sequenzen des menschlichen Genoms. Danach ist davon auszugehen, dass für mindestens 10% aller menschlichen Gene natürliche Antisense-RNA vorhanden ist (Yelin et al., 2003). Somit ist es nicht verwunderlich, dass dieses Regulationsprinzip auch bei einer Vielzahl von kardialen Genen nachweisbar ist, nachdem ursprünglich es nur für β -MyHC beschrieben worden war. Wenn die Antisense-Transkripte eine spezifische Wirkung auf die Genexpression haben sollen, wird im allgemeinen ein bestimmter relativer Level als notwendig postuliert, der mit der korrespondierenden Sense mRNA interagiert. Eine direkte Interaktion zwischen Sense und Antisense-Transkripten, also eine Duplex-Formation konnte mittels eines modifizierten RNase-Protection-Assays, wie von Krystal und Mitarbeitern (1990) beschrieben, für TnI dargestellt werden. Die Quantifizierung ergab sowohl für MyHC (Ratte) als auch für TnI (Mensch) Antisense-Transkript-Level, die mit denen der Sense Transkripte vergleichbar sind. Da diese *Ko-Expression* von Sense und Antisense-RNA im Normalmyokard bereits nachgewiesen wurden, ergeben sich hieraus Probleme mit der bisherigen Sicht der RNA bezüglich ihrer Funktion im Rahmen der Genexpression: Ein mindernder Effekt von natürlicher Antisense-RNA auf die Protein-Translation impliziert eine inverse Regulation, d.h. ein Überwiegen des Antisense-Transkriptes korrespondiert mit einer Downregulation des Proteins (und umgekehrt), welches für eine ganze Reihe von Genen auch beschrieben ist (Kimelman und Kirschner, 1989). Allerdings wurde auch schon frühzeitig über Beispiele mit *Ko-Expression* von Sense und Antisense berichtet (Laabi et al., 1994). Als Erklärungsversuch dieses Phänomens wurde eine unterschiedliche Transkription, entweder von Zelle zu Zelle oder innerhalb verschiedener intrazelluläre Kompartimente, angeführt (Nellen und Lichtenstein, 1993). Auch die Duplexbildung könnte als regulierter Prozess in einem Kompartiment stattfinden. Somit lässt der Nachweis einer *Ko-Expression* die Möglichkeit einer translationshemmenden Funktion der natürlichen Antisense zu. Allerdings ist diese Funktion mit einer *Ko-Regulation* (d.h. parallele Induktion von Sense und Antisense-RNA), die für die MyHC Antisense-RNA nachgewiesen wurde, schlecht zu vereinbaren. So muss man davon ausgehen, dass natürliche Antisense-RNA kein einheitliches Regulationsprinzip darstellt. Vielmehr bestehen offensichtliche Unterschiede nicht nur bezüglich des Entstehungsortes bzw. -mechanismus', ihrer Regulation und ihrer Ausdehnung, sondern auch in ihrer Funktion im Rahmen der Genexpression. Es existieren Beispiele, bei denen Antisense-RNA möglicherweise einen unterstützenden Effekt auf die Translation des entsprechenden Genes hat. Im Rahmen der bcl-2/IgH-Translokation bei B-Zell Lymphome treten bcl/IgH Antisense-Transkripte auf (Capaccioli et al., 1996). Es liess

sich zeigen, dass eine verminderte Antisense-Transkription zu einer verminderten Proteinexpression führte (Morelli et al., 1997). Als möglicher Mechanismus wurde von den Autoren diskutiert, dass die Interaktion der Antisense-RNA mit dem Sense-Transkript eine AU-reiche Sequenz maskiert, die normalerweise zu einem raschen Abbau des mRNA führt. Ein weiterer Mechanismus wurde von Kim et al. (1996) beschrieben: Er konnte zeigen, dass Antisense-RNA mit solchen Proteinen interagieren können, die für die Funktion der Sense-Transkripte von Bedeutung sind und somit sich unterschiedlich auf die Translation auswirken kann.

Es gibt Hinweise, dass Antisense-Transkripte auch eine Funktion unabhängig von der Transkription/Translation-Regulation haben. So konnte für Antisense des Basic Fibroblast Growth Factor nachgewiesen werden, dass es für ein Protein mit bislang unbekannter Funktion kodiert (Kimelmann und Kirschner, 1989). Eigene Untersuchungen der Tnl-Antisense-Transkripte mittels der RACE-Technik ergaben den überraschenden Nachweis von Sense-Antisense-Hybrid-Transkripten, also RNA mit Sense und Antisense-Sequenzen. Als möglicher Entstehungsmechanismus des Hybrid-Moleküls wurde ein Modell entworfen, nach dem eine RNA-abhängige zytoplasmatischen Transkriptase eine RNA-Duplex-Formation transkribiert. Dieser Mechanismus könnte eine wichtige Rolle bei der Rekombination von Genen spielen, wie sie von Herbert (2004) als eine der neu entdeckten Funktionen der RNA beschrieben wurde.

Um die Regulation der Antisense-Transkripte zu verstehen, ist die Kenntnis ihrer Entstehung von kritischer Bedeutung. Prinzipiell gibt es drei Möglichkeiten (s. Abbildung 1): 1) Antisense-RNA kann von einem Pseudogen abgeschrieben werden. Pseudogene stellen Versionen von aktiven Genen dar, die durch Akkumulation von Mutationen so verändert wurden, dass sie zwar noch transkribiert aber nicht mehr in Proteine translatiert werden können (Lewin, 1990). Antisense-Transkription von einem Pseudogen wurde für die neuronale Nitrit Oxid Synthetase (nNOS) beschrieben (Korneev et al., 1999). 2) Transkription vom Gegenstrang, beschrieben z.B. für das proliferating cell nuclear antigen (Tommasi und Pfeiffer, 1999). 3) Transkription vom Sense-Transkript durch einer RNA-anhängige Polymerase, welches für Antisense-RNA des α -Globins (Volloch et al., 1996) und der M40 Untereinheit der V-ATPase (Merzendorfer et al., 1997) vorgeschlagen worden ist, da diese Antisense-Transkripte ausschliesslich Exon-Sequenzen enthielten. Damit übereinstimmend sind die Ergebnisse einer umfassenden Untersuchung von Rosok und Sioud (2004) an menschlichen Brustkrebszellen: Sie ergab den Nachweis von einer Reihe von Antisense-Transkripten, deren Sequenzen ebenfalls ausschliesslich Exon-Abschnitte enthielten, so dass auch diese Autoren in diesen Fällen eine Transkription mittels einer RNA-anhängigen Polymerase postulierten.

Aufgrund der Ergebnisse der Tnl-RACE-Experimente ist die Transkription vom Sense-Transkript der wahrscheinliche Mechanismus. Der Nachweis von ausschliesslich Exon-Sequenzen sowie eines Poly-U-Schwanzes am 5' Ende des Transkriptes liegt dies nahe. Aktivität einer RNA-abhängige Polymerase konnte in Erythrozyten gezeigt werden (Volloch et al., 1996). Demgegenüber unterscheidet sich die MyHC Antisense bezüglich des Entstehungsortes und -mechanismus': Haddad et al. (2003) berichtet über die Existenz eines bidirektionalen Promotors zur MyHC-Antisense Regulation. Interaktion mit dem Promotor soll bei Induktion von Sense α -MyHC gleichzeitig eine vermehrte Antisense β -MyHC-Transkription bewirken. Bei Annahme eines translationsmindernden Effektes würde diese Anordnung den β -/ α -Isoform-Switch in der Neonatalphase unterstützen. Jedoch sind die Ergebnisse unserer Untersuchungen bezüglich der MyHC-Regulation nicht ohne weiteres mit einer signifikanten Aktivität des beschriebenen Promotors zu vereinbaren. Der Nachweis einer *Ko-Regulation* unter α -MyHC-Induktion (mit Zunahme der α -MyHC Antisense und Abnahme der β -MyHC Antisense) widerspricht sowohl der Regulation durch den Promotor als auch einer translationsmindernden Funktion der MyHC-Antisense.

Eine Möglichkeit, die Rolle von endogener Antisense-RNA auf die Expression eines Genes zu klären, ist die spezifische Hemmung mit sich anschliessender Untersuchung der Proteinexpression des entsprechenden Gens. Prinzipiell ist dies – bei Kenntnis des Entstehungsmechanismus – einerseits durch Hemmung der Antisense-Transkription (z.B. durch Hemmstoffe der Polymerase II, Boheler et al., 1992) möglich, andererseits durch Hemmung der Antisense/sense Interaktion. Letzteres ist mit synthetisierten Oligonukleotiden durchführbar, die gegen die Antisense-RNA gerichtet sind. Mit dieser Technik, die erstmalig von Morelli et al. (1997) beschrieben wurde, konnte eine signifikante Verminderung von endogener Antisense-RNA erreicht werden (Rosok und Sioud (2004). Somit liegt es nahe, in den Fällen, in denen die Rolle von Antisense-RNA im Rahmen eines Krankheitsprozesses geklärt ist, über die Möglichkeit der Applikation von gegen Antisense-RNA gerichteter Oligonukleotide nachzudenken. Da Oligonukleotide gegen Sense-mRNA zunehmend als Therapie-Ansatz geprüft und im Rahmen von klinischen Studien schon eingesetzt werden (Überblick in Crooke, 2004), könnten sich in Zukunft therapeutische Möglichkeiten auch bei der Behandlung von Erkrankungen ergeben. Ein Beispiel hierfür stellt die essentielle leichte Kette (ALC-1) dar, für die signifikant höhere Level von Antisense-RNA im Myokard bei Patienten mit Fallot'scher Tetralogie nachgewiesen werden konnte (Ritter et al., 1999). Diese höheren Level waren mit einer niedrigeren Protein-Expression assoziiert. Da eine vermehrte ALC-1-Expression den Anpassungsmechanismus des humanen Herzens an eine gesteigerte mechanische Belastung darstellt (Morano, 1999), ist in diesem Fall eine direkte Beteiligung von Antisense-RNA an der Pathophysiologie einer Herzerkrankung nachgewiesen.