

INAUGURAL-DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
AKADEMISCHEN GRADES
DOCTOR RERUM NATURALIUM IM FACH BIOCHEMIE

**Antivirale Oligonukleotide:
DNAzym- und RNA-Interferenz Strategien gegen Picornaviren**

Vorgelegt von
Steffen Schubert
aus Kiel

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

April 2005

Diese Arbeit wurde in der Zeit von September 2002 bis Februar 2005 am Institut für Chemie/Biochemie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker A. Erdmann angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

Gutachter: Prof. V. A. Erdmann, FU Berlin

Prof. H. Zeichhardt, Charité Berlin

Datum der Disputation: 7.10.2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Antisense-basierte Strategien	2
1.2	Mechanismen von Antisense-Agentien	3
1.2.1	Antisense-Oligodesoxynukleotide (AS-ODNs)	3
1.2.2	Ribozyme	4
1.2.3	DNAzyme	7
1.2.4	RNA-Interferenz (RNAi)	8
1.2.4.1	<i>Mechanismus</i>	9
1.2.4.2	<i>Biologische Funktion in der Virusabwehr</i>	10
1.2.4.3	<i>Anwendung in Säugetierzellen</i>	12
1.2.4.4	<i>Antivirale RNAi-Ansätze</i>	14
1.3	Schwierigkeiten bei der Entwicklung effizienter Antisense-Strategien	18
1.3.1	Wahl einer geeigneten Zielsequenz (<i>target site selection</i>)	18
1.3.2	Stabilisierung und Pharmakokinetik	20
1.3.3	Zelluläre Aufnahme von Oligonukleotiden	23
1.3.4	Spezifität und Nebenwirkungen (<i>off-target</i> Effekte)	25
1.3.5	<i>Viral Escape</i>	26
1.4	Picornaviren	27
1.4.1	Struktur	27
1.4.2	Funktion	28
2	ZIELSETZUNG	32
3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Geräte und Chemikalien	33
3.2	Oligonukleotide	33
3.2.1	Sequenzen	34
3.2.2	Konzentrationsbestimmungen	35
3.3	Klonierungen und <i>in vitro</i> -Transkriptionen	35
3.4	Aktivitätsmessungen an DNAzymen	39
3.4.1	RNase H Assay	39
3.4.2	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	39
3.4.3	Kinetische Messungen an DNAzymen	39

3.5	Stabilitätsbestimmungen von DNAzymen	41
3.6	Zellkulturmethoden	42
3.6.1	Zellkulturbedingungen und Transfektionen	42
3.6.2	Western Blot	42
3.6.3	<i>Cell-Viability</i> Test	43
3.6.4	Plaque-Assay	43
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Optimierung eines 10-23 DNAzyms gegen 5'-NTRs von Picornaviren	44
4.1.1	Vorarbeiten	45
4.1.2	Modifizierte Nukleotide in den Bindungsarmen	46
4.1.3	Modifizierte Nukleotide im katalytischen Zentrum	49
4.1.4	Optimiertes Design für das DNAzym	50
4.1.5	Übertragung auf DNAzyme mit anderer Spezifität	51
4.1.6	Stabilitätsstudien	52
4.1.7	Erhöhte Aktivität gegen Zielmoleküle mit stabiler Sekundärstruktur	54
4.2	siRNAs gegen Coxsackievirus B3	59
4.2.1	Einfluß stabiler Sekundärstrukturen des Zielmoleküls auf die <i>Silencing</i> -Effizienz von siRNAs	63
4.2.2	shRNA-Doppelexpressionsvektor zur Verhinderung von <i>Escape</i> -Mutanten	69
4.2.3	Inhibition der Virusreplikation mit siRNAs	74
5	DISKUSSION	79
5.1	Optimierung des 10-23 DNAzyms	79
5.2	Aktivität des DNAzyms gegen 5'-NTRs verschiedener Rhino- und Enteroviren	85
5.3	RNA-Interferenz gegen Coxsackievirus B3	88
5.4	SiDEx-Vektor und Vermeidung von <i>Viral Escape</i>	94
6	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	98
7	LITERATURVERZEICHNIS	100
8	ANHANG	115
A	Verzeichnis der Abkürzungen	115
B	Danksagung	116
C	Curriculum vitae	117
D	Eigene Veröffentlichungen und Patentanmeldung	118

ANHANG C: CURRICULUM VITAE

Name: Steffen Schubert
Geburtsdatum: 21.10.1969
Geburtsort: Kiel

Schulbildung

1975-1979 Theodor-Heuss Grundschule Kiel
1979-1988 Gymnasium Kieler Gelehrtenschule
Mai 1988 Abitur
1988-1990 Zivildienst im Altenpflegeheim der Arbeiterwohlfahrt in Kiel

Studium

1990-1994 Studium Dirigieren an der Hochschule der Künste Berlin
1990-1991 Auslandsaufenthalt an der Indiana University, Bloomington, IN, USA
(Hauptfach Klavier, Nebenfach Chemie)
Mai 1994 Diplom Dirigieren, Gesamtnote „sehr gut“
1994 Beginn Studium Biochemie, Freie Universität Berlin.
Mai 2002 Diplom Biochemie an der FU Berlin. Gesamtnote „sehr gut“
seit September 2002 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Volker A. Erdmann (FU Berlin)

Beruflicher Werdegang (Musik)

1992-1998 Deutsche Oper Berlin, zunächst Assistent des Chordirektors, ab 1996 Solorepetitor
1995-heute Assistent des Chordirektors bei den Bayreuther Richard-Wagner Festspielen
1996-1998 Lehraufträge für Repetition an der HdK und der Hanns-Eisler Hochschule Berlin
1998-2000 Chordirektor und Dirigent am Salzburger Landestheater, Österreich
2000-2002 Kommissarischer Direktor der „Sing-Akademie zu Berlin“
seit 2000 freiberufliche Tätigkeit als Chorleiter und Dirigent, u.a.:
Choreinstudierungen Salzburger Festspiele 2000, Oper Zürich 2002,
Aufnahmen mit dem Chor des Westdeutschen Rundfunks und des Norddeutschen Rundfunks.