

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Identifikation und Weiterentwicklung von Oligonukleotiden als antivirale Agentien. Die Familie *Picornaviridae*, gegen deren Vertreter die hier beschriebenen Oligonukleotide gerichtet sind, enthält eine Reihe medizinisch bedeutsamer Pathogene. Insbesondere für das Humane Rhinovirus Typ 14, das Erkältungskrankheiten auslöst, und für das Coxsackievirus B3, das an der Entstehung schwerer Herzmuskelerkrankungen beteiligt ist, wurden effiziente Inhibitoren gefunden.

10-23 DNAzyme sind katalytisch aktive Oligodesoxynukleotide, die eine komplementäre RNA nukleolytisch spalten können. In dieser Arbeit wurde der Aufbau eines DNAzyms systematisch optimiert, das gegen eine in verschiedenen Picornaviren konservierte Sequenz gerichtet ist. Die Eigenschaften einer Reihe unterschiedlich modifizierter DNAzyme wurden untersucht, die eine invertierte Base am 3'-Terminus, Phosphorothioat-Bindungen, 2'-O-methyl-RNA oder *locked nucleic acid*-Monomere enthielten. Dieser Vergleich erlaubte die Herstellung eines verbesserten DNAzyms mit 2'-O-methyl-RNA Nukleotiden in den Substratbindungsarmen und im katalytischen Zentrum, das signifikant besser gegen Exo- und Endo-Nukleasen geschützt war als das unmodifizierte Enzym und eine um das zehnfache erhöhte katalytische Aktivität zeigte. Das Enzym war außerdem auch gegen virale RNAs aktiv, die das Ausgangsenzym nicht spalten konnte. Damit steht ein stark stabilisiertes und hoch aktives DNAzym zur Verfügung, das gegen eine Vielzahl picornaviraler mRNAs einsetzbar ist. Mit nur einer geringen Abweichung konnte das Design auch auf ein DNAzym anderer Spezifität übertragen werden.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die ersten wirksamen siRNAs gegen Coxsackievirus B3 entwickelt und charakterisiert. Sie reduzierten in einer Konzentration von 100 nM die Replikation des Virus in HeLa-Zellen um eine Größenordnung. Für die effizientesten siRNAs wurden Plasmide hergestellt, die eine intrazelluläre Expression der siRNAs ermöglichen. Zudem wurden Parameter untersucht, die die Effizienz einer siRNA bestimmen. Dabei wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Silencing-Aktivität einer siRNA und der Zugänglichkeit ihrer Ziel-Nukleotide gefunden.

Schließlich wurde erstmalig ein Doppelexpressionsvektor entwickelt, mit dem zwei siRNAs gleichzeitig von einem Plasmid aus intrazellulär exprimiert werden können. In Analogie zur herkömmlichen Kombinationstherapie wird dadurch die Wahrscheinlichkeit erheblich reduziert, daß lebensfähige resistente Virus-Mutanten auftreten. Die entwickelte Klonierungsstrategie ist einfach und universell anwendbar. Daher ist der neuartige siRNA-Doppelexpressionsvektor (SiDEx) ein vielversprechendes Werkzeug für die Herstellung siRNA-basierter antiviraler Wirkstoffe.

Hoffnungen auf den therapeutischen Einsatz von Antisense-Strategien haben sich bis heute nur ansatzweise erfüllt. Die hier vorgeschlagenen Wege zur Stabilisierung und Aktivierung von DNAzymen, zur Auswahl von siRNAs und zur Verhinderung von *Escape*-Mutanten bei RNAi-Anwendungen können dazu beitragen, einige der Probleme in der Anwendung antiviraler Oligonukleotide zu überwinden.

## SUMMARY

The present study describes the identification and further advancement of oligonucleotides as antiviral agents. The oligonucleotides described are directed against members of the virus family *Picornaviridae* which contains a number of clinically relevant pathogens. In particular, efficient inhibitors were found for human rhinovirus type 14, a causative agent of the common cold, and for coxsackievirus B3, which is involved in the pathogenesis of severe heart muscle diseases.

10-23 DNAzymes are catalytically active oligodeoxynucleotides that can cleave complementary RNA molecules. In this work, the design of a DNAzyme was systematically optimised which is directed against a consensus sequence conserved among a number of picornaviruses. The properties of a row of differently modified DNAzymes were investigated that carried an inverted base at the 3'-terminus, phosphorothioate-linkages, 2'-O-methyl RNA or locked nucleic acid monomers, respectively. This comparative study led to the establishment of a design for an improved DNAzyme containing 2'-O-methyl RNA nucleotides in both the substrate binding arms and the catalytic core. The enhanced DNAzyme was significantly more resistant to attack by exo- and endonucleases and displayed a tenfold increased catalytic activity compared to the unmodified species. In addition, the modified enzyme was active against viral RNAs that were left uncleaved by its unmodified counterpart. Thus, this study provides a strongly stabilised and highly active DNAzyme suitable to cleave a number of picornaviral mRNAs. Only a slight modification was necessary when transferring the optimised design to a DNAzyme of different specificity.

In addition, the first efficient siRNAs directed against coxsackievirus B3 are developed and characterised in this work. At a concentration of 100 nM, these siRNAs inhibited viral replication in HeLa cells by one order of magnitude. For the most efficient siRNAs, plasmids were constructed to achieve intracellular expression of the antiviral agents. In addition, parameters were investigated that determine the efficacy of an siRNA. In doing so, a linear correlation between siRNA efficacy and accessibility of the target nucleotides was established.

Finally, for the first time a double expression vector was generated allowing the simultaneous expression of two siRNAs from one plasmid. In analogy to conventional combinatorial therapy, the use of this vector should reduce the risk of emergence of viable resistant virus mutants after prolonged exposure to the siRNAs. The novel siRNA-double expression vector (SiDEx) may thus be a promising tool for the development of siRNA-based antiviral compounds.

Hopes for a widespread therapeutic application of antisense strategies have only rudimentally been fulfilled as yet. In the present study, approaches are presented to stabilise and activate DNAzymes, to select efficient siRNAs and to avoid the emergence of escape-mutants in antiviral antisense applications. The findings presented here may make a contribution towards the solution of some of the problems involved in employing antisense compounds for antiviral purposes.