

# Stoppt den Boten

## Antisense-, DNA Enzym- und RNA Interferenz-Strategien in der Molekularen Medizin

Antisense Technologien können zur Inhibition der Expression eines Gens eingesetzt werden. Im Gegensatz zu niedermolekularen pharmakologischen Substanzen wirken Antisense Agenzien nicht auf der Proteinebene, sondern auf der Ebene der Boten RNA (messenger RNA, mRNA). Sie binden sequenzspezifisch an ihre Ziel-RNA und induzieren über verschiedene Mechanismen deren Degradation, d.h. sie wirken als molekulare Scheren, die eine RNA zerschneiden (Abb. 1). Als Folge kann die mRNA nicht mehr in ein Protein übersetzt werden.

### Antisense Oligonukleotide

Antisense Oligonukleotide, die mit einem „sense“ Molekül einen Doppelstrang bilden, werden seit vielen Jahren in der Forschung für funktionelle Untersuchungen eingesetzt. Sie hybridisieren durch Watson-Crick Basenpaarung an eine Ziel-RNA und induzieren deren Abbau durch zelluläre RNase H, so dass das entsprechende Protein nicht mehr gebildet wird (Abb. 2). Diese Methode hat in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen, da die Sequenzen der rund 35.000 menschlichen Gene durch die großen Genomprojekte bekannt sind, ihre Funktion in vielen Fällen jedoch noch nicht aufgeklärt werden konnte. Die spezifische Inhibition der Expression eines Gens ermöglicht die Untersuchung des resultierenden *loss-of-function* Phänotyps, aus dem Rückschlüsse über die Rolle des Genproduktes gezogen werden können.

Antisense Moleküle lassen sich aber auch medizinisch für therapeutische Anwendungen zur Suppression eines schädlichen Gens einsetzen, etwa bei viralen Infektionen, Tumoren oder Entzündungserkrankungen. Zahlreiche Antisense Oligonukleotide befinden sich derzeit in klinischen Studien, eines ist als Medikament zur Therapie einer viralen Augeninfektion zugelassen [als Übersichtsartikel s. 1].

Im Rahmen eines unserer Projekte haben wir Antisense Oligonukleotide gegen den Vanilloid Rezeptor entwickelt, der durch Hitze, Protonen und Capsaizin – die scharfe Komponente aus Chili-Schoten – aktiviert wird und ein möglicher Ansatzpunkt für neue Schmerzmedika-



Die Arbeitsgruppe von Jens Kurreck am Lehrstuhl von Prof. Dr. Volker A. Erdmann an der FU Berlin. Die Autoren dieses Beitrags in der hinteren Reihe von links: Jens Kurreck, Arnold Grünweller und Steffen Schubert.

mente ist. In Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Christoph und Dr. Clemens Gilen von der Grünenthal GmbH, Aachen, konnte gezeigt werden, dass diese Oligonukleotide die Schmerzempfindlichkeit neuropathischer Ratten herabsetzen. Trotz der genannten Erfolge konnten die Antisense-Ansätze die ursprünglich in sie gesetzten Hoffnungen nicht immer erfüllen. Ursache hierfür sind unter anderem toxische Nebenwirkungen von chemisch modifizierten Nukleotiden, die eingesetzt werden müssen, um die Oligonukleotide gegen Abbau durch Nuklea-

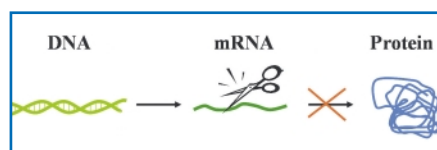


Abb. 1: Antisense Oligonukleotide, Ribozyme, DNA Enzyme und „small interfering RNAs“ wirken als molekulare Scheren, die eine Ziel-RNA zerschneiden. Als Folge kann das zugehörige Protein nicht mehr gebildet werden.

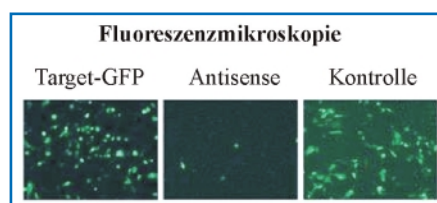


Abb. 2: Nachweis der Inhibition einer Genexpression durch Antisense Oligonukleotide. Im Fluoreszenzmikroskop wird der grüne Phänotyp des Zielproteins sichtbar. Durch Antisense Behandlung wird dessen Bildung unterbunden, ein Kontrolloligonukleotid hat dagegen keinen Effekt.

sen zu schützen. Hinzu kommt die oftmals unzureichende Effizienz. Durch neuartige Nukleotidanaloga konnten jedoch einige dieser Probleme behoben werden. Besonders viel versprechend sind die *Locked Nucleic Acids* (LNA) mit einer sehr stabilen Konformation. Im Tiermodell wurden keine toxischen Nebenwirkungen von LNA beobachtet [2], und in Zellkultur konnten wir zeigen, dass sie wesentlich effizienter als Antisense Oligonukleotide mit anderen Modifikationen sind [3].

### DNA Enzyme

Natürlich vorkommende Ribozyme sind seit den 80er Jahren bekannt. Es sind katalytisch aktive Moleküle aus RNA, die – ebenso wie Antisense Oligonukleotide – durch Basenpaarung an ihre Zielsequenz binden. Im Gegensatz zu diesen sind Ribozyme aber in der Lage, aktiv die Spaltung oder Bildung kovalenter Bindungen zu katalysieren. Das im Labor am häufigsten verwendete RNA-spaltende Ribozym, das „Hammerhead“-Ribozym, ist von natürlich vorkommenden katalytischen Motiven abgeleitet. Hammerhead-Ribozyme gegen unterschiedliche Zielmoleküle sind bereits in klinischen Studien getestet worden.

Durch Methoden der künstlichen Evolution und Selektion wurden auch katalytisch aktive DNA-Oligonukleotide gefunden, die als DNA Enzyme oder DNAzyme bezeichnet werden [4]. Das „10–23“ DNAzym gehört zu den aktivsten bekannten Nukleinsäureenzymen. Es besteht aus einem 15 Nukleotide umfassenden katalytischen Zentrum und zwei Substratbindungsarmen. Das DNA Enzym bindet die komplementäre Ziel-RNA mit hoher Spezifität und katalysiert ihre sequenzspezifische Spaltung (Abb. 3).

Wir haben funktionell wichtige Gruppen im katalytischen Zentrum des „10–23“ DNAzyms identifiziert [5]. Auf der Grundlage dieser Arbeit konnten wir ein Design für das DNAzym etablieren, das chemische Modifikationen in den Bindungsarmen und im katalytischen Zentrum umfasst. Die resultierenden Moleküle haben deutlich verbesserte katalytische Eigenschaften und sind wesentlich stabiler gegenüber nukleolytischem Abbau [6].

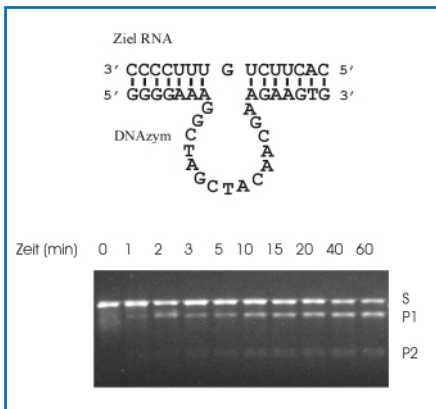


Abb. 3: Struktur des DNA Enzyms (oben) und zeitabhängige Spaltung einer Substrat RNA (S) in zwei Produkte (P1 + P2) (unten)

Andere Gruppen haben im Tiermodell gezeigt, dass DNA Enzyme auch *in vivo* gegen medizinisch bedeutsame Zielmoleküle wirksam sein können [7]. Beispielsweise konnte mit Hilfe von DNAsyzen verhindert werden, dass sich Herzkranzgefäße wieder verengen, nachdem sie mit einem Ballonkatheter aufgeweitet worden waren.

## RNA Interferenz

Die im Jahre 1998 von Andrew Fire und Craig Mello entdeckte RNA Interferenz führte zu einer Revolution auf dem Gebiet des sequenz-spezifischen Knock-downs von mRNA. Es handelt sich um einen endogenen zellulären Mechanismus, bei dem doppelsträngige RNA (dsRNA) komplementäre Sequenzen erkennt und zu einem hocheffizienten Abbau der Ziel-RNA führt. Bisher sind die biologische Funktion und der zugrunde liegende Mechanismus von RNAi nur unvollständig verstanden; vermutlich handelt es sich um einen Mechanismus zur Abwehr von Viren.

Die praktische Bedeutung der RNA-Interferenz als molekulares Werkzeug zur funktionellen Genanalyse oder zur Targetvalidierung für die Entwicklung neuer Medikamente ist in jüngster Zeit immens wichtig geworden. Dabei führte die Entdeckung, dass die kurzen, 21–23meren doppelsträngigen „*small interfering RNAs*“ (siRNAs) die eigentlichen Effektoren der RNAi sind, zum entscheidenden Durchbruch für die Anwendung in Säugerzellen [8, 9], da sie im Gegensatz zu langer dsRNA keine unspezifische Interferonantwort auslösen. Die

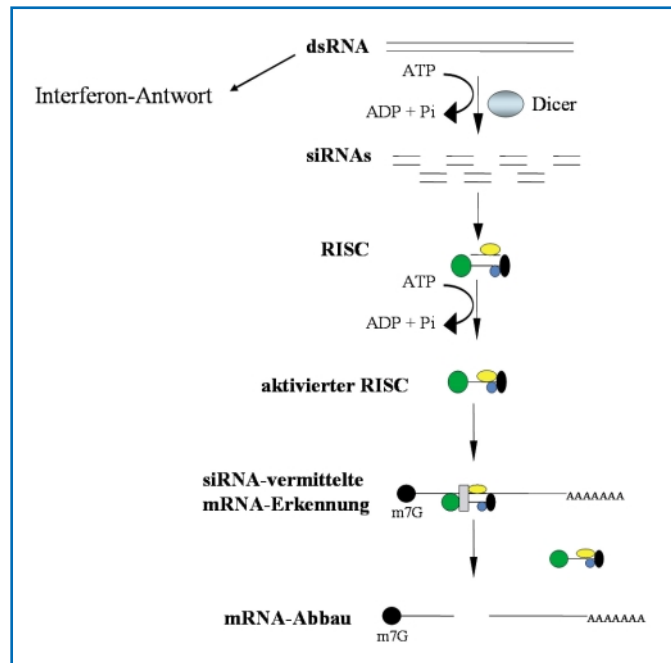


Abb. 4: Mechanismus der RNA Interferenz. Das Enzym Dicer schneidet lange Doppelstrang-RNA in 21–23mere siRNAs, die vom RNA-Induced Silencing Complex (RISC) aufgenommen werden. Dieser wird aktiviert und spaltet die Ziel-RNA, nachdem diese mit Hilfe der siRNA erkannt wurde.

siRNAs werden in den Zellen von einem Proteinkomplex namens RISC (*RNA induced silencing complex*) aufgenommen und führen schließlich zu einer Spaltung der Ziel-RNA (Abb. 4). Wir haben mit siRNAs eine bis zu 1000-fach höhere Effizienz im Vergleich zu traditionellen Phosphorothioat Antisense Oligonukleotiden beobachtet [3], und auch im Tiermodell erwiesen sich die siRNAs als besonders effizient zur Reduktion der Schmerzempfindlichkeit.

Eine der wichtigsten Aufgaben wird es nun sein, die richtigen Ziel-Gene zur Behandlung von Krebs, viralen Infektionen, Stoffwechselerkrankungen oder Störungen im zentralen Nervensystem zu identifizieren und zu validieren. Erste hoffnungsvolle Ergebnisse wurden im vergangenen Jahr im Tiermodell zur Behandlung von Hepatitis [10] und Krebserkrankungen erhalten, so dass bereits erste klinische Studien geplant sind. Dabei bleibt allerdings noch die Frage nach möglichen unspezifischen Effekten und den pharmakologischen Eigenschaften von siRNAs zu klären.

## Ausblick

Antisense Oligonukleotide, Ribozyme, DNA Enzyme und siRNAs besitzen ein enormes Potential für die funktionelle Genomik zur spezifischen Inhibition der Expression eines Gens. Dabei können sich diese Ansätze ergänzen und zur unabhängigen Bestätigung von Ergebnissen genutzt werden. Mittelfristig ist zu hoffen, dass es auch zum Durchbruch bei der Nukleinsäure-basierten Therapie kommen wird und diese Strategien zur

Behandlung von Krebserkrankungen, chronischen Schmerzen und viralen Infektionen eingesetzt werden können.

## Referenzen

- [1] Kurreck J.: Eur. J. Biochem. 270, 1628–1644 (2003)
- [2] Wahlestedt C. *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5633–5638 (2000)
- [3] Grünweller A. *et al.*: Nucleic Acids Res. 31, 3185–3193 (2003)
- [4] Santoro S. W. und Joyce G. F.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4262–4266 (1997)
- [5] Zaborowska Z. *et al.*: J. Biol. Chem. 277, 40617–40622 (2002)
- [6] Schubert S. *et al.*: Nucleic Acids Res. 31, 5982–5992 (2003)
- [7] Khachigian L. M.: Curr. Opin. Mol. Ther. 4, 119–121 (2002)
- [8] Elbashir S. M. *et al.*: Nature 411, 494–498 (2001)
- [9] Lau N. C. und Bartel D. P.: Spektrum der Wissenschaft 10, 52–59 (2003)
- [10] McCaffrey A. P. *et al.*: Nat. Biotech. 21, 639–644 (2003)

Dr. rer. nat. Arnold Grünweller  
tamina@chemie.fu-berlin.de

Steffen Schubert  
mrgreen@chemie.fu-berlin.de

Dr. rer. nat. Jens Kurreck  
jkurreck@chemie.fu-berlin.de

Freie Universität Berlin  
Institut für Chemie (Biochemie)  
Thielallee 63  
14195 Berlin