

## RNA-Interferenz

# Von der Grundlagenforschung zum Medikament

SABINE RÜDEL UND GUNTER MEISTER  
ARBEITSGRUPPE RNA BIOLOGIE, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE,  
MARTINSRIED

**Doppelsträngige RNA hemmt spezifisch die Expression von Genen. Das Phänomen heißt RNA-Interferenz und weckt Hoffnungen im Hinblick auf die Therapie von Krankheiten wie Krebs. Obwohl noch viele Hürden zu nehmen sind, befinden sich erste Medikamente mit kurzer doppelsträngiger RNA bereits in klinischen Testphasen.**

■ RNA-Interferenz (RNAi) wurde zuerst im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und in Pflanzen entdeckt. Dem Fadenwurm können lange doppelsträngige RNA-Moleküle verabreicht werden, für menschliche Zellen hin-

gegen sind solche RNAs toxisch, da sie eine Interferonantwort auslösen. Die zelluläre Nuklease Dicer zerschneidet lange RNA-Doppelstränge in kurze, etwa 21 Nukleotide umfassende Stücke, die *short interfering RNAs*

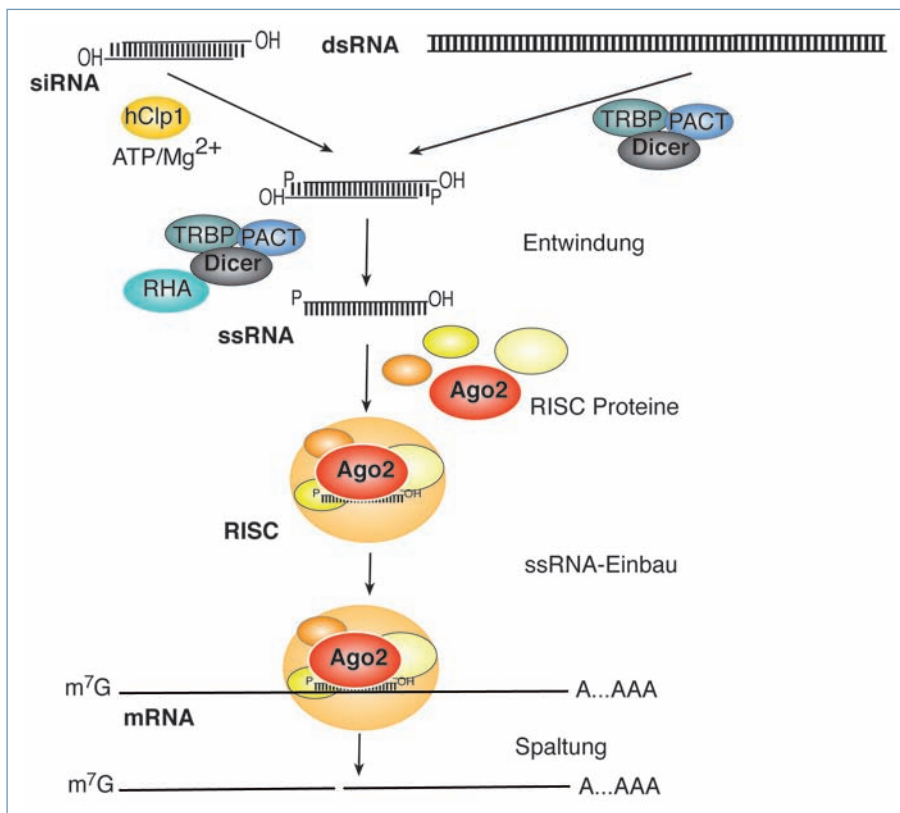
(siRNAs) genannt werden. Da diese ebenfalls doppelsträngigen siRNAs keine Interferonantwort auslösen, können sie in humanen Systemen genutzt werden.

In menschlichen Zellen wurden kürzlich die beiden Proteinen TRBP und PACT identifiziert, die für die Funktion von Dicer wichtig sind. Sowohl TRBP als auch PACT sind strukturell durch Domänen gekennzeichnet, die doppelsträngige RNA binden. Ihre genaue Funktion ist aber noch unklar.

### Wie funktioniert RNA-Interferenz?

SiRNAs sind durch 5'-Phosphate und 3'-Überhänge, die zwei Nukleotide lang sind, charakterisiert<sup>[1]</sup>. Während zelleigene, durch Dicer generierte siRNAs 5'-Phosphate tragen, sind chemisch synthetisierte siRNAs, die zur Transfektion verwendet werden, häufig nicht 5'-phosphoryliert. Kürzlich wurde die zelluläre Kinase Clp1 identifiziert, die transfizierte siRNAs in der Zelle phosphoryliert<sup>[2]</sup>.

Die doppelsträngige siRNA wird in der Zelle entwunden und ein Strang wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut. Der genaue Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Als essenzieller RNAi-Faktor wurde aber kürzlich die RNA-Helikase RHA identifiziert<sup>[3]</sup>. Möglicherweise spielt dieses Protein bei der Entwindung von siRNAs eine wichtige Rolle. Welcher der beiden siRNA-Stränge in RISC eingebaut wird, hängt im Wesentlichen von der thermodynamischen Stabilität der Enden ab. Der Strang, dessen 5'-Ende weniger stark gepaart ist, wird in der Regel bevorzugt in funktionelle RISC-Komplexe inkorporiert<sup>[1]</sup>. Mit Hilfe der eingebauten siRNA erkennt RISC vollständig komplementäre RNAs und spaltet diese dann endonukleolytisch. Die wichtigsten Proteinkomponenten von RISC gehören zur Familie der Argonauten-Proteine. In menschlichen Zellen existieren acht Ago-Proteine, wobei nur Ago1 bis 4 ubiquitär exprimiert werden. Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass Ago2 die Endonuklease von RISC ist, welche die komplementäre RNA sequenzspezifisch spaltet. Dieses Enzym nennt man in Anspielung auf Dicer auch „Slicer“<sup>[4]</sup>.



▲ Schematische Darstellung der Biogenese und der Funktion von siRNAs (m<sup>7</sup>G: 7-Methyl-Guanin, AAAA: Poly-A-Schwanz, ssRNA: einzelsträngige RNA, dsRNA: doppelsträngige RNA, p: Phosphat, OH: Hydroxylgruppe).

## Augentropfen und Salben mit siRNAs

Bei vielen Therapieansätzen ist es schwierig, den Wirkstoff so zu applizieren, dass er den Zielort im Körper erreicht. Das ist auch eins der zentralen Probleme in der medizinischen Anwendung von siRNAs, die zudem noch die Zellmembran der Zielzellen passieren müssen. Biochemische Studien haben gezeigt, dass das 3'-Ende der siRNAs für ihre Funktion nicht essenziell ist. Es kann daher modifiziert werden, ohne die RNAi-Effizienz zu beeinträchtigen. Im Tierversuch mit Mäusen und Primaten gelangten Cholesterolfunktorisierte siRNAs, die intravenös verabreicht wurden, gezielt in Leberzellen. Der Cholesterolfest half den siRNAs, die Zellmembran zu passieren. Die Inaktivierung des Gens ApoB, das für den Cholesterinhaushalt wichtig ist, führte daraufhin zur Reduktion des Cholesterinspiegels im Blut. Weitere bereits erfolgreich getestete Applikationsansätze basieren auf siRNA-Lipid- oder siRNA-Polymer-Komplexen, die mit der Zellmembran fusionieren und die siRNAs somit ins Zellinnere befördern. Auch siRNA-Antikörper-Konjugate scheinen viel versprechend zu sein<sup>[5]</sup>.

Therapieansätze, die auf siRNAs basieren und sich zum Teil bereits in klinischen Testphasen befinden, konzentrieren sich hauptsächlich auf Krankheiten, bei denen sich die siRNAs leicht verabreichen lassen. So inhalieren Patienten mit bestimmten Lungenerkrankungen siRNA-Medikamente; gegen eine Form der Retinadegeneration sollen siRNA-haltige Augentropfen, gegen Hautkrankheiten Salben mit siRNAs helfen (Tabelle)<sup>[5]</sup>.

## Unerwünschte Nebeneffekte

Obwohl es bereits ermutigende Fortschritte in der Therapie mit siRNAs gibt, sind noch einige Schwierigkeiten zu überwinden. Neben der Applikation sind vor allem so genannte off-target-Effekte problematisch bei der Anwendung am Menschen. Solche Effekte bezeichnen die siRNA-bedingte Inaktivierung von RNAs, deren Sequenzen nicht vollständig komplementär zur siRNA sind. Unter bestimmten Umständen reicht eine Komplementarität von 13 Nukleotiden aus, um einen

Krankheit	Molekularer Angriffspunkt (Ziel-RNAs)	RNAi Reagenz	Applikationsform	Ref.
<b>Neurodegenerative Leiden</b>				
Chorea Huntington	Huntingtin	shRNA	Adeno-assoziiierter Virus	5
Alzheimer	BACE 1	siRNA	Lentivirus	5
<b>Virusinfektionen</b>				
Hepatitis B (und C)	Hepatitis B Virus RNA	shRNA	oberflächenbehandelte Nanopartikel	6
HIV	u.a. CCR5	shRNA	Lentivirus	6
<b>Krebserkrankungen</b>				
Leberkrebs	Onkogene	siRNA	oberflächenbehandelte Nanopartikel	6
Hirntumore	EGFR	shRNA	u.a. PILs	5
BACE: $\beta$ -Sekretase; CCR5: HIV Korezeptor CC Chemokinrezeptor 5; EGFR: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; HIV: <i>Human immunodeficiency virus</i> ; PIL: Polyethylenglykol (PEG)-Immunitosomen; shRNA: <i>short hairpin</i> RNA (Vorstufe von siRNA); siRNA: small interfering RNA				

RNAi-Anwendung in der Therapie verschiedener Krankheiten. Übersicht über mögliche molekulare Angriffspunkte, Reagenzien und Verabreichungsformen.

signifikanten RNAi-Effekt zu erzielen. Darüber hinaus können siRNAs bei niedriger Komplementarität wie endogene *microRNAs* (miRNAs) wirken und die Translation von bestimmten RNAs inhibieren, ohne dabei die Menge der RNA zu beeinflussen. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass siRNAs auch auf Gene wirken, die nur partiell komplementäre RNAs liefern. Ein detaillierteres Verständnis der molekularen Mechanismen der RNA-Interferenz sowie eine erhöhte Spezifität von siRNAs werden die Anwendung von siRNAs als Therapeutika verbessern und somit die Entwicklung hochspezifischer Medikamente beschleunigen. ■

## Literatur

- [1] Meister, G. und Tuschl, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343–349.  
 [2] Weitzer, S. und Martinez, J. (2007): The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature* 447: 222–226.  
 [3] Robb, G. B. und Rana, T. M. (2007): RNA Helicase A Interacts with RISC in Human Cells and Functions in RISC Loading. *Mol Cell* 26: 523–537.  
 [4] Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. (2004): Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15: 185–197.

[5] Kim, D. H. und Rossi, J. J. (2007): Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8: 173–184.

[6] Federici, T., Liu, J. K., Teng, Q., Yang, J., Boulis, N. M. (2007): A means for targeting therapeutics to peripheral nervous system neurons with axonal damage. *Neurosurgery* 60: 911–918.

## Korrespondenzadresse:



Sabine Rüdell<sup>1</sup> und Dr. Gunter Meister<sup>2</sup>  
 Arbeitsgruppe RNA Biologie  
 Max-Planck-Institut für Biochemie  
 Am Klopferspitz 18  
 D-82152 Martinsried  
 Tel.: 089-8578-3042  
 Fax: 089-8578-3022  
 ruedel@biochem.mpg.de  
 meister@biochem.mpg.de  
 www.biochem.mpg.de