4 ERGEBNISSE

4.1 OPTIMIERUNG EINES 10-23 DNAZYMS GEGEN 5'-NTRs VON PICORNAVIREN

4.1.1 Vorarbeiten

In Vorversuchen war ein 10-23 DNAzym identifiziert worden, das die *in vitro* transkribierte RNA der 5'-NTR von HRV-14 mit hoher Effizienz zu spalten vermochte. Es wurde als DH5 bezeichnet. Abbildung 4.1, links, zeigt die optimierte Version dieses Enzyms (DH5E). Seine Zielsequenz ist in vielen Rhino- und Enteroviren konserviert. Daher hat DH5 das Potential, gegen eine Reihe verschiedener Viren einsetzbar zu sein. Zur Stabilisierung gegen nukleolytischen Abbau, wie er in Zellkulturmedium und in Körperflüssigkeiten zu erwarten ist, waren unterschiedliche modifizierte Nukleotide in die Bindungsarme eingeführt worden.

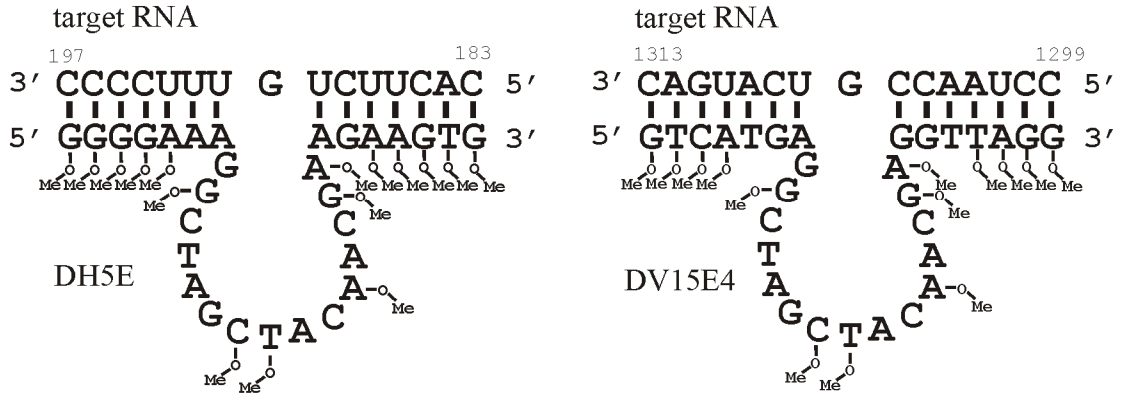


Abb. 4.1*: Optimierte DNAzyme mit 2'-O-methyl-Nukleotiden an den angezeigten Positionen. Erläuterungen siehe Text.

Die verwendeten Nukleotidmodifikationen sind in Abb. 1.5 zusammengefaßt. Es handelt sich um Phosphorothioate, *Locked nucleic acids* (LNAs), 2'-O-methyl-RNA sowie ein invertiertes Thymidin am 3'-Ende. Eine kinetische Charakterisierung der verschiedenen modifizierten DNAzym-Spezies ergab erhebliche Unterschiede im katalytischen Verhalten. Eine erhöhte Affinität zum Zielmolekül, die durch 2'-O-methyl-RNA und LNA-Nukleotide eintritt, führte zu verbesserter Katalyse bei Enzymüberschuß. Unter *multiple turnover*-Bedingungen waren dagegen DNAzyme, die das Zielmolekül sehr fest banden, gegenüber solchen mit mäßiger Substrataffinität benachteiligt. Diese vorbereitenden Versuche hatten gezeigt, daß der Balance

* Die Abbildungen in diesem Abschnitt sind der Veröffentlichung Schubert *et al.*, 2003 entnommen.

zwischen fester Substratbindung und ungehinderter Produktfreisetzung eine zentrale Rolle bei der Katalyse durch 10-23 DNAzyme zukommt. Im folgenden wird die systematische Optimierung eines DNAzyms hinsichtlich seiner katalytischen Eigenschaften und seiner Biostabilität beschrieben.

4.1.2 Modifizierte Nukleotide in den Bindungsarmen

Zunächst wurde der Einfluß unterschiedlicher Nukleotidmodifikationen in den Bindungsarmen auf die katalytische Effizienz des DNAzyms DH5 verglichen. Dazu wurde der zeitliche Verlauf der Spaltung der 630 Nukleotide langen Ziel-RNA, der 5'-NTR von HRV-14, durch modifizierte DNAzyme bei Enzymüberschuß und Substratüberschuß beobachtet. Dabei wurden Werte für die beobachtete Reaktionskonstante k_{obs} (Enzymüberschuß, *single turnover*) bzw. die Anfangsgeschwindigkeit v_{init} (Substratüberschuß, *multiple turnover*) erhalten. Abbildung 4.2A zeigt als Beispiel den Verlauf der Reaktion mit DH5 mit invertiertem Thymidin am 3'-Ende (DH5iT). Eine grafische Darstellung der Experimente unter *single* und *multiple turnover* Bedingungen wird in Abbildung 4.2B und C gegeben. Die ermittelten Werte für alle untersuchten DNAzym-Spezies sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt.

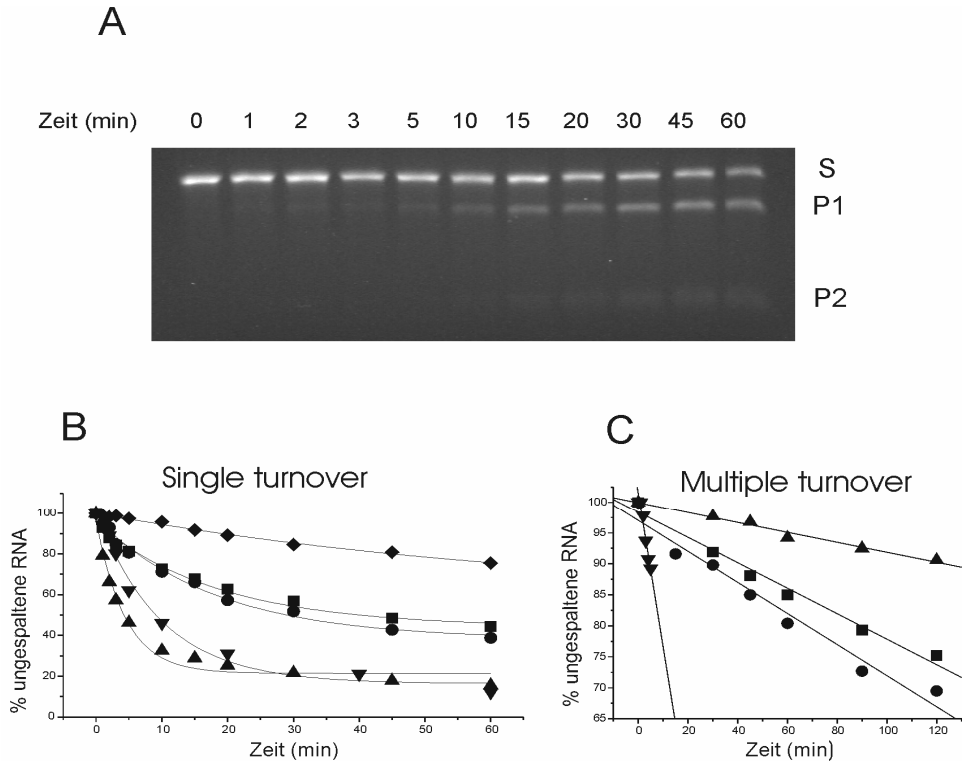


Abb. 4.2: Spaltungskinetik von DNAzymen mit modifizierten Bindungsarmen. (A) Substratspaltung durch DH5iT als Beispiel. S: Ungespaltenes Substrat. P1, P2: Produktbanden. (B) Kinetik bei 10-fachem Enzymüberschuß. (C) Kinetik bei 10-fachem Substratüberschuß. Quadrate: DH5-9/0; Kreise: DH5-iT; Diamanten: DH5-Thio; Dreiecke: LH5-9/4; invertierte Dreiecke: DH5-OMe9/4. Abkürzungen siehe Tabelle 4.1.

DNAzym	Armlänge	Modifikationen	T_M (°C)	k_{obs} (min^{-1})	v_{init} ($nM*min^{-1}$)
DH5-9/0	9	Keine	32	0.057±0.005	0.21±0.03
DH5-7/0	7	Keine	n.d.(<25)	0.033±0.002	n.d. (<0.05)
DH5-iT	9	invertiertes T am 3'-Ende	33	0.052±0.005	0.19±0.01
DH5-Thio	9	All-Phosphorothioat Bindungsarme	27	0.009±0.001	n.d.(<0.05)
LH5-9/4	9	4 LNA Endblöcke	63	0.24±0.02	0.08±0.02
LH5-7/3	7	3 LNA Endblöcke	48	0.45±0.01	1.2±0.1
LH5-7/4	7	4 LNA Endblöcke	61	0.44±0.05	0.45±0.09
DH5-OMe9/4	9	4 OMe Endblöcke	47	0.11±0.01	1.2±0.1
DH5-OMe8/4	8	4 OMe Endblöcke	44	0.29±0.01	2.8±0.5
DH5-OMe7/3	7	3 OMe Endblöcke	32	0.12±0.03	3.8±0.3
DH5-OMe7/4	7	4 OMe Endblöcke	37	0.31±0.01	4.7±0.4
DH5-OMe7/5	7	5 OMe Endblöcke	39	0.5±0.1	4.7±0.9
DH5-OMe7/6	7	6 OMe Endblöcke	44	0.23±0.06	1.9±0.5
DH5-OMe7/7	7	7 OMe Endblöcke	47	0.027±0.006	0.21±0.02
DH5-OMe6/5	6	5 OMe Endblöcke	26	0.17±0.01	1.1±0.2
DH5-CM6	9	6 OMe im katalytischen Zentrum	31	0.06±0.01	0.09±0.01
DH5 E	7	5 OMe Endblöcke; 6 OMe im katalytischen Zentrum	39	0.57±0.07	2.0±0.2
DV15 9/0	9	Keine	37	0.9±0.1	0.5±0.1
DV15-OMe 7/5	7	5 OMe Endblöcke	40	0.83±0.07	1.7±0.2
DV15-CM6	9	6 OMe im katalytischen Zentrum	36	0.43±0.03	0.8±0.2
DV15 E	7	5 OMe Endblöcke; 6 OMe im katalytischen Zentrum	37	0.05±0.01	n.d.(<0.05)
DV15 E4	7	4 OMe Endblöcke, 6 OMe im katalytischen Zentrum.	36	0.31±0.08	1.3±0.2

Tab. 4.1: In dieser Arbeit verwendete DNAzyme. Zahl vor dem Schrägstrich: Anzahl der Nukleotide in jedem Bindungsarm. Zahl nach dem Schrägstrich: Anzahl der modifizierten Nukleotide. Bezeichnung, Aufbau, Schmelztemperatur und Spaltraten bei Enzymüberschuß (k_{obs}) und Substratüberschuß (v_{init}) für jedes DNAzym sind angegeben. n.d.: mit der angewendeten Methode nicht bestimmbar.

Die Einfügung eines invertierten Thymidins am 3'-Ende hatte keinen meßbaren Einfluß auf die Spaltgeschwindigkeit. Wurden alle Nukleotide in den Bindungsarmen durch Phosphorothioate ersetzt, führte das dagegen zu einer Verlangsamung der Spaltung um 80% bei Enzymüberschuß und zu fast völliger Inaktivität unter Substratüberschuß. Es ist bekannt, daß 2'-O-methyl-Modifikationen und LNA-Nukleotide die Affinität eines Oligonukleotids zur Ziel-RNA erhöhen. Um diese Veränderung zu quantifizieren, wurden Schmelztemperaturmessungen der jeweiligen DNAzym/Ziel-RNA Hybridhelix durchgeführt. Dabei wurde ein Anstieg um etwa 4°C pro LNA-Nukleotid und um etwa 2°C pro 2'-O-methyl-RNA gefunden (Tabelle 4.1). Diese Erhöhung der Affinität findet ihren Niederschlag in einer Verdoppelung bzw. Vervierfachung der Reaktionskonstante k_{obs} für DH5-OMe9/4 und LH5-9/4. Bei Substratüberschuß war die Aktivität des LNA-modifizierten DNAzyms allerdings dramatisch reduziert, vermutlich aufgrund verlangsamter Produktdissoziation. Die Spezies mit 2'-O-methyl-Nukleotiden hingegen zeigte auch bei

Substratüberschuß eine gegenüber dem unmodifizierten Enzym sechsfach erhöhte Geschwindigkeit.

Durch Variation der Armlänge und des Gehaltes an modifizierten Nukleotiden kann die Affinität eines Antisense-Moleküls fein eingestellt werden. Eine möglichst große Anzahl modifizierter Nukleotide an den Enden des Moleküls ist wünschenswert, da dadurch die Resistenz gegenüber Nukleasen erhöht wird. Wie oben gezeigt, hat die Einführung von Modifikationen aber auch erheblichen Einfluß auf die katalytische Aktivität des DNAzyms. Für DNAzyme mit 2'-O-methyl-Modifikationen oder LNA-Nukleotiden in den Bindungsarmen wurde die Armlänge variiert und die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltungsreaktion bei Substratüberschuß ermittelt. Diese Bedingungen kommen der Situation bei einer möglichen Anwendung des DNAzyms in Zellen oder im Organismus näher als die eher artifizielle Enzymüberschußsituation.

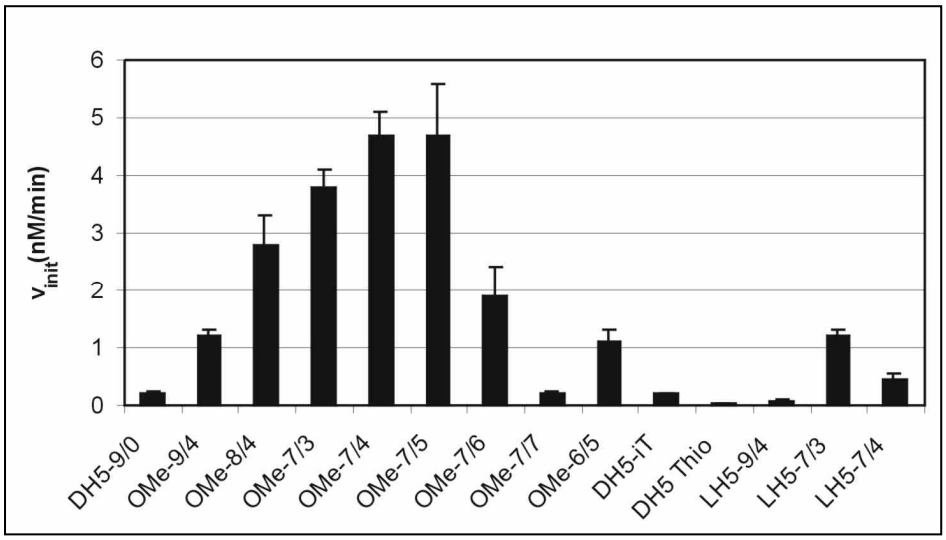


Abb. 4.3: Anfangsgeschwindigkeiten des unmodifizierten DNAzyms und unterschiedlicher Modifikationen bei Substratüberschuß. Für die Nomenklatur siehe Tabelle 4.1.

Sowohl für 2'-O-methyl modifizierte DNAzyme als auch für die Spezies mit LNA-Nukleotiden führte eine Verkürzung der Armlänge zu einer Erhöhung der Aktivität (Abb. 4.3). Für die LNA-modifizierten Enzyme erhöhte sich v_{init} mit sieben Nukleotiden in den Armen, von denen drei modifiziert waren, um das sechsfache. Die Einführung eines vierten LNA-Nukleotids führte zu einem steilen Abfall der Effizienz. Ein immenser Anstieg der Aktivität wurde für DNAzyme mit sieben Armnukleotiden und vier oder fünf 2'-O-methyl-Modifikationen auf jeder Seite beobachtet. Durch einen derartigen Aufbau konnte die Aktivität im *multiple turnover* um den Faktor 20 gesteigert werden. Setzt man die Reaktionsgeschwindigkeit 2'-O-methyl modifizierter DNAzyme mit dem Schmelzpunkt der DNAzym/RNA Hybridhelix als Maß für die Affinität zum Zielmolekül in Relation, so ergibt sich eine Verteilung, die einer Gauß-Kurve ähnelt (Abb. 4.4). Das Maximum der Aktivität

wurde mit den Enzymen erreicht, deren Schmelzpunkt im Bereich der Reaktionstemperatur von 37°C lag.

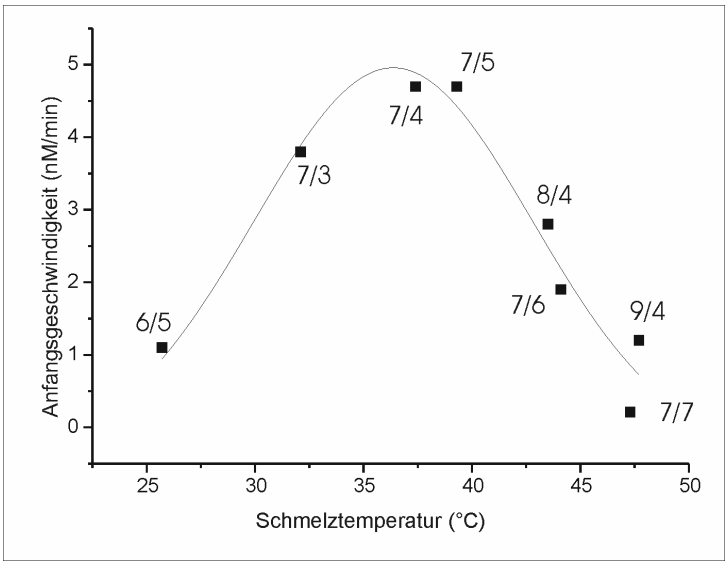


Abb. 4.4: Korrelation zwischen katalytischer Aktivität im *multiple turnover* und Schmelzpunkt der DNAzym-RNA-Helix für 2'-O-methyl modifizierte DNAzyme. Armlänge und Anzahl der modifizierten Nukleotide sind für jeden Datenpunkt angegeben.

4.1.3 Modifizierte Nukleotide im katalytischen Zentrum

Endblöcke aus modifizierten Nukleotiden schützen das DNAzym nur gegen Abbau durch Exonukleasen, der an den beiden Termini beginnt. Um die Resistenz des DNAzyms auch gegen Endonukleasen zu erhöhen, wurde untersucht, ob Nukleotide des katalytischen Zentrums ebenfalls durch Analoga ersetzt werden können, ohne daß die Aktivität des Enzyms dabei verloren geht. Jeweils eines der 15 Nukleotide des Zentrums wurde durch 2'-O-methyl-RNA ersetzt. Zunächst wurde die Aktivität der 15 entstehenden DNAzym-Varianten gegen die 19-mere Zielsequenz untersucht. In einem derartigen Experiment kann davon ausgegangen werden, daß das Zielmolekül keine hinderlichen Strukturen höherer Ordnung enthält, die die Ausbildung des produktiven Enzym-Substrat-Komplexes erschweren. Die Versuche wurden mit radioaktiv markierter Ziel-RNA bei hundertfachem Substratüberschuß durchgeführt. Der Anteil an gespaltener RNA nach 20 Minuten wurde quantifiziert.

Schon auf dem Gel wird deutlich, daß die Modifikation an neun Stellen des katalytischen Zentrums zu Inaktivität des DNAzyms führt (Abb. 4.5A). 2'-O-methyl-Gruppen an den anderen Nukleotiden wurden hingegen toleriert. Eine quantitative Auswertung mehrerer Experimente ergab, daß Modifikationen an den Positionen 2, 7, 8, 11, 14 und 15 die Ausbildung eines aktiven katalytischen Zentrums nicht zu behindern scheinen (Abb. 4.5B, graue Balken). Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn diese Varianten mit der langen Ziel-RNA inkubiert wurden (Abb. 4.5B, schwarze Balken). Selbst wenn in einem Molekül alle sechs in Frage kommenden Nukleotide modifiziert wurden, behielt das DNAzym eine

erhebliche Aktivität, die verglichen mit der Effizienz des unmodifizierten Enzyms nur um den Faktor zwei verringert war.

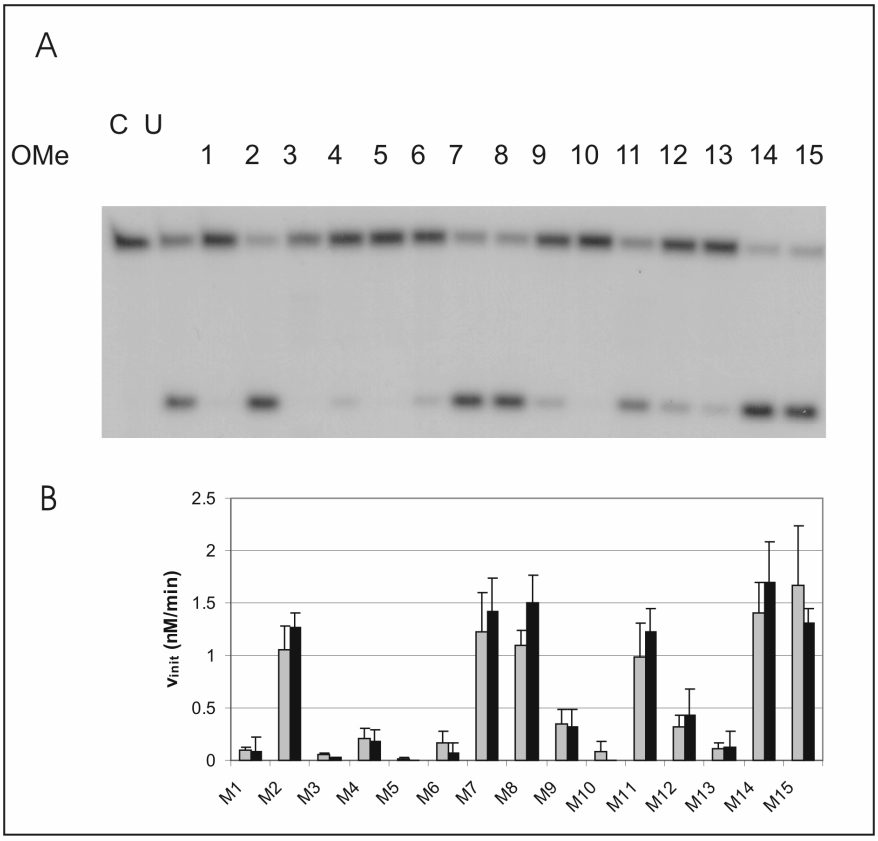


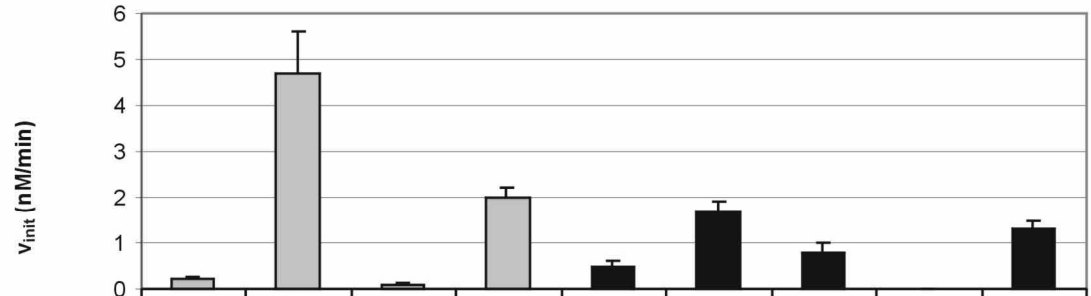
Abb. 4.5: Aktivität von DNAzymen mit 2'-O-methyl-Modifikationen im katalytischen Zentrum. (A) Reaktion mit 100-fachem Überschuß der radioaktiv markierten, 19-nt langen Ziel-RNA. Die obere Bande enthält ungespaltenes Substrat, die untere Bande ist das Reaktionsprodukt. Bahn 1: Kontrolle ohne Enzym. Bahn 2: Unmodifiziertes DH5. Bahnen 3-17: DH5 mit 2'-O-methyl-Modifikationen an den angegebenen Positionen des katalytischen Zentrums. (B) Quantifizierung der Aktivität der modifizierten DNAzyme gegen die kurze, 19-mere RNA (graue Balken) und die vollständige mRNA (schwarze Balken).

Das katalytische Zentrum des untersuchten DNAzyms toleriert also Nukleotidmodifikationen an mehreren Stellen. Dies eröffnet die Möglichkeit, ein insbesondere gegen Endonukleasen stabilisiertes Molekül herzustellen, dessen katalytische Parameter verglichen mit denen des unmodifizierten Enzyms nur wenig verschlechtert sind.

4.1.4 Optimiertes Design für das DNAzym

Die Ergebnisse der Optimierung der Bindungsarme und der systematischen Modifikation aller Kern-Nukleotide wurden nun kombiniert, um ein stabilisiertes DNAzym mit möglichst hoher katalytischer Aktivität zu erhalten. Die neue Variante des DNAzyms wurde DH5E (*enhanced*) benannt. Das Molekül besteht aus zwei Bindungsarmen von sieben Nukleotiden Länge mit Endblöcken aus jeweils fünf 2'-O-methyl RNA-Nukleotiden und einem nach dem

beschriebenen Schema modifizierten katalytischen Zentrum (Abb. 4.1). Die Aktivität dieses Moleküls bei *multiple turnover*-Bedingungen wurde mit der langen Ziel-RNA untersucht. Dabei wurde eine Erhöhung der Spaltrate um das zehnfache gefunden, was arithmetisch einer Kombination der 20-fachen Erhöhung durch die Arm-Modifikationen und der Halbierung der Geschwindigkeit durch die Modifikationen im katalytischen Zentrum entspricht (Abb. 4.6, graue Balken).



	DH5-9/0	DH5-OMe 7/5	DH5-CM6	DH5 E	DV15-9/0	DV15-OMe 7/5	DV15-CM6	DV15 E	DV15 E4
v_{init} (nM/min)	0.21	4.7	0.1	2	0.5	1.7	0.8	0	1.3
v_{init} (rel)	1	22	0.5	10	1	3.4	1.6	0	2.6

Abb. 4.6: Aktivität von DNAzymen gegen die 5'-NTR von HRV-14 (graue Balken) und VR1 (schwarze Balken). Angegeben sind Reaktionsraten bei Substratüberschuß jeweils mit der langen Ziel-mRNA für unmodifizierte DNAzyme, solche mit 2'-O-methyl-Modifikationen in Armen oder im Zentrum sowie für optimierte DNAzyme mit Modifikationen in Armen und Zentrum. Für die Nomenklatur siehe Tab. 4.1.

4.1.5 Übertragung auf DNAzyme mit anderer Spezifität

Es stellte sich die Frage, ob der optimierte Aufbau, der zu stark erhöhter Aktivität führte, von der Sequenz der Bindungsarme abhängt, oder ob auch DNAzyme anderer Spezifität auf die gleiche Art und Weise verbessert werden könnten. Als ein zweites Beispiel wurde das DNAzym DV15 verwendet, das gegen eine Sequenz im Gen für den Vanilloid Rezeptor 1 (VR1) gerichtet ist. DV15 schneidet seine 2614 Basen lange Ziel-RNA *in vitro* mit einer hohen Reaktionsrate. Wiederum wurde der modulare Ansatz angewandt, indem zunächst die Bindungsarme des Enzyms auf sieben Nukleotide verkürzt wurden, von denen die jeweils fünf endständigen 2'-O-methyl-Gruppen trugen (DV15-OMe7/5). Eine zweite Variante enthielt 2'-O-methyl-Nukleotide an den oben identifizierten Stellen des katalytischen Zentrums (DV15-CM6). Die Reaktionsrate für die Spaltung der langen VR1-mRNA wurde bei Substratüberschuß bestimmt. Die Einführung von Modifikationen in die Bindungsarme ergab eine substantielle Beschleunigung der Reaktion um einen Faktor von etwa 3,4 (Abbildung 4.6, schwarze Balken). Wurde das optimierte Design für das Zentrum

angewendet, führte das sogar zu einer leichten Erhöhung der katalytischen Aktivität verglichen mit der unmodifizierten Variante.

Interessanterweise ergab die Kombination von optimiertem Arm-Design und Modifikationen im Zentrum (DV15-E) kein aktives Enzym. Etwas Aktivität wurde in *single turnover*-Experimenten gefunden, aber die Spaltrate bei Substratüberschuß war nicht meßbar. Um zu entscheiden, ob diese Inaktivität mit der Struktur des Zielmoleküls zusammenhing oder eine dem modifizierten DNAzym inhärente Eigenschaft war, wurde die Spaltung einer 19-meren kurzen RNA untersucht (Abbildung 4.7). Hier wurde deutlich, daß die Aktivität von DV15-E unabhängig von der Zielstruktur drastisch vermindert ist. Nach 20 Minuten Inkubation mit der kurzen Zielsequenz zeigte DV15-E nur 25% der Aktivität des unmodifizierten DV15.

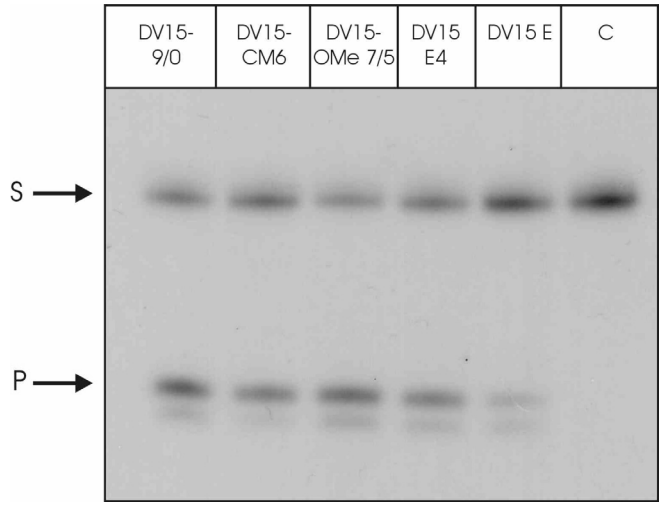


Abb. 4.7: Aktivität unterschiedlich modifizierter DNAzyme gegen die 19 nt lange VR1-Zielsequenz bei hundertfachem Substratüberschuß. C: Kontrolle ohne DNAzym. S: Ungespaltenes Substrat. P: Produktbande. Für die Nomenklatur siehe Tab. 4.1.

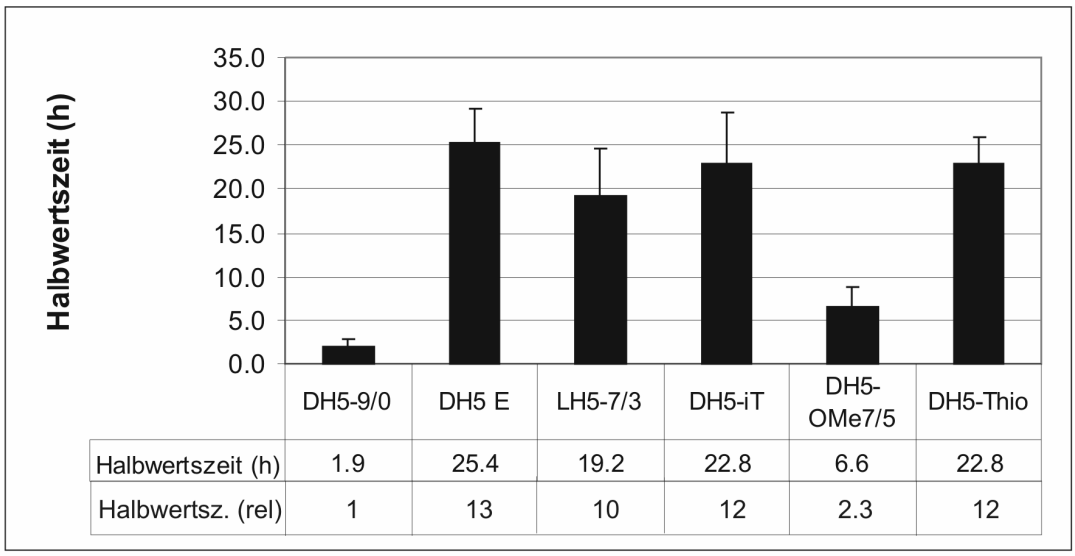
Eine aktive Variante von DV15 konnte jedoch hergestellt werden, wenn nur vier 2'-O-methyl-Gruppen statt der zunächst verwendeten fünf in jeden Bindungsarm eingeführt wurden. Das resultierende Enzym, das als DV15E4 bezeichnet wurde, zeigte eine erheblich verbesserte katalytische Effizienz. Seine Reaktionsrate überstieg die des unmodifizierten Enzyms unter Substratüberschußbedingungen um den Faktor 2.5 (Abbildung 4.6, schwarze Balken). Daraus läßt sich ableiten, daß nur geringe Modifikationen des Designs nötig sind, um den optimierten Aufbau auf ein anderes DNAzym zu übertragen.

4.1.6 Stabilitätsstudien

Der Einbau modifizierter Nukleotide in ein Oligonukleotid soll dessen Stabilität gegenüber nukleolytischem Abbau in Körperflüssigkeiten erhöhen. Die Effizienz der unterschiedlichen Modifikationen bezüglich dieser Stabilisierung wurde zunächst in Zellkulturmedium

untersucht, das 10% fötales Kälberserum enthielt. Die in anderen Untersuchungen häufig verwendete Methode der radioaktiven Markierung mit ^{32}P am 5'-Ende zur Stabilitätsabschätzung wurde hier nicht angewandt, da Phosphatasen im Medium die Markierung abbauen können, was das Ergebnis verfälschen würde. Stattdessen wurden die verschiedenen DNAzym-Spezies in einem größeren Volumen Medium inkubiert, um Absättigung der Nukleasen zu vermeiden, und anschließend durch Fällung aufkonzentriert. Das intakte Enzym wurde dann auf einem Polyacrylamid-Gel von den Abbauprodukten getrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Durch die Verwendung von LNA-Nukleotiden und Phosphorothioaten wurde die Halbwertsszeit von DNAzymen von etwa zwei Stunden für das unmodifizierte Ausgangsmolekül auf über 20 Stunden erhöht (Abb. 4.8). Die Verwendung eines invertierten Thymidins am 3'-Ende hatte eine Stabilisierung ähnlicher Größenordnung zur Folge. Überraschenderweise waren 2'-O-methyl-Nukleotide in den Bindungsarmen deutlich unterlegen: sie erhöhten die Halbwertszeit nur auf etwa 6,5 Stunden. Das optimierte Enzym DH5E mit 2'-O-methyl-RNA sowohl in den Bindungsarmen als auch im katalytischen Zentrum zeigte eine hervorragende Stabilisierung: In Zellkulturmedium stieg die Halbwertszeit auf etwa 25 Stunden.



	DH5-9/0	DH5 E	LH5-7/3	DH5-iT	DH5-OMe7/5	DH5-Thio
Halbwertszeit (h)	1.9	25.4	19.2	22.8	6.6	22.8
Halbwertsz. (rel)	1	13	10	12	2.3	12

Abb. 4.8: Stabilität modifizierter DNAzyme in Zellkulturmedium. Halbwertszeiten sind in Stunden und in relativen Einheiten bezogen auf die Stabilität des unmodifizierten DNAzyms angegeben.

Die Stabilität speziell gegenüber Endonukleasen wurde genauer untersucht, indem die verschiedenen DNAzym-Varianten mit 0,4 Einheiten S1 Endonuklease pro 100 nM DNAzym inkubiert wurden. Abbildung 4.9 läßt sich entnehmen, daß das unmodifizierte DNAzym, die Spezies mit einem invertierten Thymidin am 3'-Ende und die Variante mit 2'-O-methyl-Endblöcken nach 30 Minuten vollständig abgebaut waren. Mit LNA-Nukleotiden

modifizierte DNAzyme, die mit Ethidiumbromid schwächer angefärbt werden, waren deutlich stabiler gegen den Abbau durch die S1 Nuklease. Das Thioat-haltige Enzym zeigte eine biphasische Kinetik des Abbaus, was wahrscheinlich mit der chiralen Natur von Phosphorothioaten zusammenhängt. Etwa die Hälfte des Enzyms wird mit einer Halbwertszeit von ungefähr 13 Minuten abgebaut. Der Abbau der anderen Hälfte der Moleküle folgt einer deutlich langsameren Kinetik. Das optimierte DNAzym mit 2'-O-methyl-Monomeren in den Bindungsarmen und im katalytischem Zentrum hatte die längste Halbwertszeit aller untersuchten DNAzym Varianten. Die Stabilität war gegenüber dem unmodifizierten DNAzym ungefähr verdoppelt.

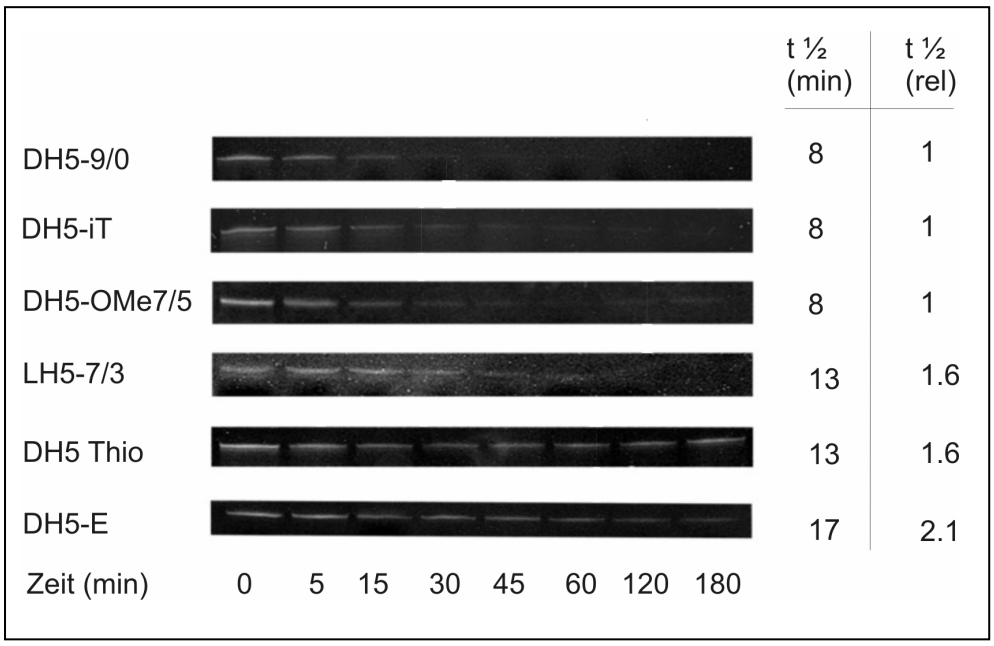


Abb. 4.9: Vergleich der Stabilität modifizierter DNAzyme gegen die S1 Endonuklease. Angegeben sind absolute und relative Halbwertszeiten.

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

4.1.7 Erhöhte Aktivität gegen Zielmoleküle mit stabiler Sekundärstruktur[†]

Das DNAzym DH5 ist gegen eine Region innerhalb der 5'-NTR von HRV-14 gerichtet, die in einem großen Teil der Rhino- und Enteroviren konserviert ist (Abbildung 4.10 und Tabelle

[†] Die Ergebnisse in Abschnitt 4.1.7 sind veröffentlicht in Schubert *et al.*, 2004. Abbildungen sind der Veröffentlichung entnommen.

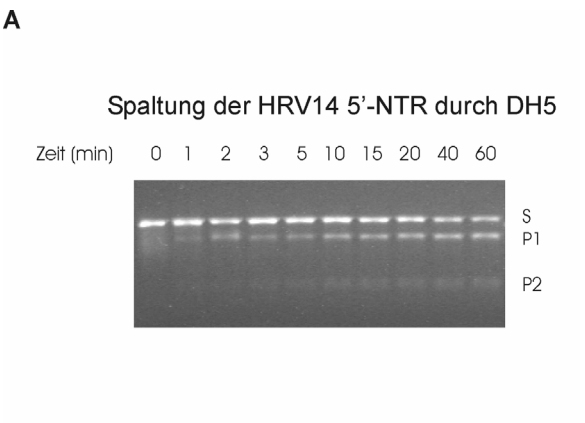
4.2). Obwohl DH5 die RNA von HRV-14 effizient schneidet, und obwohl die 5'-NTR von Coxsackievirus A 21 (CAV-21) ein identisches Sequenzelement enthält, blieb diese Ziel-RNA bei gleichen katalytischen Bedingungen fast vollständig intakt (Abb. 4.11). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß die Zielsequenz in der dreidimensionalen Struktur von HRV-14 exponiert ist, während sie in CAV-21 abgeschirmt ist.

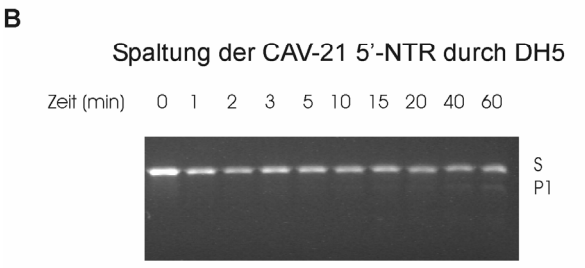
```
HRV14        171  ucuauguaca agcacuucuguuuccccgg agcgagguau
Polio 1      154  a-c-c-a--- ------------------- u-augucgua
E-14         156  gg-ua-ac-- ------------------- -cu---uauc
Entero-71    155  gucu--au-- ------------------- -cu---uauc
CAV-21       153  ----c-a--- ------------------- u-aa-ucaua
CBV-5        159  gucu--au-- ------------------- -cu---uauc
CBV-3        155  gu-u--au-- ------------a------ -cu---uauc
```

Abb. 4.10: Vergleich der Primärsequenz unterschiedlicher Picornaviren in der Zielregion für DH5. Die Zielsequenz ist umrandet. Polio 1: Poliovirus Typ 1. E-14: Humanes Echovirus 14. Entero-71: Humanes Enterovirus 71. CAV-21: Coxsackievirus A21. CBV-3: Coxsackievirus B3. CBV-5: Coxsackievirus B5.

	Anzahl der Serotypen	**Serotypen, die die Zielsequenz enthalten**
Rhinoviridae		
Humanes Rhinovirus	102	1A, 1B, 2, 7,14, 16, 21, 29, 37, 58, 62, 72
Enteroviridae		
Poliovirus	3	1, 2, 3
Echovirus	30	3, 5, 6, 13-15, 18-20, 24, 27, 29-31
Enterovirus		Porcines Enterovirus 9, Enterovirus 71
Coxsackievirus A	23	A1-22, A24
Coxsackievirus B	6	B5

Tab. 4.2: Picornaviren mit der Zielsequenz für DH5.





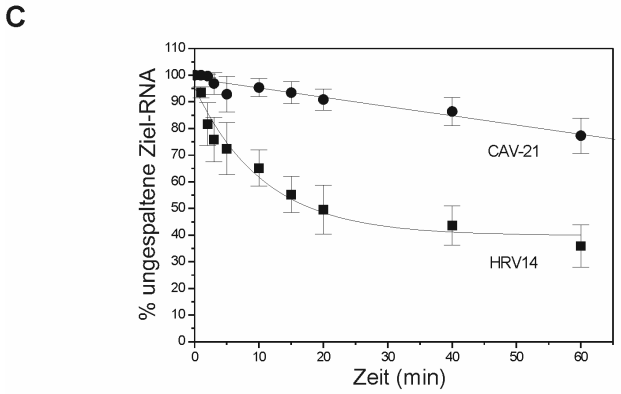


Abb. 4.11: Zeitverlauf der Spaltung *in vitro*-transkribierter RNA von HRV-14 (A) und CAV-21 (B) durch unmodifiziertes DH5 bei Enzymüberschuß. S: ungeschnittenes Substrat. P1, P2: Produktbanden. (C) Vergleich der Kinetiken für HRV-14 (Quadrate) und CAV-21 (Kreise).

Der Einfluß der Struktur des Zielmoleküls auf die Spalteffizienz des DNAzyms wurde daraufhin genauer untersucht. Abbildung 4.12 kann entnommen werden, daß ein 19-meres AS-ODN, das komplementär zur Zielregion war, effiziente Spaltung sowohl der HRV-14-NTR als auch der CAV-21-NTR durch RNase H induzierte. Diese Beobachtung zeigt, daß das konservierte Sequenzelement in beiden viralen RNAs für komplementäre Oligonukleotide zugänglich ist. Die Frage blieb, warum die 5'-NTR von CAV-21 resistent gegen die Spaltung durch DH5 war.

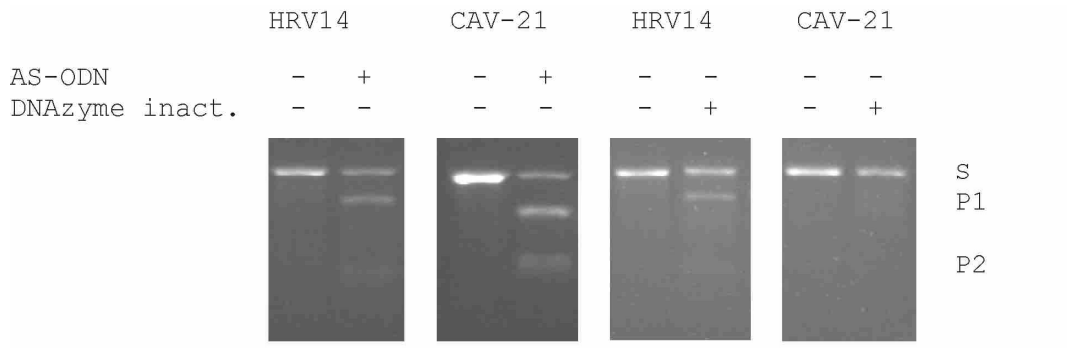


Abb. 4.12: RNase H Spaltung der Transkripte der 5'-NTRs von HRV-14 und CAV-21 durch ein 19-meres AS-ODN oder ein inaktives DNAzym. S: ungespaltenes Substrat. P1, P2: Produktbanden.

Da die Bindung komplementärer Oligonukleotide an die beiden RNAs in effizienter Weise möglich war, Spaltung durch das DNAzym hingegen nur bei einer RNA auftrat, war es notwendig, die Hybridisierung des DNAzyms an das jeweilige Substrat genauer zu untersuchen. Die Substratbindung wurde vom Spaltungsschritt entkoppelt, indem das sechste Nukleotid des katalytischen Zentrums des DNAzyms, ein Guanosin, durch Cytosin ersetzt wurde. Frühere Analysen hatten ergeben, daß diese Substitution das DNAzym vollständig inaktiviert (Zaborowska *et al.*, 2002). Die Zugänglichkeit beider RNAs wurde untersucht, indem das inaktivierte DNAzym mit der Ziel-RNA unter Zusatz von RNase H inkubiert wurde.

DH5 induzierte in diesem Experiment die RNase H-abhängige Spaltung von HRV-14 mRNA mit hoher Effizienz. Die CAV-21 mRNA blieb hingegen nach 30 Minuten Inkubation fast vollständig ungeschnitten (Abb. 4.12). Dieses Ergebnis belegt die Vermutung, daß die Resistenz der coxsackieviralen RNA gegen Spaltung mit einer eingeschränkten Zugänglichkeit der Zielnukleotide für DH5 zusammenhängt. Ein DNAzym mit erhöhter Affinität könnte möglicherweise in der Lage sein, mit den stabilen intramolekularen Strukturen um die Substratbindung zu konkurrieren.

Es lag daher nahe zu untersuchen, ob die oben beschriebene Optimierung der Länge und des Gehalts an modifizierten Nukleotiden in den Bindungsarmen eingesetzt werden kann, um die scheinbar ungeeignete Zielsequenz der CAV-21 RNA zu spalten. Die Arme wurden nach dem

bereits vorgestellten Schema modifiziert: Sie wurden auf sieben Nukleotide verkürzt, und an beiden Enden wurden fünf 2'-O-methyl-Nukleotide beziehungsweise drei LNA-Monomere eingeführt.

Sowohl das 2'-O-methyl-Design als auch die LNA-Variante führten zu schneller und effizienter Spaltung der Ziel-RNA (Abb. 4.13A). Schon nach zwanzig Minuten Inkubation war annähernd die gesamte coxsackievirale RNA gespalten worden, wogegen mit dem unmodifizierten Enzym in derselben Zeitspanne nur etwa 15% Spaltung erreicht wurden. Wenn die Daten mit einer Exponentialfunktion ersten Grades beschrieben werden, so ergibt die Auswertung, daß die Reaktion mit unmodifiziertem DH5 auch bei längeren Inkubationszeiten nicht vollständig ablaufen wird. Entsprechend dieser mathematischen Beschreibung des Verlaufs der Spaltung bleiben etwa 60% des Zielmoleküls ungeschnitten.

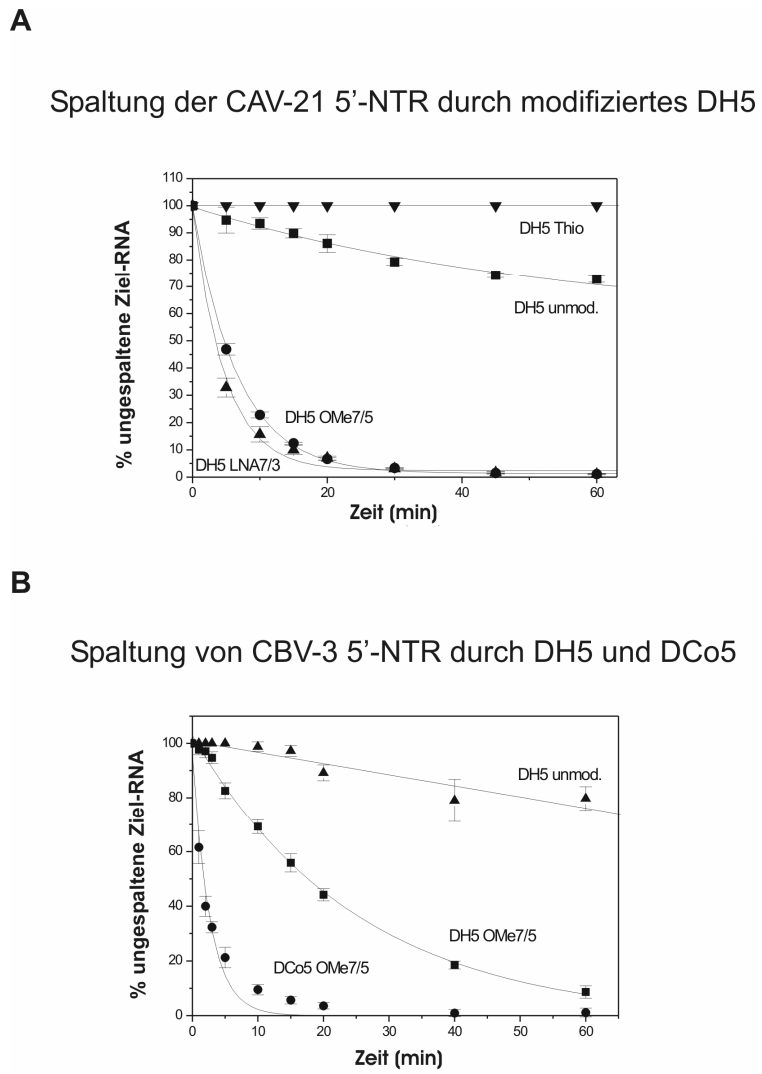


Abb. 4.13: (A) Verbesserte Spaltung der CAV-21 RNA durch DH5 durch die Einführung modifizierter Nukleotide in die Bindungsarme. Quadrate: DH5-9/0. Kreise: DH5-OMe7/5. Dreiecke: LH5-7/3. Invertierte Dreiecke: DH5-Thio. (B) Spaltung von CBV-3 mRNA durch optimierte DNAzyme. Dreiecke: DH5-9/0. Quadrate: DH5-OMe7/5. Kreise DCo5-OMe7/5. Nomenklatur wie Tab. 4.1. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Diese Daten erlauben eine Interpretation, nach der DNAzyme mit höherer Substrataffinität in der Lage sind, mit internen RNA-Strukturen um die Bindung zu konkurrieren. Dieser Erklärung zufolge müßten DNAzyme mit verminderter Bindungsstärke noch weniger effizient gegen die CAV-21-RNA sein als das nur schwach aktive unmodifizierte DH5. Wie bereits gezeigt, schwächen Phosphorothioate die Bindung eines Oligonukleotids an seine Komplementärsequenz ab. Bindungsarme aus Phosphorothioaten verminderten die Spaltung rhinoviraler RNA deutlich (s.o.). Abbildung 4.13A läßt sich entnehmen, daß diese Modifikation die enzymatische Aktivität von DH5 gegenüber CAV-21-RNA vollständig blockiert.

Um zu untersuchen, ob sich die Strategie, modifizierte DNAzyme gegen die identifizierte picornavirale Consensus-Sequenz zu richten, auf weitere virale RNAs ausweiten läßt, wurde ein weiteres Virus derselben Familie untersucht: Coxsackievirus B3 (CBV-3), ein Enterovirus von hoher klinischer Relevanz, ist an der Pathogenese schwerer Herzmuskelerkrankungen beteiligt. Unmodifiziertes DH5 zeigte nur eine geringe Aktivität gegen die 5'-NTR dieses Virus. Auch in diesem Fall verbesserte die Verwendung von 2'-O-methyl-Nukleotiden in den Bindungsarmen die katalytische Effizienz (Abb. 4.13B). Ähnlich wie bei CAV-21 kann angenommen werden, daß die höhere Substrataffinität dazu führt, daß das DNAzym besser um die Bindungsstelle konkurrieren kann. Die Spaltrate konnte noch weiter verbessert werden, wenn eine einzelne Basensubstitution in einem der Bindungsarme vorgenommen wurde, denn CBV-3 enthält an der dreizehnten Position der Zielsequenz ein A statt eines Us (Abb. 4.10). Das entstehende DNAzym, das als DCo5-OMe7/5 bezeichnet wurde, spaltet die 5'-NTR von CBV-3 mit hoher Aktivität.

Schließlich sollte gezeigt werden, daß diese Strategie, mit deren Hilfe scheinbar unzugängliche Zielsequenzen gespalten werden können, auch auf andere DNAzyme anwendbar ist. Dazu wurde wiederum ein DNAzym gegen die RNA des Vanilloid-Rezeptors verwendet, in diesem Falle das DNAzym DV28. Dieses Molekül hatte in einer früheren Untersuchung keinen Abbau der 2600 Nukleotide langen Ziel-RNA gezeigt (Kurreck *et al.*, 2002a). Die Ergebnisse, die mit DV28 und seiner Ziel-RNA erhalten wurden, entsprechen denen mit DH5 und der CAV-21 mRNA. Ein 19-meres AS-ODN induzierte effiziente Spaltung in einem RNase H-Assay. Diese Beobachtung zeigt, daß die Zielsequenz für Oligonukleotide gut zugänglich ist (Abb. 4.14A).

Das unmodifizierte DNAzym, das gegen dieselbe Sequenz gerichtet war, war hingegen auch nach zwei Stunden Inkubation bei Enzymüberschuß vollkommen inaktiv. Um die Anwendbarkeit der Modifikationsstrategie zu belegen, wurde DV28 nach dem beschriebenen Schema modifiziert. Die Variante wurde als DV28-OMe7/5 bezeichnet und enthielt

Endblöcke aus fünf 2'-O-methyl-RNA-Nukleotiden an jedem Ende der Bindungsarme, die aus jeweils sieben Nukleotiden bestanden. Wiederum zeigte das modifizierte DNAzym substantielle Aktivität gegen die Substrat-RNA (Abb. 4.14B). Eine mathematische Analyse der Daten läßt annnehmen, daß die Reaktion fortläuft, bis die VR1-mRNA annähernd vollständig gespalten ist. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die Erhöhung der Affinität katalytisch aktiver Nukleinsäuren ein geeigneter Weg ist, Zielmoleküle an sonst unzugänglichen Stellen spezifisch zu spalten.

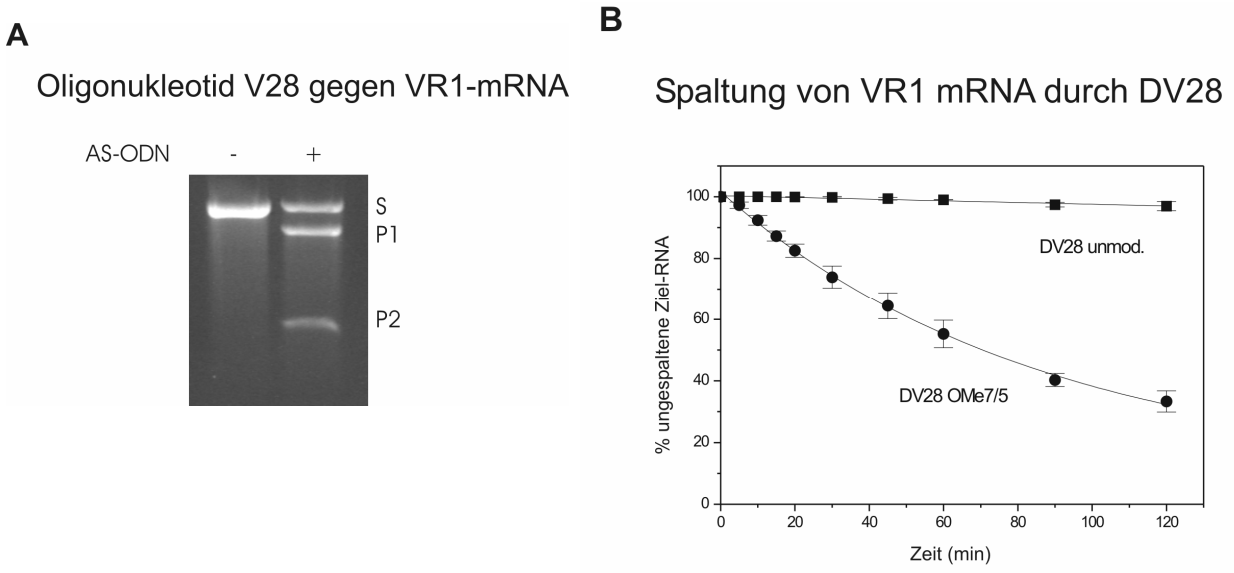


Abb. 4.14: Übertragbarkeit des optimierten Arm-Designs auf ein DNAzym anderer Spezifität. (A) RNase H-Spaltung der VR1-mRNA, induziert durch ein 19-meres AS-ODN. (B) Spaltung der VR1-mRNA durch unmodifiziertes DNAzym DV28 (Quadrate) und DV28-OMe7/5 (Kreise). Erläuterungen siehe Text.

4.2 SIRNAS GEGEN COXSACKIEVIRUS B3

Mit dem optimierten DNAzym stand ein substantiell verbessertes katalytisch aktives ODN zur Verfügung, das eine Reihe von Picornavirus-RNAs spalten kann. In Zellkulturversuchen war dieses DNAzym allerdings nicht in der Lage, die Vermehrung von HRV-14 zu blockieren (Daten nicht gezeigt). Ein alternativer Antisense-Ansatz besteht darin, *short interfering RNAs* (siRNAs) als antivirale Agentien zu verwenden. Ziel war es, eine RNAi-Strategie gegen CBV-3 zu etablieren und die Effizienz dieser Methode mit der des DNAzyms zu vergleichen. Dazu wurden eine Reihe von chemisch synthetisierten siRNAs gegen zwei Regionen von CBV-3 eingesetzt: Vier siRNAs waren gegen unterschiedliche Sequenzen in der 5'-NTR gerichtet, vier weitere siRNAs hatten ihre Zielsequenzen innerhalb der codierenden Sequenz, im Gen für die RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRP) des Virus. Die Sequenzen aller

verwendeten siRNAs und die Lage ihrer Zielsequenzen auf dem Genom des Coxsackievirus sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Bezeichnung	**Ziel-Sequenz**	**Position im Genom (GenBank M33854)**
siNTR1	ACA GCC TGT GGG TTG ATC C	5-23
siNTR2	GTA ACA CAC ACC GAT CAA C	113-131
siNTR3	GGA GAA AGC GTT CGT TAT C	217-235
siNTR4	TAC AGA CAT GGT GCG AAG A	403-421
siRdRP1	GTA CAA AAC TTT CCA CCT A	6493-6511
siRdRP2	CTA AGG ACC TAA CAA AGT T	6315-6333
siRdRP3	GCA CGA ATA TGA GGA GTT C	7192-7210
siRdRP4	GTA CAG GGA TAA ACA TTA C	6736-6754

Tab. 4.3: siRNAs gegen CBV-3.

Um die Wirkung der siRNAs in einem einfachen Versuchsaufbau bestimmen zu können, wurde die jeweilige Zielregion, also die 5'-NTR beziehungsweise das RdRP-Gen, in einen Expressionsvektor mit GFP als Reportermolekül kloniert. Die stärkste Expression des Reporters wurde erreicht, wenn die cDNA des Zielmoleküls nach einem TGA Codon, das als Stopsignal für die Translation wirkt, hinter dem 3'-Ende des GFP-Gens eingesetzt wurde. Der Aufbau eines solchen Konstruktes ist in Abbildung 4.15 schematisch dargestellt. Die jeweilige virale Sequenz ähnelt in diesem Aufbau einer künstlichen 3'-NTR des GFP-Gens. Transfektion des Plasmids in Cos-7 Zellen führte zur Expression des GFP-Gens und zu starker Fluoreszenz unter UV-Licht. Wurde durch eine der siRNAs die Spaltung der Zielsequenz induziert, so nahm die Fluoreszenz ab, da die Spaltung der chimären mRNA sehr schnell den Abbau des gesamten mRNA Moleküls nach sich zieht. Eine qualitative Beurteilung der Effizienz einer siRNA war so bereits unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich, *Western Blotting* erlaubte eine genauere Abschätzung des Effekts.

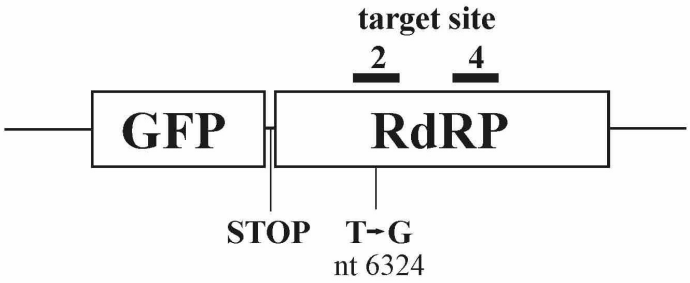


Abb. 4.15: Aufbau der Reporter-cDNA zur Bestimmung der Effizienz von siRNAs gegen die RdRP. Zwischen dem Reporter und dem Zielgen befindet sich ein Translations-Stopp-Signal. Die Zielsequenzen für siRdRP2 und siRdRP4 sind angedeutet, ebenso eine artifizielle Punktmutation in Zielsequenz 2. Weitere Erläuterungen im Text.

Überraschenderweise wurde mit keiner der vier siRNAs gegen die 5'-NTR ein deutlicher Abbau des Zielmoleküls erreicht. Sogar 100 nM der siRNAs verminderten die GFP-Fluoreszenz nur geringfügig. Die Ziel-RNA blieb also weitgehend intakt, die siRNAs waren wenig effektiv. Die siRNAs gegen die codierende Sequenz reduzierten dagegen schon bei niedrigen Konzentrationen die Expression des Reportergens weitgehend (Beispiele in Abbildung 4.16).

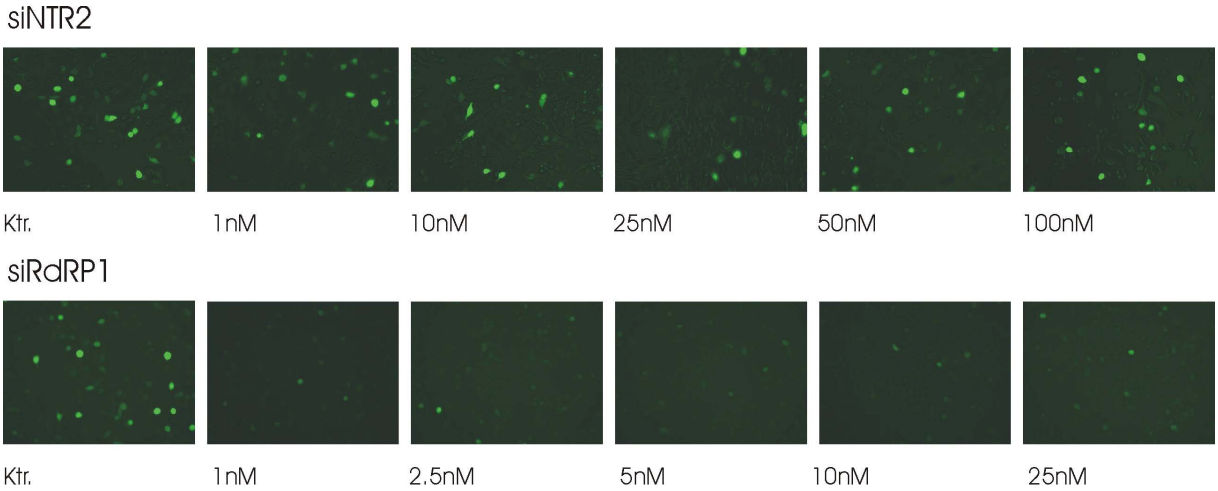


Abb. 4.16: Unterschiedliche Silencing-Effizienzen zweier siRNAs gegen CBV-3 im Reporter-Assay. Oben: Eine siRNA gegen die 5'-NTR zeigt kein Silencing im Konzentrationsbereich von 1 bis 100 nM. Unten: Eine siRNA gegen RdRP supprimiert die Genexpression bereits in einer Konzentration von 1 nM. Für die beiden Reihen wurden unterschiedliche Konzentrationsbereiche verwendet. Erläuterungen siehe Text.

Die vier siRNAs, die gegen die RdRP gerichtet waren, wurden genauer charakterisiert. Ihre Wirksamkeit gegenüber dem Zielgen wurde über einen größeren Konzentrationsbereich in Cotransfektionsexperimenten bestimmt. Alle vier siRNAs inhibierten die Translation der chimären RNA aus GFP und RdRP bereits bei subnanomolaren Konzentrationen. Schon 1 nM eines der vier Agentien konnte die Expression des Reportergens annähernd vollständig unterbinden (Abb. 4.17).

Um Werkzeuge zu erhalten, die ihr Zielgen über einen ausgedehnten Zeitraum blockieren können, sollten die siRNAs gegen die RdRP in Expressionsvektoren kloniert werden. Dazu wurden cDNA-Konstrukte der verschiedenen siRNAs hergestellt, die bei intrazellulärer Transkription shRNA-Moleküle ergeben. Diese Sequenzen wurden in pSilencer-Vektoren (Ambion) hinter einen U6-Promotor kloniert. Die entstandenen Konstrukte wurden als pSiR1-pSiR4 bezeichnet. In Cotransfektionsexperimenten ließ sich mit drei der vier hergestellten Expressionsplasmide die Menge des Zielgens deutlich verringern. Der pSilencer-Vektor mit dem Gen für die siRdRP3 zeigte allerdings nur sehr geringe Aktivität (Abb. 4.18).

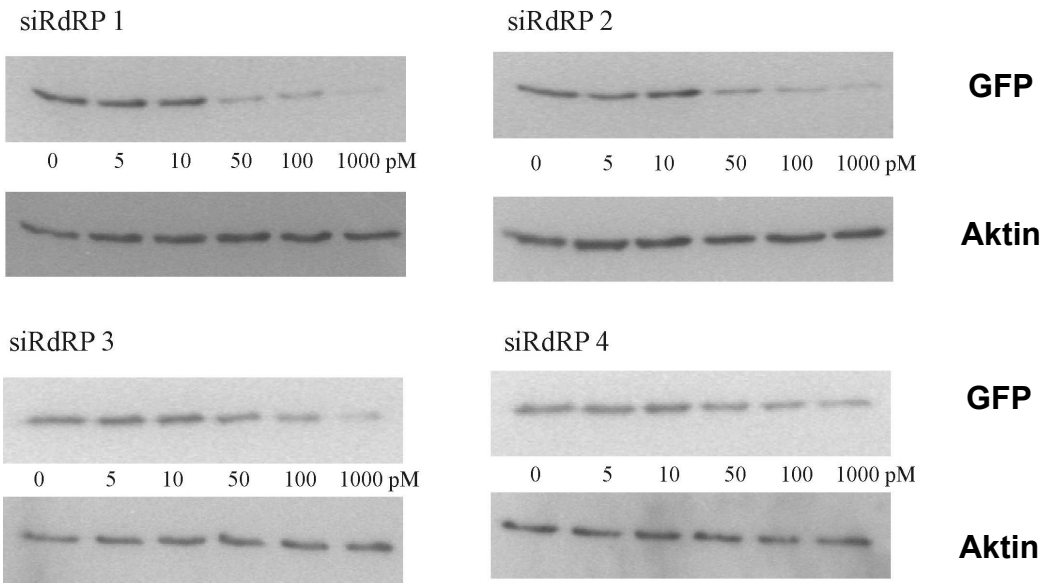


Abb. 4.17: Konzentrationsabhängiges Silencing des GFP-CBV3-RdRP Reportergens durch die vier siRNAs gegen RdRP. Western Blots gegen GFP jeweils mit Aktin als Ladekontrolle. Konzentrationsbereich: 5 pM bis 1 nM.

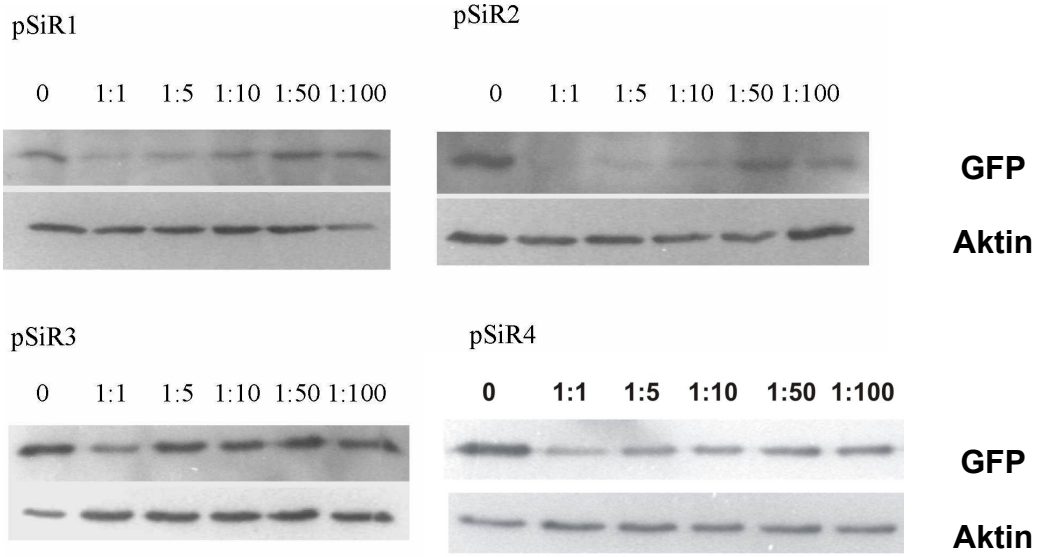


Abb. 4.18: Silencing des GFP-RdRP Reportergens durch pSilencer-Plasmide. Das Verhältnis von Zielvektor zu pSilencer ist angegeben. Western Blots gegen GFP mit Aktin als Ladekontrolle.

Keine der getesteten siRNAs gegen die 5'-NTR zeigte also einen meßbaren Protein-*knock-down*, wogegen alle untersuchten siRNAs gegen die codierende Sequenz wirksam waren. Das führte zu der Frage, welche Parameter für die Effizienz einer siRNA maßgeblich sind. Im Falle der DNAzyme hatte sich gezeigt, daß stabile Strukturen der Ziel-RNA die Aktivität eines Oligonukleotids stark inhibieren können, wenn durch sie die Targetsequenz unzugänglich wird. Am Beispiel einer hoch effizienten siRNA wurde deshalb untersucht, ob eine starke Aktivität hauptsächlich thermodynamischen Eigenschaften der siRNA-Duplex

selbst zugeschrieben werden kann, oder ob eine günstige Struktur des Zielmoleküls dazu eine wesentliche Voraussetzung ist.

4.2.1 Einfluß stabiler Sekundärstrukturen des Zielmoleküls auf die Silencing-Effizienz von siRNAs[‡]

Als Paradigma wurde eine hoch wirksame siRNA gegen den Vanilloid Rezeptor Subtyp 1 (VR1) der Ratte verwendet. Diese siRNA, die als VsiRNA1 bezeichnet wurde, war in einer anderen Studie identifiziert worden (Grünweller *et al*., 2003). In Cotransfektionsexperimenten mit einem Expressionsvektor für das Zielgen war für diese siRNA ein IC_{50}-Wert von etwa 60 pM bestimmt worden. Der Einfluß, den die Primärstruktur der siRNA einerseits und die Struktur des Zielmoleküls andererseits auf diese bemerkenswert hohe Silencing-Aktivität haben, sollte bestimmt werden.

Dazu wurde zunächst die 21-mere Zielsequenz aus dem komplexen Zusammenhang der 2600 Basen langen VR1-mRNA herausgenommen und isoliert vor ein GFP-Gen kloniert. Dieser Aufbau erlaubte es, das durch die siRNA ausgelöste Silencing zu betrachten, ohne daß schwer vorherzusagende Strukturen in der Ziel-RNA den Effekt vermindern. Zudem wurde es dadurch möglich, definierte Strukturelemente in die Zielregion einzuführen. Das neue Vektor-Konstrukt wurde als VR1straight bezeichnet. Cos-7 Zellen, die mit dem Vektor transfiziert wurden, zeigten anschließend starke GFP-Fluoreszenz unter UV-Licht. Wie zu erwarten war, wurde die GFP-Expression weitgehend reduziert, wenn VsiRNA1 gleichzeitig transfiziert wurde. Der obere Teil der Abbildung 4.19 illustriert, wie die GFP-Expression schon bei subnanomolaren Konzentrationen an spezifischer siRNA stark abnimmt.

Um zu bestimmen, welchen Anteil Sequenz-Charakteristika von VsiRNA1 an der starken Gensuppression haben, wurde anschließend die Aktivität des korrespondierenden *sense*-Stranges untersucht. Die beiden Stränge haben eine äquivalente Struktur und die gleiche Affinität für die Zielsequenz. Der einzige wesentliche Unterschied zwischen den Strängen besteht insofern in ihrer Primärsequenz, und Unterschiede in der Aktivität können diesem Aspekt zugeschrieben werden. Die Zielregion im Reporter-Vektor wurde durch die Komplementärsequenz ersetzt, so daß eine gut zugängliche Angriffsstelle für den *sense*-Strang der siRNA entstand. Der dritte Abschnitt von Abbildung 4.19 zeigt schematisch den Aufbau der Ziel-RNA. Im Blot wird sichtbar, daß das Silencing, das durch den *sense*-Strang ausgelöst wurde, gegenüber dem durch den Antisense-Strang hervorgerufenen deutlich

[‡] Die Ergebnisse dieses Teils sind veröffentlicht in Schubert *et al*., 2005b. Die Abbildungen sind der Veröffentlichung entnommen.

schwächer war. Diese Beobachtung erlaubt den Schluß, daß Charakteristika der Primärstruktur der untersuchten siRNA von grundlegender Bedeutung für ihre Aktivität sind.

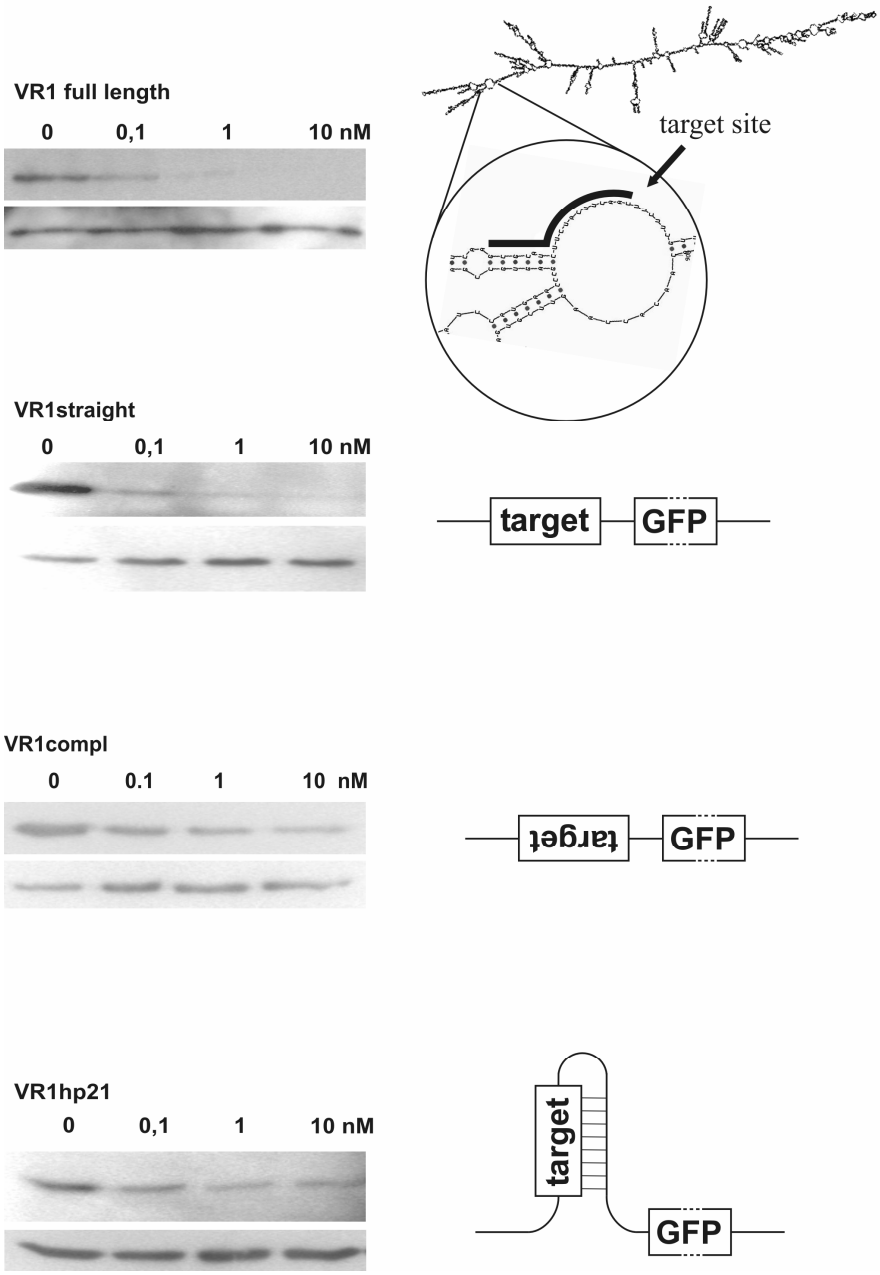


Abb. 4.19: Einfluß der Zielsequenz und des Strukturzusammenhangs auf die Silencing-Effizienz. Eine siRNA gegen die mRNA von VR1 wurde gegen unterschiedliche Ziel-Konstrukte eingesetzt. Reporter-Expression wurde durch Western Blot detektiert, Aktin dient als Beladungskontrolle. Der Aufbau der verschiedenen Ziel-Konstrukte ist rechts schematisch gezeigt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Frage blieb, ob eine günstige Sequenz bereits hinreichend ist, um eine effiziente siRNA zu identifizieren, oder ob auch die Struktur der Ziel-RNA Einfluß auf das Silencing haben kann. Als Beispiel für eine ungünstige Zielstruktur wurde ein künstliches Haarnadelmotiv so in die RNA eingeführt, daß alle 21 Nukleotide der Zielsequenz intramolekulare

Basenpaarungen ausbilden konnten (Abb. 4.19, untere Reihe). Tatsächlich wurde die Aktivität der effizienten VsiRNA1 durch diese hinderliche Struktur stark eingeschränkt. Der Blot belegt, daß die Expression des Zielgenes durch die siRNA kaum vermindert wird.
Die Quantifizierung mehrerer Experimente führte zu dem Diagramm, das in Abbildung 4.20 dargestellt ist: Die Voll-Längen-RNA und die vollständig zugängliche Zielsequenz (schwarze bzw. weiße Balken in der Abbildung) wurden bereits bei subnanomolaren Konzentrationen der siRNA zu 50% supprimiert. Mit niedrigen nanomolaren Konzentrationen von VsiRNA1 ließen sich diese Konstrukte praktisch vollständig blockieren. Wurde die Zielsequenz durch den Gegenstrang oder durch eine Haarnadelstruktur ersetzt (hellgraue bzw. dunkelgraue Balken), so war die die siRNA deutlich weniger wirksam. Sogar bei einer Konzentration von 10 nM war die Genexpression nur um etwa die Hälfte herabgesetzt.

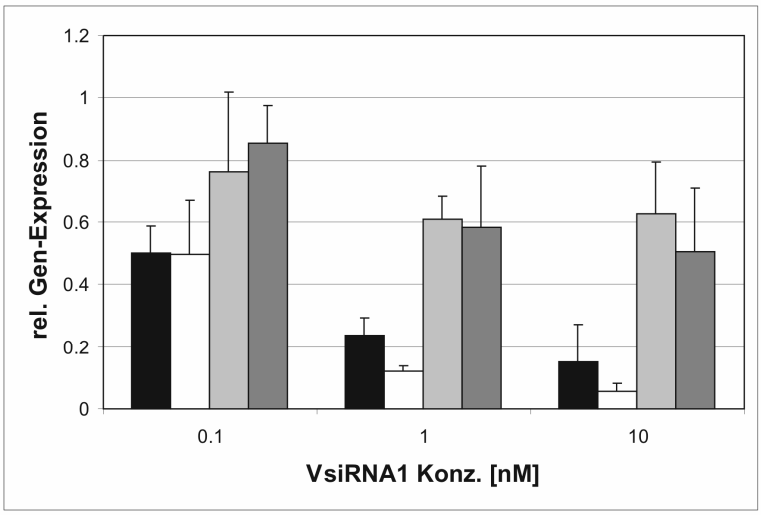


Abb. 4.20: Quantifizierung des Reporter *knock-down* durch VsiRNA1 in verschiedenen Zielkonstrukten. Schwarze Balken: VR1 full length, weiße Balken: VR1straight, hellgraue Balken: VR1compl, dunkelgraue Balken: VR1hp21. Für die Nomenklatur siehe Abb. 4.19.

Obwohl VsiRNA1 sehr effizient ist, entspricht die Sequenz nicht vollständig den später formulierten Kriterien zum Aufbau einer siRNA-Duplex (Khvorova *et al.,* 2003; Schwarz *et al*, 2003). Es könnte daher argumentiert werden, daß der Grund für die begrenzte Fähigkeit von VsiRNA1, mit stabilen Strukturen zu konkurrieren, im suboptimalen Design dieser siRNA zu finden ist. Um zu verifizieren, daß stabile Zielstrukturen die Effizienz einer siRNA begrenzen können, wurde deswegen eine der oben beschriebenen siRNAs gegen die RdRP von CBV-3 eingesetzt. Wie bereits erwähnt, zeigte siRdRP1 starke Inhibition eines RdRP-GFP Fusionsgenes (Abbildung 4.21, links). Wiederum wurde eine ungünstige stabile Sekundärstruktur in die mRNA eingeführt, indem alle Zielnukleotide in eine

Haarnadelstruktur eingebaut wurden. Ähnlich wie bei den Versuchen mit VsiRNA1 induzierte die geschützte Zielsequenz auch hier eine deutliche Abschwächung des Silencing-Effektes.

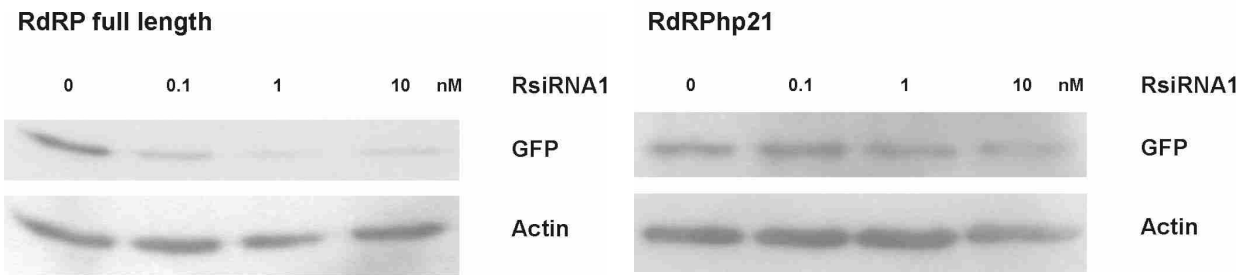


Abb. 4.21: Silencing der RdRP von CBV-3 durch siRdRP1. Links: Silencing der Voll-Längen mRNA. Rechts: Künstliche 21-nt-Haarnadelstruktur vor GFP-Reportergen. Western Blots mit Aktin als Ladekontrolle.

Der Einfluß abgeschirmter Zielnukleotide wurde im folgenden detaillierter untersucht. Eine Reihe von RNAs wurde entworfen, in denen die Zielsequenz in Haarnadelstrukturen von unterschiedlicher Länge und Stabilität enthalten war. 16, 10 und 5 Nukleotide waren an Basenpaarungen beteiligt, während der Rest der Zielsequenz frei zugänglich war. Abbildung 4.22 zeigt, wie sich die Gensuppression verändert, wenn Nukleotide am 5'-Ende (links) oder am 3'-Ende (rechts) ungepaart sind. Während eine vollständig gepaart vorliegende Zielsequenz die Aktivität der siRNA stark beeinträchtigt, wird diese Blockade schrittweise aufgehoben, je mehr Zielnukleotide zugänglich sind.

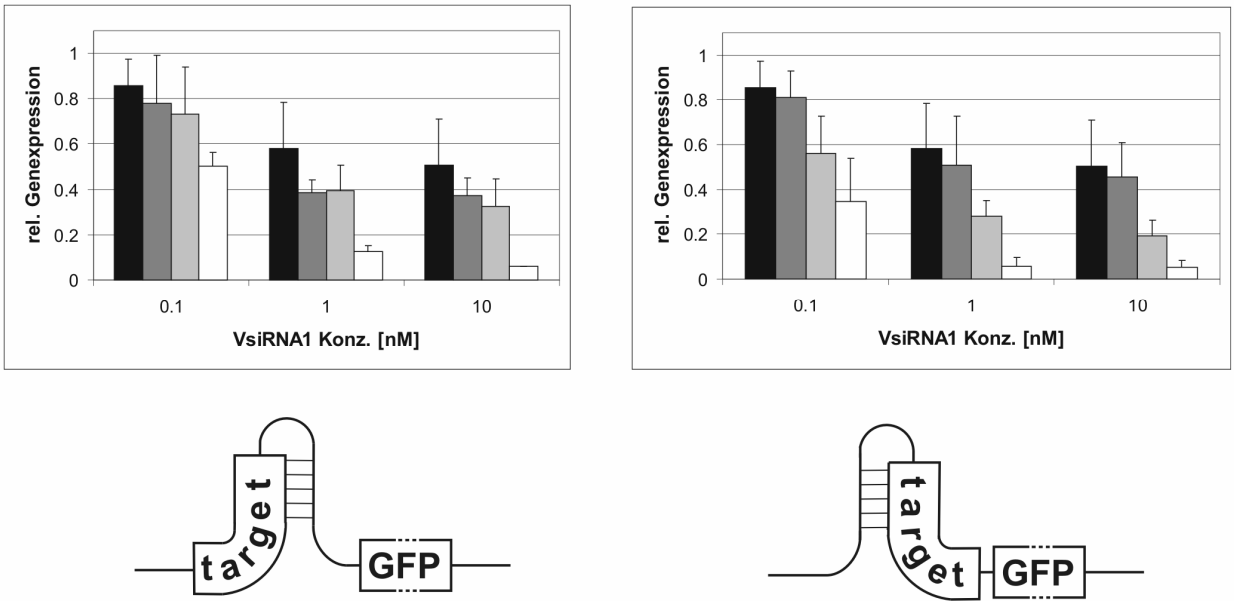


Abb. 4.22: Aktivität von VsiRNA1 gegen teilweise gepaarte Zielsequenzen. Links: Nukleotide am 5'-Ende exponiert. Rechts: Nukleotide am 3'-Ende exponiert. Schwarze Balken: Alle Nukleotide gepaart. Dunkelgraue Balken: 5 nt ungepaart. Hellgraue Balken: 10 nt ungepaart. Weiße Balken: 16 nt ungepaart.

Um diesen Zusammenhang genauer zu beschreiben, wurden Sekundärstrukturvorhersagen der jeweiligen Ziel-RNA mitsamt der Reportersequenz mit dem mfold Web Server durchgeführt (Zuker, 2003). Lokale Freie Energien wurden für diejenigen Strukturmotive berechnet, an denen Nukleotide der Zielsequenz beteiligt waren (Abb. 4.23).

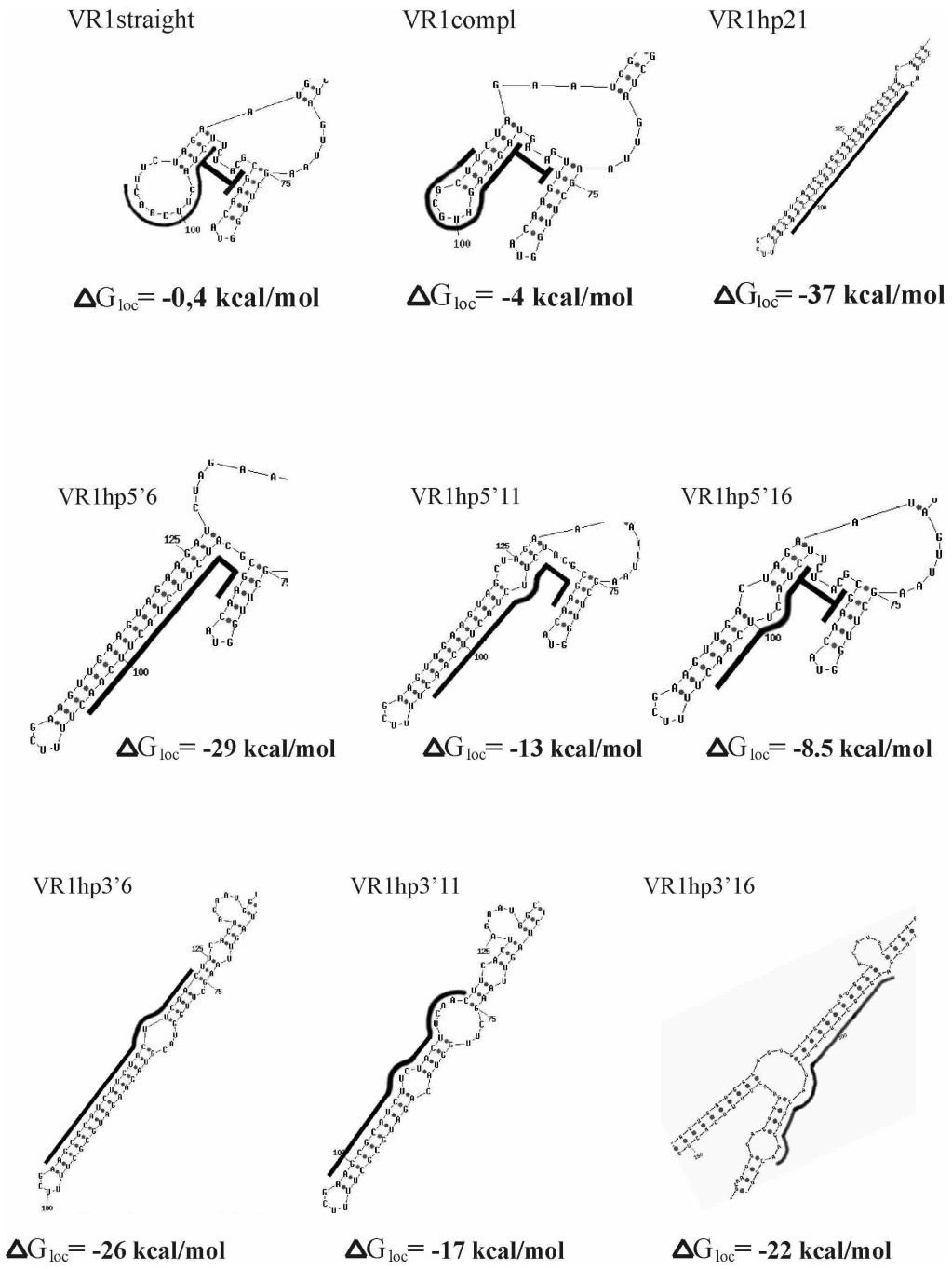


Abb. 4.23: Vorhergesagte Strukturen und lokale Freie Energien der Ziel-RNA-Reporter Konstrukte. Die Zielsequenz von VsiRNA1 in unterschiedlichen Sequenz-Zusammenhängen ist markiert. Relevante Ausschnitte der errechneten Strukturen mit den geringsten Gesamtenergien sind gezeigt. Berechnung mit dem mfold Web-Server (URL: http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold).

Es ist bekannt, daß Strukturvorhersagen für lange RNAs nur begrenzt zuverlässig sind und die reale Struktur nur annähernd wiedergeben können. Dennoch ergab die Vorhersage, daß die RNA, die Komplementärbasen zu allen 21 Zielnukleotiden enthält, eine stabile *stem-loop*-Struktur ausbildet, für die eine sehr niedrige Freie Energie berechnet wurde. Für Zielmotive, deren Stabilität geringer sein sollte, wurden tatsächlich kürzere zusammenhängende gepaarte Regionen vorhergesagt, und die errechneten Freien Energien entsprachen ebenfalls geringeren Stabilitäten. Insbesondere wurden keine Hinweise darauf gefunden, daß Zielnukleotide unbeabsichtigte stabile Strukturen mit Teilen der Reporter-mRNA eingingen. Die einzige Ausnahme bildete das Zielkonstrukt VR1hp3'16, für das eine stabile Sekundärstruktur errechnet wurde, die mit keiner der für die anderen RNAs vorhergesagten Strukturen korrelierte. Mehrere alternative Faltungsstrukturen dieser RNA, deren Gesamtenergien nur unwesentlich ungünstiger waren als die der gezeigten Struktur, zeigten aber die beabsichtigte Faltung mit weniger gepaarten Ziel-Nukleotiden. Die *straight*-Struktur und die RNA mit der Komplementärsequenz ergaben Molekülstrukturen mit der geringsten Stabilität.

Setzt man die lokale Freie Energie der Zielstruktur, als Maß für ihre Stabilität, in Beziehung zur Silencing-Aktivität der untersuchten siRNA, so ergibt sich, daß bei Zusatz einer gleichen Menge von siRNA die Expression des Reportergens linear mit der lokalen Stabilität der Ziel-RNA abnimmt (Abb. 4.24). Der Wert bei -22 kcal/mol, der am weitesten von der Ausgleichsgerade entfernt liegt, entspricht der beschriebenen unerwarteten Struktur für VR1hp3'16.

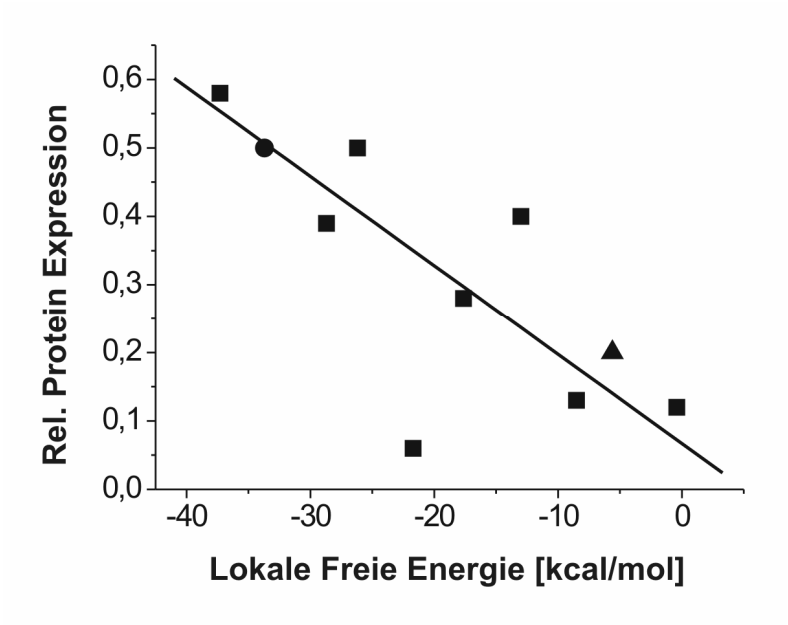


Abb. 4.24: Abhängigkeit der Reportergen-Expression von der Stabilität der Zielregion. Quadrate: siRNA gegen VR1 in verschiedenen lokalen Sequenz-Zusammenhängen. Kreis: siRdRP1 gegen vollständig gepaarte Region. Dreieck: PsiR2 gegen vollständig zugängliche Region.

Dieser Befund besagt, daß auch sorgfältig ausgewählte und effiziente siRNAs durch ungünstige Zielstrukturen fast vollständig inaktiviert werden können. Kann andersherum auch eine siRNA mit ungünstigen Eigenschaften effizient den Abbau einer komplementären RNA induzieren, wenn die lokale Zielstruktur besonders vorteilhaft ist? Um diese Frage zu untersuchen, wurde eine siRNA gegen die Serin/Threonin Kinase Pim-1 eingesetzt, die sich in einer früheren Studie als inaktiv erwiesen hatte (Grünweller *et al.*, 2003). Diese siRNA, die als PsiR2 bezeichnet wurde, entsprach nicht den Kriterien für eine gut designte siRNA, und sie zeigte auch keine Regulation des Pim-1 Gens, gekoppelt an einen Reporter (Abb. 4.25). Wurde die 21-mere Zielsequenz allerdings isoliert wie beschrieben und vor GFP positioniert, war PsiR2 in erheblichem Umfang aktiv, und eine weitgehende Genregulation wurde beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt, daß die eingeschränkte Wirksamkeit von PsiR2 ihren Grund tatsächlich nicht in der thermodynamisch ungünstigen Sequenz der siRNA selbst hat, sondern durch Strukturmerkmale der Ziel-RNA zustande kommt.

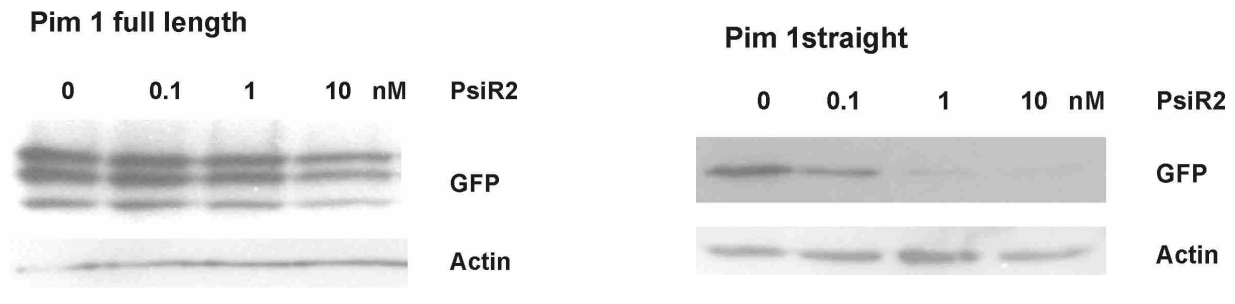


Abb. 4.25: Silencing der Pim-1-Kinase durch RNAi. Links: PsiR2 gegen die Voll-Längen RNA an GFP-Reporter. Die Tatsache, daß Pim-1 im Western Blot drei Banden zeigt, ist literaturbekannt. Rechts: Dieselbe siRNA gegen die isolierte und zugängliche Zielsequenz vor GFP.

Es erschien demnach plausibel anzunehmen, daß die konservierten Sekundärstrukturen in der 5'-NTR von Picornaviren die Anwendung von RNAi gegen diese Region erschweren. In der codierenden Region werden weniger stabile Sekundärstrukturen erwartet als in der 5'-NTR. Das könnte erklären, warum siRNAs, die spezifisch für die virale RdRP waren, deutlich effizienter waren als solche, die gegen die NTR gerichtet waren.

4.2.2 shRNA-Doppelexpressionsvektor zur Verhinderung von *Escape*-Mutanten[§]

Alle vier siRNAs, die gegen die RdRP von CBV-3 gerichtet waren, inhibierten die Expression eines mit dem Zielmolekül fusionierten GFP-Reportergens mit hoher Effizienz. Durch die intrazelluläre Expression dieser siRNAs sollte es möglich sein, Zellen über einen längeren

[§] Die Ergebnisse dieses Abschnitts sind in Schubert *et al.*, 2005a veröffentlicht. Die Abbildungen sind der Veröffentlichung entnommen.

Zeitraum gegen ein Virus zu schützen. Deswegen wurden pSilencer-Expressions-Vektoren hergestellt, die je ein Gen für eine der vier siRNAs enthielten. Wie bereits beschrieben, waren drei dieser Vektoren wirksame Inhibitoren des GFP-RdRP Reporter-Konstruktes im Cotransfektionsversuch. Für weitere Versuche wurden die Expressionsplasmide mit den Genen für siRdRP2 und siRdRP4 ausgewählt, die als pSiR2 und pSiR4 bezeichnet wurden. Beide Plasmide zeigten effizienten *knock-down* des GFP-RdRP Fusionskonstruktes über einen weiten Konzentrationsbereich (Abb. 4.26). Sie sind daher vielversprechende Werkzeuge für eine mögliche antivirale Anwendung.

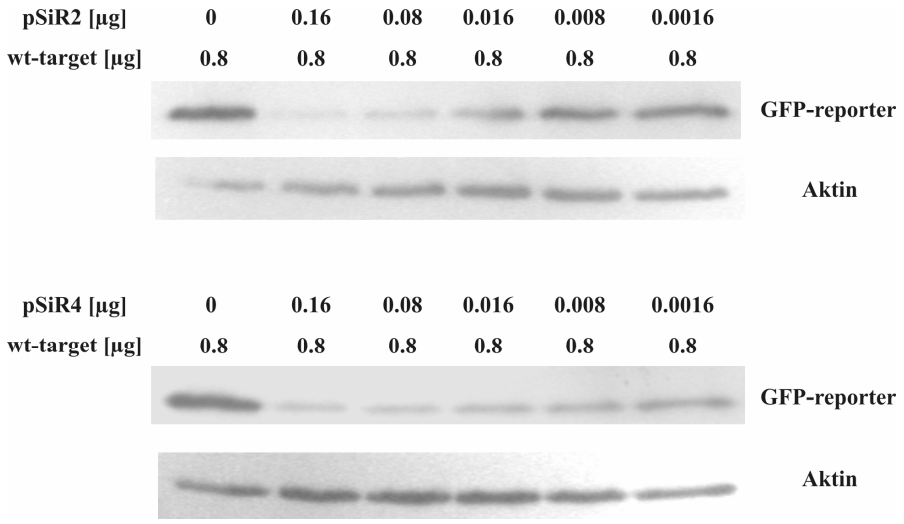


Abb. 4.26: Regulation des GFP-Reporters durch pSiR2 (oben) und pSiR4 (unten) im Western Blot. Die Ziel-mRNA wurde von 0,8 µg eines GFP-RdRP Fusionsplasmids exprimiert. Die Mengen an eingesetztem pSilencer sind angegeben. Aktin dient als Ladekontrolle.

Ein Hauptproblem antiviraler Strategien ist die hohe Mutationsrate vieler Viren, die dazu führen kann, daß *Escape*-Mutanten entstehen, die gegen das antivirale Agens resistent sind. Es sollte festgestellt werden, in welchem Maße dieses Risiko auch bei der Anwendung der hier eingesetzten pSilencer-Vektoren besteht. Dazu wurde untersucht, welche Wirkung eine künstlich eingeführte Mutation in einer der Zielsequenzen auf das Silencing durch die pSilencer-Vektoren haben würde. Das zentrale Nukleotid im Zielabschnitt von pSiR2, Thymidin 6324, wurde mithilfe zielgerichteter Mutagenese durch Guanosin ersetzt (s. o., Abb. 4.15). Diese einzelne Substitution reichte bereits aus, die Geninhibition durch pSiR2 vollständig aufzuheben, wie in Abbildung 4.27 gezeigt wird. Wie erwartet war die Wirkung von pSiR4, das an anderer Stelle angreift, durch die Mutation nicht beeinträchtigt.

Diese Beobachtung unterstreicht die Anfälligkeit von RNAi-Strategien für viralen *Escape*, da eine einzelne zentrale Substitution ausreichen kann, eine siRNA zu inaktivieren. In der konventionellen antiviralen Therapie wird dieser Gefahr begegnet, indem mehrere Wirkstoffe

gleichzeitig angewendet werden. Eine parallele Überlegung für siRNAs führte zu der Entscheidung, einen einzelnen Vektor herzustellen, der zwei shRNAs gegen verschiedene Regionen des gleichen Gens exprimiert. Eine Mutation in einer der beiden Zielregionen könnte dann durch die unverminderte Effizienz der zweiten shRNA kompensiert werden.

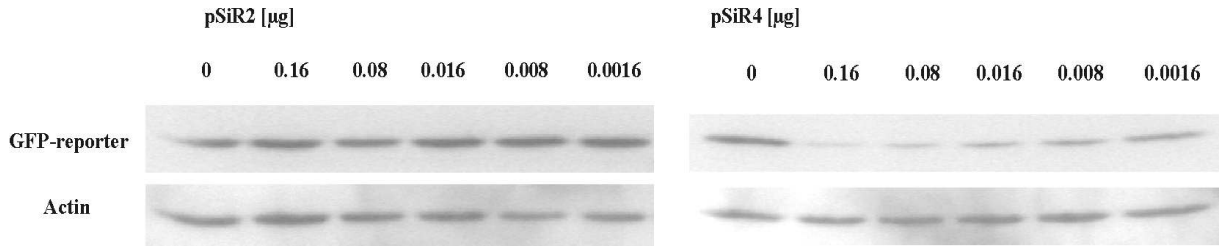


Abb. 4.27: Regulation des mutierten GFP-Reporters durch pSiR2 (links) und pSiR4 (rechts) im Western Blot. Die Ziel-mRNA wurde von 0,8 µg eines GFP-RdRP Fusionsplasmids exprimiert. In der Mitte der Zielsequenz 2 befand sich eine Punktmutation.

Eine einfache Klonierungsstrategie wurde angewandt: In pSiR4, den „Donor-Vektor“, wurde eine Eco RI-Restriktionsstelle hinter der shRNA-Sequenz eingeführt. Mithilfe dieser Schnittstelle konnte die gesamte shRNA-Expressionskassette mit Eco RI herausgeschnitten werden und über die nur einmal vorkommende Eco RI-Site in den „Akzeptor-Vektor“ pSiR2 eingebaut werden. Es entstand ein Plasmid, das die beiden shRNA Expressionskassetten in Tandem-Formation enthielt. Es wurde siRNA double expression vector, SiDEx, benannt (Abb. 4.28).

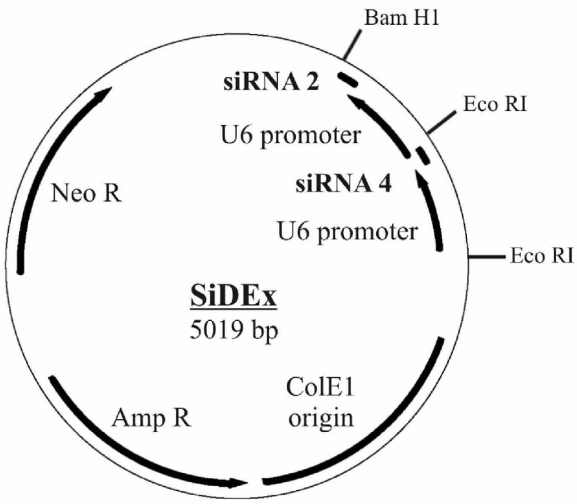


Abb. 4.28: Aufbau des Doppel-Expressionsvektors SiDEx.

Um nachzuweisen, daß beide shRNAs im Innern der transfizierten Zellen transkribiert werden und funktionsfähige siRNAs ergeben, wurde jeweils eine der 19-meren Zielsequenzen direkt vor GFP kloniert. Eine Abnahme der GFP-Fluoreszenz konnte so wiederum als Maß für den

erzielten RNAi-Effekt gelten, wobei Positionseffekte und Sekundärstrukturen auf der Ziel-RNA weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Sowohl pSiR2 als auch pSiR4 regulierten die GFP-Expression über ihre jeweilige Zielsequenz mit hoher Effizienz (Abb. 4.29, schwarze und weiße Balken). pSiR2 gab wie erwartet keine Regulation über die *target site* 4 und umgekehrt (Daten nicht gezeigt). Der Doppel-Expressionsvektor SiDEx induzierte dagegen starken *knock-down* über beide Zielsequenzen. Eine Quantifizierung der Expression des Reportergens fusioniert an Zielsequenz 2 oder Zielsequenz 4 ergab, daß die Genregulation durch SiDEx über einen Konzentrationsbereich von mindestens drei Größenordnungen im Rahmen des Fehlers nicht von der durch den jeweiligen Mono-Expressionsvektor zu unterscheiden war (Abb. 4.29, graue Balken). Damit war gezeigt, daß die Expression der shRNAs aus SiDEx ungehindert verläuft.

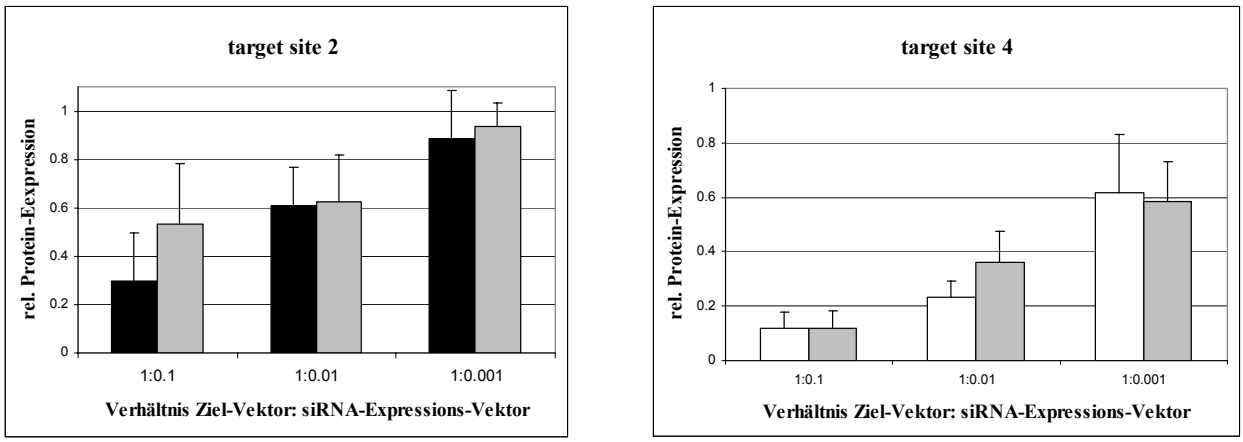


Abb 4.29: Quantifizierung des spezifischen Gen-Silencings durch pSiR2 (schwarze Balken), pSiR4 (weiße Balken) und SiDEx (graue Balken) gegen Zielsequenz 2 (links) und Zielsequenz 4 (rechts).

Anschließend wurde untersucht, inwieweit SiDEx auch die Expression des vollständigen Zielgens, der RdRP, vermindern konnte. Auch hier wurde die Zielgenexpression drastisch vermindert, wenn SiDEx und Zielvektor in Verhältnissen von 0,2:1 bis 0,001:1 cotransfiziert wurden. Der beobachtete *knock-down* durch SiDEx ähnelte der Inhibition, die mit jedem der beiden Mono-Expressionvektoren gefunden wurde, war aber weder stärker noch wurde der gleiche Effekt bereits bei geringeren Konzentrationen erzielt (Daten nicht gezeigt).

Der erwartete Vorteil des neuartigen Doppel-Expressionsvektors sollte aber anhaltende Aktivität gegen eine mRNA sein, die eine Mutation in einer der Zielsequenzen trug. Um zu zeigen, daß das entwickelte Vektor-Design für eine solche Problemstellung geeignet ist, wurde das bereits beschriebene Zielkonstrukt mit einer zentralen Punktmutation in *target site* 2 eingesetzt. Abbildung 4.30 illustriert, daß SiDEx auch das mutierte Gen effizient inhibierte. Ein Vergleich mit dem durch pSiR2 und pSiR4 induzierten *knock-down* ergab, daß SiDEx annähernd die gleiche Effizienz zeigte wie pSiR4, der gegen eine unmutierte Region

gerichtet war (Abb. 4.30 unten). Als zusätzliche Verifikation der Wirksamkeit von SiDEx wurde ein GFP-RdRP Fusionsgen hergestellt, das eine Punktmutation im Zentrum der Zielsequenz 4 trug. Während pSiR2 die Expression des mutierten Gens ähnlich gut inhibierte wie die der Wildtyp-RNA, war nun pSiR4 fast völlig unwirksam. Wiederum konnte mit dem SiDEx-Vektor der Verlust der Aktivität der einen shRNA durch die Effizienz der anderen shRNA kompensiert werden: Die Menge an Reporterprotein wurde ähnlich stark reduziert wie mit pSiR2 (Daten nicht gezeigt).

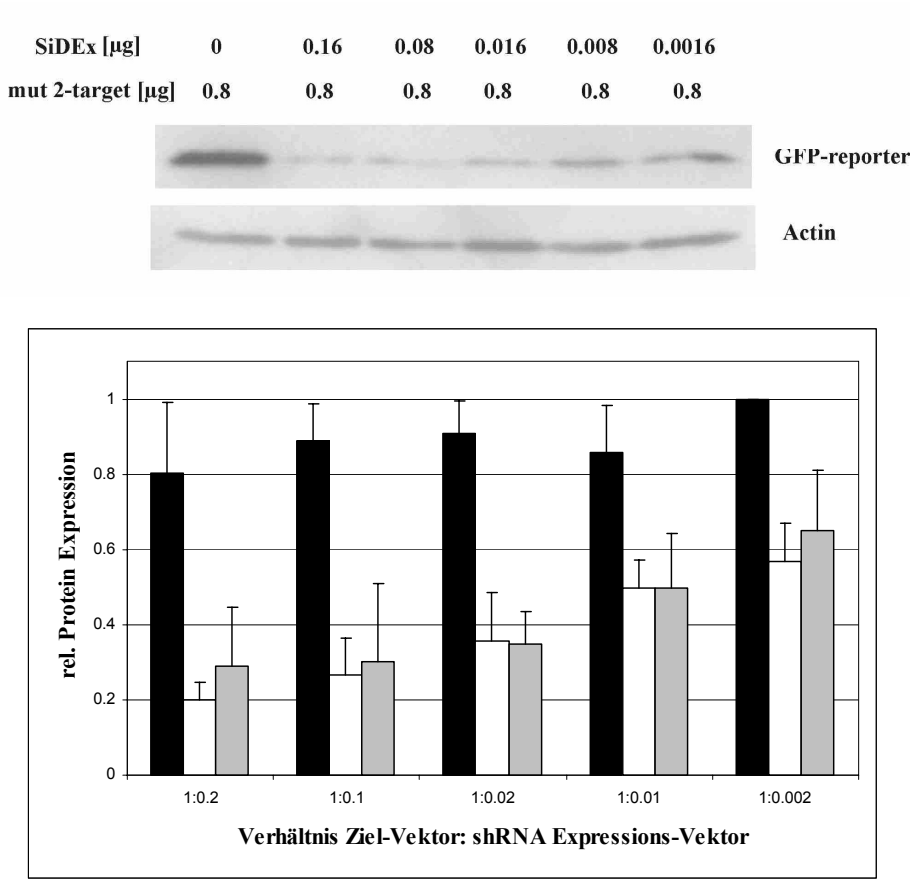


Abb. 4.28: Reglation eines RdRP-GFP Gens mit Mutation in Zielsequenz 2. Oben: Western Blot der Regulation durch SiDEx. Unten: Quantifizierung des *knock-downs* durch pSiR2 (schwarze Balken), pSiR4 (weiße Balken) und SiDEx (graue Balken).

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sich Doppelexpressionsvektoren herstellen lassen, die zwei effiziente shRNAs gleichzeitig exprimieren. Auch wenn die Aktivität einer der beiden siRNAs z. B. durch eine Mutation in der Zielsequenz reduziert wird, bleibt die andere siRNA in vollem Umfange wirksam. Diese Strategie kann zahlreiche Anwendungen finden, insbesondere in der Behandlung viraler Infektionen.

4.2.3 Inhibition der Virusreplikation mit siRNAs

Die bisher hierhin erzielten Ergebnisse ließen es sinnvoll erscheinen zu untersuchen, ob die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen siRNAs und pSilencer-Plasmide auch in der Lage sind, die Ausbreitung vollständiger Viren zu blockieren. Um den virostatischen Effekt der Oligonukleotide und Plasmide zu beobachten, wurde ein *Cell-Viability-Test* eingesetzt. Dazu wurden HeLa-Zellen, die von CBV-3 infiziert werden können und in denen sich das Virus replizieren und ausbreiten kann, mit den jeweiligen antiviralen Agenzien transfiziert und anschließend mit einer *multiplicity of infection* (MOI) des Virus von 0,1 inokuliert. Die Stoffwechseltätigkeit der Zellen als Maß für deren Lebensfähigkeit wurde über drei Tage verfolgt.

Untransfizierte Zellen waren bereits 20 Stunden nach der Inokulation mit dem Virus stark beeinträchtigt. Nach 44 Stunden waren die meisten dieser Zellen lysiert. Alle vier siRNAs gegen die RdRP verminderten dagegen in einer Konzentration von 100 nM den cytopathischen Effekt von CBV-3 deutlich (Abb. 4.31). siRdRP1 und siRdRP2 inhibierten die Ausbreitung des Virus besonders stark: Auch nach drei Tagen waren die mit den Oligonukleotiden transfizierten Zellen gegenüber den ungeschützten Zellen im Vorteil. siRdRP3 und 4 hatten einen zwar schwächeren, aber dennoch klaren schützenden Effekt.

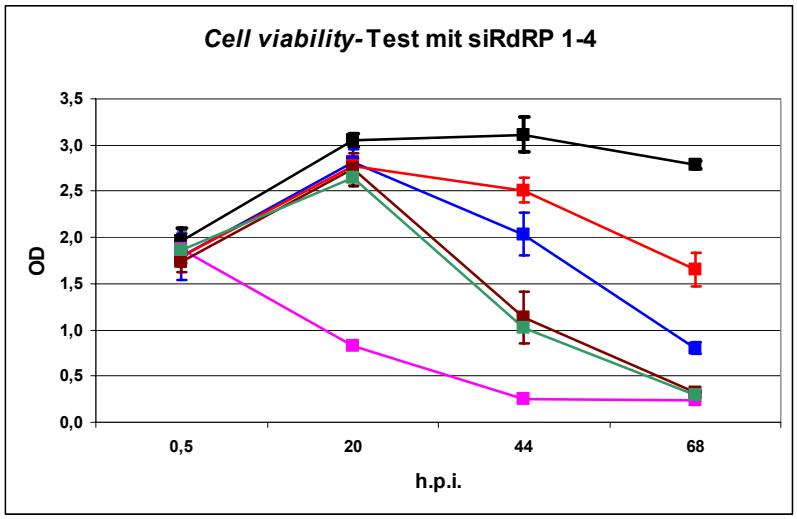


Abb. 4.31: Protektive Wirkung von siRdRP1-4 gegen CBV-3 im XTT-*Cell-Viability*-Test. Hohe OD-Werte entsprechen metabolisch aktiven Zellen. 4 Stunden vor der Infektion mit 0,1 MOI CBV-3 wurden HeLa-Zellen mit 100 nM siRdRP1 (blau), siRdRP2 (rot), siRdRP3 (braun) oder siRdRP4 (grün) transfiziert. Magenta: untransfizierte Zellen. Schwarz: Mock-Infektion untransfizierter Zellen. h.p.i.: *hours post infection.*

Die Wirkung der besonders effizienten siRdRP2 wurde in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt. Abbildung 4.32 zeigt den Verlauf der *cell viability*, wenn die Zellen vor der Infektion mit CBV-3 mit unterschiedlichen Mengen dieser siRNA transfiziert wurden.

In dieser Auftragung wird die Korrelation zwischen siRNA-Konzentration und antiviralem Effekt sichtbar.

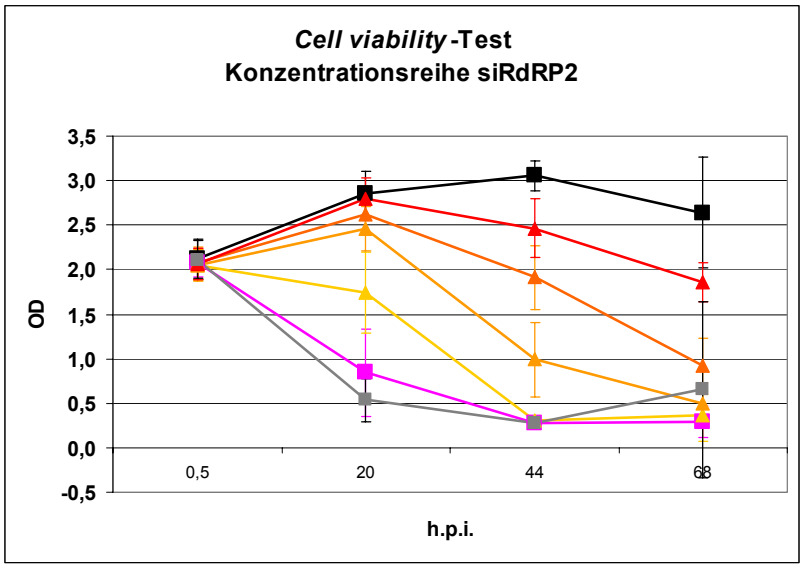


Abb. 4.32: Konzentrationsreihe mit siRdRP2. XTT-*Cell-Viability* Test über 72 Stunden. Schwarz: Mock-Infektion untransfizierter Zellen. Magenta: Untransfizierte Zellen. Grau: 100 nM nicht-homologe Kontroll-siRNA. Gelb: 0,1 nM siRdRP2; Hellorange: 1 nM siRdRP2; Dunkelorange: 10 nM siRdRP2; Rot: 100 nM siRdRP2. h.p.i.: *hours post infection.*

Um die virostatische Wirkung bei verschiedenen Konzentrationen von siRdRP2 quantitativ abzuschätzen, wurden die im XTT-Test bestimmten Werte normiert, so daß sich ein Maß für den inhibitorischen Effekt der siRNAs ergab: Die nach 44 Stunden gemessene Absorbtion wurde auf die OD-Werte für nicht-infizierte Zellen (definiert als 100% Protektion) und ungeschützte infizierte Zellen (definiert als 0% Protektion) bezogen. Abbildung 4.33 stellt den Verlauf des inhibitorischen Effektes in Abhängigkeit der Konzentration von siRdRP2 dar. Bereits im niedrigen nanomolaren Bereich entwickelt siRdRP2 ihren halbmaximalen Effekt. Wurde die Konzentration über 100 nM hinaus erhöht, verbesserte sich die antivirale Wirkung nicht weiter (Daten nicht gezeigt).

Eine verläßlichere Quantifizierung der antiviralen Aktivität ist mithilfe eines Plaque-Reduktionsassay möglich. Die inhibitorische Wirkung der beiden siRNAs, die verwendet wurden, um den SiDEx-Vektor herzustellen, wurde auf diese Weise ermittelt. Dazu wurde der Plaquetiter von CBV-3 auf HeLa-Zellen mit und ohne vorherige Transfektion mit siRdRP2 bzw. siRdRP4 bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.34 dargestellt: 100 nM siRdRP2 reduzierten die Anzahl der plaque-forming units (pfus) um eine Größenordnung, 100 nM siRdRP4 um etwa 80%. Eine Kontroll-siRNA, die weder im humanen noch im viralen Genom eine Entsprechung hat, hatte in derselben Konzentration keinerlei Einfluß auf die Bildung viraler Plaques.

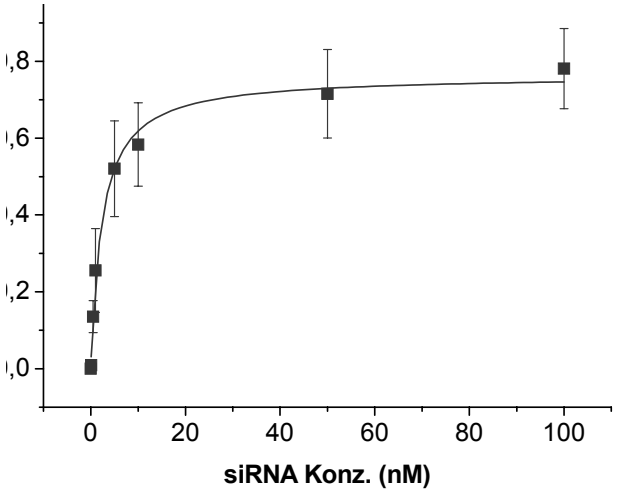


Abb. 4.33: Konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt von siRdRP2 44 Stunden nach der Infektion.

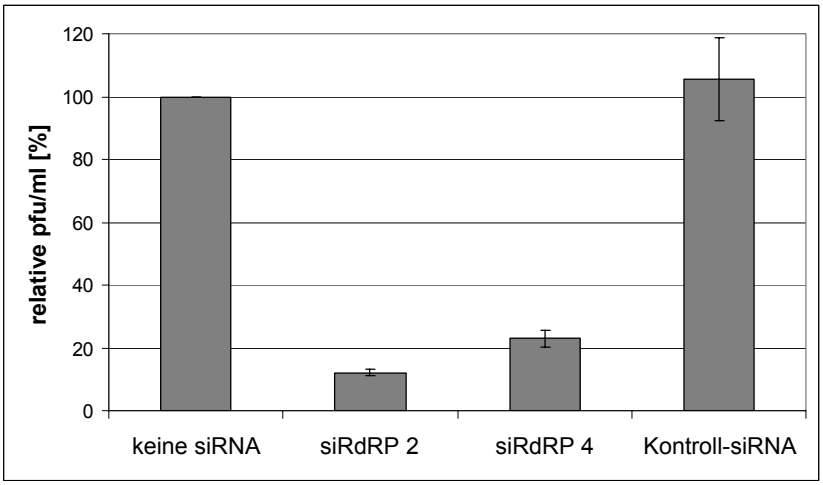


Abb. 4.34: Relative Reduktion des Virustiters durch 100 nM der angegebenen siRNAs. Der CBV-3 Titer ist angegeben als *plaque-forming units* (p.f.u.)/ml auf HeLa Zellen. Eine Reduktion der Plaques bedeutet siRNA-induzierte Inhibition der Virus-Reproduktion.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit siRdRP2 eine bereits bestehende coxsackievirale Infektion aufhalten könnte. Dazu wurde die siRNA erst nach der Inokulation mit dem Virus transfiziert. Die Zeit zwischen Infektion und Transfektion wurde von 30 Minuten bis drei Stunden variiert. Abbildung 4.35 zeigt, wie die antivirale Wirkung der siRNA abnimmt, je länger das Virus sich bereits ungehindert hat ausbreiten können. Der protektive Effekt nach 20 und 44 Stunden wurde wie oben beschrieben aus einem XTT-*cell-viability* Test berechnet. Schließlich wurde die antivirale Wirkung der pSilencer Vektoren, die für jeweils eine der vier siRNAs codierten, im *cell-viability-Assay* getestet. Der virostatische Effekt dieser Agenzien war deutlicher schwächer als der der chemisch synthetisierten siRNAs (Abb. 4.36). Da die Transfektioneffizienz für Plasmide schlechter ist als für Oligonukleotide, verfügen wahrscheinlich weniger Zellen über das inhibitorisch wirkende Plasmid. Interessanterweise

zeigt im Unterschied zu den Versuchen mit den exogen zugesetzten siRNAs hier der Vektor mit dem Gen für siRdRP4 die stärkste Virus-Inhibition, gefolgt von pSiR2. Diese scheinbare Diskrepanz läßt sich vermutlich darauf zurüchführen, daß die vier untersuchten shRNAs nicht mit der gleichen Effizienz transkribiert werden. Daher ist die Konzentration an reifen siRNAs in den jeweiligen Zellen wahrscheinlich unterschiedlich.

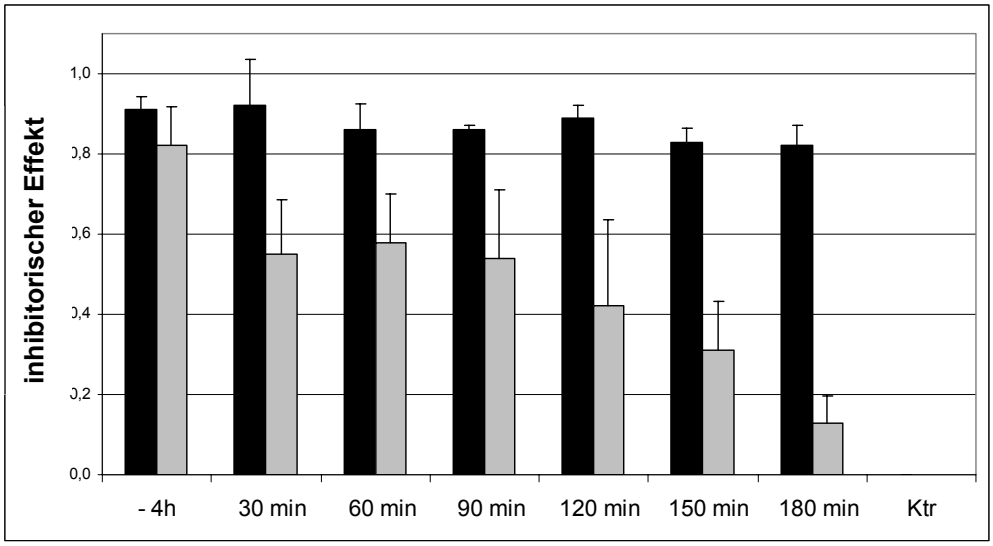


Abb. 4.35: Inhibition einer bereits bestehenden CBV-3 Infektion. 100 nM siRdRP2 wurde zu den angegebenen Zeiten nach der Infektion transfiziert (-4h: Transfektion vier Stunden vor der Infektion). Die Inhibition 20 Stunden (schwarze Balken) bzw. 44 Stunden (graue Balken) nach der Infektion wurde aus einem XTT-Test berechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus einem Experiment mit Vierfach-Bestimmung.

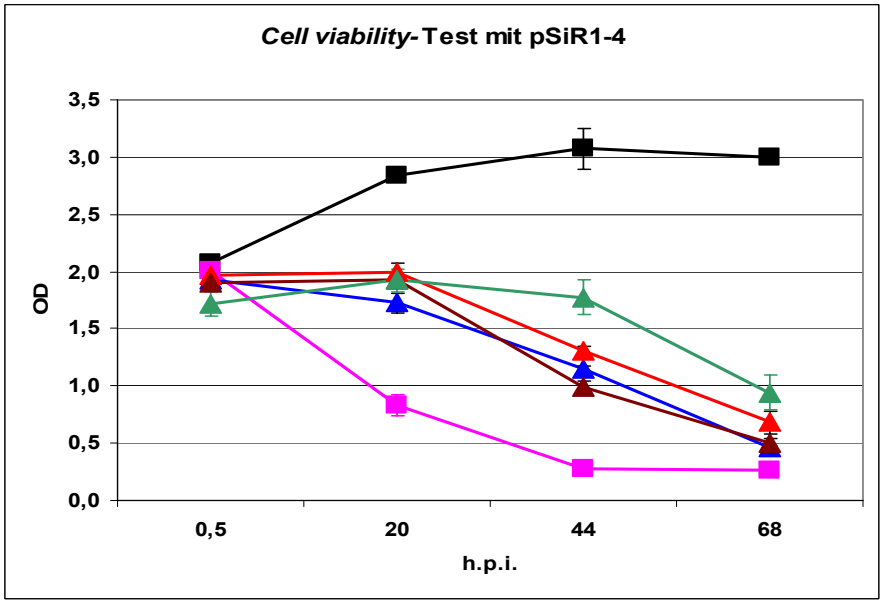


Abb. 4.33: Virostatischer Effekt der vier beschriebenen pSilencer-Plasmide. 0,2 µg des jeweiligen Plasmids wurden 24 Stunden vor der Infektion mit 0,1 MOI CBV-3 transfiziert. Schwarz: Mock-Infektion untransfizierter Zellen. Magenta: Untransfizierte Zellen. Blau: pSiR1; Rot: pSiR2; Braun: pSiR3; Grün: pSiR4. XTT-*Cell Viability* Test über drei Tage. Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Experiment mit Vierfach-Bestimmung.

Die siRNAs, die zunächst in Cotransfektionsexperimenten mit subgenomischen Fragmenten des Virus validiert worden waren, zeigen also auch gegen das vollständige Coxsackievirus eine erhebliche inhibierende Wirkung. Die wirksamste siRNA, siRdRP2, reduzierte den Virustiter im Plaque-Reduktionsassay um eine Größenordnung. Diese siRNA ist sogar in der Lage, den Verlauf einer bereits bestehenden Infektion zu verlangsamen, wenn sie innerhalb weniger Stunden nach der Infektion zugegeben wird. Eine intrazelluläre Expression der entsprechenden shRNAs von pSilencer-Vektoren ist möglich, allerdings vermutlich aufgrund schlechterer Transfektionseffizienzen weniger wirksam.