

## 5 DISKUSSION

Um Antisense-Agentien zu einer Klasse effizienter Therapeutika entwickeln zu können, müssen zahlreiche Schwierigkeiten überwunden werden. Dazu zählen die Auswahl einer geeigneten Zielsequenz, die Stabilisierung des Wirkstoffes gegen nukleolytischen Abbau und die Vermeidung der Entstehung viraler Mutanten, die sich der Wirkung des Antisense-Moleküls entziehen können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben zum einen das Design antiviraler DNAzyme, die neben einer deutlich erhöhten Stabilität gegenüber nukleolytischem Abbau auch stark verbesserte kinetische Eigenschaften aufweisen und zudem geeignet sind, selbst schwer zugängliche Regionen auf ihren Ziel-mRNAs zu schneiden. Zum anderen wurden siRNAs entwickelt, die mit hoher Effizienz die Vermehrung von CBV-3, einem bedeutsamen Herz-Pathogen, in Zellkultur inhibieren. Schließlich wird ein neuartiger Doppel-Expressionsvektor vorgestellt, der siRNA-Kombinationstherapien möglich macht, indem von einem Vektor mehrere siRNAs exprimiert werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von *Escape*-Mutanten erheblich verringert.

### 5.1 OPTIMIERUNG DES 10-23 DNAZYMS

Es ist bekannt, daß die Einführung von modifizierten Nukleotiden in die Bindungsarme eines Ribozyms nicht nur die Stabilität des Moleküls beeinflußt, sondern auch Auswirkungen auf das katalytische Verhalten hat. Befinden sich die Modifikationen im katalytischen Zentrum des Ribozyms, können sie darüber hinaus die dreidimensionale Faltung beeinträchtigen und so die enzymatische Aktivität stark reduzieren.

Zunächst wurde untersucht, welche Effekte verschiedene modifizierte Nukleotide in den Bindungsarmen auf die Katalyse des DNAzyms haben. Die Unterschiede, die dabei beobachtet wurden, können im wesentlichen einer veränderten Affinität zum Zielmolekül zugeschrieben werden. Die DNAzyme wurden mit einem hohen Überschuß an langer Substrat-RNA inkubiert. Diese Bedingungen simulieren die Situation innerhalb einer Zelle, in der die RNA stark gefaltet und im Überschuß vorliegt. Neben der katalytischen Aktivität des DNAzyms kann in diesem Versuchsaufbau auch eingeschätzt werden, wie gut das DNAzym

um Zielsequenzen innerhalb stabiler Sekundärstrukturen konkurrieren kann. Die gewählten Salzbedingungen entsprechen denen, die häufig für Untersuchungen an Ribozymen verwendet werden. Sie erlauben hohe Reaktionsraten. Bei physiologischen Bedingungen liegt insbesondere die Konzentration an Magnesium-Ionen um das 10-fache unter der hier eingesetzten. Die Aktivität eines DNAzyms ist unter solchen Umständen erheblich geringer. Allerdings existieren in der Zelle andere Faktoren, die mit Ribozymen interagieren und eine katalytisch aktive Konformation stabilisieren können. Spermin, das wichtigste Polyamin in eukaryontischen Zellen, kann z. B. die katalytische Aktivität eines *Hairpin*-Ribozyms aufrechterhalten, auch wenn keine zweiwertigen Metall-Ionen vorhanden sind (Earnshaw und Gait, 1998). Aufschluß über die Anwendbarkeit eines *in vitro* optimierten DNAzyms *in vivo* können daher letztlich nur Experimente in Zellkultur oder in Tiermodellen geben.

Ein invertiertes Thymidin am 3'-Ende eines DNAzyms ist häufig zur Stabilisierung verwendet worden. In einer Studie, in der das kinetische Verhalten von DNAzymen unterschiedlicher Armlänge analysiert wurde, hatte die Einführung eines invertierten Thymidins deutliche Auswirkungen, die je nach Armlänge von einer leichten Verminderung bis zu einer Vervierfachung der Aktivität reichten (Sun *et al.*, 1999). In der hier vorliegenden Untersuchung wurde zwar kein signifikanter Einfluß dieser Modifikation auf die Aktivität eines ansonsten unmodifizierten Enzyms gefunden. Wurde ein invertiertes Thymidin aber an einige der modifizierten DNAzyme angehängt, so änderte sich deren katalytische Aktivität in unvorhersagbarer Weise (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zum invertierten Thymidin hatte die Einführung von Phosphorothioat-Bindungen oder 2'-O-methyl-Nukleotiden in die Bindungsarme starke Effekte auf die Katalyse. Ein DNAzym, das ausschließlich Phosphorothioate in den Bindungsarmen enthielt, zeigte eine stark reduzierte Aktivität. Der Grund dafür liegt vermutlich in der Verminderung seiner Affinität zur Zielsequenz, die durch Schmelztemperaturmessungen bestätigt wurde. Im Gegensatz dazu wurde mit Endblöcken von je vier 2'-O-methyl-Nukleotiden eine Versechsfachung der Anfangsgeschwindigkeit erreicht. Warashina und Mitarbeiter haben einen ähnlichen Einfluß von Phosphorothioaten und 2'-O-methyl-Modifikationen beobachtet (Warashina *et al.*, 1999). Der Effekt war allerdings wesentlich weniger ausgeprägt, da nur zwei modifizierte Nukleotide in jedem Substratbindungsarm verwendet wurden. In einer anderen Studie wurde kein Einfluß von Phosphorothioaten auf die Spaltaktivität eines DNAzyms gegen die TNF $\alpha$ -mRNA gefunden (Iversen *et al.*, 2001). Allerdings wurde in dieser Arbeit nur die kurze Zielsequenz als Substrat für das DNAzym verwendet. Dabei wird nicht berücksichtigt, inwieweit das DNAzym mit stabilen Faltungsstrukturen der RNA

konkurrieren kann. Insbesondere diese Fähigkeit wird aber durch Affinitätsänderungen beeinflusst.

Die in der Literatur beschriebenen DNAzyme mit LNA-Monomeren in den Bindungsarmen hatten eine erhöhte katalytische Aktivität unter *single* und unter *multiple turnover* Bedingungen verglichen mit dem unmodifizierten Enzym (Vester *et al.*, 2002). Auch in der bisher einzigen Untersuchung in Zellkultur waren LNA-haltige DNAzyme bereits bei geringeren Konzentrationen aktiv als unmodifizierte Phosphordiester-Enzyme (Fahmy und Khachigian, 2004). LNAs bewirken ebenso wie 2'-O-methyl-Modifikationen eine C3'-*endo* Konformation des Zuckeranteils eines Nukleotids. Bei der Bildung einer Duplex mit der Komplementärsequenz führt diese Konformationsänderung zu einer A-Typ Helix, wie sie auch bei RNA-RNA Helices vorliegt (Bondensgaard *et al.*, 2000). Die daraus resultierende höhere Affinität kann der Grund für die beobachteten höheren katalytischen Raten sein. Diese Ergebnisse stellen ein früheres Resultat in Frage, wonach DNAzyme mit RNA-ähnlichen Substraterkennungsarmen eine reduzierte Spaltaktivität haben (Ota *et al.*, 1998). Bei Enzymüberschuß wurden auch in der vorliegenden Arbeit verbesserte Reaktionsraten für DNAzyme mit LNA-Nukleotiden in den Armen gemessen. Unter Substratüberschuß-Bedingungen kann ein zu hoher LNA-Gehalt allerdings die Produktfreisetzung beeinträchtigen und damit die Reaktion verlangsamen.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß unterschiedliche Modifikationen in die Substratbindungsarme eingeführt werden können, wurde die Spaltungseffizienz durch eine Feineinstellung der Armlänge und des Anteils an modifizierten Nukleotiden optimiert. Eine systematische Untersuchung führte zu einer 20-fachen Erhöhung der Aktivität für ein DNAzym mit sieben Nukleotiden in den Bindungsarmen und je vier oder fünf 2'-O-methyl-Monomeren als Endblöcken. Das beste LNAzym enthielt drei LNA-Nukleotide in jedem Arm und zeigte eine Versechsfachung der Anfangsgeschwindigkeit der Katalyse. Eine weitere Erhöhung des Anteils an LNA-Nukleotiden bedingte eine Reduzierung der Aktivität. Dafür können zwei mögliche Erklärungen angeführt werden: i) Modifizierte Nukleotide in der Nähe des katalytischen Zentrums können die Faltung der katalytischen Domäne beeinträchtigen und/oder ii) eine optimale Affinität zur Ziel-RNA ist für eine hohe Effizienz nötig. Ein Vergleich des Schmelzverhaltens von Hybriden aus Ziel-RNA und 2'-O-methyl modifizierten DNAzymen ergab, daß die höchste gemessene Aktivität im *multiple turnover* mit einer Schmelztemperatur der Hybridduplex um 37°C korreliert. Auch für DNAzyme, die mit LNA-Monomeren modifiziert waren, führte eine Verminderung der Schmelztemperatur von 63°C auf 48°C zu höheren Reaktionsraten. Diese Messungen belegen, daß für die Affinität

von DNAzymen zum Zielmolekül ein Mittelweg gefunden werden muß, der verbesserte Substratbindung ebenso erlaubt wie ungehinderte Produktfreisetzung.

Bei der Optimierung der Bindungsarme, wie sie hier beschrieben ist, wurden nur symmetrisch aufgebaute Arme untersucht. Cairns und Mitarbeiter haben allerdings gezeigt, daß asymmetrische Bindungsarme in manchen Fällen zu höheren Reaktionsraten führen können (Cairns *et al.*, 2000a). Eine individuelle Optimierung für jeden der beiden Bindungsarme könnte also unter Umständen die katalytischen Eigenschaften eines DNAzyms noch weiter verbessern. Die Untersuchung aller möglichen Kombinationen von Armlängen und Modifikationen lag allerdings außerhalb des Rahmens der hier dargestellten Experimente.

Die Verwendung modifizierter Nukleotide in den Bindungsarmen schützt das DNAzym gegen Degradation durch Exonukleasen. Insbesondere in Geweben spielen aber auch Endonukleasen eine wichtige Rolle beim Abbau von Oligonukleotiden (Yu *et al.*, 2004). Es ist vermutet worden, daß Oligonukleotide, die nur an den Enden stabilisiert sind, in Geweben einem schnellen Abbau unterworfen sind und deswegen nicht erfolgreich eingesetzt werden konnten (Crooke, 2000). Dieser Gefahr könnte durch zusätzliche Modifikationen im Innern des DNAzyms entgegengewirkt werden. In der einzigen vorhergehenden Studie, die den Einsatz modifizierter Nukleotide im katalytischen Zentrum eines DNAzyms beschreibt, führte die Ersetzung aller Pyrimidine oder sämtlicher Nukleotide in der katalytischen Region durch Phosphorothioate zu einem weitgehenden oder sogar vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität (Sioud und Leirdal, 2000). Um ein DNAzym mit möglichst großer Stabilität gegen Endonukleasen und hoher Aktivität zu erhalten, war dementsprechend ein systematisches Vorgehen nötig. Untersuchungen des katalytischen Zentrums des DNAzyms in dieser Arbeitsgruppe hatten überraschenderweise ergeben, daß eine Reihe von Nukleotiden in dieser Region ausgetauscht oder weggelassen werden können (Zaborowska *et al.*, 2002; Zaborowska *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, daß sechs der 15 Nukleotide im Zentrum des Enzyms durch ihre 2'-O-methyl-Analoga ersetzt werden können, ohne daß die katalytische Aktivität erheblich eingeschränkt wird. Die Tatsache, daß Cytidin an Position 7 und Thymidin an Position 8 modifizierbar sind, bestätigt die Beobachtung, daß sie für die katalytische Funktion des DNAzyms disponibel sind und sogar vollständig entfernt werden können (Zaborowska *et al.*, 2005). Dieselben sechs Nukleotide konnten mit dem gleichen Ergebnis auch in einem DNAzym mit anderer Substratspezifität modifiziert werden. Der Schutz des katalytischen Zentrums gegen endonukleolytischen Abbau, der hier entwickelt wurde, scheint insofern unabhängig von der Sequenz der Bindungsarme für viele DNAzyme einsetzbar zu sein. Anschließend wurde das optimierte Arm-Design mit dem modifizierten

Zentrum kombiniert. Das resultierende Enzym DH5E hatte gegenüber dem unmodifizierten DNAzym eine 10-fach erhöhte Aktivität.

Bei der Übertragung des Aufbaus auf ein Desoxyribozym mit einer anderen Spezifität war nur eine geringfügige Veränderung notwendig. Obwohl die Modifikationen im Zentrum hier keinen nachteiligen Einfluß auf die Spaltrate hatten, und obwohl 5 nt lange 2'-O-methyl-Endblöcke die Aktivität um den Faktor drei erhöhten, führte die Kombination der beiden Designs zu einem DNAzym mit nur geringer Aktivität im *single turnover* und mit fast vollständiger Inaktivität bei Substratüberschuß. Die Aktivität dieser Spezies war auch gegenüber dem 19-meren Substrat stark beeinträchtigt. Aufgrund dieser Beobachtung kann davon ausgegangen werden, daß die verminderte Effizienz unabhängig von der Sekundärstruktur des Zielmoleküls ist. Wahrscheinlich sind Wechselwirkungen zwischen den inneren Nukleotiden der Bindungsarme und dem katalytischen Zentrum für die reduzierte Katalyserate verantwortlich. Wurden 4 nt-Endblöcke in den Armen verwendet statt der ursprünglichen 5 nt, konnte die Aktivität wieder hergestellt werden und war sogar um den Faktor drei gegenüber dem unmodifizierten Enzym erhöht.

Nach der Optimierung der katalytischen Eigenschaften wurde die Resistenz der verschiedenen DNAzym-Spezies gegen nukleolytischen Abbau in Zellkulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum analysiert. Für das DNAzym, das mit einem invertierten Thymidin am 3'-Ende geschützt war, stieg die Halbwertszeit von etwa 2 auf über 20 Stunden. Dieses Ergebnis entspricht verschiedenen in der Literatur angegebenen Werten, bei denen eine Verzehnfachung der Stabilität in menschlichem Serum für derart modifizierte DNAzyme gefunden wurde (Sun *et al.*, 1999; Dass *et al.*, 2002). Die in der Literatur angegebenen Halbwertszeiten für DNAzyme mit invertiertem Thymidin in Zellkulturmedium variieren hingegen von sechs Stunden (Sioud *et al.*, 2000) bis drei Tage (Dass *et al.*, 2002). Diese Diskrepanzen könnten entweder auf eine Sequenzabhängigkeit der Stabilität hindeuten, oder sie beruhen auf Unterschieden im experimentellen Aufbau wie Konzentration an Enzym, Nachweismethode usw. Die Effizienz einer stabilisierenden Modifikation sollte daher nur zwischen DNAzymen gleicher Sequenz und unter denselben Bedingungen verglichen werden, wie das in dieser Studie geschieht.

Es ist bereits gezeigt worden, daß Phosphorothioat-Bindungen oder 2'-O-methyl- Nukleotide an den Enden die biologische Stabilität von DNAzymen erhöhen können (Warashina *et al.*, 1999; Cieslak *et al.*, 2002). Iversen und Mitarbeiter (2001) fanden eine Steigerung der Halbwertszeit in 50% menschlichem Serum von 3 Stunden für das unmodifizierte DNAzym auf mehr als 50 Stunden für ein DNAzym mit Phosphorothioat-Armen. Interessanterweise war in der vorliegenden Arbeit ein DNAzym mit Phosphorothioat-Modifikationen mehr als

10-fach stabilisiert, wogegen 2'-O-methyl-Modifikationen in den Armen nur eine mäßige Stabilisierung zur Folge hatten. 2'-O-methyl-Modifikationen in Zentrum und Armen zusammen erhöhten die Biostabilität in Zellkulturmedium allerdings auf 25 Stunden.

Die Verwendung von LNAs ist eine weitere geeignete Option zur Stabilisierung von AS-ODNs (Wahlestedt *et al.*, 2000; Kurreck *et al.*, 2002). Zur Stabilisierung von DNAzymen wurden sie bisher aber noch nicht verwendet. In den einzigen Studien, in denen bisher LNA-Modifikationen eingesetzt wurden, sind einzelne Nukleotide im Inneren der Substratbindungsarme durch LNA-Monomere ersetzt worden, um die kinetischen Eigenschaften zu verbessern (Vester *et al.*, 2002; Vester *et al.*, 2004; Fahmy *et al.*, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse belegen, daß LNAs sich sehr gut zur Stabilisierung von DNAzymen einsetzen lassen.

Schließlich wurde untersucht, inwieweit die unterschiedlich modifizierte DNAzyme gegen Abbau durch Endonukleasen geschützt sind. Wie erwartet hatte das invertierte Thymidin am 3'-Ende in dieser Versuchsanordnung keinen Effekt. Das gleiche Ergebnis wurde für 2'-O-methyl-Endblöcke erhalten. Thioat-Bindungen und LNA-Monomere in den Bindungsarmen erhöhten die Stabilität. Die höchste Resistenz gegen endonukleolytischen Abbau wurde aber für das optimierte DNAzym DH5 gemessen, in dem Arm- und Zentrumsnukleotide modifiziert waren.

Um die DNAzym-Varianten mit den unterschiedlichen Modifikationen bezüglich ihrer Stabilität in Zellkulturmedium, ihrer Resistenz gegen Endonukleasen und ihrer katalytischen Aktivität miteinander vergleichen zu können, wurde ein *performance index* eingeführt. Dieser Wert stellt ein zusammenfassendes Maß für Eigenschaften eines modifizierten DNAzyms dar. Er wurde definiert als das Produkt der relativen Reaktionsrate bei Substratüberschuß, der Halbwertszeit in Zellkulturmedium und der Stabilität gegen die S1 Endonuklease, bezogen auf das unmodifizierte Molekül. Eine ähnliche Berechnung wurde in einer früheren Studie von Beigelman *et al.* (1995) bei der Optimierung eines *Hammerhead*-Ribozyms verwendet.

Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt. Das DNAzym mit Phosphorothioaten in den Armen zeigte eine deutlich erhöhte Biostabilität, der Index ist aber aufgrund der niedrigen katalytischen Rate nur unwesentlich erhöht. Ein invertiertes Thymidin am 3'-Ende steigerte die Serumstabilität des Moleküls, hatte aber keinen Einfluß auf die Aktivität oder die Stabilität gegen Endonukleasen. DNAzyme mit 2'-O-methyl Modifikationen oder LNA-Monomeren in den Substratbindungsregionen zeigten eine verbesserte katalytische Effizienz und erhöhte Stabilität gegen Abbau, was sich in einem *performance index* ausdrückt, der etwa 80-fach erhöht ist. Das optimierte DNAzym mit 2'-O-methyl-Modifikationen in Bindungsarmen und katalytischem Zentrum hatte eine etwa

10-fach erhöhte Reaktionsrate und die höchste Biostabilität. Diese Eigenschaften führen zu einem 250-fach erhöhten *performance index*.

	$v_{\text{init}}$	$t_{1/2}$ Medium	$t_{1/2}$ S1-Nukl.	Performance index
<b>DH5-9/0</b>	1	1	8	<b>1</b>
<b>DH5-Thio</b>	0.23	11.5	1.6	<b>4</b>
<b>DH5-iT</b>	0.9	11.5	1	<b>10</b>
<b>DH5-OMe7/5</b>	22.4	3.5	1	<b>78</b>
<b>LH5-7/3</b>	5.7	9.5	1.5	<b>81</b>
<b>DH5 E</b>	9.7	12.5	2.1	<b>257</b>

Tab. 5.1: *Performance index* für modifizierte DNAzyme. Angegeben ist die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltreaktion bei Substratüberschuß, die Halbwertszeit in Medium, die Halbwertszeit im S1-Nuklease-Assay und der daraus ermittelte Index.

Die Optimierungsstudie für das DNAzym DH5 hat somit eine modifizierte Variante des Ausgangsmoleküls ergeben, die sowohl hinsichtlich ihrer Katalysegeschwindigkeit als auch hinsichtlich ihrer Halbwertszeit in biologischen Flüssigkeiten stark verbessert ist. Das Design dieses Moleküls ließ sich im wesentlichen auch auf ein DNAzym mit anderer Spezifität übertragen, wobei nur eine kleine Veränderung des Aufbaus nötig wurde.

## 5.2 AKTIVITÄT DES DNAZYMS GEGEN 5'-NTRS VERSCHIEDENER RHINO- UND ENTEROVIREN

Die Entwicklung effizienter AS-ODNs oder Ribozyme wird häufig von der Zugänglichkeit möglicher Zielsequenzen bestimmt. Für viele Anwendungen besteht die einfachste und erfolgversprechendste Strategie darin, sich den Beschränkungen, die durch die Faltungsstruktur der mRNA gegeben sind, zu fügen und Zielregionen, die nicht zugänglich sind, zu vermeiden. In manchen Fällen ist man aber auf eine bestimmte Zielsequenz festgelegt.

Das oben beschriebene DNAzym DH5 ist gegen eine stark konservierte Sequenz in der viralen 5'-NTR gerichtet. Es könnte daher als antivirales Agens gegen zahlreiche Picornaviren eingesetzt werden. Es wurde bereits beschrieben, daß das Enzym gegen die 5'-NTR von HRV-14 sehr aktiv war. Überraschenderweise wurde das identische Sequenzelement im Kontext der CAV-21 mRNA von DH5 fast gar nicht gespalten. Cocksackie- und Rhinoviren sind verwandte Mitglieder der Picornavirus Familie (Übersicht bei Zeichhardt und Grunert, 2000), für deren 5'-NTRs eine Consensus-Faltung vorhergesagt

wurde (Rivera *et al.*, 1988; Le und Zuker, 1990). Die Tatsache, daß DH5 die CAV-21-RNA nicht spaltet, deutet auf unterschiedliche lokale Strukturen der verwandten Virus-5'-NTRs.

Mithilfe von mutierten inaktivierten Kontrollen konnte gezeigt werden, daß beide Zielsequenzen für AS-ODNs zugänglich sind, während das DNAzym die CAV-21 RNA nicht bindet. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Hybridisierung von DNAzymen ein komplexerer Vorgang ist als die Anlagerung von AS-ODNs. Das sperrige katalytische Zentrum von DNAzymen stellt eine zusätzliche Barriere für die Anlagerung an eine Zielsequenz dar. Außerdem müssen die sterischen Bedingungen in der Zielregion die Faltung des DNAzyms in eine aktive Struktur zulassen, damit die Reaktion ausgeführt werden kann.

Diese Interpretation erlaubt die Vermutung, daß modifizierte Nukleotide mit erhöhter Affinität für ihre Komplementärsequenz ungünstige Strukturen im Zielmolekül aufschmelzen könnten und eine enge Bindung zwischen Enzym und RNA herbeiführen, die die Ausbildung eines produktiven Enzym-Substratkomplexes ermöglicht. Daher wurden die oben identifizierten Arm-Modifikationen verwendet, die eine erhöhte Bindungsaffinität des DNAzyms bewirken.

Vickers und Kollegen (2000) haben beschrieben, daß der Einbau von 2'-O-methyl-RNA in AS-ODNs deren Fähigkeit erhöht, die Expression eines Reportergens auch dann zu inhibieren, wenn die Zielsequenz in einem sterisch anspruchsvollen Zusammenhang steht. In ähnlicher Weise ist berichtet worden, daß ein DNAzym mit LNA-Modifikationen in den Bindungsarmen die stark gefaltete ribosomale 23S-RNA effizienter schneidet als das unmodifizierte Analogon (Vester *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß ein DNAzym mit 2'-O-methyl-Monomeren in den Bindungsarmen in der Lage ist, die scheinbar nicht zugängliche Zielsequenz auf der CAV-21 RNA zu schneiden. Dieser Befund wurde mit einem DNAzym bestätigt, das LNAs enthielt, als einer weiteren Modifikation, die eine hohe Affinität bewirkt. Es ist häufig beobachtet worden, daß katalytisch aktive Nukleinsäuren einen gewissen Anteil ihrer Ziel-RNA auch nach langer Inkubation nicht schneiden (Stage-Zimmermann und Uhlenbeck, 1998). Neben ihrer bereits beschriebenen erhöhten katalytischen Aktivität zeigen die hier eingesetzten modifizierten DNAzyme auch die Fähigkeit, ihre Ziel-RNA annähernd vollständig abzubauen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Annahme, daß der Grund für die Resistenz mancher Zielsequenzen gegenüber einer Spaltung durch ein komplementäres DNAzym in der mangelnden Fähigkeit des Enzyms zu suchen ist, mit stabilen internen Strukturen des Zielmoleküls zu konkurrieren.

Ein bedeutsames Pathogen aus der Gattung der Enteroviren ist das CBV-3, ein wichtiger Erreger von Herzkrankheiten. Die Anwendungsbreite des beschriebenen DNAzyms sollte



auch auf dieses Virus ausgeweitet werden. Ebenso wie für CAV-21 galt für die CBV-3 RNA, daß sie von unmodifiziertem DH5 kaum geschnitten wurde. Bereits durch die Einführung von 2'-O-methyl-Modifikationen in die Substratbindungsarme wurde eine substantielle Spaltung der Ziel-RNA erreicht, obwohl in der Zielregion der CBV-3 RNA eine einzelne Base von der Consensussequenz abweicht. Da DNAzyme sehr sequenzspezifisch wirken (Cairns *et al.*, 2000b), konnte die Spaltaktivität deutlich verbessert werden, wenn ein DNAzym mit perfekter Homologie zur Zielsequenz der CBV-3 RNA verwendet wurde.

Als unabhängige Kontrolle wurde schließlich ein DNAzym eingesetzt, das gegen die mRNA von VR1 gerichtet war. VR1 ist ein wichtiger Schmerzrezeptor, der als Integrator von Schmerzreizen fungiert. Er wird aktiviert durch Wärme, Protonen und Capsaicin, die scharfe Komponente von Chilischoten (Caterina *et al.*, 1997). Die Ergebnisse mit der VR1-mRNA entsprechen den Beobachtungen mit der RNA der Coxsackieviren: Das DNAzym war inaktiv, obwohl die Zielregion für AS-ODNs im RNase H Assay zugänglich war. Nach der Einführung modifizierter Nukleotide in die Bindungsarme des DNAzyms wurde die RNA auch in diesem Fall effizient gespalten. Diese Befunde lassen vermuten, daß die entwickelte Strategie, unvorteilhafte Zielstrukturen durch die Verwendung hochaffiner modifizierter Nukleinsäure-Enzyme aufzuschmelzen, allgemein anwendbar ist.

Insbesondere wenn die Auswahl an Spaltstellen begrenzt ist, wird diese Strategie wertvoll sein. Ein Beispiel für eine derartige Situation ist die Spaltung chimärer RNAs, wie sie bei verschiedenen Krankheiten wie Leukämie auftreten. In einer solchen Anwendung ist man notwendigerweise auf die Region beschränkt, in der die beiden Teile der RNA aneinander stoßen (Warashina *et al.*, 1999). Nukleinsäure-Enzyme werden auch als ein Werkzeug verwendet, um heterogene Enden von RNA Molekülen zu prozessieren (Ferré-D'Amaré und Doudna, 1996; Price *et al.*, 1995). Auch in diesem Fall bedingt der experimentelle Aufbau die Spaltung an einer einzigen Sequenz, die für unmodifizierte DNAzyme unter Umständen nicht zugänglich ist.

Die Vorgehensweise, hoch strukturierte RNA Moleküle zu spalten, indem modifizierte Bindungsarme verwendet werden, kann auch auf andere *in vitro*-selektierte DNAzyme wie das 8-17 DNAzym (Santoro und Joyce, 1997) und das zweiteilige DNAzym (Feldman und Sen, 2001) oder RNA-Ribozyme wie das *Hairpin* und das *Hammerhead*-Motiv (Doudna und Cech, 2002) anwendbar sein. Die hier erhaltenen Ergebnisse können daher Anlaß bieten, auch solche Ribozym-Strategien zu überdenken, die zunächst wegen unzureichender Spaltung der Ziel-RNA aufgegeben wurden.

Trotz der dargestellten hervorragenden kinetischen Eigenschaften und der hohen Nuklease-Resistenz der verbesserten DNAzyme *in vitro* zeigten sich diese Moleküle in Zellkulturversuchen anderen Methoden unterlegen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise liegt der Grund dafür in einer ineffizienten Aufnahme des Enzyms in die Zelle oder in nicht ausreichender Freisetzung nach der Aufnahme. Unter Umständen reichen aber auch die intrazellulären Konzentrationen an zweiwertigen Ionen nicht aus, um die von uns eingesetzten DNAzyme ausreichend für die Bindung und Spaltung ihrer Ziel-RNA zu stabilisieren. Cieslak und Mitarbeiter (2003) haben spektroskopische Methoden eingesetzt, um die Faltung eines DNAzyms bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen zu analysieren. Wenn intrazelluläre Salzbedingungen simuliert wurden, war das DNAzym nur teilweise gefaltet, hybridisierte nicht mit dem Substrat und zeigte nur rudimentäre katalytische Aktivität. Die Autoren deuten davon ausgehend an, daß DNAzyme in transfizierten Zellen inaktiv sein könnten. Die in vielen Studien beobachteten spezifischen Effekte wären dann ausschließlich auf Antisense-Effekte zurückzuführen.

### 5.3 RNA-INTERFERENZ GEGEN COXSACKIEVIRUS B3

Mit der Entwicklung von RNAi zu einer allgemein anwendbaren Methode in Säugetierzellen stand ein attraktives neues Instrument zur Verfügung, um virale RNAs zu spalten. In mehreren Untersuchungen ist gezeigt worden, daß siRNAs deutlich effizienter sind als AS-ODNs (Grünweller *et al.*, 2003; Miyagishi *et al.*, 2003). Daher sollte eine RNAi-Strategie gegen CBV-3 als komplementärer und möglicherweise wirkungsvollerer Ansatz zum optimierten DNAzym entwickelt werden.

Zunächst wurden siRNAs gegen die 5'-NTR von CBV-3 entwickelt. Keines der getesteten Moleküle hatte bis zu einer Konzentration von 100 nM einen inhibierenden Effekt auf die Expression eines Reportergens, das mit der 5'-NTR von CBV-3 fusioniert war. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Studien in der Literatur, in denen ebenfalls keine aktiven siRNAs gegen die 5'-NTR von RNA-Viren gefunden werden konnten (Wilson *et al.*, 2003; Phipps *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2005). Diese Region ist wegen ihres hohen Konservierungsgrades ein attraktives Ziel für Antisense-Strategien. Sie enthält die IRES, von der bekannt ist, daß sie stark stabilisierte Sekundärstrukturen ausbildet. Selbst in Fällen, in denen die Virusreplikation durch siRNAs, die gegen die 5'-NTR gerichtet waren, inhibiert werden konnte, war der Effekt oft schwach im Vergleich zu siRNAs gegen die codierende Region des Virus (Yokota *et al.*, 2003; Zusammenfassung bei Haasnoot, 2003). Daher wurde

zunächst untersucht, ob und in welchem Maße die Struktur des Zielmoleküls Einfluß auf das siRNA-induzierte spezifische Silencing eines Gens hat.

RNAi ist ein mehrstufiger Vorgang, bei dem neben der Hybridisierung des beladenen RISC-Komplexes an das Zielmolekül auch die Aufwindung der siRNA-Duplex und die Beladung des RISC wichtig für die Effizienz sind. Zunächst waren einfache empirische Regeln für die Selektion effizienter siRNAs aufgestellt worden, die den GC-Gehalt und die Position der Zielsequenz innerhalb einer mRNA betrafen (Elbashir *et al.*, 2002). siRNAs, die diesen Regeln entsprachen, zeigten aber drastische Variationen in ihrer Effizienz (Vickers *et al.*, 2003; Kretschmer-Kazemi Far und Szakiel, 2003; Holen *et al.*, 2002). Eine genauere Analyse der Zusammensetzung des RISC ergab, daß die Beladung des Komplexes mit dem Antisense-Strang einer siRNA abhängig von thermodynamischen Eigenschaften der siRNA ist (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Es wurde gefunden, daß die relative Stabilität der beiden Enden der siRNA-Duplex in entscheidender Weise beeinflußt, in welchem Maße jeder der beiden Stränge in den RNAi-Weg eintreten kann. Weitere Sequenzmotive innerhalb der siRNA wurden identifiziert, die ebenfalls von Bedeutung für die Wirksamkeit der siRNA sind. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Algorithmen entwickelt, die eine höhere Erfolgsrate beim Design von siRNAs erlauben (Amarzguioui und Prydz, 2004; Reynolds *et al.*, 2004). Die Auswahl potenter siRNAs nach diesen Algorithmen stützt sich dementsprechend im wesentlichen auf die Analyse von Sequenzelementen der siRNA, die einen effizienten Einbau in den RISC erlauben. In einer Reihe von Untersuchungen wurde aber auch ein erheblicher Einfluß der Struktur der Ziel-mRNA auf die Silencing-Aktivität gefunden (Holen *et al.*, 2002; Vickers *et al.*, 2003; Bohula *et al.*, 2003). Eine systematische Untersuchung der Bedeutung stabiler Zielstrukturen ist bisher noch nicht durchgeführt worden.

Um die Bedingungen für effizientes Silencing durch siRNAs zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Zielsequenzen in definierte Sekundärstrukturen eingebaut. Ungepaarte Nukleotide, stabile Haarnadelschleifen und *stem-loop*-Konstrukte unterschiedlicher Länge und Stabilität wurden verwendet. Als Modellsystem wurde zunächst eine siRNA eingesetzt, die gegen eine Zielsequenz auf der mRNA von VR1 gerichtet war und dessen Expression mit sehr hoher Effizienz inhibierte. Wie erwartet war diese siRNA auch aktiv gegen ein Reporter-gen, vor dessen Translationsstart die VR1-Zielsequenz künstlich eingeführt worden war. Gegen die Komplementärsequenz allerdings, die eine Angriffsfläche für den anderen Strang der siRNA darstellt, wurde in einem entsprechenden Experiment kaum Aktivität gefunden. Die Rechner-basierte Faltung der beiden künstlichen Ziel-RNAs zeigte, daß weder die ursprüngliche Zielsequenz noch die komplementäre Sequenz stabile Strukturen mit

anderen Nukleotiden der mRNA ausbilden. Die Unterschiede im Silencing sind dementsprechend aller Wahrscheinlichkeit nach nicht auf Änderungen der Struktur in der Zielregion zurückzuführen. Vielmehr bestätigt diese Beobachtung die bereits erwähnten früheren Ergebnisse, wonach die Beladung des RISC stark asymmetrisch ist und von thermodynamischen Bedingungen innerhalb der siRNA-Duplex bestimmt wird (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Entsprechend diesen früheren Studien hat auch in der vorliegenden Arbeit der Strang mit dem weniger stabilen 5'-Ende ein wesentlich stärkeres inhibitorisches Potential.

Zusätzlich zu dem Einfluß der Eigenschaften der siRNA wurde hier aber auch ein starker Effekt der Zielstruktur beobachtet, wenn die Zielsequenz in Haarnadelstrukturen eingebaut wurde, deren Stabilität durch die Verkürzung des Stamms variiert wurde. Waren die Zielnukleotide vollständig mit anderen Nukleotiden in einer stabilen *stem-loop*-Struktur gepaart, war das Gensilencing durch dieselbe siRNA drastisch vermindert. Auch dieses Ergebnis findet Entsprechungen in der Literatur (Vickers *et al.*, 2003; Yoshinari *et al.*, 2004). Der Vorteil der hier vorgestellten systematischen Analyse, in der die Sequenz der untersuchten siRNA unverändert blieb, während die Zielnukleotide in bewußt hergestellte Sequenz-Zusammenhänge gebracht wurden, besteht in der Entkopplung der beiden Parameter siRNA-Sequenz und Ziel-Zugänglichkeit. Mit diesem experimentellen Aufbau konnte hier gezeigt werden, daß die Blockade des Silencings umso mehr aufgehoben wurde, je mehr Nukleotide der Zielsequenz frei zugänglich, das heißt nicht in Basenpaarungen involviert waren.

Der Zusammenhang zwischen Silencing und Sekundärstruktur des Ziel-Moleküls wurde anschließend bioinformatisch weitergehend analysiert. Dazu wurden Sekundärstrukturen für alle künstlich hergestellten Konstrukte vorhergesagt und lokale Freie Energien für die Substrukturen errechnet, an denen Nukleotide der Zielsequenz beteiligt waren. Wie erwartet wurde für die RNA, in der die Zielnukleotide vollständig gepaart vorliegen, eine stabile *stem-loop* Struktur mit sehr niedriger Freier Energie vorhergesagt. Für Zielkonstrukte mit weniger komplementären Nukleotiden wurden kürzere zusammenhängende *stems* vorhergesagt, die dementsprechend energetisch weniger stabil waren. Die Ziel-RNA „straight“ und die RNA, die das komplementäre Sequenzelement enthielt, bildeten Substrukturen mit den geringsten Stabilitäten aus. Es ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass die computergestützte Faltung langer RNAs die realen Verhältnisse nur annähernd wiedergeben kann (Eddy, 2004). Auch die Berechnung der lokalen Energien kann nur als Abschätzung betrachtet werden. Dennoch ergibt sich nach den gemessenen Werten für die untersuchten Konstrukte eine lineare Abhängigkeit zwischen der Effizienz der Geninhibition und

abnehmender Stabilität der Sekundärstruktur motive in der Zielregion, die sich in niedrigeren absoluten Werten für die lokale Freie Energie ausdrückt. Diese Abhängigkeit ist umso erstaunlicher, als davon ausgegangen werden mußte, daß verschiedene Schritte im RNAi-Mechanismus überlagernde Effekte ausüben könnten (Übersicht bei Tang, 2004).

In einer vorhergehenden Studie hatten Kawasaki und Mitarbeiter (2003) für zwei Zielgene große Aktivitäts-Unterschiede zwischen verschiedenen siRNAs gefunden. Eine Strukturvorhersage der beiden mRNAs zeigte kein Muster, nach dem die Aktivität einer siRNA mit der Zugänglichkeit der Zielsequenz zu korrelieren gewesen wäre. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen künstlich und bewusst hergestellten Sekundärstrukturen enthalten natürlich vorkommende mRNAs allerdings sehr heterogene Strukturelemente wie kurze Helices, Ausbuchtungen (*bulges*) und *loops*. Bereits das Vorhandensein weniger zugänglicher Basen in einem *bulge* zwischen zwei perfekten Helices kann ausreichen, um eine Zielsequenz empfänglich für siRNA-Inhibition zu machen. Derartige Beispiele finden sich auch in den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Messungen mit kürzeren *stem-loops*.

Die Bindung des durch eine siRNA programmierten RISC an seine Ziel-RNA könnte am 5'- oder 3'-Ende initiiert werden. Eine mögliche Asymmetrie dieser Anlagerung wurde untersucht, indem *stem-loop* Strukturen unterschiedlicher Stabilität hergestellt wurden, in denen Nukleotide an einem der beiden Termini der Zielsequenz ungepaart vorlagen. Hierbei zeigte sich, daß die Aktivität der siRNA ausschließlich von der Anzahl der zugänglichen Nukleotide abhing, nicht aber davon, welches Ende der Sequenz besser erreichbar war.

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass eine scheinbar inaktive siRNA gegen die Pim-1 Kinase sehr effizient war, wenn die Zielsequenz aus der mRNA isoliert und zugänglich vor ein Reporter gen kloniert wurde. Die in den bisher beschriebenen Experimenten verwendeten siRNAs entsprachen in vieler Hinsicht nicht den inzwischen bekannten Kriterien zum Design effizienter siRNAs. Die Ergebnisse sollten deshalb mit einer weiteren siRNA validiert werden, die nach den heute gängigen Regeln zur Bestimmung effizienter RNAs ausgewählt wurden (Amarzguioui und Prydz, 2004; Reynolds *et al.*, 2004). Es wurde daher die siRdRP1, die gegen die RdRP von CBV-3 gerichtet ist, verwendet. Diese siRNA wies am 5'-Ende des *sense*-Stranges einen höheren G/C Gehalt auf als am 3'-Ende, enthielt Guanosin an Position 1, Adenosin an Positionen 3 und 19 und Uridin an Position 10. Tatsächlich war diese siRNA in der Lage, ihr Zielgen effizient zu inhibieren. Interessanterweise wurde aber auch mit dieser sorgfältig entworfenen siRNA keine Geninhibition mehr erreicht, wenn die Zielsequenz in eine stabile *hairpin*-Struktur eingebettet wurde. Damit wurde die Annahme bestätigt, daß

neben thermodynamischen Eigenschaften der siRNA-Duplex auch die Sekundärstruktur der Zielsequenz limitierend für die Effizienz einer RNAi-Strategie sein kann.

Die hier durchgeführte systematische Analyse von Parametern, die für die Effizienz und Wirksamkeit einer siRNA-Strategie entscheidend sind, läßt sich zusammenfassend und modellhaft illustrieren (Abbildung 5.1). Der vielstufige Mechanismus der RNAi wird dabei auf zwei Ebenen reguliert. i) Zunächst entscheiden thermodynamische Parameter, die der siRNA-Duplex intrinsisch sind, darüber, welcher der beiden Stränge präferentiell in RISC eingebaut wird. ii) Die Kinetik der Erkennung der Zielsequenz, die von lokalen Sekundärstrukturen im Zielmolekül abhängig ist, moduliert die Effizienz des Silencings zusätzlich. Die Aktivität auch solcher siRNAs, die allen bisher bekannten thermodynamisch günstigen Parametern entsprechen, kann demnach empfindlich eingeschränkt sein, wenn die Zielsequenz in einer stark strukturierten Region liegt.

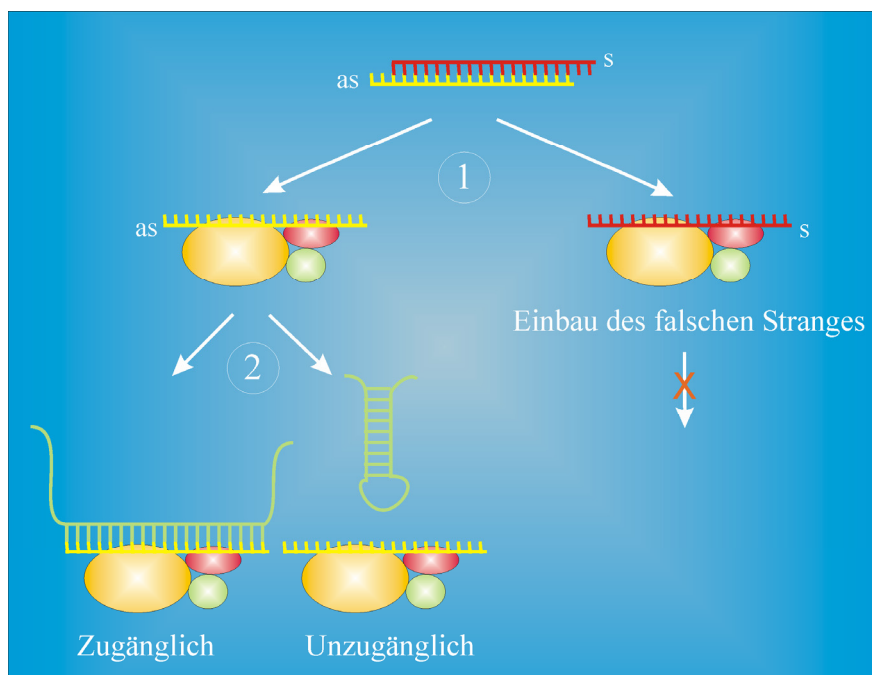


Abb. 5.1: Die Effizienz einer siRNA wird an mindestens zwei Punkten des Silencing-Weges bestimmt: 1) Strangpräferenz, die durch intrinsische thermodynamische Faktoren der siRNA-Duplex gegeben ist: Der Strang mit dem höheren A/T-Gehalt am 5'-Ende wird präferentiell in den RISC eingebaut. 2) Eine stark strukturierte Zielregion (grün) kann die Anlagerung des siRNA/RISC Komplexes an seine Komplementärsequenz behindern. Daher können auch thermodynamisch günstige siRNA-Sequenzen ungeeignet für das Gensilencing sein (modifiziert aus Schubert *et al.*, 2005b).

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß es notwendig ist, neben dem Aufbau der siRNA auch die Struktur der Zielregion bei der Auswahl effizienter Sequenzen in Betracht zu nehmen. Die Ergebnisse erlauben die Spekulation, daß die starke Strukturierung der 5'-NTR von Picornaviren den Angriff durch Antisense-Agentien in dieser Region besonders schwierig

macht. Es erschien daher ratsam, siRNAs zu verwenden, die gegen weniger strukturierte Regionen gerichtet waren, wie sie zum Beispiel in der codierenden Sequenz zu erwarten sind. Deswegen wurden siRNAs entwickelt, die gegen das Gen für die virale RdRP gerichtet waren.

Tatsächlich waren alle vier getesteten siRNAs mit Zielsequenzen in dieser Region des Genoms von CBV-3 sehr effizient. Schon Konzentrationen von wenigen nM der beiden wirksamsten siRNAs reichten aus, um den cytopathischen Effekt einer CBV-3-Infektion in HeLa-Zellen signifikant zu vermindern. Mit 100 nM dieser antiviralen Oligonukleotide konnte der Virustiter im Plaque-Reduktionsassay um eine Größenordnung reduziert werden. Die hier beschriebenen siRNAs sind die ersten, die erfolgreich zur Inhibition der Vermehrung dieses gefährlichen Herzwirus in Zellkultur eingesetzt worden sind. Wang *et al.* (2001) haben Phosphorothioat-AS-ODNs entwickelt, die in einer Konzentration von 10 µM den Virustiter in HeLa-Zellen um etwa eine halbe Größenordnung verminderten. Eines dieser AS-ODNs wurde anschließend auch im Mausmodell eingesetzt und verringerte nach intravenöser Gabe den Titer im Herzen um 0.5 Logstufen (Yuan *et al.*, 2004). Mit den siRNAs, die in der vorliegenden Studie verwendet wurden, reicht eine hundertfach niedrigere Konzentration aus, um in Zellkultur eine zehnfache Reduktion des Titers zu induzieren. In einer kurz nach Abschluß dieser Arbeit veröffentlichten Untersuchung von Yuan und Mitarbeitern (2005) zur Inhibition von CBV-3 durch siRNAs wurden in HeLa-Zellen und Maus-Cardiomyozyten Reduktionen des Virustiters in derselben Größenordnung erzielt wie in der vorliegenden Studie. Mit einer siRNA gegen die virale Protease 2A konnte der Titer von CBV-3 um zwei Zehner-Potenzen reduziert werden. Obwohl die experimentellen Bedingungen zwischen den genannten Studien divergieren, zeigen die hier dargestellten Ergebnisse deutlich das enorme Potential der RNAi-Technik im Vergleich zu konventionelleren Antisense-Ansätzen.

#### **5.4 SIDEX-VEKTOR UND VERMEIDUNG VON *VIRAL ESCAPE***

Für eine nachhaltige Inhibition der Virusvermehrung durch RNAi müssen Expressionsvektoren verwendet werden, die shRNAs über längere Zeiträume intrazellulär zur Verfügung stellen. Oligonukleotide, die für zwei der aktiven siRNAs gegen die RdRP codieren, wurden dazu in einen kommerziell erhältlichen Vektor kloniert, in dem sie von einem U6-Promotor aus exprimiert wurden. Die Vektoren, die als pSiR2 und pSiR4 bezeichnet wurden, reduzierten die Expression eines Reporter-Konstruktes aus RdRP und GFP in Cotransfektionsexperimenten selbst bei einem hohen Überschuß an Zielplasmid. pSiR2 und pSiR4 sind deswegen geeignete Kandidaten, CBV-3 auch langfristig zu inhibieren.

Als Ergebnis andauernder Konfrontation eines Virus mit antiviraler RNAi ist in verschiedenen Studien *Viral Escape* beobachtet worden (Gitlin *et al.*, 2002; Boden *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2003; Westerhout *et al.*, 2005). Die RdRP der Picornaviren arbeitet mit einer vergleichsweise hohen Fehlerrate von einem Fehler auf 2200 Basen (Wells *et al.*, 2001). Daher ist auch für Coxsackieviren davon auszugehen, daß resistente Mutanten relativ schnell entstehen können. Verschiedene Strategien sind vorgeschlagen worden, um diese Einschränkung der Anwendbarkeit von RNAi zu umgehen. Durch die Auswahl von Zielsequenzen, die innerhalb verwandter Viren hoch konserviert sind, sollte der Anteil lebensfähiger resistenter Mutanten reduziert werden können. Allerdings erscheint diese Strategie besser geeignet für antivirale Agentien, die auf der Proteinebene ansetzen als für RNAi. Auf RNA-Ebene sind nämlich stumme Mutationen möglich, die keinen Einfluß auf die Aminosäurezusammensetzung des Proteins haben und daher die konservierte Proteinsequenz nicht beeinträchtigen (Gitlin *et al.*, 2002). Der Weg, der in der vorliegenden Arbeit eingeschlagen wurde, bestand darin, zwei effiziente shRNAs gleichzeitig zu exprimieren, so daß die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von *Escape*-Mutanten eingeschränkt wird. Eine resistente Mutante müßte dann in beiden Zielsequenzen Mutationen tragen, die die Lebensfähigkeit des Virus nicht beeinträchtigen.

Für die Entstehung einer viralen *Escape*-Mutante kann eine einzelne Punktmutation in der Mitte der Zielsequenz ausreichend sein (Gitlin *et al.*, 2002; Boden *et al.*, 2003). Um die Entstehung einer solchen Mutante zu simulieren und um den Einfluß von Basensubstitutionen in einer der hier verwendeten Zielsequenzen zu untersuchen, wurden Mutationen in die hoch sensitive Mittelregion eingeführt. Thymidin in Position 10 der 19 Basen langen Zielsequenz 2 wurde durch Guanosin ersetzt. Die Aktivität des dazugehörigen shRNA-Expressionsvektor kam tatsächlich bereits durch diese einzelne Substitution zum Erliegen. Wie erwartet blieb aber die Effizienz der anderen shRNA, die gegen eine entfernt liegende Sequenz gerichtet war, unbeeinflusst von der Mutation. Das entsprechende Resultat ergab sich, wenn das zentrale Adenosin in Zielsequenz 4 durch Thymidin ersetzt wurde. Diese Substitution ist ein Beispiel für eine stumme Mutation, da sowohl das ursprüngliche Codon als auch das künstlich hergestellte für Glycin codieren. Diese Beobachtungen legten nahe, daß die Verwendung einer Kombination der beiden siRNAs eine geeignete Gegenmaßnahme im Falle einer Basenmutation in einer der beiden Zielsequenzen sein müßte. Daher wurde eine Klonierungsstrategie entworfen, mit der ein Doppelsexpressionsvektor hergestellt werden konnte, der beide shRNA exprimiert. Dieser Vektor wurde als siRNA Doppel-Expressionsvektor, SiDEx bezeichnet (Abb. 5.2).



Zwei Promotoren in enger Nachbarschaft können genetische Instabilitäten verursachen oder sich negativ auf die Expression ihrer Gene auswirken. Darüber hinaus wurde kürzlich gefunden, daß unterschiedliche RNAs, die gleichzeitig in einer Zelle exprimiert werden, um den Zugang zur RNAi Maschinerie konkurrieren können (Bitko *et al.*, 2005). In der zitierten Untersuchung wurde beobachtet, daß die Wirkung einer effizienten RNA durch das Vorhandensein einer zweiten Spezies abgeschwächt wurde, da einer oder mehrere der beteiligten Enzymkomplexe gesättigt war. Um sicherzustellen, daß beide shRNAs, die von SiDEx exprimiert wurden, funktional waren, wurden Reporter-Vektoren entwickelt, die die Zielsequenz einer der beiden shRNAs *upstream* von GFP enthielten. Die Expression des Reporters von Plasmiden mit Zielsequenz 2 oder 4 wurde von SiDEx mit derselben Effizienz inhibiert wie von dem jeweiligen passenden Mono-Expressionsvektor. Diese Experimente erlauben den Schluß, daß beide shRNAs, die von SiDEx exprimiert wurden, funktional waren, und daß die oben beschriebenen negativen Effekte auf die beiden hier verwendeten shRNAs nicht zuträfen.

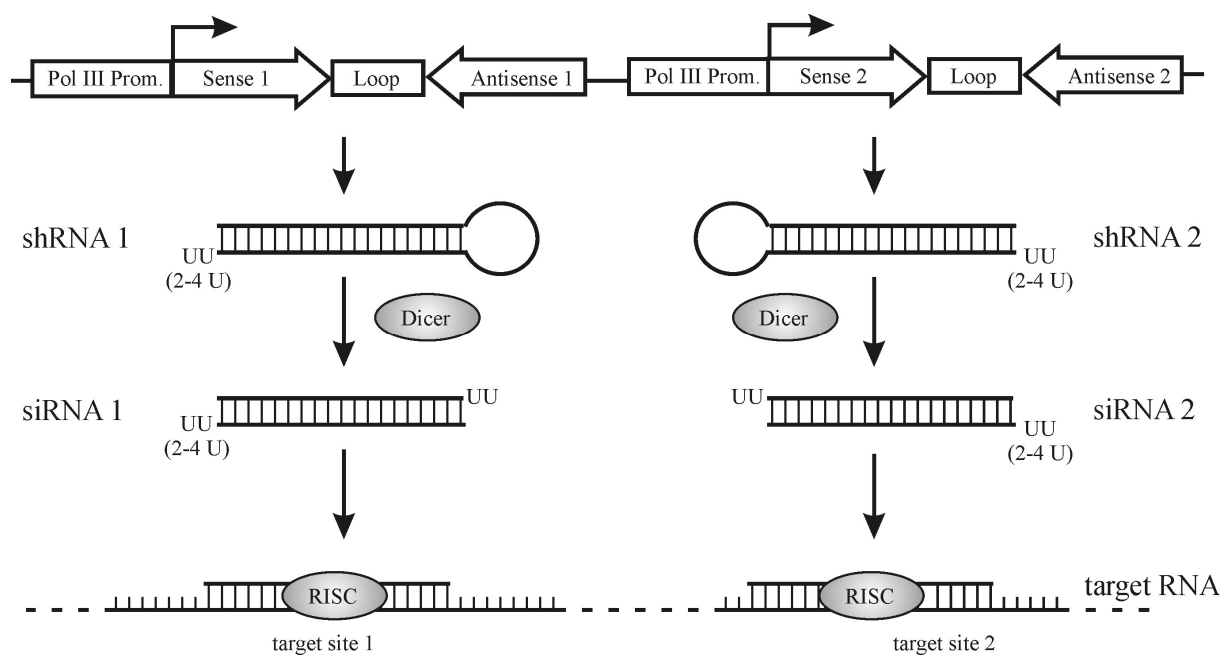


Abb. 5.2: Prinzip des Doppel-Expressionsvektors SiDEx. Zwei shRNAs werden von distinkten Polymerase III-Promotoren aus transkribiert. Durch die Wirkung von Dicer entstehen funktionsfähige siRNAs, die dann im Komplex mit RISC an ihre jeweilige Zielsequenz hybridisieren (aus Schubert und Kurreck, 2005).

Das hier vorgestellte Reporter-System ist eine einfache Möglichkeit, die Transkription funktioneller shRNAs von Expressionsplasmiden zu verifizieren. Ein solches System kann für verschiedene Fragestellungen von Nutzen sein. Zum einen kann damit gezeigt werden, daß von einem Plasmid mit mehreren Expressionskassetten shRNAs in funktioneller Art und Weise transkribiert werden. Es kann zum anderen aber auch eingesetzt werden, um zu

überprüfen, ob eine nur schwache Silencing-Aktivität einer shRNA, die von einem konventionellen Vektor aus exprimiert wird, mangelhafter Transkription zuzuschreiben ist. Zahlreiche Faktoren wie Eigenschaften des Promotors, das erste Nukleotid der zu transkribierenden Sequenz oder die Zell-Linie, in der die Untersuchung stattfindet, beeinflussen die Expression von shRNAs von Vektoren. Um den Einfluß dieser Faktoren zu untersuchen oder um shRNA-Expression in neuen Zell-Linien oder Primärzellen zu etablieren, ist die Klonierung der Zielsequenz vor ein Reporter-gen eine einfache und bequeme Methode. Die Funktionalität der shRNA kann dabei unabhängig von komplexen Faktoren wie Zielstruktur und Proteinbindung untersucht werden.

Der SiDEx-Vektor, der zwei shRNAs exprimiert, wurde gegen die Wild-Typ-Vollängen-RNA der CBV3-RdRP eingesetzt und inhibierte die Expression des Gens mit großer Effizienz, die der der beiden shRNA Expressionsvektoren entsprach. Allerdings wurde kein additiver Effekt der beiden shRNAs beobachtet. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit dem einer früheren Studie überein, in der berichtet wurde, daß mehrere siRNAs, die gegen unterschiedliche Sequenzen desselben Gens gerichtet waren, verbessertes Gen-Silencing im Vergleich zu gleichen Konzentrationen jeder einzelnen siRNA zeigten (Ji *et al.*, 2003). Allerdings wurde in der zitierten Untersuchung nur ein sehr geringer additiver Effekt gefunden. Zudem verwendeten die Autoren chemisch synthetisierte siRNAs, wogegen hier intrazellulär exprimierte shRNAs zum Einsatz kamen. In der bereits erwähnten Studie von Yuan und Mitarbeitern (2005), in der ebenso wie hier siRNAs gegen CBV-3 untersucht wurden, wurde ebenfalls kein additiver Effekt bei der Verwendung mehrerer siRNAs gefunden.

Durch den gleichzeitigen Einsatz zweier effizienter shRNAs, die von einem einzigen Vektor aus exprimiert wurden, sollte aber nicht in erster Linie die Potenz des antiviralen Agens gesteigert werden. Das Ziel war vielmehr, anhaltendes Silencing zu ermöglichen, auch wenn Punktmutationen in einer der Zielsequenzen auftreten. Mit den künstlich mutierten RdRP-RNAs als Modelle für *Escape*-Mutanten konnte gezeigt werden, daß SiDEx tatsächlich erhebliche Aktivität behält, wenn eine Mutation auftritt, die eine der beiden shRNAs weitestgehend inaktiviert, so daß der jeweilige konventionelle shRNA-Expressionsvektor keinen inhibierenden Effekt mehr zeigt. Das Ausmaß des Silencings war vergleichbar mit dem, das mit demjenigen Mono-Expressionsvektor gemessen wurde, der gegen die unmutierte Sequenz gerichtet war. Daher kann geschlossen werden, daß diese Herangehensweise geeignet ist, die Entstehung von *Escape*-Mutanten substantiell zu behindern.

In der vorliegenden Arbeit wird somit erstmalig die Ausbreitung von CBV-3 in Zellkulturversuchen durch RNAi inhibiert. Eine der hier entwickelten siRNAs reduzierte in einer Konzentration von 100 nM die Bildung viraler Plaques um eine Größenordnung. Da CBV-3 ein medizinisch relevantes Herz-Pathogen ist, dem eine Rolle bei der Entstehung akuter und chronischer Cardiomyopathien zukommt, kann sich hieraus langfristig eine neue therapeutische Option für Patienten mit chronischer Herzmuskelinfektion ergeben, für die bisher keine spezifische Therapie existiert. Für die effizienten siRNAs wurden außerdem Expressionsvektoren hergestellt, um die Resistenz von Zellen gegen die Ausbreitung von CBV-3 über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten als das mit chemisch synthetisierten, exogen zugegebenen siRNAs möglich ist. Die Verwendung des hier erstmalig vorgestellten Doppelsexpressionsvektors für shRNAs kann dazu beitragen, einen möglichen viralen *Escape* bei andauernder siRNA-Gabe zu verhindern.

Zur Zeit wird detaillierter untersucht, ob auch der virale (-)-Strang, der als Replikationsintermediat auftritt, ein geeignetes Zielmolekül für siRNA-induzierte Virusinhibition darstellt. In diesem Zuge soll auch analysiert werden, an welcher Stelle des Replikationszyklus von CBV-3 die effizienten siRNAs angreifen und in welchem Maße der Angriff auf den (+)-Strang eine Verminderung der (-)-Strang-Synthese nach sich zieht.

Mittelfristig besteht ein Ziel darin, die hier entwickelten shRNA-Expressionsplasmide auch in Tierversuchen anzuwenden. Dazu muß zunächst die Aufnahme der Plasmide in die Zielzellen deutlich verbessert werden. Derzeit wird daran gearbeitet, adenovirale und lentivirale Vektoren mit den Genen für die beschriebenen shRNAs herzustellen, mit denen eine weitaus größere Transfektionseffizienz erreicht werden kann als mit den in dieser Arbeit verwendeten kationischen Lipiden. In einem anderen Ansatz sollen die chemisch synthetisierten siRNAs im Rattenmodell durch Schwanzveneninjektion auf ihre *in vivo*-Wirksamkeit getestet werden. Bereits an diesen Überlegungen läßt sich ablesen, daß die zelluläre Aufnahme derzeit das größte Problem bei der Anwendung von siRNA-Strategien *in vivo* darstellt. Ob spezifische und effiziente *delivery*-Systeme für siRNAs und Expressionsplasmide bereitgestellt werden können, wird voraussichtlich mitentscheidend sein für den Erfolg oder Mißerfolg einer therapeutischen Anwendung der RNAi-Technologie.