1 EINLEITUNG

Virusinfektionen werden heute zu den größten globalen Bedrohungen gerechnet. Das engmaschige weltweite Verkehrsnetz, das umfassende Mobilität ermöglicht, und die unmittelbare Nachbarschaft von Mensch und Tier in einigen Gebieten der Welt begünstigen die Entstehung und Ausbreitung neuer Virusstämme. Weitere Faktoren, die das Risiko für den Ausbruch einer Virusepidemie erhöhen, sind inadäquate hygienische Zustände sowie mangelnde medizinische Versorgung und Aufklärung insbesondere in den ärmeren Regionen der Erde. Das Auftauchen von Vogelgrippe-Viren, die den Menschen befallen können, die Verbreitung des SARS-Coronavirus und die weiterhin rasche Ausbreitung des HI-Virus illustrieren die Gefahr einer weltweiten Pandemie. Darüber hinaus fordern Viren wie die persistierenden Hepatitis B und C Viren (HBV, HCV) jedes Jahr mehr als eine Million Tote, da allgemein wirksame Therapien fehlen. Zur Zeit sind etwa vierzig niedermolekulare Stoffe für den Einsatz bei viralen Infektionen zugelassen. Mindestens die Hälfte dieser Präparate wurde zur Behandlung von AIDS-Patienten entwickelt (DeClercq, 2004). Die wichtigste Stoffklasse, die eingesetzt wird, um das Fortschreiten einer Viruserkrankung zu verhindern, bilden die Nucleosid-Analoga als Inhibitoren der DNA- oder RNA-Synthese des Virus. Diese Substanzen sind allerdings nicht voll spezifisch für virale Polymerasen und haben daher oftmals schwere Nebenwirkungen, insbesondere wenn sie über einen längeren Zeitaum hinweg eingenommen werden müssen. Daher werden neue Ansätze bei der Entwicklung antiviraler Medikamente dringend benötigt.

Antisense-Strategien gelten als vielversprechend, um virale Replikation zu blockieren. Dabei werden Nukleinsäuremoleküle verwendet, die einer gegebenen Ziel-RNA komplementär sind. Sobald die Sequenz eines viralen Genoms bekannt ist, können Oligonukleotide entworfen werden, die mit einer beliebigen Virus-RNA interagieren. Diese Wechselwirkung soll dann auf die eine oder andere Weise zur kontrollierten Zerstörung der viralen RNA führen, ohne daß dabei zelluläre Prozesse gestört werden. Bereits die erste publizierte Studie, in der Antisense-Oligonukleotide verwendet wurden, hatte die Inhibition eines Virus als Ziel, in diesem Falle des Rous-Sarkom Virus (Zamecnik und Stephenson, 1978). Trotz ermutigender Ergebnisse in präklinischen Untersuchungen haben sich bisher allerdings nur wenige Moleküle, die nach einem Antisense-Mechanismus arbeiten, in klinischen Studien bewährt. Die neue Methode der RNA-Interferenz (RNAi) scheint nun die Hoffnungen auf

entscheidende Fortschritte auf dem Gebiet der therapeutischen Anwendung von Antisense-Strategien neu zu nähren.

1.1 ANTISENSE-BASIERTE STRATEGIEN

Die spezifische Hemmung der Expression eines Gens durch Antisense-Moleküle beruht auf der Watson-Crick Basenpaarung des Antisense-Moleküls mit seiner Komplementärsequenz auf der Ziel-RNA. Antisense-Moleküle wirken somit auf der Ebene der RNA statt auf Proteinebene, wie das konventionelle Therapeutika im allgemeinen tun (Abb. 1.1). Theoretisch kann mit Antisense-Strategien jede beliebige zelluläre oder virale RNA mit hoher Spezifität inhibiert werden. Als Ausgangsinformation für die Herstellung eines Antisense-Agens reicht dabei die Sequenz der Ziel-RNA aus. Antisense-Oligonukleotide lassen sich zudem mittlerweile auch in großen Mengen mit relativ geringem Aufwand herstellen. Besonders geeignet ist diese Strategie, wenn die Blockade eines einzelnen Gens ausreicht, um einen Phänotyp zu verändern.

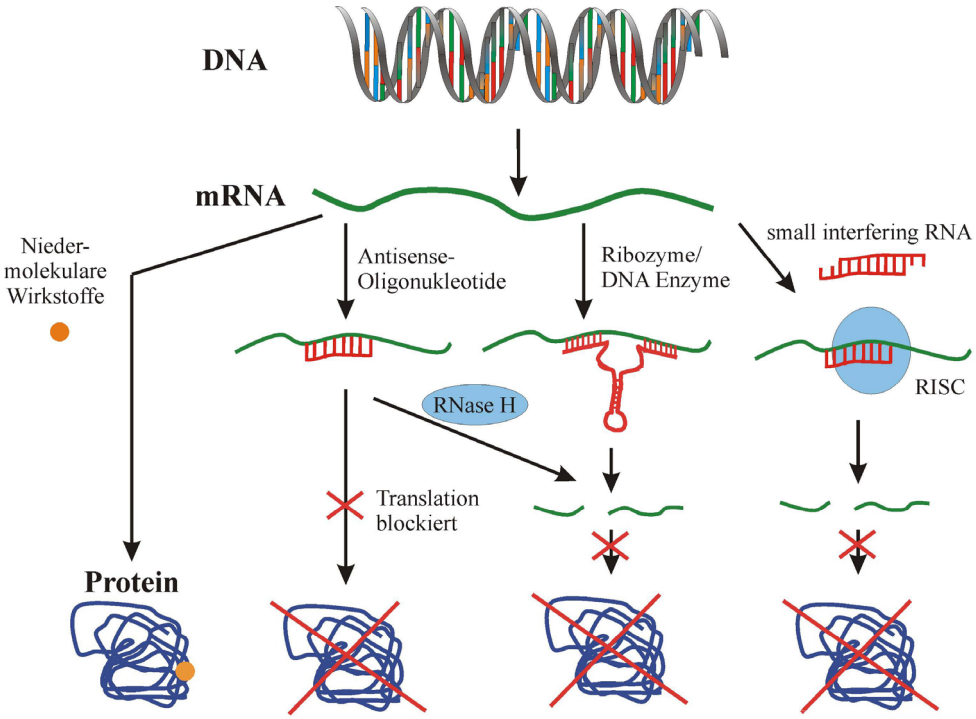

Abb. 1.1: Konventionelle Therapeutika inhibieren die Funktion des Zielproteins (links). Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme und siRNAs greifen die mRNA an und verhindern so bereits die Herstellung des Proteins (modifiziert nach Kurreck, 2003).

Einen hohen Wert besitzen derartige effiziente und einfache Möglichkeiten zur Gen-Suppression, die auch als *Silencing* bezeichnet wird, wenn unbekannte Genfunktionen aufgeklärt werden sollen (*functional genomics*). Die Sequenzierung des menschlichen Genoms sowie der Genome mehrerer Modellorganismen hat eine große Anzahl von Genen zutage gefördert, deren Bedeutung für den Organismus bisher unbekannt ist. Wird die Expression eines solchen neu identifizierten Gens in Zellkulturexperimenten oder im Tiermodell blockiert, können sich entscheidende Hinweise für die Aufklärung seiner Funktion ergeben. Auf eine ähnliche Weise werden Antisense-Ansätze auch verwendet, um geeignete Zielmoleküle für medizinische Zwecke zu identifizieren oder zu validieren (*target identification*, *target validation*). Erheblicher Aufwand ist zudem getrieben worden, um Antisense-Moleküle selbst zu Therapeutika zu entwickeln. Bisher wurde allerdings nur ein einziges therapeutisch wirksames Oligonukleotid, das nach einem Antisense-Mechanismus wirkt, zugelassen: Vitraven wird zur Behandlung von Cytomegalovirus-induzierter Retinitis in AIDS-Patienten verwendet. Dieses Medikament ist zudem von untergeordneter kommerzieller Bedeutung.

Im wesentlichen lassen sich drei Klassen von Antisense-Agentien zum sequenzspezifischen *knock-down* einer Ziel-RNA unterscheiden: Ursprünglich wurden *Antisense-Oligodesoxynukleotide (AS-ODNs)* für Antisense-Strategien eingesetzt. Die Entdeckung katalytisch aktiver Nukleinsäuren, sogenannter *Ribozyme*, durch Altman und Cech in den frühen 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts eröffnete neue Möglichkeiten für sequenzspezifischen RNA-Abbau. Erst vor wenigen Jahren wurde die Methode der *RNA Interferenz (RNAi)* mithilfe doppelsträngiger RNA beschrieben. Sie wurde innerhalb kurzer Zeit aufgrund ihrer hohen Effizienz die Methode der Wahl sowohl zur Untersuchung von Genfunktionen im Labor als auch zur Ziel-Validierung in der pharmazeutischen Forschung.

1.2 MECHANISMEN VON ANTISENSE-AGENTIEN

1.2.1 Antisense-Oligodesoxynukleotide (AS-ODNs)

AS-ODNs, die für die spezifische Gen-Suppression hergestellt werden, haben im allgemeinen eine Länge von 15-20 Nukleotiden. Eine Basenfolge dieser Länge ist statistisch gesehen im menschlichen Genom einmalig, so daß Nebeneffekte aufgrund zufälliger Sequenzübereinstimmungen mit anderen Genen unwahrscheinlich sind. Längere Sequenzen bergen die Gefahr, teilweise homolog zu Genen zu sein, die nicht supprimiert werden sollen, was zu unerwünschten Effekten führen kann. Im einfachsten Fall ist ein AS-ODN aus DNA-

Monomeren zusammengesetzt. Um die Stabilität des Moleküls zu erhöhen und seine pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern, werden allerdings für Untersuchungen in Zellkultur oder im Tiermodell in den meisten Fällen Derivate von DNA- oder RNA-Monomeren eingesetzt (siehe unten, Stabilisierung und Pharmakokinetik).

Zwei Mechanismen von AS-ODNs sind beschrieben worden: Im Zellkern wird eine Heteroduplex aus DNA und RNA von dem Enzym RNase H erkannt. Diese Endonuklease schneidet den RNA-Strang des Hybrids, der anschließend von Exonukleasen abgebaut wird. Der Antisense-Strang wird freigesetzt und kann an weitere Zielmoleküle binden. Der zweite Mechanismus, nach dem AS-ODNs wirken können, besteht in der sterischen Blockade von Zielsequenzen. Zum Beispiel kann die Anlagerung des Ribosoms an eine mRNA verhindert werden, so daß keine Translation des Zielgens mehr stattfinden kann. Aber auch *Splicing* und Transport können durch sterische Effekte von AS-ODNs inhibiert werden, ohne daß RNase H dazu rekrutiert werden muß.

AS-ODNs mit verschiedenen stabilisierenden Nukleotidmodifikationen sind eingesetzt worden, um eine Vielzahl von Genen sequenzspezifisch zu inhibieren. Etwa 20 solche Moleküle sind bis in klinische Studien vorgedrungen. Eine Übersicht findet sich bei Crooke (2004). Das bisher einzige zugelassene Antisense-Medikament, Vitraven (Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA), ist ein AS-ODN mit Phosphorothioat-Modifikationen, das gegen die mRNA des Cytomegalovirus gerichtet ist. AS-ODNs, die sich zur Zeit in fortgeschrittenen klinischen Studien befinden, sollen zur Behandlung verschiedener Krebsarten, AIDS und Asthma eingesetzt werden. Auch zur Therapie viraler Erkrankungen sind weitere AS-ODNs entwickelt worden (Übersicht bei Schubert und Kurreck, 2005): Ein Phosphorothioat-Oligonukleotid gegen HCV reduzierte Virustiter in chronisch infizierten Patienten in einer Phase II-Studie. Weiterhin sind Wirkstoffe gegen HIV, HBV und Papillomaviren in klinischen Tests.

1.2.2 Ribozyme

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die ähnlich wie Proteine chemische Reaktionen katalysieren können. Das erste katalytisch aktive RNA-Molekül, das entdeckt wurde, war ein Intron in der prä-ribosomalen RNA des Ciliaten *Tetrahymena thermophila*, das sich selbst aus dem Transkript herausspleißen und die beiden Exons zusammenfügen kann (Kruger *et al.*, 1982). Seitdem sind mehrere Klassen von Ribozymen in einer Reihe von Organismen und Organellen gefunden worden, die zumeist intramolekulare Spaltungs- und *Splicing*-Reaktionen katalysieren. Sie werden grob in große und kleine Ribozyme unterteilt, wobei

große Ribozyme wie die erwähnten Gruppe I-Introns aus mehreren hundert bis zu Tausenden von Nukleotiden bestehen, wogegen kleine Ribozyme 30-150 Nukleotide lang sind. Übersichten über Klassen und Mechanismen von Ribozymen finden sich bei Doudna und Cech (2002) sowie Tanner (1999). Vor wenigen Jahren wurde zudem gefunden, daß einer der fundamentalen zellulären Prozesse, die Peptidyl-Transferreaktion bei der Synthese von Proteinen im Ribosom, von einem Ribozym ausgeführt wird. Die Strukturaufklärung des Ribosoms ergab, daß sich in der Nähe des katalytischen Zentrums des Ribosoms kein Protein, sondern nur RNA befindet (Nissen *et al.*, 2000).

Viele Ribozym-Motive können auch für den sequenzspezifischen katalytischen Abbau von mRNA im Labor verwendet werden. Dazu sind Varianten der natürlich vorkommenden Ribozyme entwickelt worden, die ihre Zielsequenz *in trans*, also auf einem anderen Molekül liegend, binden und spalten und mehrere Katalyserunden durchlaufen können (*multiple turnover*). Insbesondere zwei katalytische Motive, die in Pflanzenpathogenen vorkommen, sind in dieser Hinsicht von Bedeutung: Das *Hammerhead*- und das *Hairpin*-Motiv, deren Sekundärstrukturen in der Abbildung 1.2 gezeigt werden. Beide Motive binden ihr Zielmolekül mithilfe von Substraterkennungsarmen und spalten es unter Entstehung eines 2'-3'-Cyclophosphates und einer freien 5'-OH Gruppe.

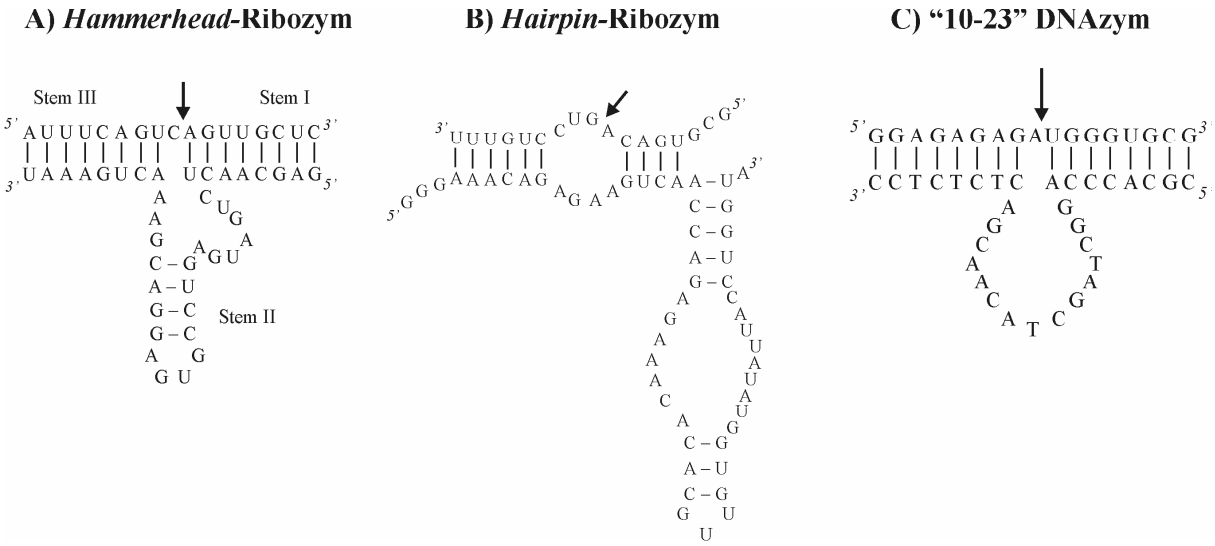

Abb. 1.2: Sekundärstrukturen der *Hammerhead*- und *Hairpin*-Ribozyme und des 10-23 DNAzyms im Komplex mit ihren jeweiligen Zielsequenzen. Die Spaltstellen sind mit Pfeilen markiert (modifiziert aus Schubert und Kurreck, 2004).

Zu den Vorteilen von Ribozymen gegenüber AS-ODNs zählt, daß die Spaltung des Zielmoleküls unabhängig von RNase H abläuft. Ribozyme bieten weiterhin ein über die endonukleolytische Spaltung hinausgehendes erweitertes Repertoire an Reaktionen: Die

Splicing-Aktivität von Gruppe I-Introns ist zum Beispiel ausgenutzt worden, um pathogene mutierte Exons der β-Globin mRNA in Zellen von Patienten mit Sichelzellanämie durch das γ-Globin 3'-Exon zu ersetzen (Lan *et al.*, 1998). Das daraus translatierte γ-Globin verursachte im Gegensatz zu der pathogenen Form keine krankhafte Hämoglobin-Polymerisation. Ein weiterer wichtiger Vorteil von Ribozymen besteht darin, daß sie nicht nur exogen zu Zellen hinzugegeben werden können, sondern durch den Einsatz von Vektoren auch endogen in Zellen exprimiert werden können. Zum einen ermöglicht das eine länger andauernde Inhibition des Zielgens, die nicht in erster Linie durch den Abbau des zugegebenen Ribozyms durch Nukleasen begrenzt ist. Zum anderen besteht die Möglichkeit, Zellen stabil mit Ribozym-exprimierenden Vektoren zu tranfizieren und diejenigen Zellen, die das Transgen aufgenommen haben, anzureichern. Durch die Verwendung geeigneter Promotoren oder Lokalisationssignale können Vektor-codierte Ribozyme auch zelltypspezifisch exprimiert oder zu bestimmten Kompartimenten der Zelle transportiert werden (Lee *et al.*, 1999).

Bei der Anwendung von Ribozymen können verschiedene Probleme auftreten. Schon die Wahl einer geeigneten Spaltstelle ist häufig anspruchsvoll. Jede Ribozymklasse hat eigene Anforderungen an diese Region. *Hammerhead*-Ribozyme spalten etwa präferentiell nach NUH Tripletts, wobei N ein beliebiges Nukleotid darstellt und H jedes Nukleotid außer G bezeichnet. *Hairpin*-Ribozyme verlangen eine NGUC Sequenz als Spaltstelle. Die Auswahl an geeigneten Zielsequenzen kann dadurch deutlich eingeschränkt sein. Zudem sind die minimierten Ribozyme, die im Labor verwendet werden, abhängig von zweiwertigen Metallionen für ihre Aktivität. Obwohl diese Moleküle ihre maximale Aktivität erst bei unphysiologisch hohen Salzkonzentrationen erreichen, sind *Hammerhead*- und *Hairpin*-Ribozyme häufig erfolgreich in Zellkulturstudien und *in vivo* eingesetzt worden.

Insbesondere sind Ribozyme häufig verwendet worden, um die Vermehrung von Viren zu inhibieren (Übersicht bei Peracchi, 2004). So wurden zum Beispiel hämatopoetische Vorläuferzellen *ex vivo* mit anti-HIV-1 *Hammerhead*-Ribozymen transduziert. In einem SCID/hu Maus-Modell waren diese Zellen dann signifikant gegen die Infektion mit HIV-1 geschützt (Bai *et al.*, 2002). Auch die Hepatitis-auslösenden Viren HCV und HBV wurden erfolgreich mit Ribozymen inhibiert (Zusammenfassung in Schubert und Kurreck, 2004).

Mehrere Ribozyme sind bereits in klinischen Studien eingesetzt worden, um die Ausbreitung von Viren oder das Wachstum von Tumoren zu verhindern (Sullenger und Gilboa, 2002). *Hammerhead*- und *Hairpin*-Ribozyme gegen die RNA von HIV-1 wurden mithilfe retroviraler Vektoren in hämatopoetische Vorläuferzellen infizierter Patienten eingeführt. Die transduzierten Zellen, die das Transgen enthielten, wurden expandiert und schließlich wieder

in den Blutkreislauf der Patienten infundiert. Das Vorgehen erwies sich als ungefährlich für die Patienten, aber der Schutz gegen eine Ausbreitung des Virus im Körper war nur von kurzer Dauer (Michienzi *et al.*, 2003). Die Transduktion pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen, die freilich deutlich schwieriger zu bewerkstelligen ist, könnte ein vielversprechender Lösungsansatz sein.

In einer anderen Studie wurde ein chemisch stabilisiertes *Hammerhead*-Ribozym gegen HCV (Markenname HEPTAZYME) exogen gegeben. Trotz ermutigender Anfangserfolge wurden die klinischen Versuche beendet, nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Menge an viraler RNA im Serum der behandelten Patienten nur um 10% reduziert werden konnte (Perrachi 2004). Die therapeutische Wirksamkeit von Ribozymen zur Behandlung von Virusinfektionen ist somit noch nicht gezeigt worden, und auch bei der Verwendung in der Krebstherapie ist bisher kein entscheidender Durchbruch gelungen. Mit dem Aufkommen der RNAi-Methode steht nun eine neue Technik zur Verfügung, deren Effizienz erheblich höher ist als die von Ribozymen. Eine der führenden Firmen auf dem Gebiet der Ribozyme, Ribozyme Pharmaceuticals, hat alle Arbeiten zu Ribozymen eingestellt und konzentriert sich nun unter dem Namen „Sirna Therapeutics“ ausschließlich auf RNAi-Strategien. Diese Entscheidung veranschaulicht, welche Hoffnungen an die neue Methode geknüpft werden.

1.2.3 DNAzyme

Ribozyme, die aus RNA bestehen, sind in der Natur weit verbreitet. DNA-Moleküle mit katalytischen Eigenschaften sind hingegen bisher nicht gefunden worden. DNA ist allerdings grundsätzlich durchaus in der Lage, als Katalysator zu wirken. Mithilfe von *in vitro*-Selektionsmethoden wurden mehrere Oligodesoxynukleotide erhalten, die biochemische Reaktionen katalysieren (siehe die Übersicht bei Breaker, 2000). Diese Moleküle werden als DNAzyme, DNA Enzyme oder Desoxyribozyme bezeichnet. Eines der aktivsten DNAzyme ist das RNA-spaltende „10-23“ Desoxyribozym, das in Abbildung 1.2 gezeigt ist. Es wurde 1997 von Santoro und Joyce als 23. Klon in der zehnten Runde einer *in vitro*-Selektion gefunden (Santoro und Joyce, 1997). Das DNAzym spaltet sein RNA-Substrat in einer Reaktion, die von divalenten Metallionen abhängig ist. Ähnlich wie bei *Hammerhead*- und *Hairpin*-Ribozymen entstehen dabei ein 2’-3’-Cyclophosphat und eine freie 5’-Hydroxylgruppe. Weder der detaillierte Mechanismus der Spaltung noch die dreidimensionale Struktur der aktiven Konformation des Enzyms konnten bisher aufgeklärt werden.

10-23 DNAzyme bestehen aus einem katalytischen Zentrum von 15 Nukleotiden und zwei Substratbindungsarmen von variabler Sequenz. Ihre kinetischen Eigenschaften sind denen von Ribozymen aus RNA zumindest ebenbürtig (Santoro und Joyce, 1998; Joyce, 2001). Die Anforderungen an die Sequenz der Spaltstelle sind zudem ausgesprochen gering: Jede Verbindung einer Purin- und einer Pyrimidinbase kann von 10-23 DNAzymen gespalten werden, wobei AU- und GU-Verbindungen bevorzugt werden. In einer vergleichenden Studie von DNAzymen und *Hammerhead*-Ribozymen, die gegen dasselbe Zielmolekül gerichtet waren, war das aktivste gefundene Molekül ein DNAzym (Kurreck *et al.*, 2002a). Weitere Vorteile von DNAzymen gegenüber RNA-Ribozymen machen ihre erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen und ihre allgemein einfachere Synthese und Handhabbarkeit aus. Diese Eigenschaften sind insbesondere deswegen von großer Wichtigkeit, weil DNAzyme exogen gegeben werden müssen.

Eine erhebliche Anzahl therapeutisch relevanter zellulärer und viraler Gene wurde bereits durch DNAzyme reguliert. Eine Übersicht dazu findet sich bei Khachigian (2002). So wurden antivirale DNAzyme entwickelt, die in Zellkulturexperimenten die Verbreitung von HIV-1 inhibieren konnten, indem sie entweder die virale RNA angriffen (Zhang *et al*., 1999) oder den zellulären Corezeptor CCR5 reprimierten (Goila und Banerjea, 1998). Ein anderes DNAzym, das durch Phosphoroamidat-Nukleotide chemisch stabilisiert war, inhibierte die Replikation des Influenza A Virus in Zellkultur um mehr als 99% (Takahashi *et al*., 2004). Erfolgreiche *in vivo* Studien mit DNAzymen sind ebenfalls durchgeführt worden. Dabei sind insbesondere Tiermodelle für cardiovaskuläre Krankheiten und Krebs zum Einsatz gelangt (Übersicht bei Schubert und Kurreck, 2004).

1.2.4 RNA-Interferenz (RNAi)

Die Entdeckung, daß RNA-Moleküle eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression innehaben, wird als ein entscheidender Schritt in unserem Verständnis der Zellbiologie angesehen (siehe z. B. Novina und Sharp, 2004). Das Magazin *Science* erklärte die Entdeckung der regulatorischen Funktion kleiner RNAs im Jahr 2002 zum „Durchbruch des Jahres“ (Couzin, 2002). Ursprünglich wurde RNA wahrgenommen als kaum mehr als ein transportfähiges Zwischenprodukt auf dem Weg vom Gen zum Protein. Inzwischen ist bekannt, daß RNA an zahlreichen fundamentalen zellulären Prozessen beteiligt ist, wobei sie wichtige strukturelle und katalytische Funktionen ausübt. Ihre Beteiligung an der Genregulation fügt unserer Vorstellung vom Leben auf molekularer Ebene eine neue Komplexitätsstufe hinzu. Darüberhinaus kann die effiziente zelluläre Maschinerie, die an der

Genregulation durch RNA beteiligt ist, auch im Labor dazu verwendet werden, Gene sequenzspezifisch zu inhibieren. Es steht damit ein neuartiges Werkzeug zur Verfügung, mit dem Genfunktionen analysiert werden können. Es wird interessant sein zu beobachten, inwieweit RNAi auch als vielversprechender neuer therapeutischer Ansatz eingeschätzt und Verwendung in der klinischen Forschung finden wird.

1.2.4.1 Mechanismus

Der Begriff RNAi wird für zelluläre Vorgänge benutzt, bei denen doppelsträngige RNA Einfluß auf die Genexpression nimmt. Insbesondere bezeichnet der Begriff die Zerstörung einer mRNA, die durch dsRNA derselben Sequenz induziert wird. Das Phänomen wurde zuerst im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* identifiziert. Fire, Mello und Kollegen beobachteten, daß die Injektion von dsRNA in Würmer spezifisch und effizient die Expression eines Gens inhibierte, das eine passende Sequenz enthielt (Fire *et al.*, 1998). Die Aufklärung dieses Sachverhaltes vermochte auch frühere entsprechende Beobachtungen in Pflanzen zu erklären. Zahlreiche Arbeitsgruppen waren im folgenden daran beteiligt, den Mechanismus der RNAi aufzuklären. Eine aktuelle Übersicht über mechanistische Details findet sich bei Meister und Tuschl (2004).

Längere dsRNA wird durch das Protein *Dicer*, eine Endonuklease des RNase III-Typs, in 19-mere RNA-Duplexe zerschnitten, die an den 3'-Enden symmetrische Überhänge von zwei Nukleotiden Länge enthalten (Abb. 1.3). Diese kurzen dsRNAs werden als *small interfering RNAs*, siRNAs, bezeichnet. Im nächsten Schritt wird die Duplex entwunden. Einer der beiden Stränge wird abgebaut, während der andere, der als Antisense-Strang bezeichnet wird, in den proteinhaltigen *RNA induced silencing complex* (RISC) eingebaut wird. Welcher der beiden Stränge in den RISC gelangt, hängt nach neueren Ergebnissen von der relativen Stabilität der Enden der siRNA Duplex ab (Tomari *et al.*, 2004). Die genaue Zusammensetzung des RISC ist noch nicht abschließend geklärt. Es sind verschiedene Formen in der Literatur beschrieben worden. In jedem Falle sind aber Proteine der Argonaut-Familie oder ihre Homologe Bestandteile des Komplexes (Übersicht bei Tang, 2005). Der gebundene Antisense-Strang programmiert RISC, spezifisch mit einer RNA zu interagieren, die eine homologe Sequenz aufweist. Das entsprechende Molekül wird gebunden und in der Mitte der Zielsequenz gespalten. Neuere Forschungen haben starke Hinweise darauf geliefert, daß eine konservierte RNase H-artige Domäne im Protein Ago 2 die Endonuklease-Aktivität sein dürfte, die den Spaltungsschritt ausführt (Song *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Die beschädigte Ziel-RNA wird

anschließend durch zelluläre Nukleasen abgebaut, während der beladene RISC weitere Spaltungsreaktionen durchführen kann (Haley und Zamore, 2004).

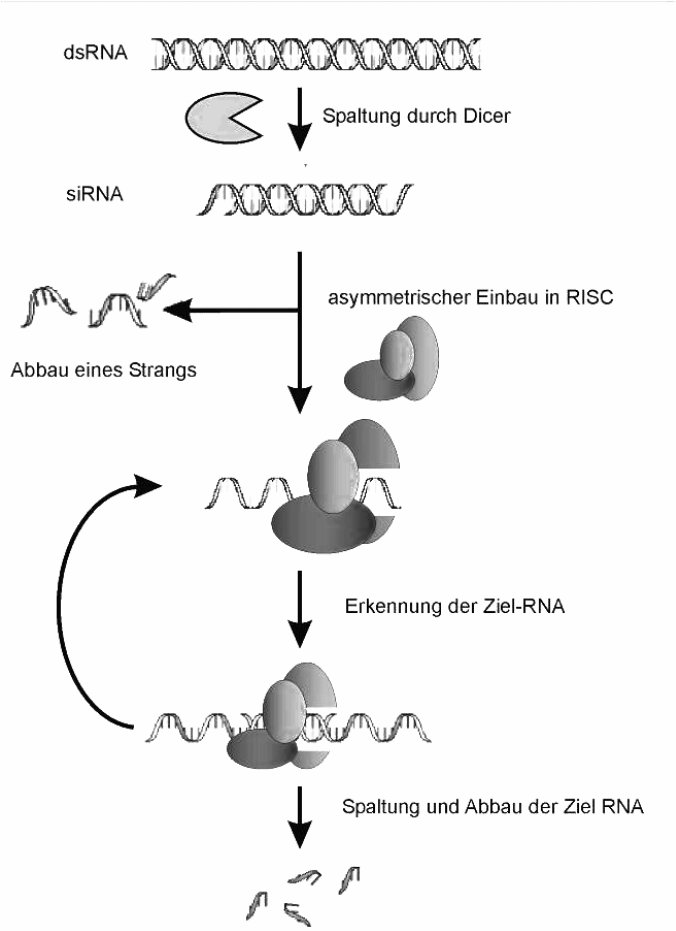

Abb. 1.3: Mechanismus der RNA-Interferenz. Für Erläuterungen siehe Text (modifiziert nach Novina und Sharp, 2004).

Komponenten der Maschinerie, die bei der Gensuppression aktiv ist, sind auch an anderen wichtigen Prozessen beteiligt. Dazu zählen die spezifische Genregulation auf der Ebene der Translation durch microRNAs (miRNAs), die im zellulären Genom codiert werden (Ambros, 2004), sowie die Bildung von Heterochromatin, die durch „*repeat associated small interfering RNAs*“ (rasiRNAs) oder heterochromatische RNAs ausgelöst werden, was zu Gensilencing auf der Ebene der Transkription führen kann (Lippmann und Martienssen, 2004).

1.2.4.2 Biologische Funktion in der Virusabwehr

Der Mechanismus des dsRNA-vermittelten Silencings von Genen ist in fast allen Eukaryonten im wesentlichen konserviert. Allerdings gibt es bedeutsame Variationen zwischen den verschiedenen Spezies. Die biologischen Funktionen dieses komplexen

Regulationssystems sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist wahrscheinlich, daß RNAi zumindest in Pflanzen der Abwehr von Viren dient. Mehrere Beobachtungen stützen diese Theorie (zusammengestellt bei Plasterk, 2002): 1) Virusinfektionen können spezifisches RNA-vermitteltes Silencing auslösen. 2) Pflanzen mit einer Silencing-Defizienz sind anfälliger für Virusinfektionen. 3) Viele Pflanzenviren codieren für Repressoren der RNAi (Übersicht bei Baulcombe, 2004). 4) Zelluläre RNA-abhängige RNA Polymerasen (RdRPs) amplifizieren das Silencing-Signal. 5) Ein bisher nicht identifiziertes Signal kann sich im pflanzlichen Organismus verbreiten und vermittelt antivirale Immunität in Organen, die noch nicht mit dem Virus in Berührung gekommen sind. Insofern erfüllt RNAi alle Bedingungen, die an ein genomisches Immunsystem gestellt werden können: Die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd, Amplifizierung des Abwehrsignals und die Vermittlung protektiver Immunität in bisher nicht infizierten Teilen der Pflanze.

Ob und in welchem Ausmaß RNAi-Mechanismen ähnliche antivirale Aufgaben auch in Tieren und insbesondere in Säugetieren wahrnehmen, wird noch diskutiert. Die Datenmenge zu dieser Fragestellung ist begrenzt, so daß verschiedene Interpretationen möglich sind. Erst kürzlich wurden unterschiedliche Ansichten zu dem Thema publiziert (Baulcombe, 2004; Ding *et al*., 2004). Signalamplifikation durch RdRPs und *Spreading*, also Ausbreitung der Immunität im Körper, wurden in Zellen von Wirbeltieren allerdings bisher nicht beobachtet. Ebensowenig ist bisher die biologische Relevanz viraler RNAi-Inhibitoren in Säugersystemen belegt worden.

Wirbeltiere haben ein komplexes Immunsystem zur Verfügung, um auf das Eindringen von Pathogenen zu reagieren. Daher unterscheidet sich die Reaktion von Säugerzellen auf dsRNA deutlich von der, die Pflanzen und Wirbellose zeigen (Übersicht bei Wang und Carmichael, 2004). Viele Viren produzieren an irgendeinem Punkt ihres Lebenszyklus dsRNA. Daher wird cytoplasmatisch lokalisierte dsRNA, die die Länge von etwa 30 bp überschreitet, als Zeichen einer viralen Infektion angesehen. Das Auftauchen solcher dsRNA kann dementsprechend eine Reihe drastischer Reaktionen auslösen, die die erste Welle der Immunantwort gegen einen vermuteten Angriff durch Viren darstellt. Zunächst wird die Produktion von α- und β-Interferonen induziert. Diese Cytokine werden von der Zelle sekretiert und haben mehrere Folgeeffekte sowohl in den infizierten Zellen selbst als auch im benachbarten Gewebe. Dazu zählen: 1) Vermehrte Expression der Proteinkinase R (PKR). PKR wird durch die Bindung von dsRNA aktiviert und phosphoryliert eine Anzahl von Substraten, unter anderem den eukaryontischen Translations-Initiationsfaktor 2 (eIF-2). Dadurch wird die Initiation der Proteinsynthese unterbunden. 2) Hochregulation der

2'-5'-Oligoadenylatzyklase, was zur Polymerisation von ATP führt. Dadurch wird wiederum die Endonuklease RNase L aktiviert. Dieses Enzym katalysiert den Abbau aller zellulären und viralen mRNAs, so daß die Proteinsynthese in der Zelle zum Erliegen kommt. 3) Aktivierung von *natural killer*-Zellen (NKs) und Sensitivierung infizierter Zellen für deren Wirkung. Diese Ereignisfolge stellt eine Barriere für die Ausbreitung einbrechender Viren dar, die dem Immunsystem Zeit gibt, eine spezifische adaptive Antwort aufzubauen.

1.2.4.3 Anwendung in Säugetierzellen

Die beschriebene unspezifische Reaktion von Säugerzellen auf lange dsRNA im Cytoplasma, die zum Zelltod führt, verhinderte zunächst die Anwendung von RNAi zur spezifischen Gensuppression in Säugetiersystemen. Eine bahnbrechende Arbeit von Tuschl und Mitarbeitern aus dem Jahr 2001 zeigte, daß diese Schwierigkeit umgangen werden kann, wenn statt der langen dsRNA 21-mere siRNAs in die Zellen eingebracht werden (Elbashir *et al*., 2001). Dadurch wird keine Interferon-Antwort ausgelöst. Seitdem hat sich die Anzahl der Studien, in denen die RNAi-Technik verwendet wird, explosionsartig vermehrt.

Ähnlich wie Ribozyme können auch siRNAs sowohl exogen zugegeben werden als auch innerhalb der Zelle von Vektoren exprimiert werden (siehe die detaillierte Übersicht bei Mittal, 2004). In den meisten Fällen werden siRNAs dazu von Polymerase III-Promotoren des U6 oder H1 Typs aus transkribiert. Diese Promotoren sind in allen Zelltypen aktiv und steuern gewöhnlich die Synthese kleiner nukleolärer RNAs (U6) oder des RNA-Anteils der RNase P (H1). Die beiden Stränge der siRNA-Helix können von zwei distinkten Promotoren aus transkribiert werden, oder es wird zunächst ein durchgehendes selbst-komplementäres RNA Molekül hergestellt, das als *short hairpin* RNA (shRNA) bezeichnet wird. Nach der Transkription nimmt das shRNA Molekül eine Haarnadelkonformation an, indem es interne Basenpaarungen ausbildet. Im Cytoplasma wird diese *stem-loop*-Struktur von *Dicer* weiterverarbeitet, so daß eine reife siRNA entsteht (Abb. 1.4). Mithilfe derartiger Plasmidvektoren konnten stabil transfizierte Zellen selektiert werden, die noch zwei Monate nach der Transfektion effizientes Gensilencing zeigen (Brummelkamp *et al*., 2002a).

Die neue Methode wurde schnell zum Standard, wenn die Funktionen unbekannter Gene untersucht werden sollten, die in den verschiedenen Sequenzierungsprojekten gefunden wurden (Hannon und Rossi, 2004). Die Expression einer enormen Anzahl einzelner Gene wurde in Zellkulturexperimenten herabreguliert, um ihre Funktion aufzuklären oder molekulare Stoffwechselwege zu verfolgen (Silva *et al.*, 2004). Mehrere Gruppen haben umfängliche siRNA-Expressionsbibliotheken hergestellt, die gegen 10000 bzw. 8000

menschliche Gene gerichtet sind. Mithilfe dieser Bibliotheken wurden zunächst bekannte Gene mit Relevanz für den Proteinabbau im Proteasom identifiziert bzw. neue Komponenten im p53 Signalweg gefunden (Paddison *et al*., 2004; Berns *et al*., 2004). Solche Expressionsbibliotheken werden zunehmend auch in der pharmazeutischen Forschung eingesetzt (Clayton, 2004).

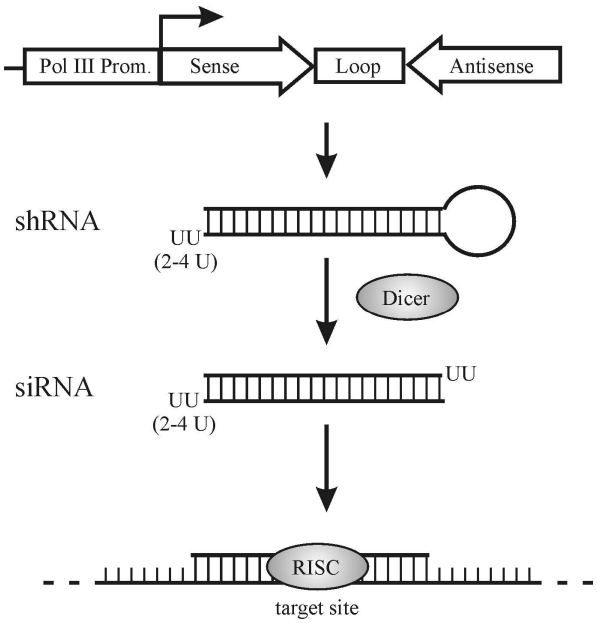

Abb. 1.4: Expression einer *short hairpin* RNA und Prozessierung zu einer siRNA. Erläuterungen siehe Text (modifiziert nach Schubert und Kurreck, 2004).

Der erste Bericht über die Anwendung von siRNA-vermitteltem Gen *knock-down* in Mäusen erschien bereits ein Jahr nachdem Elbashir und Kollegen RNAi in Säugerzellen beschrieben hatten (McCaffrey *et al*., 2002). In den vergangenen Jahren wurde RNAi mehrfach in Tiermodellen menschlicher Krankheiten verwendet, so z. B. in Mausmodellen für akutes Leberversagen (Song *et al.*, 2003; Zender *et al.*, 2003). Eine Übersicht über die Anwendung von siRNAs in Tiermodellen findet sich bei Sioud (2004). Außerdem wurden Transgene, die siRNAs codieren, erfolgreich in Keimbahnzellen von Mäusen und Ratten eingebracht (Carmell *et al*., 2003; Hasuwa *et al*., 2002). Durch diese Technik ist die äußerst arbeitsaufwendige und anspruchsvolle Herstellung transgener Tiere immens vereinfacht worden. Umfassende Überblicke über den derzeitigen Stand der RNAi-Forschung und Anwendung werden in zwei kürzlich erschienen Übersichtsartikeln gegeben (Mittal, 2004; Dorsett und Tuschl, 2004).

1.2.4.4 Antivirale RNAi-Ansätze

In verschiedenen Studien ist gezeigt worden, daß RNAi-Strategien sich grundsätzlich zur Inhibition von Viren in Säugetierzellen eignen. In Tabelle 1.1 werden die Säugetierviren zusammengefaßt, die bisher erfolgreich mit siRNAs inhibiert wurden. In den *Review*-Artikeln von Haasnoot *et al*. (2003), Ryther *et al*. (2005) sowie Schubert und Kurreck (2005) wird die Inhibition einzelner dieser Viren durch siRNAs genauer beschrieben. Einige der am weitesten fortgeschrittenen Ansätze werden im folgenden dargestellt. In der Tabelle 1.1 fehlen RNAi-Ansätze gegen Retroviren, die aufzuführen den Rahmen dieser Arbeit übersteigt. Insbesondere gegen HIV sind zahlreiche siRNAs gerichtet worden. Übersichten dazu finden sich bei Haasnoot *et al.* (2003), Lee und Rossi (2004) und Hannon und Rossi (2004).

Zwei wichtige Auslöser respiratorischer Erkrankungen sind im Mausmodell inhibiert worden. Das *Influenza A Virus* wurde von zwei Gruppen erfolgreich mit siRNAs an der Ausbreitung gehindert. Tompkins und Mitarbeiter (2004) injizierten die siRNAs mit hohem Druck in einem großen Flüssigkeitsvolumen in die Schwanzvene und erreichten dadurch eine mindestens zehnfache Reduktion der Virustiter in den Lungen der Mäuse am zweiten Tag nach der Infektion. Achtzehn Tage nach der Infektion waren alle Tiere der Kontrollgruppe tot, wogegen die Mortalität in der Gruppe der mit siRNAs behandelten Tiere auf 10-20% reduziert werden konnte. In der anderen Studie wurden dieselben siRNAs in einem Komplex mit Polyethylenimin (PEI) in die Tiere injiziert (Ge *et al*., 2004). Diese Methode ist eher als die Hochdruck-Injektion auch für eine mögliche therapeutische Anwendung am Menschen geeignet. Auch hier wurde eine zehnfache Virusreduktion 24 Stunden nach der Infektion gemessen.

Kürzlich wurde gezeigt, daß siRNAs gegen respiratorische Viren auch intranasal gegeben werden können (Bitko *et al*., 2005; Zhang *et al*., 2005). Dabei wurden effiziente siRNAs gegen das *Respiratorische Syncytial Virus (RSV)* eingesetzt. Intranasale Gabe von 5 nmol der verschiedenen siRNAs mit oder ohne Transfektionsreagenzien reichte aus, den Virustiter in den Lungen der Versuchstiere um bis zu drei Größenordnungen zu reduzieren.

Viren, deren Zielorgan die Leber ist, gelten ebenfalls als gut erreichbar für siRNAs. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, daß sich Oligonukleotide nach intravenöser Gabe vorzugsweise in der Leber anreichern. Die medizinisch relevanten *Hepatitis B*- und *Hepatitis C*-Viren replizieren allerdings nicht in Mäusen oder Ratten. Daher werden replikationskompetente Plasmide eingesetzt, mit deren Hilfe die meisten Schritte des viralen Lebenszyklus in Zellkulturversuchen und im Tiermodell nachvollzogen werden können. Kürzlich ist es auch gelungen, eine bereits existierende HBV-Genexpression in Mäusen vollständig zum Erliegen

GENOM	VIRUSFAMILIE	VIRUS	ERKRANKUNGEN (AUSWAHL)	LITERATUR	ANMERKUNGEN
ssRNA, (-)-strängig	***Orthomyxoviridae***	*Influenza A*	Respiratorische Erkrankungen	Ge *et al.*, 2003; McCown *et al.*, 2003	
				Ge *et al.*, 2004; Tompkins *et al.*, 2004	*in vivo*
	Paramyxoviridae	*Respiratory Syncytial Virus (RSV)*	Respiratorische Erkrankungen	Bitko und Barik, 2001	
				Zhang *et al.*, 2005; Bitko *et al.*, 2005	Intranasal *in vivo*
		Parainfluenzavirus	Respiratorische Erkrankungen	Bitko *et al.*, 2005	Intranasal *in vivo*
ssRNA, (+)-strängig	***Flaviviridae***	*Hepatitis C virus*	Chronische Hepatitis, Leberzirrhose, Leberkarzinom	Kapadia *et al.*, 2003; Randall *et al.*, 2003; Sen *et al.*, 2003 ; Seo *et al.* 2003 ; Wilson *et al.*, 2003 ; Yokota *et al.*, 2003	
				Kronke *et al.*, 2004	siRNAs aus Endoribonuklease-Spaltung, retrovirale *Delivery*
				Takigawa *et al.*, 2004	Lentivirale *Delivery*
				Zhang *et al.*, 2004	Adenovirale *Delivery*, gegen zelluläre Cofaktoren
		Dengue Virus	Hämorrhagisches Fieber	Zhang *et al.*, 2004	Adenoassoziierte Viren-*Delivery*
	Picornaviridae	*Foot-and mouth disease virus*	Maul- und Klauen Seuche	Kahana *et al.*, 2004 Mohaptra *et al.*, 2005	
				Chen *et al.*, 2004	*in vivo*
		Poliovirus	Poliomyelitis	Gitlin *et al.*, 2002; Gitlin *et al.*, 2005	Auftauchen von *Escape*-Mutanten
		Rhinovirus 16	Schnupfen	Phipps *et al.*, 2004	
		Coxsackievirus B3	Myocarditis; dilatative Cardiomyopathie	Schubert *et al.*, 2005a	siRNA Doppel-Expressionsvektor
				Yuan *et al.*, 2005	
		Enterovirus 71	Meningitis; Hand-Fuß-Mundkrankheit	Lu *et al.*, 2004	
		Hepatitis A virus	Hepatitis	Kanda *et al.*, 2004	

	Coronaviridae	*SARS-Virus*	Respiratorische Erkrankungen	Lu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004	
dsRNA	***Reoviridae***	*Rotavirus*	Diarrhoe	Dector *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2004	
dsDNA	***Papovaviridae***	*Polyomavirus (JC)*	Leukoenzephalopathie in immunsupprimierten Individuen	Radhakrishnan *et al.* 2004; Orba *et al.*, 2004	
		Papillomavirus (HPV16)	Cervix-Karzinom	Jiang und Milner, 2002	
	Herpesviridae	*HSV-1*	Hautausschlag	Bhuyan *et al.*, 2004	
				Karikó *et al.*, 2004	Unspezifisches Silencing über TLR 3
		HHV-6B	Asymptomatisch	Yoon *et al.*, 2004	
		Humanes Cytomegalovirus	Mononucleosis in immunsupprimierten Patienten	Wiebusch *et al., 2004*	
		Epstein-Barr Virus	Mononucleosis, Burkitt-Lymphom	Gao *et al.*, 2004	
	Hepadnaviridae	*Hepatitis B*	Hepatitis	Konishi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004 ; Hamasaki *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2004	
				Ni *et al.*, 2004	Zelluläres Gen angegriffen
				Klein *et al.*, 2003; Giladi *et al.*, 2003 ; McCaffrey *et al.*, 2003	*In vivo*
				Chen *et al.*, 2003	Stabil transfizierte Zellen
				Uprichard *et al.*, 2005	Adenovirale Delivery, *in vivo*. Beendigung einer laufenden Infektion.

Tabelle 1.1: RNAi-Anwendungen gegen humanpathogene Viren mit Ausnahme von Retroviren.

zu bringen (Uprichard *et al*., 2005). shRNA-exprimierende Vektoren wurden durch Schwanzveneninjektion rekombinanter Adenoviren in Versuchstiere eingebracht, die stabil replizierende Replicons in der Leber besaßen. Durch die antivirale siRNA wurde die Menge an Antigen im Serum, die Menge an exprimierter viraler RNA und auch die Anzahl an dsDNA-Replikationsintermediaten drastisch verringert. Der antivirale Effekt hielt über mindestens 26 Tage an.

Zahlreiche Untersuchungen wurden auch mit dem *HI-Virus* durchgeführt. Verschiedene virale Gene oder zelluläre Cofaktoren sind dazu mit siRNAs in Zellkulturversuchen inhibiert worden. Banerjea und Mitarbeiter (2003) haben mithilfe lentiviralen Transfers eine anti-*rev* siRNA in primäre hämatopoetische Vorläuferzellen eingebracht. Die Zellen wurden dann in SCID/hu chimären Mäusen expandiert. Nach 60 Tagen wurden Thymocyten aus den Tieren isoliert. Bis zu 53% der untersuchten Zellen trugen das Transgen und waren signifikant gegen eine Infektion mit HIV-1 geschützt. Aufgrund der erheblichen Erfahrung, die bereits mit anti-HIV-Ribozymen gewonnen wurde und wegen des dringenden Bedarfs an neuen HIV-Therapeutika wird erwartet, daß erste klinische Studien mit siRNAs gegen HIV in Kürze beginnen werden (Hannon und Rossi, 2004).

Eine Reihe von Firmen wie Alnylam Pharmaceuticals Inc., Benitec Ltd., International Therapeutics Inc., CytRx Corporation, Sirna Therapeutics Inc. und Nucleonics Inc. erklären auf ihren jeweiligen Internet-Seiten, siRNAs zur Behandlung von Infektionen mit HIV, HCV oder HBV zu entwickeln. Zwei Firmen, Sirna Therapeutics und Acuity Pharmaceuticals, haben kürzlich die Aufnahme von Phase I Studien zur Abschätzung der Sicherheit und Verträglichkeit von siRNA basierten Therapeutika begonnen. Die dabei eingesetzten siRNAs sollen die Gefäßbildung im Auge inhibieren, um so einer bestimmten Form der Makuladegeneration zu begegnen. Die Ergebnisse dieser Studien wären die ersten klinischen Daten, die für siRNAs erhältlich sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Oligonukleotide eine wertvolle Alternative zu niedermolekularen Substanzen bei der Behandlung viraler Infektionen werden könnten. Einige der am weitesten entwickelten AS-ODNs und Ribozyme sind schon in klinischen Studien untersucht worden, und ein AS-ODN ist zur Behandlung des Cytomegalovirus im Auge zugelassen. Obwohl die Substanzen in den eingesetzten Dosen im allgemeinen gut von den Patienten toleriert wurden, fehlt allerdings in den meisten Fällen der Beweis für ihre therapeutische Wirksamkeit. Die neuere Methode der RNAi verspricht aufgrund ihrer höheren Effizienz viele der Probleme zu lösen, die beim Einsatz von AS-ODNs und Ribozymen

auftreten. Nur dreieinhalb Jahre nach der ersten Beschreibung des Gensilencings durch siRNAs haben die ersten klinischen Studien mit dieser Methode begonnen. Weitere siRNAs gegen Krebs und Virusinfektionen werden voraussichtlich ebenfalls bald in klinische Studien kommen.

1.3 SCHWIERIGKEITEN BEI DER ENTWICKLUNG EFFIZIENTER ANTISENSE-STRATEGIEN

1.3.1 Wahl einer geeigneten Zielsequenz (*target site selection*)

Das grundlegende Prinzip der Antisense-Inhibition ist sehr einfach. Bei der Anwendung tauchen aber Hürden auf, die allen drei beschriebenen Klassen im wesentlichen gemeinsam sind: Identifizierung geeigneter Angriffsstellen auf dem Zielmolekül, Stabilisierung der Agentien gegen nukleolytischen Abbau, Vermeidung von Nebenwirkungen (*off-target*-Effekte) und die Aufnahme des Oligonukleotids in die Zielzelle oder das Zielorgan (*delivery*).
Das Prinzip der Watson-Crick-Basenpaarung erlaubt es, zu jeder beliebigen Sequenz auf einem RNA-Molekül ein komplementäres AS-ODN oder eine siRNA herzustellen. Man kann davon ausgehen, daß sich auch Ribozyme und Desoxyribozyme gegen fast jede RNA richten lassen. Allerdings verlangen diese katalytisch aktiven Moleküle bestimmte Basenfolgen an der Spaltstelle (s.o.). Obwohl sich Antisense-Moleküle ohne weiteres konzipieren lassen, ist der Großteil dieser Substanzen praktisch inaktiv. Es ist geschätzt worden, daß nur eines von acht AS-ODNs für den *knock-down* seines Zielgens geeignet ist (Stein, 2001). Für Ribozyme ist ebenfalls berichtet worden, daß 90% der möglichen Zielsequenzen auf Ziel-RNAs nicht effizient gespalten werden (Kurreck *et al.*, 2002a; Cairns *et al.*, 1999).
Die Gründe für diese Tatsache liegen zunächst in der Eigenschaft längerer RNA Moleküle, in der Zelle komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen auszubilden. Geeignete Zielsequenzen können im Inneren einer stabilen Struktur verborgen sein und nicht für die Bindung von AS-ODNs zur Verfügung stehen. RNAs sind im zellulären Kontext zudem mit Proteinen assoziiert, die ebenfalls Zielsequenzen maskieren können. Somit ist die Zugänglichkeit der Zielsequenz eine erste und entscheidende Voraussetzung für eine effiziente Antisense-Strategie. Die Hybridisierung von Ribozymen und Desoxyribozymen an RNA ist noch komplexer als die Anlagerung von AS-ODNs, da hier ein katalytisch aktiver Enzym-Substrat-Komplex mit eigener Geometrie ausgebildet werden muß (siehe z. B. Schubert *et al.*, 2004).

Zahlreiche Methoden sind beschrieben worden, um geeignete Zielsequenzen zu bestimmen (siehe die Zusammenfassungen bei Sohail und Southern, 2000 und Gautherot und Sodoyer, 2004). Strukturvorhersagen auf bioinformatischem Wege stoßen an ihre Grenzen, wenn die Faltung langer RNA-Moleküle bestimmt werden soll. Daher werden zumeist experimentelle Strategien verfolgt. Mithilfe von Oligonukleotidbibliotheken mit vollständig randomisierten oder auf das Zielmolekül abgestimmten Sequenzen und RNase H können zugängliche Regionen auf der RNA identifiziert werden. Die RNase H spaltet das Zielmolekül nur an Stellen, an denen Oligodesoxynukleotide gebunden haben. Durch *Primer-Extension* können diese Stellen anschließend kartiert werden (Ho *et al.*, 1998; Scherr *et al.*, 2000). Um den zusätzlichen Anforderungen für die Bindung von Ribozymen zu entsprechen, sind auch Ribozym-Bibliotheken mit randomisierten Substratbindungsarmen entwickelt worden (Lieber und Strauss, 1995; Bramlage *et al.*, 2000; Barroso-delJesus *et al.*, 2004). Die Vorhersage der besten Angriffspunkte auf der RNA bleibt aber in erheblichem Maße ein Prozeß von Versuch und Irrtum.

Inwieweit die Struktur des Zielmoleküls bei der Auswahl effizienter siRNAs die gleiche Bedeutung hat wie für AS-ODN- und Ribozym-Strategien, ist noch Gegenstand der Diskussion. RNAi ist ein mehrstufiger Vorgang, bei dem neben der effizienten Hybridisierung des beladenen RISC-Komplexes an das Zielmolekül auch die Aufwindung der siRNA-Duplex und die Beladung des RISC entscheidend für die Effizienz sind. Analysen der Zusammensetzung des RISC ergaben, daß die Beladung des Komplexes mit dem Antisense-Strang einer siRNA, die abhängig von thermodynamischen Eigenschaften der siRNA ist, das Ausmaß des Gen-Silencings bestimmt (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). In anderen Untersuchungen wurde wiederum ein erheblicher Einfluß der Struktur des Zielmoleküls auf die Inhibition der Genexpression durch siRNAs gefunden (Vickers *et al.*, 2003; Holen *et al.*, 2002; Bohula *et al.*, 2003).

Bei der Inhibition von Viren muß zudem die Überlegung angestellt werden, gegen welche der viralen RNA Spezies ein Antisense-Oligonukleotid gerichtet sein sollte. In mehreren Studien wurde gezeigt, daß einige virale RNA-Spezies resistent gegen siRNA-induzierten Abbau sind: siRNAs, die gegen HIV-1, Rotavirus oder RSV gerichtet waren, führten zu erheblichem Abbau der entsprechenden viralen mRNA. Die genomische RNA der Viren, die dieselbe Zielsequenz enthält, wurde aber nicht reduziert (Bitko und Barik, 2001; Arias *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2002). Diese Beobachtung läßt vermuten, daß manche genomische RNAs durch die Assoziation mit Proteinen vor Abbau geschützt sind oder sich in Zellkompartimenten befinden, die für RISC nicht zugänglich sind.

1.3.2 Stabilisierung und Pharmakokinetik

Unmodifizierte Oligonukleotide werden in Zellkulturmedium, im Blutkreislauf und im Gewebe sehr schnell von Nukleasen abgebaut. Vor einer exogenen Anwendung in biologischen Systemen ist es deswegen notwendig, die Moleküle zu stabilisieren. Die pharmakokinetischen Eigenschaften eines RNA- oder DNA-Moleküls sind im allgemeinen unabhängig von der Sequenz und werden bestimmt von der Chemie des Zuckerphosphat-Rückgrates. Mehrere hundert unterschiedliche Nukleotid-Analoga sind entwickelt worden, die RNA- oder DNA-Nukleotide in AS-ODNs, Ribozymen und siRNAs ersetzen können und Einfluß nehmen auf deren Stabilität, Interaktion mit Proteinen, Verweildauer im Blutstrom und Aufnahme in Gewebe (siehe die Übersicht bei Kurreck, 2003). Die Modifikationen können an den Basen, am Zucker oder an der Phosphordiesterbindung vorgenommen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Nukleotidmodifikationen sind in Abbildung 1.5 zusammengefasst und werden im folgenden beschrieben. Für eine detailliertere Beschreibung der Pharmakokinetik modifizierter Oligonukleotide siehe Wang *et al.* (2003) sowie Crooke (2004).

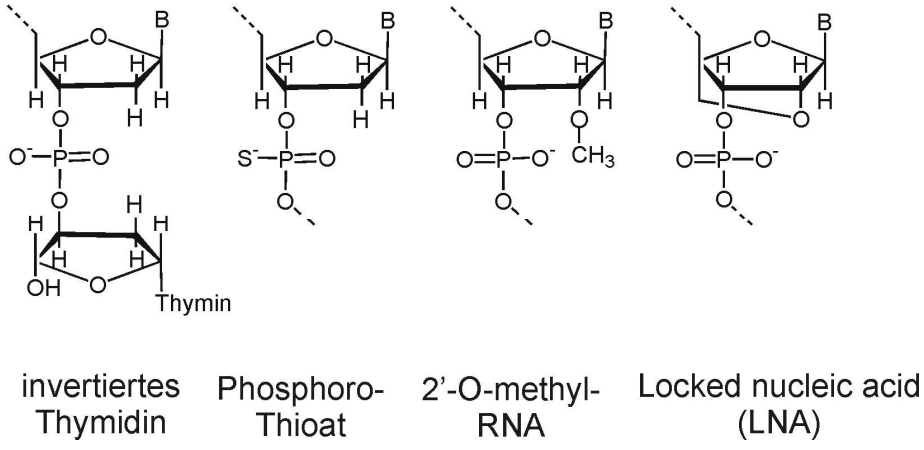

Abb. 1.5: Nukleotid-Modifikationen, die in dieser Arbeit verwendet werden (modifiziert nach Schubert *et al.,* 2003).

Die am häufigsten verwendeten Nukleotidanaloga sind *Phosphorothioate*. Sie entstehen, wenn eines der freien Sauerstoffatome in der Phosphordiesterbindung durch ein Schwefelatom ersetzt wird (Übersicht bei Eckstein, 2000). Diese Moleküle haben eine bis um das zehnfache erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen und behalten die Fähigkeit, RNase H zum Abbau der komplementären RNA zu aktivieren. Andererseits ist ihre Affinität für die Zielsequenz gegenüber unmodifizierten Molekülen deutlich reduziert. Außerdem zeigen Phosphorothioate ein erhöhtes Maß an unspezifischer Bindung an Plasmaproteine. Das zieht

verschiedene Effekte nach sich: Zum einen werden Phosphorothioate deutlich langsamer aus dem Blutkreislauf entfernt und über die Niere ausgeschieden als Phosphodiester. Sie verteilen sich auch besser in die Gewebe und werden dort relativ langsam metabolisiert. Die Halblebensdauer von Phosphorothioaten wurde mit Zeiten zwischen 20 und 120 Stunden in verschiedenen Geweben von Ratten und Affen angegeben (Wang *et al.*, 2003). Zum anderen führt die erhöhte unspezifische Wechselwirkung mit Proteinen aber auch zu unerwünschten Nebeneffekten (Levin 1999). Schnelle Infusion in Affen führte zum Beispiel zu negativen cardiovaskulären Effekten bis hin zu cardiovaskulärem Kollaps (Galbraith, 1994). In dem Dosisbereich, der in klinischen Versuchen zum Einsatz kam, wurden Phosphorothioate jedoch gut toleriert.

Einige der Probleme, die bei Verwendung von Phosphorothioaten auftreten können, lassen sich durch Modifikationen am 2'-OH der Ribose umgehen. *2'-O-methyl* und *2'-O-methoxyethyl* sowie *2'-fluoro* RNAs sind die am häufigsten verwendeten 2'-substituierten Nukleotidanaloga. Oligonukleotide mit diesen Modifikationen sind weniger toxisch als Phosphorothioate. Sie haben eine erhöhte Affinität für die Ziel-RNA. Zudem ist ihre biologische Verfügbarkeit insbesondere nach oraler und rektaler Gabe höher als bei Phosphorothioaten. RNase H-Spaltung wird durch diese Moleküle nicht induziert. Daher sind sogenannte Gapmere entwickelt worden, die 2'-O-Modifikationen nur an den Enden eines AS-ODNs tragen, während in der Mitte eine Reihe von unmodifizierten DNA-Nukleotiden für die Aktivierung der RNase H-Spaltung sorgt (Monia *et al.*, 1993).

Locked nucleic acids (LNAs) sind Ribonukleotide, in denen eine Methylenbrücke das 2'-Sauerstoffatom mit dem 4'-C des Zuckerrings verbindet. Diese Brücke hält das Molekül in einer C3'-*endo* Konformation (Übersicht bei Jepsen und Wengel, 2004). Dadurch sind LNA-Stränge vororganisiert in Richtung auf eine A-Typ Helix, wie sie auch bei RNA-RNA-Duplexen vorliegt. Die Einführung einzelner LNA-Monomere in ein DNA-Oligonukleotid führt aus diesem Grunde bereits zu einer deutlichen Erhöhung der Affinität für eine komplementäre RNA. Der Schmelzpunkt einer solchen Hybridhelix ist um bis zu 9°C pro LNA-Nukleotid erhöht. Cytotoxische Wirkungen von LNA-Molekülen wurden bisher nicht beobachtet (Wahlestedt *et al.*, 2000). Ähnlich wie 2'-O-Alkyl Modifikationen können auch LNAs die RNase H nicht aktivieren. Daher werden auch hier Gapmere verwendet (Kurreck *et al.*, 2002b).

Der Einbau stabilisierender Nukleotide in katalytisch aktive Nukleinsäuremoleküle stellt eine besondere Herausforderung dar, denn die modifizierten Analoga können die dreidimensionale Struktur des Moleküls verändern und so die katalytische Aktivität verringern oder sogar

vollständig blockieren. Insbesondere zur Stabilisierung des *Hammerhead*-Ribozyms sind ausführliche Untersuchungen angestellt worden. Beigelman und Mitarbeiter (1995) haben ein stark modifiziertes *Hammerhead*-Ribozym entwickelt, dessen Halbwertszeit im Serum mehr als zehn Tage betrug und dessen katalytische Effizienz nicht beeinträchtigt war. Das Molekül enthält lediglich fünf unmodifizierte RNA-Nukleotide im katalytischen Zentrum. An allen anderen Positionen befinden sich Phosphorothioate, 2'-O-methyl-RNAs und ein 2'-C-allyluridin. Das oben beschriebene therapeutische Ribozym HEPTAZYME ist nach der beschriebenen Methode stabilisiert worden und wurde erfolgreich in Phase I klinischen Studien eingesetzt (s.o. und Usman und Blatt, 2000).

DNAzyme haben eine intrinsisch höhere Resistenz gegen Nukleasen als Ribozyme, die aus RNA bestehen. Die Halbwertszeit eines unmodifizierten DNAzyms in Serum liegt bei etwa zwei Stunden, wogegen *Hammerhead*-Ribozyme in weniger als einer Minute abgebaut werden. Für Anwendungen *in vivo* müssen aber auch diese Moleküle zusätzlich stabilisiert werden. Verwendete Modifikationen sind invertierte Basen am 3'-Ende (z.B. Santiago *et al.*, 1999), Phosphorothioat-Bindungen (Iversen *et al.*, 2001), 2'-O-methyl-Modifikationen (Warashina *et al.*, 1999), LNAs (Vester *et al.*, 2002; Fahmy und Khachigian, 2004) sowie Phosphoroamidate (Takahashi *et al.*, 2004). Alle bisher beschriebenen Nukleotidmodifikationen in DNAzymen waren auf die Substratbindungsarme beschränkt. Der Einbau solcher Modifikationen in das katalytische Zentrum ist besonders anspruchsvoll, da man erwarten kann, daß eine präzise dreidimensionale Faltung dieser Region für die katalytische Funktion des DNAzyms unabdingbar ist. Untersuchungen zur Konservierung der einzelnen Nukleotide haben aber ergeben, daß mehrere Nukleotide durch andere natürlich vorkommende oder modifizierte Analoga ersetzt oder sogar vollständig entfernt werden können (Zaborowska *et al*., 2002; Zaborowska *et al*., 2005). Daher erschien der Versuch sinnvoll, einen Schutz gegen Endonukleasen durch möglichst weitgehende Modifikationen im katalytischen Zentrum des DNAzyms anzustreben, ohne dabei die katalytische Aktivität zu verlieren.

Unmodifizierte siRNAs sind im Zellkulturexperiment etwa vier Tage lang wirksam. Diese Stabilität reicht für viele Anwendungen in Zellkultur aus. Es sind aber auch stabilisierende Modifikationen in siRNAs eingeführt worden (Übersicht bei Dorsett und Tuschl, 2004). Die modifizierten Nukleotide können den Einbau der siRNA in RISC, die Aufwindung der Duplex durch Helikasen sowie Spaltungsgeschwindigkeit und Produktfreisetzung beeinflussen. Mehrere Gruppen haben untersucht, an welchen Stellen stabilisierende modifizierte Nukleotide ohne negativen Einfluß auf das Gensilencing eingebaut werden

können. Dabei sind Phosphorothioate, LNAs und 2'-O-Modifikationen zum Einsatz gekommen (Czauderna *et al.,* 2003; Amarzguioui *et al.*, 2003; Braasch *et al.*, 2003; Elmén *et al.*, 2005). In einer ersten vergleichenden *in vivo* Studie hatten modifizierte siRNAs allerdings keine Vorteile gegenüber der unmodifizierten Spezies (Chiu und Rana, 2003).

1.3.3 Zelluläre Aufnahme von Oligonukleotiden

Die Aufnahme von Oligonukleotiden durch das richtige Kompartiment der richtigen Zelle gehört zu den größten Hindernissen, die für eine effiziente Anwendung überwunden werden müssen. Alle beschriebenen Klassen von Antisense-Agentien sind negativ geladene Moleküle, die nicht durch hydrophobe Membranen hindurch diffundieren können. Um exogen zugegebenen Oligonukleotiden zu ermöglichen, die Zellmembran zu überwinden, sind eine Reihe von Transfektionsagentien entwickelt worden (zusammengefaßt in Seksek und Bollard, 2004). Zumeist handelt es sich dabei um Lipide mit positiv geladenen Kopfgruppen, die sich zu Liposomen zusammenlagern, an die das Oligonukeotid assoziieren kann. Die Aufnahme erfolgt dann über endozytotische Stoffwechselwege. Sie ist im allgemeinen in Standardzellinien sehr effizient. *In vivo* wirken Liposomen allerdings toxisch und immunstimulierend. Außerdem werden sie zügig aus der Blutzirkulation entfernt. Für Anwendungen *in vivo* sind daher andere makromolekulare Transportsysteme vorgeschlagen worden, unter anderem hochverzweigte Kohlenhydrate, die als Dendrimere bezeichnet werden, und biologisch abbaubare Polymerstrukturen wie Polylactide (Übersicht bei Hughes *et al.*, 2001). Um eine spezifische Aufnahme systemisch gegebener Oligonukleotide in bestimmte Zelltypen zu erreichen, können die Nukleinsäuremoleküle auch an Antikörper oder Liganden gekoppelt werden, die von zelltypspezifischen Rezeptoren erkannt werden (Hudson *et al.*, 1999).

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß Oligonukleotide *in vivo* häufig auch ohne Transfektionsreagenzien effizient aufgenommen werden. Im Tierversuch führt zum Beispiel die bereits beschriebene Methode der Hochdruck-Schwanzveneninjektion (*high pressure tail vein injection*) ohne den Zusatz von Transportvehikeln zu einer erheblichen Anreicherung des Oligonukleotids insbesondere in der Leber. Für medizinische Anwendungen am Menschen ist diese Methode nicht geeignet. Schonendere Applikationswege für die systemische Gabe werden zur Zeit entwickelt. Ein fortgeschrittenes Beispiel ist die erfolgreiche intravenöse Injektion einer chemisch stabilisierten siRNA, die an Cholesterin gekoppelt war. Dieses Konstrukt hatte stark verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften und reduzierte die

Konzentration von endogenem Apolipoprotein B im Plasma von Mäusen (Soutchek *et al.*, 2004).

Exogen zugegebene Agentien haben eine begrenzte Lebensdauer. Durch nukleolytischen Abbau und Verdünnung aufgrund von Zellteilung verlieren sie zügig ihre Wirksamkeit. Deswegen werden Ribozyme und siRNAs wie oben beschrieben häufig endogen von Vektoren aus exprimiert. Um Wachstumsvor- oder nachteile von Zellen auszugleichen, die konstitutiv ein Ribozym oder eine siRNA exprimieren, finden auch Tetracyclin-induzierbare oder *cre-lox* regulierte Transgene Anwendung (siehe Mittal, 2004; Bowden und Riegel, 2004).

Die Aufnahme von DNA-Vektoren mit Standard-Transfektionsprotokollen ist oft ineffizient, insbesondere wenn Primärzellen oder Stammzellen das Ziel sind. Ein efiizienterer Gentransfer wird erreicht, wenn virale Vektoren verwendet werden. *Oncoviren* und *Lentiviren* sind Subklassen der Familie der *Retroviren*, die als Gentransporter verwendet werden können (Brummelkamp *et al.*, 2002b). Sie integrieren ihr Genom an mehr oder weniger zufälligen Stellen des Zell-Genoms. So bleibt die Expression des Transgens auch in Tochterzellen erhalten. Lentivirale Transduktion von menschlichen T-Zellen mit einer siRNA gegen den Corezeptor CCR5 führte zum Beispiel zu einer Inhibition von HIV-1 in Zellkultur (Qin *et al*., 2003). In der klassischen Gentherapie sind retrovirale Systeme in zahlreichen klinischen Studien für die Einbringung von Transgenen verwendet worden. Da sich das fremde Gen zufällig in das zelluläre Genom integriert, besteht dabei die Gefahr einer Insertions-Mutagenese. Tatsächlich haben drei Kinder, die an einer klinischen Studie zur Therapie der angeborenen Immunschwächekrankheit SCID mit retroviralem Gentransfer teilnahmen, leukämieartige Symptome entwickelt. Eines der Kinder ist inzwischen verstorben (Check, 2005).

Adenovirale Vektoren transduzieren Zellen mit sehr hoher Effizienz. Sie integrieren ihr genetisches Material nicht in das zelluläre Genom. Das Transgen bleibt vielmehr in episomaler Form im Zellkern erhalten. Die Methode ist daher hauptsächlich für nicht-teilende Zellen anwendbar. Ein erheblicher Nachteil von Adenoviralen Vektoren ist ihre hohe Immunogenität. Ein Patient in einer klinischen Studie starb, nachdem er eine massive inflammatorische Antwort auf die Gabe eines Adenoviralen Vektors entwickelt hatte.

Rekombinante *Adeno-assoziierte Viren (AAV)* stellen eine interessante Alternative zu den beschriebenen viralen Vektoren dar: Sie sind nicht pathogen oder immunogen und transduzieren viele verschiedene Zelltypen mit hoher Effizienz. Rekombinante AAV inserieren ihr Genom an einer definierten Stelle im menschlichen Chromosom 19.

Unkontrollierte zufällige Insertionen an anderen Stellen sind sehr unwahrscheinlich. AAV-Vektoren mit Transgenen für shRNAs sind insbesondere erfolgreich eingesetzt worden, um die Replikation von HIV-1 und Dengue Virus in Zellkultur zu verhindern (Han *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Eine zusammenfassende Übersicht über virale Vektorsysteme findet sich bei Thomas und Mitarbeitern (2003).

1.3.4 Spezifität und Nebenwirkungen (*off-target* Effekte)

Die Spezifität eines Antisense-Oligonukleotids ist durch seine Sequenz unmittelbar gegeben. Wie bereits ausgeführt, ist statistisch betrachtet eine Sequenz von 15-17 Nukleotiden Länge ausreichend, um eine Stelle im menschlichen Genom eindeutig zu definieren. Eine Datenbank-Recherche ist aber in jedem Falle notwendig, um ungewollte Homologien mit anderen Genen als dem Zielgen auszuschließen. Bei Ribozymen ergibt sich die zusätzliche Schwierigkeit, daß die Länge der Bindungsarme sowohl die Bindung an das Substrat als auch die Freisetzung der Produkte beeinflußt und daher nicht frei wählbar ist. Die *multiple turnover*-Katalyse kann erheblich beeinträchtigt sein, wenn die Dissoziation der Produkte aufgrund erhöhter Affinität zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998). Die Länge der Substratbindungsregion muß also die Balance halten zwischen Spezifität und ungehinderter Produktdissoziation.

Nebeneffekte (*off-target effects*) können nicht nur dann auftreten, wenn zufällige teilweise oder vollständige Homologien zwischen Genen bestehen, sondern auch wenn die Immunantwort ausgelöst wird. Das Dinukleotid CpG wird zum Beispiel von Immunrezeptoren erkannt, die als *Toll-like receptors* (TLRs) bezeichnet werden. Es ist vermutet worden, daß die beobachtete *in vivo*-Wirkung zahlreicher AS-ODNs zumindest teilweise auf eine derartige Immunstimulation zurückzuführen ist (Agrawal und Kandimalla, 2004). Coley Pharmaceuticals nutzt diese Wirkung bei einigen Oligonukleotiden, die sich in klinischen Studien befinden, bewußt aus, um Krebs, Asthma und virale Infektionen zu behandeln (Dove *et al*., 2002).

siRNAs gelten als hochspezifische Werkzeuge. Ihre Sensibilität gegenüber Basenfehlpaarungen scheint allerdings sequenz- und positionsabhängig zu sein. In mehreren Studien sind unspezifische Wirkungen von siRNAs beschrieben worden. Dazu zählen die Induktion von Streß- und Apoptose- Genen ebenso wie die Auslösung der Interferon-Antwort (Semizarov *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2003; Bridge *et al.*, 2003; Sledz *et al.*, 2003). Außerdem wurde gezeigt, daß eine Teilhybridisierung zwischen siRNA und Ziel-RNA ausreicht, um Gene durch Translationsinhibition nach dem Muster von micro RNAs zu

supprimieren (Doench und Sharp, 2004). Die meisten siRNAs sind teilweise komplementär zu einem oder mehreren menschlichen Genen und könnten daher derartige Effekte auslösen. Um die beschriebenen Nebeneffekte zu minimieren ist es empfehlenswert, nur hocheffiziente siRNAs einzusetzen, die bereits in niedrigen Konzentrationen wirksam sind.

1.3.5 *Viral Escape*

Viren sind in der Lage, sich einer nachhaltigen Inhibition zu entziehen, indem sie Mutationen ansammeln, die die Wirkung des Virostatikums abschwächen oder vollständig aufheben. Besonders bei RNA-Viren ist dieses Problem relevant, die aufgrund einer fehleranfälligen Replikationsmaschinerie eine besonders hohe genetische Variation aufweisen können. In mehreren antiviralen Ansätzen mit RNAi ist das Problem des *viral escape* aufgetreten (Gitlin *et al.*, 2002, Boden *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2004). Die siRNAs, die in diesen Studien verwendet wurden, inhibierten das HI-Virus bzw. das Poliovirus zunächst sehr effizient. Nach längerer Exposition tauchten aber Mutanten auf, die resistent gegen die siRNAs waren. Sequenzierungen der Mutanten ergaben eine Punktmutation in der Mitte der Zielsequenz bzw. weitergehende Umordnungen im viralen Genom. In einem anderen Fall lag die Mutation sogar außerhalb der Zielregion (Westerhout *et al.*, 2005). Die Autoren vermuten, daß hier eine Veränderung der Faltungs-Struktur der Virus-RNA dafür verantwortlich ist, daß die siRNA ihre Wirkung verliert. Verschiedene Strategien können hilfreich sein, um das Auftreten resistenter Mutanten zu verhindern:

i) In vielen Fällen wurde eine möglichst stark konservierte Sequenz als Ziel ausgewählt, da Mutationen in solchen Abschnitten unwahrscheinlicher sind. ii) Statt die schnell mutierende Virus-RNA anzugreifen, können auch zelluläre Cofaktoren herunterreguliert werden (Zhang *et al.*, 2004; Novina *et al.*, 2002). Dabei ist natürlich die Gefahr von Nebeneffekten unbedingt auszuschließen. iii) In Analogie zu herkömlichen Kombinationstherapien ist es denkbar, mehrere Antisense-Agentien gleichzeitig zur Inhibition zu verwenden. Ein derartiger Ansatz wird in der vorliegenden Arbeit vorgestellt.

1.4 PICORNAVIREN

Picornaviren sind eine Familie kleiner Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom. Die genomische RNA hat Positivstrang-Orientierung und kann deswegen direkt als mRNA für die Synthese viraler Proteine fungieren. Innerhalb der Picornaviren werden sechs Genera unterschieden: Rhinoviren, Enteroviren, Parechoviren, Hepatoviren, Cardioviren und Aphthoviren. Die Familie umfaßt mehr als 200 Serotypen, darunter zahlreiche Viren mit erheblicher medizinischer Bedeutung. Dazu zählen die Polioviren als Auslöser der Kinderlähmung, Rhinoviren, die die Atemwege befallen, und Coxsackieviren, die unter anderem Herzmuskelentzündungen auslösen können. Auch eines der wirtschaftlich bedeutsamsten Tierpathogene, das Maul- und Klauenseuche-Virus, gehört zu den Picornaviren. Einige charakteristische Vertreter sind in Tabelle 1.2 zusammengefaßt. Eine umfassende Übersicht findet sich bei Racaniello (2001).

Genus	**Viren**	
Rhinovirus		>100 humane Serotypen
Enterovirus	Poliovirus	Typ 1-3
	Coxsackievirus A	23 Typen
	Coxsackievirus B	6 Typen
	Echovirus	29 Typen
	Enterovirus	Typ 68, 69, 70, 71
Parechovirus	Parechovirus	2 Typen
Hepatovirus	Hepatitis A –Virus	
Cardiovirus	Encephalomyocarditis-Virus (EMCV)	
Aphthovirus	Maul- und Klauenseuche-Virus	

Tab. 1.2: Die Familie *Picornaviridae*. Erläuterungen siehe Text. Unter Vewendung von Modrow *et al.* (2003) und Zeichhardt und Grunert (2003).

1.4.1 Struktur

Alle Picornaviren zeigen starke Ähnlichkeiten im Aufbau der Viruspartikel, in der Organisation des Genoms und im Reproduktionszyklus. Das Poliovirus ist strukturell und funktionell am besten charakterisiert und dient als Paradigma für die Familie. Im Viruspartikel ist ein einzelnes RNA-Molekül von einer ikosahedralen Proteinhülle umgeben, die einen Durchmesser von etwa 30 nm hat (Abb. 1.6). Vier Capsidproteine sind an der Ausbildung der Struktur beteiligt, von denen eines (VP4) direkt mit der RNA assoziiert ist. VP1, VP2 und VP3 befinden sich an der Außenseite des Capsids. Über die Oberfläche läuft

eine Vertiefung, die als Canyon bezeichnet wird. Im Inneren dieses Grabens liegen Adsorptionsstellen für zelluläre Rezeptoren (Hogle *et al*., 1985; Rossman *et al.*, 1985).
Die einzelsträngige genomische RNA der Viren umfaßt etwa 7200 (Rhinovirus-14) bis 8500 Basen (Maul- und Klauenseuche-Virus). Das 3'-Ende ist polyadenyliert, und an das Uridin am 5'-Ende ist ein kleines viruscodiertes Protein verestert, das als VPg bezeichnet wird und aus etwas über 20 Aminosäuren besteht. Ein einzelner Leserahmen codiert für ein Polyprotein, das noch während der Translation autokatalytisch in mehrere Teile gespalten wird (Abb. 1.7).

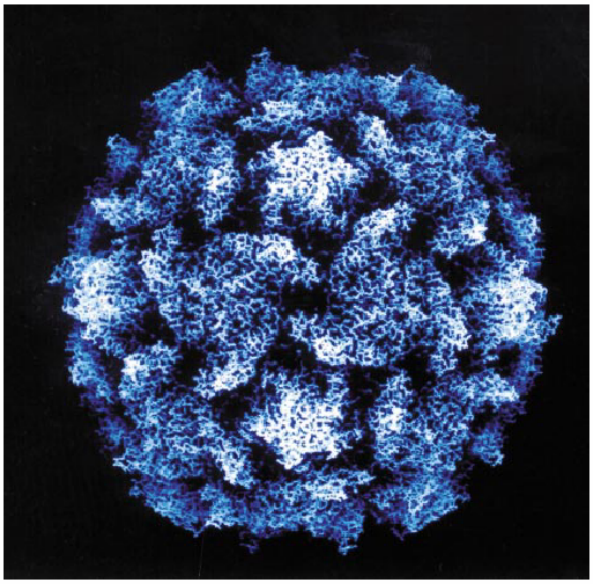

Abb. 1.6: Oberfläche des Poliovirus. Helle Bereiche entsprechen Erhebungen auf der Oberfläche, dunkle Bereiche Vertiefungen (aus Hogle, 2002).

1.4.2 Funktion

Eine besondere Rolle bei der Replikation spielt die ungewöhnlich lange nicht-translatierte Region im 5'-Bereich der Virus-RNA (5'-NTR). Ihr Umfang von 624 bis 1200 Basen (Rhinoviren bzw. Maul- und Klauenseuche-Virus) entspricht 10-15% des gesamten Genoms. Dieser Bereich enthält nach Computervorhersagen eine Reihe stabiler Sekundärstrukturen, die innerhalb verwandter Viren stark konserviert sind. Insbesondere für Rhino- und Enteroviren ist eine Consensus-Faltung vorhergesagt worden, die zumindest teilweise durch biochemische Methoden gestützt wird (Le und Zuker, 1990). Innerhalb der 5'-NTR befindet sich eine konservierte Struktur, die als Interne Ribosomen Eintritts-Sequenz (IRES) bezeichnet wird (Abb. 1.7 und Le und Maizel, 1998).
Mehrere zelluläre Proteine sind identifiziert worden, die mit dieser Region wechselwirken (Übersicht bei Stewart und Semler, 1997). Die Verfügbarkeit dieser Proteine ist ebenso wie

das Vorhandensein der passenden Rezeptoren auf der Außenseite der Zelle bedeutsam für den Zelltropismus der verschiedenen Viren. Die IRES bewirkt, daß sich ribosomale Untereinheiten an die virale RNA anlagern und führt damit zur Translation des Genoms. Diese Translationsinitiation benötigt keine *Cap*-Stuktur am 5'-Ende der RNA, die für den gewöhnlichen Translationsbeginn zellulärer RNAs vorhanden sein muß. Die *Cap*-Struktur interagiert mit eukaryontischen Initiationsfaktoren, die für die Anlagerung des Ribosoms unerläßlich sind. Durch die Wirkung viraler Proteasen wird unter anderem das Protein p220, ein wesentlicher Teil des Initiationskomplexes, gespalten und so die Translation zellulärer mRNAs und damit die Stoffwechselaktivität der Zelle zerstört. Dieser Vorgang wird als *virus-host shutoff* bezeichnet. Der *Cap*-unabhängige Translationsmechanismus der viralen RNA läuft hingegen weiter.

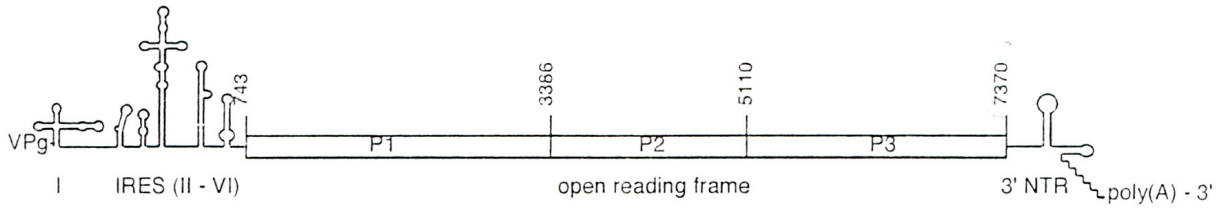

Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Poliovirus-Genoms. Region P1 codiert für Strukturproteine, P2 und P3 ergeben nach proteolytischen Spaltungen die Nicht-Strukturproteine (Aus Xiang *et al.*, 1997).

Die genauen Eintrittsmechanismen von Picornavirus-RNAs in die Zielzelle sind noch Gegenstand der Diskussion (Hogle, 2002). Das jeweilige Virus adsorbiert an einen spezifischen Membranrezeptor. 90% der Rhinoviren und mehrere Coxsackieviren verwenden das Interzelluläre Adhäsions Molekül ICAM-1 als Rezeptor. Die Coxsackieviren der B-Gruppe gelangen hingegen über den Coxsackie-Adenovirus Rezeptor, ein Protein der Immunoglobulin-Superfamilie, in die Zelle. Polioviren verwenden ebenfalls einen Rezeptor der Immunoglobulin-Superfamilie, den Poliovirus-Rezeptor. Für einige Viren sind auch Cofaktoren der Anlagerung identifiziert worden (Übersicht z. B. bei Zeichhardt und Grunert, 2003). Nach der Adsorption kommt es zu strukturellen Veränderungen der gebundenen Viren und zur Freisetzung des viralen Genoms durch die Zellmembran in das Cytoplasma der Wirtszelle. Inwieweit dieser Vorgang mit endocytotischer Aufnahme des Viruspartikels und einer Verminderung des pH-Wertes in Endosomen einhergeht, ist unklar. Da die genomische RNA über die IRES direkt von Ribosomen als mRNA erkannt wird, beginnt unmittelbar nach dem Eintritt der RNA in die Zelle die Synthese des viralen Polyproteins. Wie bereits beschrieben, wird dieses Protein cotranslational gespalten. Dabei entstehen das für die

Replikation des Virus notwendige VPg-Protein und die virale RNA-abhängige RNA Polymerase, RdRP. Die Replikation verläuft am glatten Endoplasmatischen Retikulum und wird im wesentlichen von der RdRP durchgeführt. Als Matrize dient eine ebenfalls von der RdRP hergestellte Kopie der genomischen RNA in (-)-Orientierung. An einem (-)-Strang entstehen sechs bis acht Tochterstränge mit (+)-Orientierung. Die Fehlerrate der RdRP ist mit durchschnittlich einem Fehler auf 2200 Basen relativ hoch (Wells *et al*., 2001). Jeder neusynthetisierte RNA-Strang eines Picornavirus weist demnach statistisch etwa vier Basenmutationen auf. Diese Ungenauigkeit ist verantwortlich für die hohe Mutationsrate bei Picornaviren, die die Gefahr des Auftretens von *Escape*-Mutanten erhöht. Wenn genügend virale Proteine und RNA vorhanden sind, entstehen an Membrankompartimenten neue Viruspartikel durch *self-assembly*. Nach sechs bis acht Stunden ist der Replikationszyklus eines Poliovirus beendet. Bis zu 10000 neue Viruspartikel sind in dieser Zeit in einer einzigen Zelle entstanden. Die Vorgänge im Verlaufe der Replikation führen zu starken morphologischen Veränderungen in der Wirtszelle, die man als cytopathischen Effekt bezeichnet (CPE). Schließlich wird die Zellmembran durchlässig, und die Viruspartikel werden freigesetzt.

In der vorliegenden Arbeit werden Antisense-Strategien gegen Rhinoviren und Coxsackieviren erarbeitet. Von den Rhinoviren existieren über 100 Serotypen. Sie sind Auslöser des gewöhnlichen Schnupfens und damit für etwa 40% der akuten Atemwegsinfektionen verantwortlich (Übersicht bei Couch, 1996). Obwohl die Rhinovirus-Infektion keine bedrohlichen Krankheiten auslöst, ist sie durch den mit ihr verbundenen Arbeitsausfall von erheblicher ökonomischer Bedeutung. Pro Jahr macht jeder Mensch ein bis drei Rhinovirusinfekte durch. Dabei zeigen die verschiedenen Serotypen kaum Kreuz-Reaktivität, so daß eine Immunantwort gegen ein bestimmtes Rhinovirus keinen Schutz vor einer Infektion mit einem der anderen Typen bietet. Aus diesem Grund ist auch die Entwicklung von Impfstoffen bisher nicht gelungen.

Die Coxsackieviren gehören zu den Enteroviren (siehe Zeichhardt und Grunert, 2003). Die Gruppe A umfaßt 23 Typen, die Gruppe B enthält sechs Serotypen. Sie werden über respiratorische oder fäkal-orale Wege aufgenommen, nach massiver Vermehrung im Darm in den Blutkreislauf transportiert und schließlich während der Virämie im Organismus verteilt. Eine Voraussetzung für die Magenpassage ist die hohe Säurestabilität der Enteroviren, die einen pH-Wert unterhalb von 3, wie er im Magen herrscht, vertragen. Die Symptome einer Coxsackievirus-Infektion können sehr vielgestaltig sein. Sie reichen von leichten Erkältungsbeschwerden bis zu Meningitis und Myocarditis. Insbesondere der Typ B3 gilt als

häufiger Erreger von Herzmuskelentzündungen. Eine solche Entzündung kann einen chronischen Verlauf nehmen und zu dilatativer Cardiomyopathie führen, die lebensbedrohlich sein kann und oftmals Herztransplantationen notwendig macht. Häufig läßt sich in solchen Fällen eine persistierende Coxsackievirus-Infektion nachweisen (Übersicht bei Kim *et al.,* 2001). Coxsackievirus B4 scheint in die Entstehung von Diabetes mellitus Typ I involviert zu sein. Allerdings ist die statistische Signifikanz dieser Korrelation kürzlich in Zweifel gezogen worden (Green *et al*., 2004).

Bisher stehen weder spezifische Therapien noch Schutzimpfungen für andere Enteroviren als Poliovirus zur Verfügung. Das neu entwickelte antivirale Medikament Pleconaril ist ausführlich und mit wechselndem Erfolg in klinischen Studien eingesetzt worden, um die Ausbreitung von Enteroviren zu blockieren (siehe DeClercq, 2004). Die Verbindung bindet an eine hydrophobe Tasche auf der Unterseite des Canyons und verhindert dadurch die Abgabe der viralen RNA in das Cytoplasma (Romero, 2001). Zur Therapie von persistierenden Coxsackievirusinfektionen im Herzen wurde Interferon β mit Erfolg verwendet (Kühl *et al.,* 2003). Die Entwicklung Oligonukleotid-basierter therapeutischer Strategien ist aufgrund fehlender spezifischer Therapeutika für viele der relevanten Viren ein vielversprechender und lohnender Ansatz.