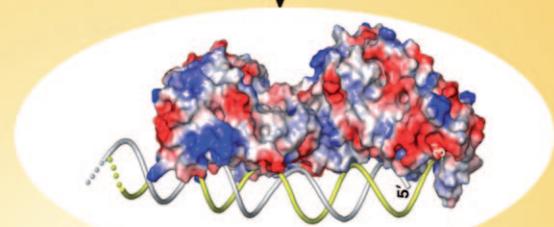
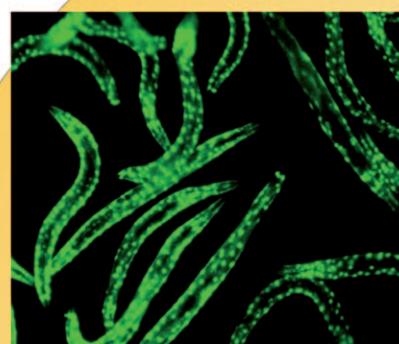


# RNA-Interferenz: von den Grundlagen zur therapeutischen Anwendung

Jens Kurreck\*

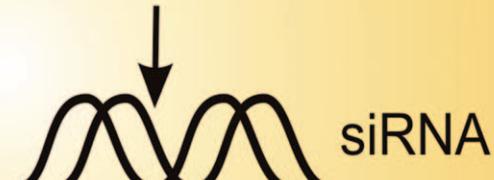
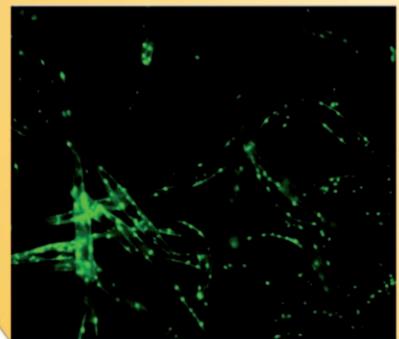
**Stichwörter:**Genexpression · Molekularbiologie ·  
RNA · RNA-Interferenz

Professor Volker A. Erdmann gewidmet



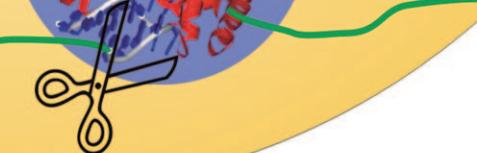
AN  
AUS

↓ Genstumm-schaltung



RISC

mRNA



**Angewandte**  
Chemie

**V**or gerade einmal zehn Jahren konnten Andrew Fire und Craig Mello zeigen, dass doppelsträngige RNA-Moleküle in Eukaryoten die Expression homologer Gene posttranskriptionell inhibieren können. Dieser als RNA-Interferenz bezeichnete Prozess hat sich mittlerweile zu einer Standardmethode der Molekularbiologie entwickelt. Der vorliegende Aufsatz gibt einen Überblick über die zugrunde liegenden zellulären Vorgänge mit besonderem Fokus auf die posttranskriptionelle Inhibition der Genexpression in Säugerzellen, die Anwendungsmöglichkeiten in der Forschung und die ersten Ergebnisse der bereits laufenden klinischen Studien.

## 1. Einführung

Als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet man einen zellulären Vorgang, bei dem doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) die Expression eines Gens sequenzspezifisch inhibieren. Dieser sehr effiziente Prozess der posttranskriptionellen Genstummschaltung (Post Transcriptional Gene Silencing, PTGS), an dem neben der RNA zahlreiche zelluläre Proteine beteiligt sind, ist in Eukaryoten evolutionär stark konserviert und dient vermutlich als Schutzmechanismus gegen Viren und genetische Instabilität durch mobile genetische Elemente wie Transposons. Er wurde ursprünglich in Pflanzen beobachtet,<sup>[1]</sup> aber erstmalig Ende der 1990er Jahre für den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* korrekt beschrieben.<sup>[2]</sup> Für diese Leistung wurden Andrew Fire und Craig Mello 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin oder Physiologie geehrt.<sup>[3,4]</sup> Gemessen an der Zahl der veröffentlichten Arbeiten gehört RNAi gemeinsam mit der Proteomik zu den dynamischsten Feldern der modernen Biotechnologie.<sup>[5]</sup>

### 1.1. Der Mechanismus der RNA-Interferenz

In ihrer Schlüsselpublikation hatten Fire und Mello eine lange doppelsträngige RNA in Fadenwürmer eingebracht und beobachtet, dass dadurch die Expression des homologen Gens blockiert wurde.<sup>[2]</sup> Mittlerweile ist es gelungen, den zugrunde liegenden Prozess detailliert aufzuklären: In einem ersten Schritt wird die lange dsRNA von der Endonuclease Dicer in kurze RNA-Moleküle prozessiert, die als kleine oder kurze interferierende RNA (small or short interfering RNA, siRNA) bezeichnet werden und etwa 21 Nucleotide lang sind, wobei 19 Nucleotide eine Helix bilden und jeweils zwei Nucleotide an den 3'-Enden überhängen (Abbildung 1A). Der eigentliche Effektor der RNAi ist der Ribonucleoproteinkomplex RISC (RNA-Induced Silencing Complex), den die siRNA zur komplementären Ziel-RNA führt. In der Folge wird die Ziel-RNA an einer spezifischen Stelle im Zentrum des Duplex, zehn Nucleotide vom 5'-Ende des siRNA-Stranges entfernt, gespalten.<sup>[6]</sup> Als katalytische Komponente, die die Ziel-RNA spaltet (Slicer-Aktivität), wurde ein als Argonaut 2 (Ago2) bezeichnetes Protein identifiziert.<sup>[7]</sup> Eine Kristallstrukturanalyse von Ago2 hat ergeben, dass das Protein eine Domäne enthält, die der RNase H

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einführung</b>	1405
<b>2. Design und Stabilisierung von siRNAs</b>	1408
<b>3. Vektorexpression von shRNAs</b>	1411
<b>4. Unspezifische Nebeneffekte</b>	1412
<b>5. Transportsysteme (Delivery)</b>	1414
<b>6. Anwendungen der RNA-Interferenz</b>	1418
<b>7. Zusammenfassung und Ausblick</b>	1422

ähnelt,<sup>[8]</sup> einem schon lange bekannten Protein, das die RNA-Komponente eines DNA/RNA-Duplex spaltet. Nach der Spaltung fehlen der Ziel-RNA die Elemente, die typischerweise mRNAs stabilisieren – die Cap-Struktur am 5'-Ende und der Poly-A-Schwanz am 3'-Ende –, sodass die gespaltene mRNA von RNasen abgebaut wird und das darin kodierte Protein nicht mehr synthetisiert werden kann.

Es wird davon ausgegangen, dass die Beladung von RISC mit der siRNA durch den RISC-Loading Complex (RLC) erfolgt, der in *Drosophila melanogaster* aus Dicer-2 und R2D2 sowie in Säugern aus Dicer und dem TAR-RNA-Bindeprotein (TRBP) besteht. Weiterhin wurde gezeigt, dass bei der Aktivierung von RISC einer der beiden siRNA-Stränge, der als Passenger- (oder auch Sense-)Strang bezeichnet wird, gespalten wird, während der andere Strang, der Guide- (oder Antisense-)Strang, im RISC verbleibt.<sup>[10,11]</sup> Neuere Untersuchungen mit rekonstituiertem humanem RLC ergaben, dass beladenes Ago2 vom Rest des Komplexes dissoziiert.<sup>[12]</sup>

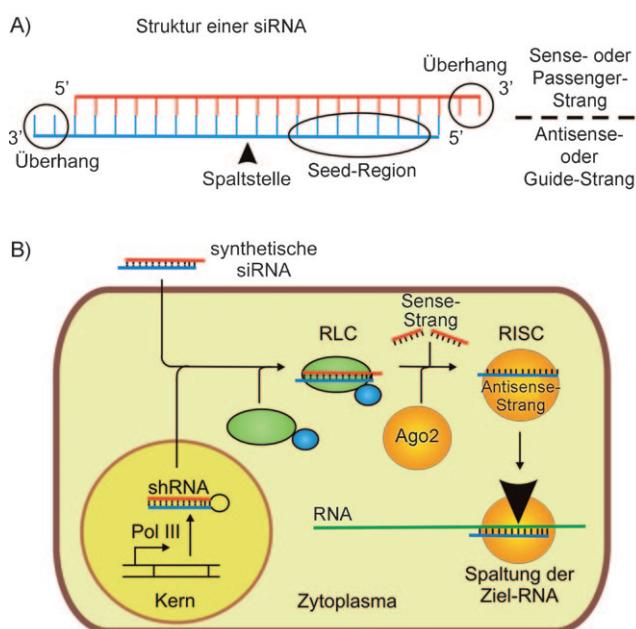
### 1.2. RNA-Interferenz in Säugerzellen

#### 1.2.1. siRNAs zur gezielten Inhibition der Genexpression

Die Technik, Gene spezifisch durch dsRNAs auszuschalten, ließ sich zunächst bei zahlreichen Eukaryoten wie Pflanzen, *C. elegans* oder *D. melanogaster* anwenden, konnte jedoch nicht bei Säugern eingesetzt werden, da lange dsRNAs bei diesen eine unspezifische Interferon(INF)-Antwort auslösen. Die dsRNA wird von den Zellen als pathogen interpretiert, und es kommt zur Aktivierung der Proteinkinase R, die die Proteinsynthese in den betroffenen Zellen beendet;<sup>[13]</sup>

[\*] Prof. Dr. J. Kurreck

Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart  
Allmandring 31, 70569 Stuttgart (Deutschland)  
Fax: (+49) 711-685 66973  
E-Mail: jens.kurreck@iig.uni-stuttgart.de  
Homepage: <http://www.uni-stuttgart.de/iig/institut/staff/kurreck/index.html>



**Abbildung 1.** A) Struktur einer siRNA. Die beiden Stränge der siRNA bilden einen etwa 19 Nucleotide langen Duplex. Jeweils zwei Nucleotide hängen an den 3'-Enden über. Bei chemisch synthetisierten siRNAs werden hier häufig Desoxythymidine verwendet. Die Position, an der die komplementäre Ziel-RNA gespalten wird, ist durch den Pfeil markiert, und die Seed-Region, über die die Wechselwirkung mit der Ziel-RNA beginnt, ist gekennzeichnet. B) Vereinfachtes Modell des RNAi-Mechanismus in Säugerzellen. Nach der Aufnahme der synthetisierten siRNAs in die Zelle werden diese vom RLC in den RISC eingebaut, wobei der Sense-Strang entfernt wird. Der Antisense-Strang führt RISC dann zur komplementären Ziel-RNA, die vom Ago2-Protein gespalten wird. Eine längerfristige Inhibition der Genexpression kann erreicht werden, indem statt der exogenen Applikation einer siRNA eine shRNA intrazellulär exprimiert wird. (Abbildung verändert nach Lit. [9].)

weiterhin werden Enzyme induziert, die 2'-5'-verknüpfte Oligoadenylate produzieren und damit einen RNase-L-vermittelten, unspezifischen Abbau einzelsträngiger RNA bewirken.<sup>[14]</sup>

Da die INF-Antwort nur von dsRNAs ausgelöst wird, die länger als 30 Nucleotide sind,<sup>[15]</sup> zeigte die Erkenntnis, dass RNAi durch etwa 21 Nucleotide lange RNAs vermittelt wird,<sup>[6,16]</sup> den Weg zur Lösung dieses Problems auf: Mit ihrer bahnbrechenden Arbeit, dass chemisch synthetisierte, 21-nukleotidige siRNAs in Säugerzellen eine spezifische RNAi auslösen können, eröffneten Thomas Tuschl und seine Mitarbeiter die



Jens Kurreck studierte Biochemie und Philosophie an der Freien Universität (FU) Berlin und promovierte 1998 an der Technischen Universität Berlin. Nach einem Aufenthalt an der Arizona State University ging er an die FU Berlin, wo er sich 2006 habilitierte. Seit 2007 ist er Professor für Nukleinsäuretechnik an der Universität Stuttgart. Er beschäftigt sich mit der Anwendung der RNA-Interferenz für medizinisch relevante Themen (insbesondere Virologie und Schmerzforschung).

Möglichkeit, RNAi auch für Experimente in Säugerzellen einzusetzen.<sup>[17]</sup> Damit wurden nicht nur neue Möglichkeiten für die Forschung, sondern auch neue therapeutische Optionen geschaffen. Die prä-synthetisierte siRNA wird in der Zelle am 5'-Ende von der Kinase Clp1 phosphoryliert<sup>[18]</sup> und tritt dann in den zuvor beschriebenen RNAi-Weg ein (Abbildung 1 B).

Die RNAi erweitert das Repertoire der bereits länger bekannten Oligonucleotid-basierten Strategien des PTGS. Seit rund 30 Jahren werden Antisense-Oligonucleotide eingesetzt, um die Expression von Genen auf der mRNA-Ebene zu inhibieren. Antisense- und RNAi-Strategien haben zahlreiche Gemeinsamkeiten wie etwa die Notwendigkeit, geeignete Bindungssequenzen an der Ziel-RNA zu identifizieren, die Stabilisierung der Oligonucleotide durch chemische Modifikationen oder den Transport der negativ geladenen Polymere über die Zellmembran. Durch die Erfahrungen im Antisense-Bereich konnten mit der neuen RNAi-Strategie sehr schnell große Fortschritte erzielt werden.<sup>[19]</sup> Allerdings gibt es zwischen beiden Techniken auch bedeutende Unterschiede: Antisense-Oligonucleotide sind einzelsträngige (modifizierte) DNA-Moleküle, die vor allem im Zellkern über Aktivierung der RNase H eine Spaltung der Ziel-RNA hervorrufen. Dagegen wird RNAi durch doppelsträngige RNA ausgelöst, die primär im Zytosol wirkt. Ago2, die wichtigste Komponente des RISC, wurde in den p-bodies lokalisiert,<sup>[20]</sup> zentrale Schritte der RNAi scheinen also in diesen diskreten Strukturen des Zytosplasmas stattzufinden. Bei der RNAi wird ein endogener zelleigener Weg genutzt, der die hohe Effizienz erklären könnte, mit der siRNAs die Expression der Zielgene inhibieren. Sie können bis zu 1000-mal effizienter als traditionelle Antisense-Oligonucleotide gegen dasselbe Zielmolekül wirken.<sup>[21,22]</sup> Während bei den normalerweise 15–20 Nucleotide langen Antisense-Oligonucleotiden keine besonders wichtigen Bereiche ausgemacht werden konnten, ist bei siRNAs die Seed-Region (Positionen 2–8 des Antisense-Stranges, Abbildung 1A) von großer Bedeutung, da hier vermutlich die Wechselwirkung mit der Ziel-RNA beginnt.

Die Wirkung von siRNAs ist transient. Der Abbau der Ziel-RNA beginnt gewöhnlich unmittelbar, nachdem die siRNA in die Zelle eingedrungen ist, doch hängt die Verringerung der Proteinkonzentration von der Halbwertszeit des Zielproteins ab. Normalerweise lässt sich in Zellkultur 48 Stunden nach der Transfektion einer siRNA ein deutlicher inhibitorischer Effekt auf Proteinebene nachweisen, doch gibt es Proteine mit einer sehr langsamen Umsatzgeschwindigkeit, die noch wesentlich länger stabil sein können. Auch sollte bedacht werden, dass das Zielgen in der Regel durch RNAi nicht vollständig ausgeschaltet wird, weshalb man von einer Knockdown-Technik in Abgrenzung zum Knockout bei der Erzeugung transgener Tiere durch homologe Rekombination spricht.

Die Inhibition der Expression des Zielgens hält gewöhnlich sowohl *in vitro*<sup>[23]</sup> als auch *in vivo*<sup>[24]</sup> rund fünf bis sieben Tage lang an. Interessanterweise kann eine siRNA aber in verschiedenen Tierarten unterschiedlich lange wirken: So war eine siRNA gegen das Apolipoprotein B in Mäusen nur einige Tage aktiv, und nach neun Tagen erreichte die Ex-

pression bereits wieder rund 70 % des Ausgangsniveaus, wohingegen der Knockdown in nichthumanen Primaten auch nach elf Tagen noch anhielt.<sup>[25]</sup> Die Wirkdauer einer siRNA hängt also vermutlich von zahlreichen Faktoren wie dem Zielorgan, dem Zielgen und der Spezies ab. Um die Genstummschaltung zu verlängern, können statt der chemisch synthetisierten siRNA auch intrazellulär exprimierte, kurze Haarnadel-RNAs (short hairpin RNAs, shRNAs) verwendet werden (siehe Abbildung 1B und Abschnitt 3).

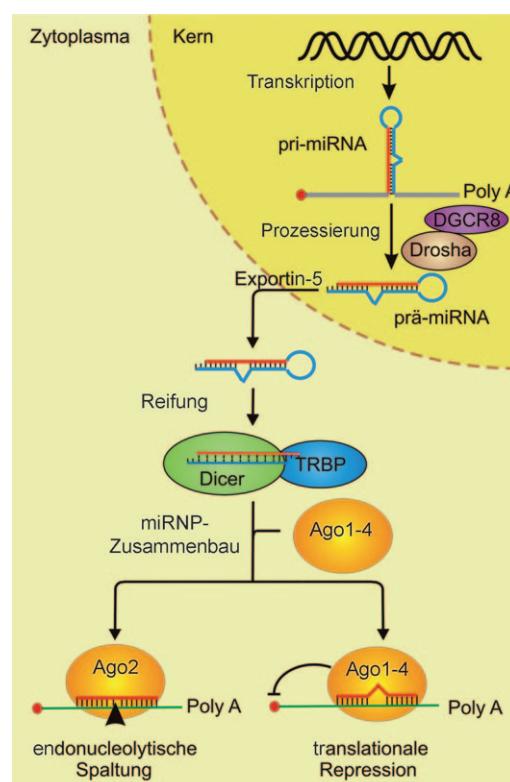
RNAi ist primär ein Prozess des PTGS, d.h., dass die Genexpression durch selektive Blockade einer mRNA inhibiert wird. Es wurde jedoch auch beschrieben, dass RNAi im Kern die Chromatinstruktur und damit die Transkription beeinflussen kann.<sup>[26]</sup> Dies wurde insbesondere für Hefen, Pflanzen und Fliegen beobachtet. Die Bedeutung der RNAi für die transkriptionelle Genstummschaltung in Säugern ist dagegen bislang noch nicht eindeutig geklärt.

### 1.2.2. Endogene kurze RNAs: miRNAs, piRNAs und esiRNAs

Außer den zuvor beschriebenen siRNAs, die als Forschungswerzeuge und potenzielle Therapeutika zur künstlichen Regulation der Genexpression eingesetzt werden können, finden auch zelleigene kurze RNAs immer mehr Interesse, die keine Proteine kodieren. Sehr intensiv wurde in den vergangenen Jahren die Rolle der etwa 21 Nucleotide langen Mikro-RNAs (miRNAs) als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression untersucht.<sup>[27]</sup> In Version 11.0 der miRBase-Datenbank (<http://microrna.sanger.ac.uk>) vom April 2008 sind über 6000 miRNAs aus Tieren, Pflanzen und Viren verzeichnet; allein für den Menschen wurden über 1000 miRNAs vorhergesagt.

Im Zellkern werden miRNA-Vorstufenmoleküle (pri-miRNAs) von speziellen miRNA-Genen oder als Introns proteinkodierender Polymerase-II-Transkripte gebildet. Sie werden von der RNase III Drosha zu etwa 70 Nucleotide langen prä-miRNAs (engl. pre-miRNAs) prozessiert, die von Exportin-5 aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert und dort von Dicer zur reifen miRNA geschnitten werden (Abbildung 2). Wie die siRNAs auch bilden sie mit Argonautenproteinen einen Ribonucleoproteinkomplex, der an seine Ziel-RNA bindet. Allerdings erkennen miRNAs bevorzugt Zielsequenzen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR), und außerdem erfolgt die Bindung oftmals über unvollständige Homologie, wobei eine perfekte Basenpaarung in der bereits erwähnten Seed-Region (Positionen 2–8 der miRNA) Ausgangspunkt der Wechselwirkung ist. Je nach Grad der Homologie zwischen miRNA und mRNA kann es entweder zu einer irreversiblen Spaltung des Zielmoleküls oder lediglich zu einer Repression der Translation kommen.

Der genaue Mechanismus der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Repression der Genexpression ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen.<sup>[27]</sup> Nach den beiden wichtigsten Modellen wird entweder die Translation blockiert oder die mRNA destabilisiert. Die Inhibition der Translation kann bereits beim Schritt der Initiation stattfinden. Dabei wird davon ausgegangen, dass der Ago2/miRNA-Komplex nach Bindung an die 3'-UTR einer mRNA mit der Cap-Struktur am 5'-Ende wechselwirkt und somit die Bin-



**Abbildung 2.** miRNA-Weg in Säugerzellen. miRNAs werden im Kern in Form einer Vorstufe (pri-miRNA) transkribiert, die von der RNase III Drosha zur prä-miRNA prozessiert wird. Dabei bildet Drosha einen Komplex mit dem DGC8-Protein. Die prä-miRNA wird von Exportin-5 aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert und dort von Dicer (im Komplex mit TRBP) zur reifen miRNA gespalten, die sich mit einem Argonautenprotein (Ago) zum miRNA-Ribonucleoprotein (miRNP)-Komplex zusammenlagert. Die miRNA kann entweder über Ago2 eine endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA bewirken oder bei partieller Komplementarität die Translation blockieren. (Abbildung verändert nach Lit. [27].)

dung des Initiationsfaktors eIF4E verhindert. Dadurch kann sich der Initiationskomplex der Translation nicht zusammensetzen. Allerdings könnte die Translation auch erst nach der Initiation verlangsamt oder ein vorzeitiges Abfallen der Ribosomen bewirkt werden. Nach dem alternativen Modell wird die mRNA durch die miRNA desadenyliert, wodurch ein 3'→5'-Abbau ermöglicht wird, oder die Cap-Struktur wird entfernt, was einen Abbau durch Exonucleasen in 5'→3'-Richtung möglich macht. Möglicherweise gibt es auch mehrere Mechanismen, nach denen miRNAs wirken können.

Für Säuger wird angenommen, dass miRNAs die Aktivität von etwa 30 % aller proteinkodierenden Gene kontrollieren. Da jede miRNA zahlreiche mRNAs reguliert und umgekehrt mRNAs von mehreren miRNAs beeinflusst werden können, ergibt sich ein äußerst komplexes regulatorisches Netzwerk. So ist es wenig erstaunlich, dass miRNAs in alle bislang untersuchten zellulären Prozesse involviert sind und bei zahlreichen Erkrankungen wie Krebs,<sup>[28]</sup> Virusinfektionen<sup>[29,30]</sup> oder Erbkrankheiten<sup>[30]</sup> eine wichtige Rolle spielen. Für weitere Informationen über die Wirkweise und Funktion von miRNAs sei auf kürzlich erschienene Übersichtsartikel verwiesen.<sup>[27,31]</sup>

Eine weitere Klasse kurzer regulatorischer RNAs ist mit Piwi-Proteinen assoziiert und wird daher als piRNAs bezeichnet.<sup>[32]</sup> Diese RNAs sind mit etwa 24–30 Nucleotiden etwas länger als typische siRNAs oder miRNAs. Sie werden vermutlich aus einzelsträngigen Vorstufen prozessiert und kommen vornehmlich in Keimzellen vor. Neben ihrer Bedeutung bei der Kontrolle mobiler genetischer Elemente haben sie möglicherweise auch eine Funktion bei der Spermatogenese.

Erst kürzlich wurden durch umfassende Sequenzierungen kurzer RNAs in Sägerzellen (Mausoocyten) endogene siRNAs (esiRNAs) gefunden.<sup>[33,34]</sup> Zuvor ging man davon aus, dass für die Produktion von esiRNAs eine RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität benötigt wird, die in Säugern nicht auftritt. Nun hat sich allerdings gezeigt, dass auch andere doppelsträngige RNAs wie etwa lange Haarnadelstrukturen oder komplementäre Sequenzen als Ausgangspunkt für die Produktion von esiRNAs dienen können. Die esiRNAs stammen von Retrotransposons ab und haben offensichtlich die Aufgabe, diese zu inhibieren. Daneben wurden aber auch esiRNAs von Pseudogenen gefunden, die eine Bedeutung bei der Regulation proteinkodierender Transkripte haben könnten.

## 2. Design und Stabilisierung von siRNAs

### 2.1. Design von siRNAs

Der erste wichtige Schritt für erfolgreiche Anwendungen der RNAi ist das Design effizienter siRNAs. Die ursprüngliche Annahme, dass es für RNAi-Anwendungen nicht notwendig sei, geeignete Zielsequenzen in der Ziel-RNA zu identifizieren,<sup>[35]</sup> hat sich als zu optimistisch erwiesen. In der Tat variiert die Effizienz verschiedener siRNAs gegen dieselbe Ziel-RNA drastisch.<sup>[36]</sup> Offensichtlich spielen also intrinsische Faktoren der siRNA selbst oder Eigenschaften der Ziel-RNA bei der Stummschaltung eine Rolle.<sup>[37]</sup>

Die Wahrscheinlichkeit, sehr effiziente siRNAs zu identifizieren, konnte deutlich erhöht werden, nachdem entdeckt wurde, dass die beiden Stränge einer siRNA oder miRNA nicht gleichberechtigt in RISC eingebaut werden. Vielmehr wird der Strang bevorzugt, der eine geringere thermodynamische Stabilität, d.h. einen höheren A/T-Gehalt, an seinem 5'-Ende aufweist.<sup>[38,39]</sup> Die molekulare Basis für diese Strangasymmetrie konnte in der Folge aufgeklärt werden:<sup>[40]</sup> In *D. melanogaster* wird RISC von einem Heterodimer, bestehend aus Dicer-2 und dem dsRNA bindenden Protein R2D2, beladen. Hierbei bindet R2D2 an das thermodynamisch stabilere Ende der doppelsträngigen RNA und bestimmt damit, welcher Strang als Guide-Strang mit RISC assoziiert wird. In einer vertiefenden Studie mit 180 siRNAs gegen zwei verschiedene Ziel-RNAs wurden neben der relativen Stabilität der beiden Enden zusätzliche Kriterien (Präferenzen spezieller Basen in bestimmten Positionen) identifiziert, die funktionelle siRNAs auszeichnen.<sup>[41]</sup>

In diesen Ansätzen wird die Bedeutung der einzelnen Parameter jedoch nur unabhängig voneinander erfasst. Um auch synergistische Einflüsse mehrerer miteinander ver-

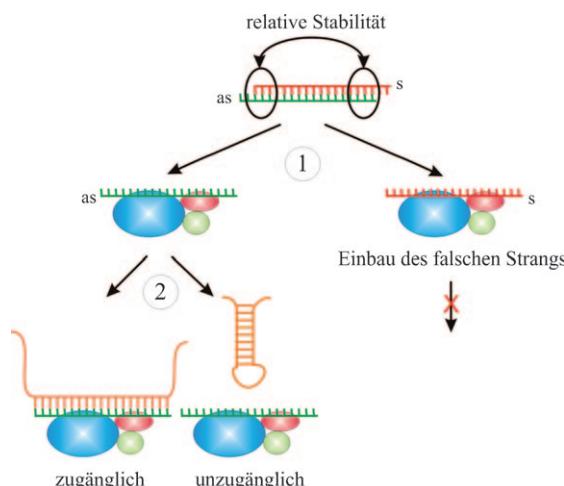
knüpfter Parameter zu berücksichtigen, wurde ein artificielles neuronales Netzwerk mit einem Datensatz von über 2000 siRNAs gegen 34 verschiedene mRNAs trainiert (BIO-PREDsi-Algorithmus).<sup>[42]</sup>

Allerdings zeigt sich bei einer umfassenden Betrachtung der Aktivität von publizierten siRNAs, dass es eine Reihe sehr aktiver siRNAs gibt, die den vorgeschlagenen Kriterien nicht entsprechen, während andererseits auch zahlreiche sorgfältig konzipierte siRNAs inaktiv sind. Kürzlich wurde die These, dass die relative Stabilität der beiden Enden einer siRNA einen Einfluss auf ihre Effizienz hat, sogar grundsätzlich in Zweifel gezogen.<sup>[43]</sup> Weder in einem experimentell untersuchten Satz verschiedener siRNAs noch bei einer umfassenden Analyse publizierter oder in Datenbanken erfasster siRNAs wurde eine Korrelation zwischen den terminalen Stabilitäten der siRNA und ihrer Stummschaltungsaktivität gefunden. Möglicherweise spielen also andere Eigenschaften der siRNA eine Rolle. So wurde gezeigt, dass siRNAs, deren Antisense-Stränge stabile Helices an den Enden bilden, nur eine geringe Aktivität aufweisen.<sup>[44]</sup> Die Autoren raten daher, siRNAs so zu gestalten, dass der Antisense-Strang möglichst unstrukturiert ist.

Außer der siRNA selbst könnte jedoch auch die Ziel-RNA eine wichtige Rolle bei der Stummschaltung spielen. Damit ließe sich erklären, warum sich die Expression einiger Zielgene leicht inhibieren lässt, während der Knockdown anderer Gene schwierig ist. In einer Studie mit mehreren tausend siRNAs, die nach dem BIOPREDsi-Algorithmus für unterschiedliche Gene konzipiert wurden, konnten 70% der untersuchten Kinasegenen leicht stumm geschaltet werden (zwei von zwei getesteten siRNAs erfolgreich), wohingegen sich 6% der Gene auch mit bis zu zehn siRNAs nicht herunterregulieren ließen.<sup>[45]</sup>

Bereits von Studien mit Antisense-Oligonucleotiden war bekannt, dass die Zugänglichkeit der Bindungsregionen auf der Ziel-RNA für Oligonucleotide von großer Bedeutung für die Effizienz der Stummschaltung ist. In der Tat hat sich ein Zusammenhang zwischen der Zugänglichkeit für Antisense-Oligonucleotide und siRNAs gezeigt.<sup>[46]</sup> In einer umfassenden Analyse wurde die Zugänglichkeit von Ziel-RNAs durch einen iterativen bioinformatischen Ansatz und experimentelle RNase-H-Kartierung vorausgesagt.<sup>[47]</sup> Dabei wirkten siRNAs gegen vorausgesagte, gut zugängliche Regionen effizienter als solche, deren Zielsequenz unzugänglich ist. Die relative thermodynamische Stabilität der beiden Enden der siRNA erwies sich dagegen nicht als geeignetes Kriterium für die Vorhersage der Effizienz einer siRNA.

Wir haben den Einfluss, den das thermodynamische Design der siRNA und die Zugänglichkeit der Ziel-RNA auf die Stummschaltung haben, mithilfe von künstlichen Zielstrukturen näher analysiert.<sup>[48]</sup> In Reporterassays konnten wir zunächst die Strangasymmetrie klar bestätigen, d.h., dass die Zielsequenz in der natürlichen Orientierung zu einer stärkeren Stummschaltung führt als die reverse Anordnung. Andererseits ergab sich auch eine klare Korrelation zwischen der lokalen freien Energie der siRNA-Bindungsregion und der Stummschaltung. Wir haben daher ein Zweistufenmodell zur Beschreibung der inhibitorischen Effizienz von siRNAs vorgeschlagen (Abbildung 3): Zunächst bestimmen hiernach die



**Abbildung 3.** Zweistufenmodell zur Erklärung der Effizienz einer siRNA (s: Sense-Strang, as: Antisense-Strang): 1) Abhängig von der relativen Stabilität der beiden Enden einer siRNA wird einer der beiden Stränge bevorzugt beim Zusammenbau in RISC eingebaut. Durch die Auswahl einer geeigneten Sequenz kann erreicht werden, dass der zur Ziel-RNA komplementäre Strang im RISC verbleibt. 2) Allerdings kann auch ein in RISC eingebauter Antisense-Strang zur Stummschaltung ungeeignet sein, wenn die komplementären Nucleotide der Ziel-RNA nicht zugänglich sind. Die lokale Struktur der Zielregion beeinflusst daher die Stummschaltung ebenfalls maßgeblich. (Abbildung verändert nach Lit. [48] mit Genehmigung von Elsevier.)

thermodynamischen Eigenschaften der siRNA – also die relative Stabilität der beiden Enden – den asymmetrischen Einbau der beiden Stränge in RISC. In einer zweiten Stufe wirkt sich dann jedoch die Zugänglichkeit der Bindungsregion für die siRNA in der Ziel-RNA stark auf die Stummschaltung aus. Dieses Modell wurde in einer umfassenderen Analyse mit rund 200 siRNAs und shRNAs gegen über 100 verschiedene humane Gene bestätigt.<sup>[49]</sup> Nach dieser Studie ist die Zugänglichkeit der Ziel-RNA für die siRNA sogar von größerer Bedeutung für effizienten Knockdown als die Duplexasymmetrie. In einer weiteren Arbeit zeigte sich, dass besonders die Zugänglichkeit des 3'-Endes der siRNA-Bindungsregion wichtig ist.<sup>[50]</sup> Wie bereits in Abschnitt 1 beschrieben, beginnt in diesem als Seed-Region bezeichneten Bereich die Wechselwirkung zwischen der siRNA oder miRNA und der Ziel-RNA.

Einige Algorithmen zum Design von siRNAs, wie der Sfold web server,<sup>[51]</sup> berücksichtigen sowohl die thermodynamischen Eigenschaften des Duplex als auch die vorhergesagte Sekundärstruktur der Ziel-RNA. Es muss allerdings betont werden, dass keines der bislang vorgeschlagenen Modelle die Aktivität einer siRNA garantiert korrekt voraussagt. Es müssen daher noch weitere Faktoren, insbesondere auch synergistische Effekte, identifiziert werden, die die Effizienz von RNAi-Ansätzen beeinflussen.

Konventionelle siRNAs bestehen aus einem 19-meren Duplex und zwei Nucleotide langen Überhängen an beiden 3'-Enden. Es ist allerdings berichtet worden, dass längere siRNAs effizienter sein können. In einer Untersuchung mit siRNAs verschiedener Länge hatten 27-mere eine bis zu 100fach höhere Effizienz als die konventionellen 21-mere.<sup>[52]</sup>

In einer weiteren Arbeit erwiesen sich 29-merne shRNAs als besonders potent.<sup>[53]</sup> Die längeren Duplexe werden zunächst vom Dicer-Protein zu 21-meren prozessiert und werden daher vermutlich effizienter über den RLC in RISC eingebaut.

Das Problem des Designs individueller siRNAs kann durch die Verwendung enzymatisch hergestellter siRNA-Pools umgangen werden.<sup>[54]</sup> Hierbei werden zunächst lange dsRNAs generiert, die dann mit bakteriell hergestellter RNase III oder rekombinantem Dicer zu Endoribonuclease-präparierten siRNAs (endoribonuclease-prepared siRNAs) prozessiert werden. Das Gemisch an siRNAs könnte das Risiko verstärkter Off-Target-Effekte bergen (siehe Abschnitt 4); allerdings ist jede einzelne siRNA in nur sehr geringer Konzentration vorhanden, sodass die unerwünschten Nebeneffekte offensichtlich ausverdünnt werden. Mit dieser Methode konnten kostengünstig umfassende Bibliotheken von Endoribonuclease-präparierten siRNAs gegen das humane und das murine Genom hergestellt werden.

## 2.2. Chemische Modifizierung von siRNAs

Zwar können auch unmodifizierte siRNAs in Zellkultur eingesetzt werden, um die Expression eines Gens spezifisch zu inhibieren, es kann jedoch vorteilhaft sein, modifizierte Nucleotide in die siRNA einzubauen. Der Hauptgrund für die chemische Modifizierung von siRNAs ist die Erhöhung ihrer Resistenz gegen nucleolytischen Abbau. Zwar haben siRNAs eine unerwartet lange Lebensdauer, doch ist es für In-vivo-Anwendungen gewöhnlich notwendig, sie durch den Einbau modifizierter Nucleotide weiter zu stabilisieren. Außerdem kann versucht werden, durch Modifikationen die Halbwertszeit der siRNA in der Blutzirkulation zu verlängern und die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern. Weiterhin können neue Funktionalitäten eingeführt werden, beispielsweise in Form von Fluoreszenzmarkern oder lipophilen Gruppen, die die Zellgängigkeit verbessern. Beim Einbau chemisch veränderter Bausteine kann auf die Erfahrungen im Bereich der Antisense-Techniken zurückgegriffen werden. Eine Vielzahl modifizierter Nucleotide wurde in den vergangenen Jahren für siRNAs eingesetzt, von denen hier einige ausgewählte Beispiele erläutert werden sollen. Weitere Details sind in umfassenden Übersichtsartikeln dargestellt worden.<sup>[55–57]</sup>

Der Einbau nichtnatürlicher Nucleotide in siRNAs ist eine besonders schwierige Aufgabe, da die Modifikationen die Stummschaltungsaktivität der siRNA nicht beeinträchtigen dürfen. Dabei sollte bedacht werden, dass die beiden Stränge der siRNA unterschiedliche Funktionen haben: Während der Guide-Strang in RISC eingebaut wird und den Komplex zur Ziel-RNA führt, wird der Passenger-Strang bei der Beladung von RISC verworfen. Letzterer wird daher Modifikationen eher tolerieren, aber auch in den Guide-Strang können modifizierte Nucleotide in geeigneten Positionen eingebaut werden.

Von besonderer Bedeutung ist die Hydroxygruppe am 5'-Ende des Guide-Stranges, das zum Eintritt der siRNA in den RNAi-Weg phosphoryliert werden muss. Folglich verliert eine siRNA, deren 5'-Ende – beispielsweise durch Amino-

brücken – blockiert ist, ihre inhibitorische Wirkung.<sup>[58]</sup> Vergleichsweise problemlos ist dagegen der Einbau funktioneller Gruppen an den Enden des Passenger-Strangs. So lässt sich die zelluläre Aufnahme und Lokalisation einer siRNA durch einen Fluorophor am 5'-Ende des Passenger-Strangs verfolgen, ohne dass die Stummschaltungsaktivität hierdurch gravierend beeinflusst wird.<sup>[59]</sup> Außerdem kann die zelluläre Aufnahme der siRNA durch lipophile Reste wie 12-Hydroxyalurylsäure und Cholesterin verbessert werden (siehe auch Abschnitt 5.1.1).<sup>[60]</sup>

Die am häufigsten verwendete Modifikation zur Stabilisierung von Antisense-Oligonucleotiden ist die Phosphorothioat-DNA, in der ein Nicht-Brücken-Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom substituiert ist. Phosphorothioate sind sehr stabil gegen Nucleaseen und relativ einfach herzustellen. RNA-Varianten der Phosphorothioate (Abbildung 4) wurden daher auch in siRNAs eingebaut. Grundsätzlich werden diese Modifikationen in der siRNA von der RNAi-Maschinerie toleriert, doch wurden bei einem hohen Anteil an Phosphorothioaten toxische Nebeneffekte beobachtet.<sup>[61]</sup>

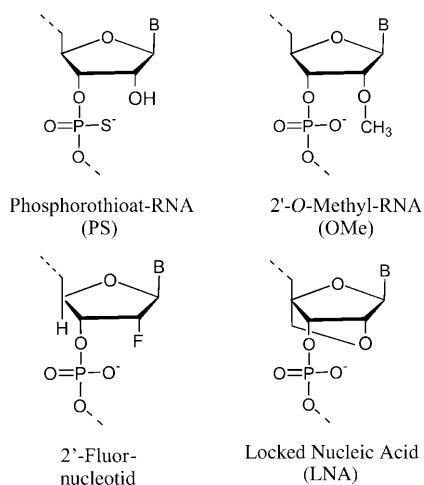


Abbildung 4. Ausgewählte modifizierte Nucleotide, die zur Stabilisierung von siRNAs eingesetzt werden.

Außerdem werden Nucleotide verwendet, deren Ribose an der 2'-Position modifiziert ist, z.B. 2'-O-Methyl-RNA und 2'-fluormodifizierte Nucleotide (Abbildung 4). Der Fluor-Substituent ist sehr klein, sodass er die Funktionalität der siRNA nicht gravierend beeinflusst.<sup>[61–63]</sup> Die deutlich größere Methylgruppe inhibiert dagegen die RNAi-Wirkung, wenn die gesamte siRNA aus 2'-O-Methyl-Nucleotiden besteht.<sup>[63]</sup> Daher wurden Modifikationsmuster gesucht, mit denen sich die Stabilität der siRNA erhöhen lässt, ohne die Stummschaltungsaktivität zu verringern. Als geeignet erwiesen sich stumpfe (blunt-end) siRNAs, bei denen sich in beiden Strängen RNA-Bausteine und 2'-O-Methyl-Nucleotide abwechseln, wobei jeweils ein modifiziertes Nucleotid einem nichtmodifizierten gegenüberliegt.<sup>[64]</sup> Derart modifizierte siRNAs wurden systemisch (d.h. intravenös in den Blutstrom) als Bestandteile von Lipoplexen (siehe Ab-

schnitt 5.1.1) in Mäuse injiziert.<sup>[65]</sup> Die siRNAs wurden in vaskuläre Endothelzellen aufgenommen und verringerten das Niveau der Ziel-mRNA und des Zielproteins.

Eine weitere, in den vergangenen Jahren viel verwendete Modifikation ist die fixierte Nucleinsäure „Locked Nucleic Acid“ (LNA; Abbildung 4).<sup>[66–68]</sup> LNAs haben zahlreiche positive Eigenschaften wie eine hohe Nucleasestabilität und eine hohe Affinität für Zielstrukturen; ihr Einbau in einen RNA-Duplex bewirkt allerdings gravierende Strukturänderungen. Eine umfassende Modifizierung einer siRNA mit LNAs ist daher nicht möglich, aber einige LNA-Monomere können ohne Verlust der Stummschaltung in die siRNA eingebaut werden.<sup>[62]</sup> In einer systematischen Studie wurden die Positionen des Antisense-Stranges identifiziert, die die Substitution des RNA-Nucleotids durch einen LNA-Baustein ohne Aktivitätsverlust tolerieren.<sup>[69]</sup> Der Einbau von LNAs in siRNAs erhöht nicht nur die Nucleasestabilität, er kann auch die Off-Target-Effekte einer siRNA (siehe Abschnitt 4) durch Inaktivierung des Sense-Stranges verringern und die Effizienz von siRNAs durch verbesserte Beladung des RISC erhöhen. Entsprechend zeigten LNA-modifizierte siRNAs bei der systemischen Anwendung in vivo vorteilhafte Eigenschaften im Vergleich zu unmodifizierten siRNAs.<sup>[70]</sup>

Wir haben die Methode der Inaktivierung eines Stranges einer siRNA durch den Einbau von LNAs genutzt, um den Mechanismus der RNAi-vermittelten Coxsackievirusinhibition genauer zu analysieren.<sup>[71]</sup> Diese herzpathogenen Viren, die zur Familie der *Picornaviridae* gehören, haben ein einsträngiges Genom in Plusstrangorientierung, von dem während der Replikation eine Minusstrang-RNA als Intermediat gebildet wird. Durch selektive Inaktivierung eines der beiden Stränge durch LNAs konnten wir nachweisen, dass nur siRNAs gegen den genomischen Plusstrang eine antivrale Aktivität zeigen.

In einer weiteren Arbeit wurde ein dreisträngiges siRNA-Konstrukt verwendet, bei dem der Antisense-Strang mit zwei kürzeren, 10–12 Nucleotide langen komplementären Strängen hybridisiert wurde.<sup>[72]</sup> Diese als kleine intern segmentierte interferierende RNAs (small internally segmented interfering RNAs, sisiRNAs) bezeichneten Moleküle waren an verschiedenen Positionen mit LNAs modifiziert und hatten eine sehr hohe Serumstabilität und Stummschaltungsaktivität.

Die Tatsache, dass die verschiedenen Modifikationen an unterschiedlichen Positionen der siRNA ohne gravierenden Aktivitätsverlust eingebaut werden können, ließ es sinnvoll erscheinen, diverse Typen von RNA-Analoga miteinander zu kombinieren. Auf diese Weise konnten in einer siRNA sämtliche OH-Gruppen substituiert werden: Für alle Pyrimidine wurden 2'-fluormodifizierte Nucleotide eingesetzt, die Purine des Sense-Stranges waren Desoxyribonucleotide, während 2'-O-Methyl-RNAs für die Purine des Antisense-Stranges verwendet wurden.<sup>[73]</sup> Weiterhin waren die Enden durch invertierte abasische Zucker und eine Phosphorothioatbindung geschützt. Diese vollständig modifizierte siRNA hatte in humanem Serum eine von wenigen Minuten auf mehrere Tage erhöhte Halbwertszeit und war in einem vektorbasierten In-vivo-Modell für Hepatitis-B-Virus(HBV)-Infektionen deutlich effizienter als die unmodifizierte Ausgangs-siRNA.

### 3. Vektorexpression von shRNAs

Ein großer Nachteil chemisch synthetisierter siRNAs besteht darin, dass ihre Wirkung nur wenige Tage anhält, weil die siRNAs mit der Zeit abgebaut und durch Zellteilung ausverdünnt werden. Es war daher ein erheblicher Fortschritt, als 2002 von mehreren Gruppen gleichzeitig Expressionssysteme entwickelt werden konnten, bei denen die siRNA kontinuierlich in der Zelle generiert wird.<sup>[74]</sup>

#### 3.1. Expressionsplasmide für shRNAs

Bei dem am weitesten verbreiteten System wird die siRNA in eine DNA-Sequenz konvertiert, die den Sense-Strang, eine Schleife und den Antisense-Strang kodiert. Von einem Vektor aus wird diese DNA-Matrize dann unter Kontrolle von Polymerase-III-Promotoren intrazellulär transkribiert. Diese Promotoren sind darauf optimiert, große Mengen präzise definierter RNAs zu generieren. Am häufigsten verwendet werden der Promotor der U6-Komponente des Spleißosoms sowie der H1-Promotor des RNA-Bestandteils der RNase P. Bei der Transkription entsteht eine selbstkomplementäre RNA, die als shRNA bezeichnet wird. Diese wird intrazellulär vom Dicer-Protein zur siRNA prozessiert und vermittelt dann die Stummschaltung.

Mit den shRNA-Expressionssystemen wurden neue Anwendungsmöglichkeiten für die RNAi geschaffen. Gewöhnlich hält die Wirkung einer vektorexprimierten shRNA deutlich länger an als die einer chemisch synthetisierten siRNA. Befinden sich Resistenzgene auf den Plasmiden, können stabil transfizierte Zelllinien selektiert werden, mit denen das Zielgen auch über mehrere Monate hinweg herunterreguliert werden kann.<sup>[75]</sup>

Außerdem können mit den shRNA-Expressionsvektoren transgene Tiere generiert werden, in denen die Expression des interessierenden Gens dauerhaft inhibiert wird. Beispielsweise kann die shRNA-Expressionskassette durch Elektroporation<sup>[76]</sup> oder lentiviralen Transfer<sup>[77]</sup> (siehe Abschnitt 5.2.1) in embryonale Mausstammzellen eingebracht werden. Ein Problem dieser Methoden besteht darin, dass die Integration des Transgens in das Genom zufällig erfolgt, sodass die Stummschaltungseffizienz je nach Integrationslocus sehr schwanken kann und unter Umständen auch wichtige zelluläre Gene zerstört werden können. Daher wurde nach einem Locus gesucht, der eine starke und vorhersagbare shRNA-Expression gewährleistet. Der Locus *Rosa 26* erfüllt diese Voraussetzungen und wurde daher verwendet, um das Transgen durch rekombinasevermittelten Kassettenaustausch (Recombinase-Mediated Cassette Exchange, RMCE) gezielt einzubringen. Mit einer einzigen Kopie der shRNA-Expressionskassette gelang in den meisten der analysierten Organe ein Knockdown von 80–95 %.<sup>[78]</sup> Ein Vorteil dieses Verfahrens gegenüber konventionellem Knockout besteht im immensen Zeitgewinn: Die shRNA exprimierenden Tiere stehen nach rund drei bis vier Monaten für Untersuchungen zu Verfügung, während bei Knockout-Tieren häufig bis zu mehreren Jahren dauernde Rückkreuzungen notwendig sind,

bevor das Gen aus beiden Chromosomen in einem genetisch definierten Hintergrund entfernt wurde.

Überraschenderweise haben wir kürzlich phänotypische Unterschiede beim Vergleich von Knockout-Tieren und shRNA exprimierenden Tieren beobachtet.<sup>[79]</sup> In dieser Studie sollte die Funktion des Vanilloidrezeptors TRPV1, der bei der Schmerzwahrnehmung eine wichtige Rolle spielt, genauer charakterisiert werden. Während die Reaktionen der shRNA exprimierenden Tiere in den meisten Tests (Capsaicin-induzierte Hypothermie und Colitis, Reaktion auf einen Hitzestimulus) mit den publizierten Daten einer Analyse von TRPV1-Knockout-Tieren übereinstimmten, zeigten sich deutliche Unterschiede im neuropathischen Schmerzgeschehen. Während der Knockout von TRPV1 keinen Einfluss auf die Wahrnehmung neuropathischer Schmerzen hatte, waren die mechanische Hypersensitivität und Allodynie (zwei Formen erhöhter Schmerzempfindlichkeit) in den shRNA exprimierenden Tieren deutlich geringer als bei Wildtypieren. Dieser Befund stimmte mit den Ergebnissen von Studien mit niedermolekularen Rezeptorantagonisten überein.<sup>[80]</sup> Die Ursache für die Unterschiede im Verhalten von Knockout-Tieren und shRNA exprimierenden Tieren ist noch nicht völlig verstanden, doch scheinen ein vollständiger Knockout und ein partieller Knockdown zu unterschiedlichen Kompressionsmechanismen zu führen. Dabei sollte bedacht werden, dass auch niedermolekulare pharmakologische Wirkstoffe ihre Ziele nur unvollständig inhibieren, sodass der teilweise Knockdown in einem RNAi-Experiment zur Targetvalidierung im Rahmen einer Wirkstoffentwicklung die Situation einer Medikamententherapie unter Umständen besser reflektiert.

Ein weiterer Vorteil der RNAi-Technik besteht in der breiten Anwendbarkeit. Während klassische Knockouts durch homologe Rekombination routinemäßig nur bei Mäusen vorgenommen werden, lassen sich mit der shRNA-Vektortechnik auch in anderen Tierarten, beispielsweise Ratten, Gene ausschalten.<sup>[81]</sup> Hieraus entstand die Idee, mit Hilfe der RNAi krankheitsresistente Nutztiere zu erzeugen. Es gelang, das Prionprotein (PrP), das bei übertragbaren spongiformen Enzephalopathien (Transmissible Spongiform Encephalopathy, TSE) aggregiert, in Ziegenfötten und Rinderblastozysten mittels RNAi auszuschalten.<sup>[82]</sup> Auf diese Weise könnten Nutztiere erhalten werden, die gegen BSE und verwandte Erkrankungen resistent sind. Mit einem ähnlichen Ansatz könnten Rinder auch gegen die Maul- und Klauenseuche widerstandsfähig gemacht werden. Es sollte allerdings bedacht werden, dass die Erzeugung transgener Nutztiere nicht nur technische, sondern auch ethische und soziale Implikationen hat.

#### 3.2. shRNAs vom Mikro-RNA-Typ

Während die shRNAs bei den bislang beschriebenen Systemen unter Kontrolle von Polymerase-III-Promotoren exprimiert werden, können bei moderneren Systemen auch Polymerase-II-Promotoren eingesetzt werden. Dadurch entstehen Transkripte, die an ihrem 5'-Ende eine Cap-Struktur und am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz tragen. Diese Struk-

turen sind nicht mit der RNAi-Maschinerie kompatibel. Um trotzdem Polymerase-II-Promotoren verwenden zu können, wird daher die Expression von miRNAs simuliert. Diese sind in der Regel Bestandteil längerer Vorstufen-RNAs, die unter Kontrolle von Polymerase-II-Promotoren transkribiert werden. Es ist möglich, die natürlich vorkommende miRNA durch eine künstliche shRNA in der miRNA-Sequenzumgebung zu ersetzen.<sup>[83]</sup> Die RNA-Polymerase II generiert zunächst ein langes Primärtranskript, aus dem Drosha die prä-miRNA herausschneidet. Diese wird in das Zytosoma exportiert, wo sie von Dicer zu einer siRNA prozessiert wird, die in RISC eingebaut wird.

Vergleichende Studien mit konventionellen und miRNA-Typ-shRNAs gegen HIV-1 haben gezeigt, dass letztere bis zu 80% effizienter sind.<sup>[84]</sup> Außer ihrer hohen Effizienz haben die miRNA-Typ-shRNAs noch weitere Vorteile gegenüber klassischen shRNAs: Zunächst einmal ermöglichen sie die simultane Expression einer proteinkodierenden Sequenz stromaufwärts der miRNA-Umgebung. Auf diese Weise können beispielsweise ein Reporter wie GFP oder ein funktional relevantes Protein gleichzeitig mit der shRNA exprimiert werden. Außerdem wird eine polycistronische Expression möglich, d.h., es können mehrere microRNA-Typ-shRNAs mit einem einzigen Transkript gebildet werden.<sup>[85]</sup> Dadurch lassen sich entweder mehrere Gene gleichzeitig stumm schalten, oder ein Zielgen kann durch mehrere shRNAs besonders effizient inhibiert werden. Ein dritter Vorteil besteht in der Option, zelltypspezifische Promotoren zu verwenden. Während Polymerase-III-Promotoren eine starke und ubiquitäre Expression vermitteln, gibt es eine große Zahl verschiedener Polymerase-II-Promotoren, die nur unter spezifischen Bedingungen oder in speziellen Zelltypen aktiv sind. Beispielsweise wurde eine miRNA-Typ-shRNA gegen den Transkriptionsfaktor Wilms Tumor 1 unter Kontrolle des proximalen Promotors des murinen Gens *Rhox5* exprimiert. Dadurch wurde die Expression des Zielgens spezifisch in Zellen des Hodens inhibiert.<sup>[86]</sup>

### 3.3. Induzierbare Systeme

Mit den Vektorsystemen wurde auch die Möglichkeit eröffnet, die RNAi durch pharmakologische Substanzen zu regulieren. Hierbei muss grundsätzlich zwischen reversiblen und nichtreversiblen Systemen unterschieden werden. Bei den reversiblen Systemen wird die Expression der shRNA durch die Zugabe eines Induktors „eingeschaltet“. Nach Absetzen des Induktors wird die Transkription der shRNA wieder reprimiert, und das Zielgen wird wieder exprimiert. Bei nichtreversiblen Systemen wird die shRNA-Expression dagegen einmalig induziert, ohne die Möglichkeit, dies wieder rückgängig zu machen. Diese Form der Regulation wird benötigt, wenn Gene in adulten Organismen untersucht werden, die für die Embryonalentwicklung essenziell sind.

Das am weitesten verbreitete reversible shRNA-Expressionssystem basiert auf der tetracylinkontrollierten Transkription (tet).<sup>[87]</sup> Für die tet-Kontrolle wird gewöhnlich ein tet-Operon in den Promotor eingefügt, an das ein Repressorprotein bindet. Durch Zugabe eines Induktors – Tetra-

cyclin oder das gewöhnlich verwendete Strukturanalogen Doxycyclin (Dox) – wird eine Strukturänderung des tet-Repressors induziert, sodass dieser vom tet-Operon freigesetzt wird und damit die Transkription der shRNA freigibt.

Das tet-System funktioniert sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Beispielsweise wurde eine shRNA gegen die Polo-like Kinase 1 (PLK1) Dox-abhängig exprimiert, um die Bedeutung des Zielgens für die Proliferation von Krebszellen zu untersuchen.<sup>[88]</sup> Durch Inokulation dieser Zellen in immundefiziente Nacktmäuse konnte gezeigt werden, dass die RNAi-vermittelte Stummschaltung auch *in vivo* Dox-abhängig gesteuert werden kann. In einer weiteren Arbeit wurden transgene Tiere nach dem zuvor beschriebenen RMCE-Verfahren generiert, in denen sich die shRNA-Expression reversibel durch Dox induzieren ließ.<sup>[89]</sup> Auf diese Weise konnte das Zielgen, das für den Insulinrezeptor kodiert, eine definierte Zeit lang herunterreguliert werden.

Das tet-System kombiniert zahlreiche Vorteile: Es hat in Abwesenheit des Induktors eine geringe Hintergrundaktivität, es ist stark induzierbar und nach Absetzen des Induktors schnell wieder umkehrbar, und die Induktoren Tetracyclin und Doxycyclin sind ungiftige, pharmakologisch gut charakterisierte Substanzen. Außer dem beschriebenen System gibt es noch zahlreiche weitere Varianten der tet-Kontrolle und andere reversible Regulationsmöglichkeiten, die in einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel zusammengefasst sind.<sup>[90]</sup>

Das Cre-lox-System findet seit vielen Jahren breite Anwendung für konventionelle Knockouts und wurde daher auch als nichtreversibler Ansatz für konditionale RNAi eingesetzt. Dabei wird die Transkription der funktionalen shRNA zunächst durch einen zusätzlichen DNA-Abschnitt in der Expressionskassette zerstört. Beispielsweise kann ein Resistenzgen für Neomycin (*neo*), das von zwei *loxP*-Stellen flankiert ist, in die shRNA-kodierende Region eingefügt werden.<sup>[91]</sup> Durch die CRE-Rekombinase wird die unterbrechende Sequenz entfernt und die Bildung der shRNA induziert. Alternativ kann die *stuffer*-Sequenz auch in die Promotorregion integriert werden. Cre-lox-Systeme ermöglichen eine zeitliche Steuerung der RNAi-Suppression, beispielsweise eine Induktion nach der Embryonalentwicklung, und auch gewebespezifische Stummschaltung, wenn die CRE-Rekombinase in speziellen Zelltypen exprimiert wird.

## 4. Unspezifische Nebeneffekte

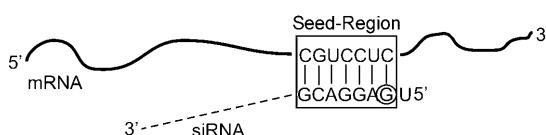
### 4.1. Off-Target-Effekte

Niedermolekulare pharmakologische Wirkstoffe, die gewöhnlich an Proteine binden und katalytische Zentren inhibieren oder Membranrezeptoren blockieren, interagieren meist über sterische Wechselwirkungen mit ihren Zielmolekülen. Dabei kommt es häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen, wenn die Substanz auch an andere, strukturell ähnliche Proteine bindet. Da RNAi-Ansätze auf Watson-Crick-Wechselwirkungen zwischen einem Oligonucleotid und einer RNA basieren, bestand die Hoffnung, dass unerwünschte Effekte keine Rolle spielen, wenn eine Zielsequenz verwen-

det wird, die nur einmal im Genom vorkommt. In der Tat kann eine einzige Fehlpaarung zu einem kompletten Verlust der Stummschaltung führen.<sup>[75,92]</sup>

Genauere Mikroarrayanalysen, mit denen globale Profile der Genexpression erstellt werden, zeigten jedoch, dass siRNAs nicht völlig spezifisch sind. Während erste Untersuchungen darauf hindeuteten, dass die so genannten Off-Target-Effekte von siRNAs dosisabhängig sind und durch die Verwendung geringer siRNA-Konzentrationen vermieden werden können,<sup>[93]</sup> wurde in anderen Arbeiten berichtet, dass die unspezifischen Effekte einen ähnlichen Konzentrationsverlauf haben wie der intendierte Knockdown des Zielgens.<sup>[94]</sup> Bereits bei einer Identität von elf Nucleotiden mit dem Antisense-Strang der siRNA kann eine mRNA herunterreguliert werden, die nicht das eigentliche Ziel darstellt. Diese Off-Target-Effekte können Auswirkungen auf den Phänotypen haben, beispielsweise auf die Zellviabilität.<sup>[95]</sup>

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass es nicht die generelle Identität einer mRNA mit der siRNA, sondern vielmehr die perfekte Übereinstimmung zwischen Teilen der 3'-UTR und der Seed-Region (Positionen 2–7 oder 2–8) des Antisense-Strangs der siRNA ist, die bestimmt, ob die Genexpression beeinflusst wird (Abbildung 5).<sup>[96]</sup> In einer sys-



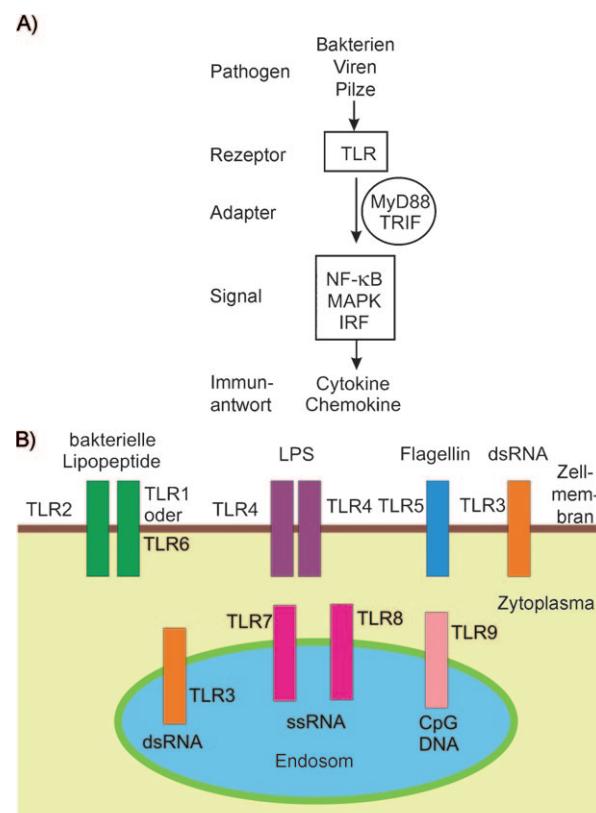
**Abbildung 5.** Basenpaarung zwischen den Nucleotiden 2–8 der siRNA (Seed-Region) und mRNAs kann bei RNAi-Anwendungen zu Off-Target-Effekten führen. Diese unerwünschten Nebenwirkungen können durch eine 2'-O-Methyl-Substitution des zweiten Nucleotids (Kreis) deutlich verringert werden.

matischen Studie wurde für alle 4096 möglichen Hexamere das Vorkommen in der 3'-UTR des Transkriptoms untersucht.<sup>[97]</sup> Dabei zeigte sich, dass einige Hexamere selten, andere dagegen wesentlich häufiger vorkommen. In einer Mikroarrayanalyse wurde deutlich, dass siRNAs mit häufig vorkommenden Seed-Regionen stärkere Off-Target-Effekte auslösen als solche, zu deren Seed-Regionen es nur wenige komplementäre Sequenzen gibt. Dies bedeutet, dass die Gefahr von Off-Target-Effekten durch geschicktes Design der siRNA deutlich verringert werden kann. Darüber hinaus kann die Spezifität von siRNAs durch den Einbau modifizierter Nucleotide verringert werden. Es ist vergleichsweise einfach, den Sense-Strang durch Modifikationen vollständig zu inaktivieren, sodass von diesem keine Gefahr der Off-Target-Regulation mehr ausgeht. Änderungen am Antisense-Strang sind dagegen anspruchsvoller, da die inhibitorische Wirkung auf die Zielgenexpression nicht beeinflusst werden darf. Eine einzige 2'-O-Methyl-Substitution an der Ribose des zweiten Nucleotids reicht jedoch aus, um die Off-Target-Effekte deutlich zu reduzieren und dabei zugleich die Stummschaltungsaktivität aufrecht zu erhalten (Abbildung 5).<sup>[98]</sup>

#### 4.2. INF-Antwort

siRNAs können überraschenderweise auch eine Interferon(INF)-Antwort auslösen, obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass diese nur durch doppelsträngige RNA-Moleküle induziert wird, die länger als 30 Nucleotide sind. Eine umfassende Analyse der INF-stimulierten Gene ergab jedoch, dass auch siRNAs – vermutlich vermittelt über Proteinkinase R – das Interferonsystem aktivieren können.<sup>[99]</sup> Dieser Effekt ist nicht spezifisch für siRNAs, sondern wurde auch bei vektorexprimierten shRNAs beobachtet.<sup>[100]</sup>

Bei der Immunerkennung von siRNAs spielen außer der Proteinkinase R vermutlich auch Toll-like Rezeptoren (TLR) sowie die Helicasen RIG-1 und Mda5 eine wichtige Rolle. Drei Mitglieder der TLR-Familie erkennen RNA und können über einen komplexen Signalweg eine Immunantwort auslösen (Abbildung 6). Für plasmacytoid dendritische Zellen konnte gezeigt werden, dass siRNAs INF- $\alpha$  über TLR7 induzieren.<sup>[101]</sup> Die aktivierende Wirkung der siRNAs auf endosomale TLRs ist von der Sequenz der siRNA abhängig.<sup>[102]</sup> So konnten Motive identifiziert werden, die zu einer starken Induktion der Immunantwort führen. Dies bedeutet, dass die Immunstimulation durch Vermeidung dieser Motive der siRNAs umgangen werden kann. Für spezielle Anwendungen wie etwa die Behandlung von Virusinfektionen oder Krebs



**Abbildung 6.** Toll-like Rezeptoren (TLR). A) Signalweg der TLRs. B) Zelluläre Lokalisation und Liganden, die die verschiedenen TLRs aktivieren. LPS: Lipopolysaccharid; CpG: Cytidin-Phosphat-Guanosin; MyD88: myeloid differentiation primary response protein 88; NF-κB: nuclear factor kappa beta; MAPK: mitogen-activated protein kinases; IRF: interferon regulatory factor (Abbildung modifiziert nach Lit. [104]).

können aber auch gezielt stark immunstimulatorische siRNAs verwendet werden, die zwei Funktionen haben: den Knockdown des Zielgens und die Induktion von Interferonen.<sup>[103]</sup>

In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde berichtet, dass unspezifische Wirkungen von siRNAs auch über TLR3 vermittelt werden können. Bei der Untersuchung der anti-angiogenetischen Wirkung von siRNAs, die beispielsweise zur Behandlung der altersbedingten Degeneration der Macula eingesetzt werden (siehe Abschnitt 6.3.1), wurde in einem Tiermodell beobachtet, dass unspezifische siRNAs ohne Homologien im Säugergenom ebenso effizient waren wie siRNAs gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) oder dessen Rezeptor.<sup>[105]</sup> Die Wirkung beruhte also nicht auf einer sequenzspezifischen Stummenschaltung des Zielgens; auch wurden weder Off-Target-RNAi noch INF- $\alpha/\beta$  aktiviert. Vielmehr wurde die choroidale Neovaskularisation über den TLR-3, der in verschiedenen Zelltypen an der Zelloberfläche lokalisiert ist, und dessen Adapter TRIF sowie die Induktion von INF- $\gamma$  und Interleukin-12 blockiert.

### 4.3. Überschneidungen mit dem miRNA-Weg

Weitere, unerwünschte Seiteneffekte bei RNAi-Anwendungen können durch Überschneidungen mit dem miRNA-Weg entstehen. Wie in der Einleitung beschrieben, funktionieren siRNAs und miRNAs über sehr ähnliche Mechanismen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass siRNAs als miRNAs wirken können. Dies bedeutet, dass siRNAs über partielle Homologien mit der 3'-UTR von mRNAs wechselwirken und deren Translation inhibieren können, ohne ihre Degradation zu initiieren.<sup>[106, 107]</sup>

Außerdem können exprimierte shRNAs den endogenen miRNA-Weg blockieren. So wurde eine ausgeprägte Lebertoxizität beobachtet, nachdem shRNA-Expressionskassetten mit einer hohen Dosis an viralen Vektoren Mäusen verabreicht worden waren.<sup>[108]</sup> 36 von 49 shRNAs führten zu Leberschäden, 23 davon sogar zum Tod der Tiere. Vermutlich wurde der zelluläre miRNA-Weg unter anderem durch Übersättigung von Exportin-5 gestört, das die miRNA-Vorstufen aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert. Bei einer geringeren Vektordosis wurden dagegen keine Nebenwirkungen beobachtet, und es wurde in einem Tiermodell über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr ein Schutz vor HBV erreicht. Als Reaktion auf diese Arbeit wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie untersucht, ob auch chemisch synthetisierte siRNAs einen Einfluss auf die zellulären miRNAs haben.<sup>[109]</sup> Durch liposomalen Transport der siRNAs konnte die Expression hepatozytenspezifischer Gene um rund 80% inhibiert werden. Das Niveau und die Funktion mehrerer untersuchter miRNAs wurden durch die siRNA-Behandlung dagegen nicht beeinflusst.

RNAi-Anwendungen werden wohl niemals völlig spezifisch sein. Durch ein geeignetes Design der siRNAs sowie den Einsatz modifizierter Nucleotide können die unspezifischen Effekte jedoch minimiert werden. Außerdem sollte die Dosis der siRNAs oder shRNAs möglichst gering gehalten werden.

Bei funktionellen Analysen kann die Aussagekraft der Experimente erhöht werden, indem der Phänotyp mit mehreren unabhängigen siRNAs verifiziert wird. Für den therapeutischen Einsatz sollte bedacht werden, dass auch niedermolekulare Wirkstoffe gewöhnlich zahlreiche (toxische) Nebenwirkungen haben. Daher sollten für RNAi-Anwendungen dieselben Sicherheitsanforderungen in der präklinischen Entwicklung gelten wie für alle anderen Substanzen auch.

## 5. Transportsysteme (Delivery)

Oligonukleotide sind mehrfach negativ geladene Makromoleküle, die nur schlecht die hydrophobe Zellmembran passieren. Der Transport der siRNAs in die Zellen des Zielgewebes ist daher eine der schwierigsten Aufgaben bei der Entwicklung von RNAi-Ansätzen. Für Zellkulturanwendungen werden gewöhnlich Transfektionsreagentien verwendet, die im Tier (oder Menschen) jedoch oftmals toxische Nebenwirkungen haben. Bereits aus dem Antisense-Bereich ist bekannt, dass Oligonukleotide *in vivo* in einem gewissen Maße spontan von den Zellen aufgenommen werden. So wirken siRNAs auch ohne Träger bei lokaler Verabreichung, etwa intranasaler Gabe<sup>[110]</sup> oder intrathekaler Injektion.<sup>[24]</sup> Hierbei sollte allerdings bedacht werden, dass bei der lokalen Anwendung eine räumlich begrenzte hohe Konzentration der siRNA erzeugt werden kann. Für effizienten, systemischen Transport ist dagegen eine zusätzliche Unterstützung notwendig. Grundsätzlich wird dabei nichtviraler Transport von chemisch synthetisierten siRNAs und viraler Transport von shRNA-Expressionskassetten unterschieden. Welcher der beiden Wege zu bevorzugen ist, hängt von der jeweiligen Anwendung ab: Bei temporären Erkrankungen (beispielsweise akuten Infektionen) können die zeitlich begrenzt wirkenden siRNAs ausreichend sein, während bei chronischen Erkrankungen (etwa HIV-Infektionen, Stoffwechselerkrankungen) vermutlich der vektorbasierte Ansatz vorteilhaft ist, um wiederholte Behandlungen zu vermeiden.

### 5.1. Nichtviraler Transport

Für die ersten *In-vivo*-Anwendungen der RNAi wurden freie siRNAs durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion verabreicht.<sup>[111]</sup> Dabei wird ein vergleichsweise großes Volumen der siRNA-Lösung in kurzer Zeit mit hohem Druck injiziert. Auf diese Weise gelangen die siRNAs bevorzugt in die Leber, und in der Tat konnte dort der Knockdown von Zielgenen erreicht werden. Diese Methode ist allerdings sehr harsch und daher beim Menschen nicht anwendbar. Daher wird seit Jahren intensiv an der Entwicklung biokompatibler Verfahren zum Transport von siRNAs gearbeitet.

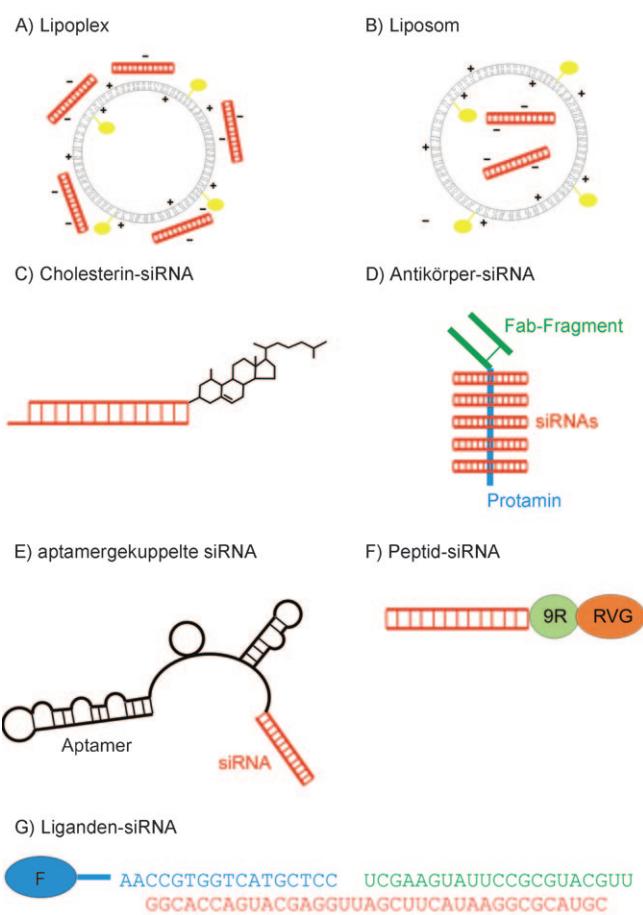
Bei der systemischen Anwendung *in vivo* müssen die siRNAs zahlreiche Barrieren überwinden, um ihre Aktivität entfalten zu können.<sup>[112]</sup> So werden freie Oligonukleotide sehr schnell von der Niere aus dem Blut gefiltert und anschließend ausgeschieden. Auch werden unmodifizierte siRNAs rasch von Nucleaseen abgebaut (siehe Abschnitt 2.2), und fremde Makromoleküle werden vom reticuloendothelialen System

phagozytiert und in der Leber und Milz abgelagert. Die Verweildauer der siRNAs im Blutstrom kann durch hydrophobe Polymere wie Polyethylenglycol (PEG) verlängert werden. Die siRNAs müssen dann das Endothel der Kapillaren überwinden und in die extrazelluläre Matrix des Zielgewebes diffundieren. Die Aufnahme in die Zellen erfolgt gewöhnlich über Endozytose, wobei ein wichtiger Schritt die Freisetzung der siRNAs aus den Endosomen ins Zytosol ist, wo sie schließlich wirken. Es gibt zahlreiche Ansätze, um diese Prozesse zu unterstützen, von denen die wichtigsten hier dargestellt werden sollen.

### 5.1.1. Unspezifischer Transport

Viele Wirkstoffe werden in Liposomen verpackt, um ihre pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern. Die Liposomen umschließen ein wässriges Kompartiment in einer Phospholipid-Doppelschicht, in das sich polare Substanzen einlagern können, und vermitteln die Aufnahme des Wirkstoffes durch vesikulären Transport, z.B. über Endosomen. Für den Transport negativ geladener Nucleinsäuren eignen sich insbesondere kationische Lipide. Die meisten kommerziell erhältlichen Transfektionsagentien bilden mit den Oligonukleotiden Lipoplexe, bei denen die siRNA sich nicht im inneren Kompartiment befindet. Für In-vivo-Applikationen wurden jedoch zahlreiche neue, weniger toxische Formulierungen entwickelt. Gewöhnlich werden Lipoplexe und Liposomen mit PEG umgeben (Abbildung 7 A,B), um eine längere Zirkulation im Blutstrom zu erreichen und die Toxizität zu verringern. Außerdem werden fusogene Lipide hinzugefügt, die die Freisetzung der siRNAs aus den Endosomen erleichtern. Während freie siRNA nach intravenöser Injektion schnell wieder über die Niere ausgeschieden wird, konnte eine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierte siRNA, die als siRNA-Lipoplex verabreicht wurde, in zahlreichen Organen nachgewiesen werden.<sup>[65]</sup> Sie verbleibt allerdings primär in den Endothelzellen der Blutgefäße und durchdringt das dahinter liegende Gewebe kaum.

Liposomaler Transport der in Abschnitt 2.2 beschriebenen, vollständig modifizierten siRNA gegen HBV erhöhte in einem Mausmodell sowohl deren Effizienz als auch die Dauer der Wirkung.<sup>[113]</sup> Die siRNA war in so genannte SNALPs (Stable Nucleic Acid-Lipid Particles) eingekapselt, die aus einem kationischen und einem fusogenen Lipid bestehen und ebenfalls PEG-funktionalisiert sind (Abbildung 7B). SNALPs wurden auch verwendet, um eine siRNA gegen das Apolipoprotein B in Primaten zu testen.<sup>[25]</sup> Das Niveau der mRNA in der Leber wurde nach einer einzelnen Injektion um mehr als 90% herabgesetzt, und als Konsequenz waren das Protein-, das Serum-Cholesterin- und das Low-Density-Lipoprotein(LDL)-Niveau verringert. Damit war nachgewiesen, dass liposomenvermittelter siRNA-Transfer erfolgreich in einem klinisch relevanten Zusammenhang eingesetzt werden kann. Der Knockdown des Apolipoproteins B verdeutlicht noch zwei weitere wichtige Aspekte: Zum einen reicht hierbei eine partielle Verringerung des Zielproteins aus, um einen deutlichen therapeutischen Nutzen (Verringerung des LDL-Niveaus auf das Normalmaß) zu erzielen. Bei der Anwendung der RNAi bei Tumorerkrankungen oder



**Abbildung 7.** Nichtviraler Transport von siRNAs. A) Lipoplex: Kationische Lipide (grau) bilden Komplexe mit den negativ geladenen siRNAs (rot). Häufig wird PEG (gelb) angefügt, um die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern. B) Liposom, in denen die kationischen Lipide die siRNA umschließen. C) siRNA, an die Cholesterin als lipoophile Gruppe gekuppelt wurde. D) Spezifischer Transport durch Kupplung von siRNAs an das antigenbindende Fragment eines Antikörpers über positiv geladenes Protamin. E) Direkte Kupplung einer siRNA an ein Aptamer zum tumorzellspezifischen Transport. F) Neuronaler Transport durch ein Peptid des Rabiesvirus-Glycoproteins (RVG) mit einem Arginin-Nonamer (9R) zur Bindung der siRNA. G) Rezeptorvermittelter Transport durch Kupplung eines Liganden (F: Folat) an ein DNA-Oligonukleotid (blau), das an die siRNA hybridisiert (Sense-Strang: grün, Antisense-Strang: rot). Weitere Details sind im Text beschrieben.

Virusinfektionen muss dagegen eine möglichst vollständige Inhibition des Zielgens erreicht werden, um ein Wiederauftreten der Erkrankung zu verhindern. Zum anderen wird der Vorteil der RNAi-Technik deutlich, dass jedes beliebige Gen inhibiert werden kann, also nicht nur Zielstrukturen, gegen die sich traditionelle niedermolekulare Wirkstoffe entwickeln lassen (so genannte drugable Targets).

Außer den lipidbasierten Systemen wurden auch verschiedene weitere Polymere zum Transport von siRNAs eingesetzt. Eines der am intensivsten untersuchten Polymere zum Transport von Nucleinsäuren ist Polyethylenimin (PEI). Die linearen oder verzweigten PEI-Polymere sind stark positiv geladen und können daher Komplexe mit siRNAs bilden und elektrostatisch mit der Zelloberfläche wechselwirken.

Die Komplexe werden über Endozytose aufgenommen, und das PEI unterstützt die Freisetzung der siRNA durch Zerstörung der Endosomen. PEI-siRNA-Komplexe wurden unter anderem eingesetzt, um Influenzainfektionen in Mäusen einzudämmen.<sup>[114]</sup>

Des Weiteren wurden auch Nanopartikel aus gänzlich anderen Substanzen entwickelt. Beispielsweise haben Medarova et al. Nanopartikel verwendet, die nach systemischer Gabe gleichzeitig Transport und Nachweis der siRNA-Aufnahme ermöglichen.<sup>[115]</sup> Die Proben bestanden aus magnetischen Nanopartikeln, die mit einem Farbstoff versehen waren, der im nahen Infrarot absorbiert, sodass die Anreicherung in Tumoren mittels Magnetresonanztomographie (Magnetic Resonance Imaging, MRI) und In-vivo-Nahinfrarotfluoreszenzbildgebung (Near-Infrared in vivo Optical Imaging, NIRF) beobachtet werden konnte. Für die Translokation über die Membran waren die Nanopartikel noch mit einem myristoylgekoppelten Polyargininpeptid versehen. In einem alternativen System wurden Kohlenstoffnanoröhren verwendet, mit denen die siRNAs auch in T-Zellen und Primärzellen eingeführt werden können, die sich mit liposomalen Systemen nur schlecht transfizieren lassen.<sup>[116]</sup>

Eine alternative Strategie besteht darin, lipophile Moleküle direkt an die siRNA zu kuppeln. Von einer Reihe getesteter Gruppen erwiesen sich 12-Hydroxyalaurylsäure und Cholesterin, die an das 3'-Ende des Sense-Stranges angefügt wurden, als am besten geeignet, um eine gute zelluläre Aufnahme und effizienten Knockdown des Zielgens zu erreichen.<sup>[60]</sup> Daraufhin wurde eine cholesteringekoppelte siRNA (Abbildung 7C) in die Schwanzvene von Mäusen injiziert.<sup>[117]</sup> Zelluläre Aufnahme und Stummschaltung des Zielgens (Apolipoprotein B) konnten in Zellen der Leber und des Jejunums (Leerdarm, ein Abschnitt des Dünndarms) nachgewiesen werden.

Außer lipophilen Gruppen können auch zellpenetrierende Peptide (Cell Penetrating Peptides, CPP) die zelluläre Aufnahme von Oligonucleotiden verbessern.<sup>[118]</sup> Interessanterweise wird auch durch Phosphorothioat-Oligonucleotide, die mit der siRNA nicht kovalent verknüpft sind, deren Aufnahme über einen Caveolin-vermittelten Mechanismus unterstützt.<sup>[119]</sup> Auf diese Weise konnte die Expression von Lamin in primären Endothelzellen (HUVEC) inhibiert werden.

## 5.1.2. Zelltypspezifischer Transport

Ein großer Fortschritt war die Entwicklung von Systemen, die spezifischen Transport der siRNAs in die Zielzellen ermöglichen. Dadurch kann die verabreichte Dosis verringert werden, und mögliche Nebenwirkungen in anderen Geweben können vermieden werden. Eine elegante Möglichkeit besteht darin, die siRNA an einen Antikörper zu kuppeln, der Oberflächenproteine auf speziellen Zellen erkennt. In einer grundlegenden Arbeit wurde das antigenbindende Fragment eines Antikörpers gegen das HIV-Glycoprotein verwendet, das mit Protamin verbunden war (Abbildung 7D).<sup>[120]</sup> Dieses positiv geladene Protein kann etwa sechs (negativ geladene) siRNAs nichtkovalent binden. Mit diesem Konstrukt konnte eine HIV-Infektion in primären T-Zellen inhibiert werden,

die sich mit lipidbasierten Strategien schwer transfizieren lassen. In vivo gelang den Autoren der Transport von siRNAs mit der Antikörperstrategie in Tumorzellen, die spezielle Proteine an der Zelloberfläche präsentieren.

Um zu vermeiden, dass zwei Molekülklassen (Proteine und Nucleinsäuren) kombiniert werden müssen, wurden siRNAs an Aptamere – Liganden bindende, *in vitro* selektierte Nucleinsäuren – gekuppelt. In einer ersten Arbeit wurde eine siRNA gegen Lamin über eine Streptavidinbrücke mit einem Aptamer gegen das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) verbunden,<sup>[121]</sup> einem Oberflächenrezeptor, der auf Prostatakrebszellen und dem vaskulären Endothel von Tumoren exprimiert wird. Dieses Konjugat ermöglichte eine effiziente Stummschaltung, ist aber wegen der Biotin-Streptavidin-Brücke vergleichsweise komplex. Daher wurde die siRNA in einer weiteren Arbeit direkt an ein (anderes) Aptamer gegen PSMA gekuppelt (Abbildung 7E).<sup>[122]</sup> Intrazellulär wird die siRNA durch Dicer vom Aptamer getrennt. Im Tiermodell gelang es, das Wachstum eines Tumors aus humanen Prostatakarzinomzellen mit einer aptamergekoppelten siRNA gegen PLK1 zu inhibieren.

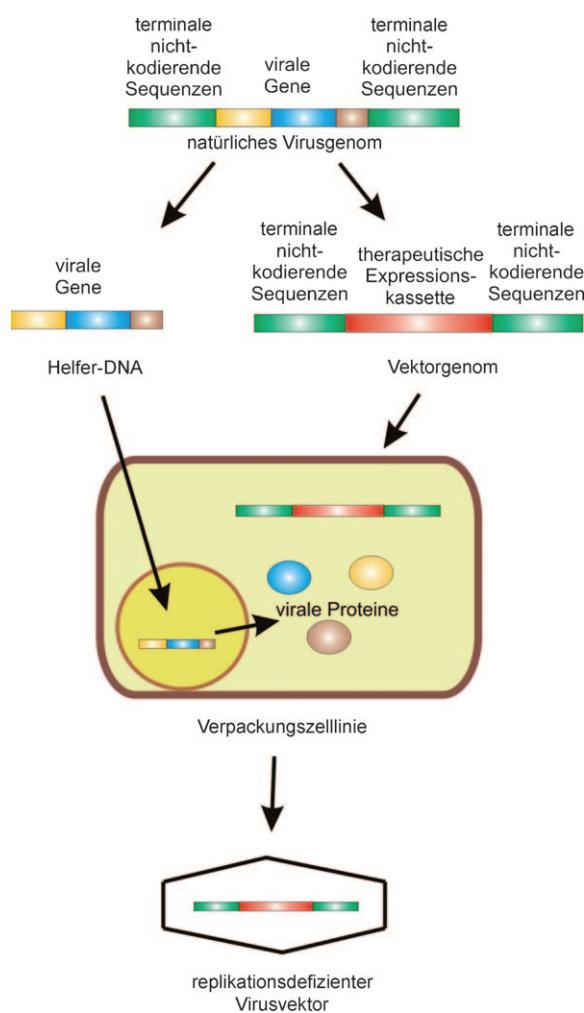
Die Behandlung neurologischer Erkrankungen wird durch die Blut-Hirn-Schranke erschwert, die das Eindringen von Wirkstoffen aus dem Blutstrom in das Gehirn verhindert. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurde ein 29 Aminosäuren langes Peptid des Rabies(Tollwut)-Virus-Glycoproteins über ein Arginin-Nonamer an eine siRNA gekuppelt (Abbildung 7F).<sup>[123]</sup> Das Peptid bindet an den Acetylcholinrezeptor, der von neuronalen Zellen exprimiert wird, sodass das Konjugat spezifisch in Neurone eindringt. In vivo gelangte eine intravenös injizierte siRNA mit dem Peptid in Gehirnzellen und schützte die Mäuse vor einer Infektion mit dem Japanische-Enzephalitis-Virus.

Eine weitere Möglichkeit des zelltypspezifischen Transports besteht in der Kupplung eines Rezeptorliganden (beispielsweise Folat) an ein DNA-Oligonucleotid (Abbildung 7G).<sup>[124]</sup> Dieses DNA-Oligonucleotid hybridisiert dann mit dem 3'-seitig verlängerten Ende des Antisense-Stranges der siRNA und vermittelt über den Liganden die Aufnahme des aus zwei RNA-Molekülen und einem DNA-Oligonucleotid bestehenden Konstruktes in die Zellen. Dort produziert Dicer oder eine RNase H dann (vermutlich) die reife siRNA.

Weitere Details zum nichtviralen Transport von siRNAs sind in kürzlich erschienenen Übersichtsartikeln beschrieben.<sup>[112, 125–127]</sup>

## 5.2. Viraler Transport

Viren gehören zu den gefährlichsten Pathogenen für den Menschen; vielfach gibt es keine oder nur unzureichende Behandlungsmöglichkeiten gegen eine Vireninfektion. Seit fast 20 Jahren wird allerdings das Konzept verfolgt, therapeutisch wirksame Gene mithilfe viraler Vektoren in Patienten einzubringen. Dabei werden die Viren in der Regel so verändert, dass ihnen essenzielle Komponenten für die Replikation fehlen, sodass sie sich nach der Verabreichung im Patienten nicht vermehren können und ihn daher nicht schädigen (Abbildung 8). Obwohl weltweit mittlerweile über



**Abbildung 8.** Herstellung replikationsdefizienter viraler Vektoren. Für den Gentransfer werden die zentralen proteinkodierenden Gene aus dem natürlichen Virusgenom entfernt und durch das Transgen (beispielsweise eine shRNA-Expressionskassette) ersetzt. In einer Verpackungszelllinie wird das Vektorgenom dann durch separate Expression der viralen Gene, die aus Sicherheitsgründen zumeist auf mehrere Plasmide verteilt werden, verpackt. Der entstehende Virusvektor enthält nur die Expressionskassette für das Transgen, während die essenziellen Virusgene fehlen, sodass keine weitere Replikation möglich ist.

220 Gene in nahezu 1500 klinischen Studien transferiert wurden,<sup>[128]</sup> ist der große Durchbruch bei der Gentherapie bislang ausgeblieben. Starke Hoffnungen werden darin gesetzt, die neuartige und sehr effiziente RNAi-Technik mit den Erfahrungen der Gentherapie zu kombinieren.<sup>[90,129]</sup> Dabei werden die shRNA-Expressionskassetten mithilfe viraler Vektoren in die Zielzellen eingebracht. Diese Form des Gentransfers ist in der Regel deutlich effizienter als der nichtvirale Transport von siRNAs. Drei Typen von Vektoren werden hauptsächlich verwendet: retrovirale Vektoren, adenovirale Vektoren sowie Vektoren auf der Basis Adeno-assozierter Viren (AAV). Die wichtigsten Vor- und Nachteile der drei Vektortypen sind in Tabelle 1 zusammen-

gefasst. Die Erfahrungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass es nicht einen einzigen optimalen Vektor für alle Indikationen geben kann, sondern dass die Wahl des Vektortyps vom jeweils spezifischen Anwendungsprofil abhängt.

### 5.2.1. Retrovirale Vektoren

Retroviren haben ein RNA-Genom, das in eine doppelsträngige DNA überführt wird, die in das Genom der Wirtszelle als provirale DNA integriert wird. Diese Eigenschaft bleibt auch bei den therapeutisch genutzten retrovirkalen Vektoren erhalten, sodass das Transgen langfristig exprimiert wird. Die Immunreaktion auf diese Vektoren ist schwach, und die Viren sind so verändert, dass sie die Zellen nicht mehr verlassen und schädigen können.

Die Familie der *Retroviridae* wird in die Untergruppen der Onkoretroviren und der Lentiviren unterteilt. Onkoretroviren können nur proliferierende Zellen transduzieren. Sie werden vorwiegend ex vivo angewendet, d.h., dem Patienten werden Zellen – beispielsweise hämatopoetische Stammzellen – entnommen, die in Kulturschalen mit dem Retrovirusvektor transduziert und dann dem Patienten wieder infundiert werden. Auf diese Weise wurden unter anderem Kinder behandelt, die an X-SCID leiden, einer schweren Immunschwäche (Severe Combined Immunodeficiency Disorder), die durch eine Mutation im Interleukin-Rezeptor-γ-Gen hervorgerufen wird, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist.<sup>[130]</sup> Der vermeintliche Vorteil der langfristigen Expression durch stabile Integration in das Wirtsgenom erwies sich allerdings als ein Nachteil, da sich bei mehreren Kindern Leukämie als Folge der Behandlung entwickelte.<sup>[131]</sup> Der retrovirale Vektor hatte sich in der Nähe des LMO2-Protoonkogen-Promotors integriert und zu einer anomalen Transkription und Expression von LMO2 geführt. Dies zeigt, dass die Sicherheit der Vektoren erhöht werden muss; allerdings sollte auch bedacht werden, dass sich einige Erkrankungen wie SCID häufig auf anderem Wege gar nicht behandeln lassen und zum frühen Tod der Kinder führen.

Lentivirale Vektoren können beispielsweise vom humanen Immundefizienzvirus (HIV) abgeleitet sein. Sie haben die Fähigkeit, außer proliferierenden auch ruhende Zellen zu transduzieren, wodurch sich ihre Anwendungsbreite vergrößert. Außerdem ist ihr onkogenes Potenzial vermutlich geringer. Als Hüllprotein für lentivirale Vektoren kann das G-Glycoprotein des vesikulären Stomatitisvirus verwendet werden, durch das es fast keine Einschränkungen bezüglich der zu transduzierenden Zelltypen gibt.

**Tabelle 1:** Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften viraler Vektoren.

	Retrovirale Vektoren	Adenovirale Vektoren	Adeno-assoziierte Virusvektoren
Transduktion ruhender Zellen	nein – Onkoretroviren ja – Lentiviren	ja	ja
Integration	ja	nein	nein (oder geringfügig)
potenzielles Risiko	Insertionsmutagenese	Immunreaktion, Zytotoxizität	Zytotoxizität

Nachdem durch Inhibition des Reportergens eGFP gezeigt wurde, dass sich retrovirale Vektoren grundsätzlich zur RNAi-vermittelten Genstummschaltung eignen,<sup>[132]</sup> wurden sie für medizinisch relevante Ansätze verwendet. Durch spezifischen Knockdown des onkogenen *K-Ras*<sup>V12</sup>-Allels in humanen Tumorzellen verloren diese ihre Tumorgenität.<sup>[133]</sup> Außerdem wurden lentivirale Vektoren eingesetzt, um shRNA-Expressionskassetten gegen Viren oder deren Rezeptoren auf den Wirtszellen einzubringen. Zur Inhibition des Hepatitis-C-Virus (HCV) erwies sich ein lentiviraler Vektor als besonders effizient, der mehrere shRNAs gegen das Virusgenom und den Wirtszellrezeptor CD81 gleichzeitig produziert und so die HCV-Replikation, die CD81-Expression und die Bindung des HCV-Oberflächenproteins E2 blockiert.<sup>[134]</sup> Die intensiven Bemühungen, lentivirale Vektoren zum Transfer von shRNA-Expressionskassetten zur Behandlung von HIV-Infektionen einzusetzen, und eine bereits laufende diesbezügliche klinische Studie werden in Abschnitt 6.3.2 beschrieben.

## 5.2.2. Adenovirale Vektoren

Adenoviren haben ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom und verursachen beim Menschen vor allem Atemwegserkrankungen. Die genomische DNA von Adenoviren verbleibt in den befallenen Zellen episomal, sodass kein Risiko der Insertionsmutagenese besteht. Allerdings lösen Adenoviren eine starke Immunreaktion aus, die in einer klinischen Studie sogar zu einem tödlichen Zwischenfall führte.<sup>[135]</sup> Bei der ersten Generation adenoviraler Vektoren wurden Teile der frühen Gene entfernt. Um die Immunogenität weiter zu verringern und mehr Kapazität für das Transgen zu schaffen, wurden bei den Adenovirusvektoren der zweiten Generation die weiteren frühen Gene *E2* und/oder *E4* entfernt. Bei den neuesten Vektoren, als Gutless-Vektoren bezeichnet, sind alle kodierenden Sequenzen deletiert, sodass außer dem Transgen nur die terminalen invertierten Sequenzwiederholungen (Inverted Terminal Repeats, ITRs) und das Verpackungssignal  $\Psi$  übrigbleiben.<sup>[136]</sup> Hierdurch werden die Toxizität und Immunogenität der Vektoren drastisch verringert, und eine langfristige Expression des Transgens wird ermöglicht.

Adenovirale Vektoren wurden bereits in verschiedenen medizinischen Bereichen zum Knockdown von schädlichen Genen eingesetzt. Beispielsweise wurden sowohl Meerschweinchen als auch Schweine durch einen shRNA exprimierenden Adenovirusvektor gegen Infektionen mit dem Virus der Maul- und Klauenseuche geschützt.<sup>[137]</sup> Der Adenovirusvektor-vermittelte Transfer von shRNA-Expressionskassetten wird auch für die Behandlung von Herzerkrankungen entwickelt. Die Störung des Calciumhaushaltes ist eine wichtige Ursache für Herzversagen. Durch RNAi-vermittelte Inhibition von Phospholamban, einem Inhibitor der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  Pump, SERCA2A), gelang es in primären neonatalen Rattenkardiomyozyten, die Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum wieder zu erhöhen.<sup>[138]</sup>

## 5.2.3. Vektoren auf der Basis von Adeno-assoziierten Viren

Adeno-assoziierte Viren (AAV) gehören zur Familie der *Parvoviridae* und haben ein vergleichsweise kleines, lineares, einzelsträngiges DNA-Genom. Sie sind vielversprechende Fähren für den Gentransfer, da sie die Zielzellen effizient transduzieren und für den Menschen nicht pathogen sind. Während natürliche AAVs in eine spezielle Region im Chromosom 19 integrieren, sind die hierfür notwendigen Gene aus den rekombinanten Vektoren gewöhnlich deletiert, sodass sie weitgehend episomal verbleiben. Trotzdem zeichnen sich AAV-Vektoren durch eine langfristige, stabile Expression des Transgens aus.

Für gentherapeutische Ansätze wurde zunächst der AAV-Serotyp 2 als Vektor entwickelt. Da dieser aber zahlreiche Zelltypen, beispielsweise Muskelzellen, nur ineffizient transduziert, wurden in den vergangenen Jahren vermehrt andere Serotypen eingesetzt, um den Tropismus (d.h. die Zelltypen und Gewebe, die von einem Virus befallen werden) zu erweitern. Dabei kann das Genom des AAV-2-Vektors in Capside anderer Serotypen verpackt werden, wobei so genannte pseudotyppisierte Vektoren entstehen, mit denen nun praktisch Zellen jedes beliebigen Gewebes transduziert werden können.<sup>[139]</sup> Auch ein weiterer Nachteil der konventionellen einzelsträngigen Vektoren, der späte Beginn der Transgenexpression, konnte beseitigt werden. Mit selbstkomplementären doppelsträngigen AAV-Vektoren wird die maximale Genexpression bereits nach wenigen Tagen erreicht.<sup>[140]</sup>

Wegen ihrer zahlreichen Vorteile werden AAV-Vektoren auch intensiv für RNAi-Experimente eingesetzt. Exemplarisch sei eine der ersten In-vivo-Studien genannt, in der das Dopamin synthetisierende Enzym Tyrosin-Hydroxylase im Mittelhirn von Mäusen mit shRNA exprimierenden AAV-Vektoren herunterreguliert wurde.<sup>[141]</sup> Als Konsequenz wurden Verhaltensänderungen wie motorische Defizite und veränderte Reaktionen auf Psychostimulatoren beobachtet. Für Zellkulturexperimente erwiesen sich die schneller wirksamen selbstkomplementären AAV-Vektoren als nützlich: 72 Stunden nach Transduktion einer Kultur von Fibroblasten aus Rattenlungen war die mRNA des Zielgens um bis zu 80% reduziert.<sup>[142]</sup>

## 6. Anwendungen der RNA-Interferenz

### 6.1. Untersuchungen von Genfunktionen

Die Sequenzierung des humanen Genoms sowie der Genome zahlreicher eukaryotischer Modellorganismen gilt als eine der wichtigsten Entwicklungen der vergangenen Jahrzehnte in den Lebenswissenschaften. Allerdings ist von zahlreichen Genen nur die Sequenz, nicht aber die Funktion der darin kodierten Genprodukte bekannt. Deren Ermittlung ist eine der wichtigsten Aufgaben der gegenwärtigen Forschung. Mit der RNAi hat sich zeitgleich mit dem Abschluss der großen Sequenzierprojekte eine Methode etabliert, die vergleichsweise einfach und schnell die Erzeugung von Loss-of-Function-Phänotypen ermöglicht. Aus den beobachteten

Auswirkungen des Ausschaltens eines Gens kann dabei auf dessen Funktion geschlossen werden. Dies führte dazu, dass sich RNAi innerhalb weniger Jahre zu einer Standardmethode in der molekularbiologischen Forschung entwickelt hat, die heute in sehr vielen biochemischen Laboren eingesetzt wird.

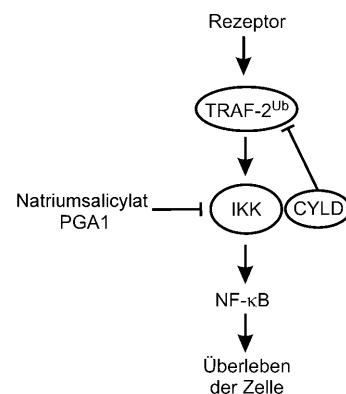
Da die Stummschaltung auf der Basenpaarung zwischen der mRNA des Zielgens und dem siRNA Guide-Strang basiert, können Genfunktionen wesentlich schneller untersucht werden, als dies mit niedermolekularen Inhibitoren möglich ist, die in aufwändigen Hochdurchsatz-Screens (High-Throughput-Screens) gewonnen werden müssen. Auch lassen sich eng verwandte Isoformen von Proteinen durch geeignete Auswahl der Zielsequenzen selektiv ausschalten, um deren spezifische Funktion zu untersuchen,<sup>[143]</sup> was mit pharmakologischen Wirkstoffen kaum zu erreichen ist. Doch selbst wenn das Ziel eines pharmazeutischen Projektes die Entwicklung eines traditionellen Medikamentes ist, so bietet sich RNAi als eine sehr schnelle Methode zur Targetvalidierung an.<sup>[144]</sup>

Allerdings müssen die in Abschnitt 4 diskutierten unspezifischen Effekte bei RNAi-Anwendungen bedacht werden, sodass von den Journals schon frühzeitig geeignete Kontrollen festgelegt wurden, mit deren Hilfe die Spezifität eines RNAi-Ansatzes nachgewiesen werden sollte.<sup>[145]</sup> Dazu zählen unter anderem geeignete siRNA-Kontrollen, der Nachweis des Knockdowns auf mRNA- und Proteinebene, Dosis-Wirkungs-Kurven der siRNA oder die Verwendung mehrerer siRNAs gegen dasselbe Zielgen.

## 6.2. Screens mit genomweiten Bibliotheken

Mit siRNA-Bibliotheken können zahlreiche Gene gleichzeitig untersucht werden. Bei einem der ersten Beispiele hierfür wurden sämtliche Mitglieder der Familie der desubiquitylierenden Enzyme selektiv durch shRNAs ausgeschaltet.<sup>[146]</sup> Auf diese Weise wurde herausgefunden, dass der Knockdown des familiären Zylindromatose-Tumorsuppressors (CYLD) die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B nach TNF- $\alpha$ -Stimulation erhöht (Abbildung 9). Interessanterweise ließ sich diese Aktivierung durch ein Aspirin-Derivat verhindern. Daraufhin wurden Patienten mit Zylindromatose, zumeist gutartigen Tumoren an der Kopfhaut, mit Salicylsäuresalbe behandelt, was zum Teil zu vollständigen Remissionen führte.<sup>[147]</sup> Dieses Beispiel zeigt, wie RNAi bereits zu neuen Indikationen für lange bekannte Wirkstoffe geführt hat.

Mittlerweile gibt es eine Reihe von Bibliotheken aus siRNAs, Endoribonuclease-präparierten siRNAs sowie shRNA exprimierenden Retrovirusvektoren, die das gesamte humane Genom abdecken. Genomweite Screens werden vor allem in virologischen oder onkologischen Studien eingesetzt. So konnten beispielsweise mit einem umfassenden Screen mit jeweils vier siRNAs gegen 21 000 humane Gene über 250 zelluläre Faktoren identifiziert werden, die HIV-1 für die Infektion benötigt.<sup>[148]</sup> Dadurch werden nicht nur Informationen über den viralen Lebenszyklus gewonnen, sondern auch mögliche neue Zielstrukturen für die Therapie identifi-



**Abbildung 9.** Funktion des Tumorsuppressors CYLD, die durch einen RNAi-Screen ermittelt wurde. CYLD wirkt im NF- $\kappa$ B-Signalweg inhibierend. Durch Wegfall der CYLD-Funktion kommt es zu Wucherungen. In den Signalweg kann inhibierend durch Natriumsalicylat oder Prostaglandin-1 (PGA1) eingegriffen werden. TRAF: TNF-Rezeptor-assoziiert Faktor; IKK: I $\kappa$ B-Kinase-Komplex. Schema modifiziert nach Lit. [146].

ziert. In einem Screen unter Verwendung von retroviralen Vektoren mit miRNA-Typ-shRNAs gegen etwa 3000 Gene wurden Proteine identifiziert, die in die Proliferation von Krebszellen involviert sind.<sup>[149]</sup> Mit einem weiteren, genomweiten Screen konnten mögliche Tumorsuppressorgene ausgemacht werden, die benötigt werden, um die Proliferation von Fibroblasten und Melanozyten durch eine aktivierte Mutante des *braf*-Protoonkogens zu blockieren.<sup>[150]</sup>

## 6.3. Therapeutische Anwendungen

Bei der therapeutischen Anwendung von siRNAs kann auf Jahrzehntelange Erfahrungen zurückgegriffen werden, die bei der klinischen Entwicklung von Antisense-Oligonukleotiden<sup>[151]</sup> und Ribozymen<sup>[152]</sup> gemacht wurden. Nur so lässt sich erklären, dass bereits dreieinhalb Jahre, nachdem siRNAs erstmals in Säugerzellen eingesetzt worden waren, die ersten RNAi-Anwendungen am Menschen begannen. Antisense-Oligonukleotide und siRNAs unterscheiden sich von konventionellen Wirkstoffen durch ihre Größe, weshalb die Synthese in großem Maßstab erhebliche Schwierigkeiten bereitet und hohe Kosten verursacht. Bei siRNAs kommt erschwerend hinzu, dass die beiden Strände separat synthetisiert und anschließend hybridisiert werden müssen. Dabei muss gewährleistet sein, dass ein einheitlicher Wirkstoff entsteht, der nicht zuletzt auch den Anforderungen der Arzneimittelbehörden genügt. Aufgrund des zuvor diskutierten Transportproblems wurden für die ersten grundlegenden Studien lokale Verabreichungen gewählt. Im Folgenden sollen die am weitesten fortgeschrittenen, RNAi-basierten klinischen Entwicklungen kurz dargestellt werden (Tabelle 2).

### 6.3.1. Augenerkrankungen

Das Auge ist ein räumlich eng begrenztes Organ mit geringer Nucleaseaktivität, in das der Wirkstoff vergleichsweise

**Tabelle 2:** RNAi in klinischen Studien (basierend auf Lit. [153]).

Firma	Erkrankung	Produkt	Status
Sirna/MERCK	AMD	Sirna-027/AGN211745	Phase II
Quark Pharma. (Pfizer)	AMD	RTP801i-14	Phase I/II
Opko Health	AMD	Bevasiranib	Phase III
Benitec/City of Hope	HIV/AIDS	Lentivirus Vektor	Phase I
Nucleonics Inc.	HBV	NUC B1000	Phase I
Alnylam Pharma.	RSV	ALN-RSV-02	Phase II
Senetek PLC	Glioblastoma multiforme	ATN-RNA	Phase I
Calando Pharma.	solide Tumoren	CALAA-01	Phase I
Quark Pharma.	akutes Nierenversagen	AKli-5	Phase I
TransDerm Inc.	Pachyonychia congenita	TD101	Phase Ib
Santaris Pharma.	HCV	SPC3649	Phase I

einfach intravitreal (direkt in den Glaskörper) injiziert werden kann. Die beiden einzigen bislang von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Oligonukleotide dienen der Behandlung von Augenerkrankungen. Das Antisense-Oligonukleotid Fomivirs ist gegen das Cytomegalovirus gerichtet, das bei AIDS-Patienten eine Retinitis auslöst; Macugen ist ein Aptamer zur Behandlung der altersbedingten Degeneration der Macula (AMD), einer der häufigsten Erblindungserkrankungen bei älteren Menschen. Die erste RNAi-basierte klinische Studie wurde Ende 2004 mit einer siRNA gegen VEGF begonnen. Durch die Inhibition der VEGF-Expression soll die Neovaskularisation bei Patienten mit AMD aufgehalten werden. Die siRNA wird mittlerweile von der Firma Opko Health unter dem Namen Bevasiranib in einer Phase-III-Studie getestet.

Sirna Therapeutics (mittlerweile eine Tochterfirma von Merck & Co. Inc., USA) initiierte die erste klinische Studie mit einer chemisch modifizierten siRNA. Die siRNA mit der Bezeichnung Sirna-027 wurde durch ungepaarte Desoxythymidine mit einer Phosphorothioatbindung und invertierten abasischen Zuckern an den Enden des Antisense- und Sense-Stranges stabilisiert und ist gegen den VEGF-Rezeptor-1 gerichtet. Auch dieser Ansatz dient der Behandlung von Patienten mit AMD. In einem Mausmodell für die choroidale Neovaskularisation reduzierte eine intravitreale Injektion der siRNA die Fläche der Neovaskularisation um bis zu 66%.<sup>[154]</sup> Die bereits in Abschnitt 4 diskutierte Studie von Kleinmann et al.<sup>[105]</sup> hinterfragt den Wirkmechanismus der siRNAs gegen VEGF und dessen Rezeptor allerdings kritisch. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass die antiangiogenetische Wirkung nicht auf einem Knockdown der Zielgene, sondern vielmehr auf extrazellulärer TLR-3-Aktivierung beruht.

In einer weiteren klinischen Studie wird nach Angaben der Firma Quark Pharmaceuticals die siRNA RTP801i-14 gegen das Hypoxie-induzierbare Gen *rtp801* zur Behandlung der AMD eingesetzt. Möglicherweise ist dieser Ansatz sicherer und effizienter als die Anti-VEGF-Wirkstoffe.

### 6.3.2. Virusinfektionen

Virusinfektionen sind ein immer drängenderes medizinisches Problem. Die Zahl der chronischen Infektionen mit HIV-1 sowie HBV und HCV steigt stetig an. Zu einer zusätzlichen Bedrohung sind neue Virusvarianten wie das Influenzavirus H5N1 oder neue Viren wie das SARS-Corona-

virus geworden. Durch das enge Zusammenleben von Menschen und Nutztieren in einigen Regionen der Welt und durch den intensiven globalen Verkehr ist mit immer neuen Gefahren durch Viren zu rechnen. Dem enormen Bedarf an virushemmenden Agentien stehen nur vergleichsweise wenige zugelassene Wirkstoffe zur Behandlung von Virusinfektionen gegenüber. Dies zeigt die Notwendigkeit der Entwicklung neuer antiviraler Strategien.

RNAi basiert auf der komplementären Basenpaarung zwischen einer Ziel-RNA und dem Guide-Strang der siRNA, daher

kann diese Technik schnell an jede beliebige Variante eines Virus oder auch an neue Virustypen angepasst werden. Dies ist ein großer Vorteil der RNAi gegenüber konventionellen Ansätzen, bei denen langwierige Optimierungen niedermolekularer Wirkstoffe notwendig sind. Seit den ersten Berichten über die antivirale Wirkung von siRNAs gegen das respiratorische Syncytial-Virus (RSV)<sup>[155]</sup> wurden daher erfolgreiche RNAi-Anwendungen gegen die meisten Klassen medizinisch relevanter Viren, darunter HIV-1, HBV, HCV, SARS-Corona-, Influenza-, Polio- oder Coxsackieviren publiziert.<sup>[156]</sup>

Eine wichtige Rolle bei RNAi-Ansätzen gegen Viren spielt die Auswahl einer geeigneten Zielsequenz. Virale RNAs sind zum Teil sehr strukturiert, wodurch die Effizienz der Inhibition mithilfe einer siRNA erheblich gemindert werden kann (siehe Abschnitt 2.1). Beispielsweise ist die HIV-1-TAR-RNA für RISC unzugänglich und ließ sich erst spalten, nachdem die feste Struktur durch 2'-O-Methyl-RNA-Oligonukleotide gegen benachbarte Regionen zur siRNA-Bindungsstelle aufgebrochen wurde.<sup>[157]</sup>

Eines der größten Probleme für längerfristige Anwendungen der RNAi gegen Viren ist ein Entkommen des Virus (viraler Escape). Sowohl für Polioviren<sup>[158]</sup> also auch für HIV<sup>[159]</sup> wurde beschrieben, dass die Virusreplikation anfangs effizient blockiert werden kann, der Virustiter aber nach einer Zeit wieder ansteigt, da sich Mutanten gebildet haben, die sich der Inhibition entziehen können. Bei Genen, die für das Virus nicht essenziell sind – beispielsweise dem *nef*-Gen von HIV-1 – kann es zu Deletionen kommen.<sup>[160]</sup> In der Regel umgehen die Viren die RNAi-vermittelte Stummschaltung jedoch durch Punktmutationen in der Zielsequenz. Eine umfassende Analyse von 500 HIV-1-Mutanten hat ergeben, dass dabei spezielle Positionen bevorzugt mutiert sind.<sup>[161]</sup>

Um ein solches Entkommen zu vermeiden, sollten die siRNAs daher gegen möglichst konservierte Regionen des Virus gerichtet werden. Nichtstrukturproteine werden oftmals von Mutationen stärker betroffen sein als Capsidproteine, doch wurde berichtet, dass es sich bei den Basenaustauschen häufig um stille Mutationen handelt.<sup>[162]</sup> Dieser Ausweg des Virus kann verhindert werden, indem konservierte Regionen ausgewählt werden, die eine Strukturfunktion haben, die durch Mutationen gestört werden würde. So konnten Coxsackieviren durch eine siRNA gegen das konservierte Cis-aktive Replikationselement (CRE) langfristig inhibiert werden, während sich Resistenzen gegen eine

siRNA bildeten, die eine strukturell nicht bedeutsame Region zum Ziel hatte.<sup>[163]</sup>

Selbst bei sorgfältiger Auswahl der Zielsequenz wird bei RNAi-Ansätze jedoch eine Kombinationstherapie vonnöten sein, wie sie bei der konventionellen Behandlung von Virusinfektionen bereits zum Einsatz kommt. In Analogie zur hochaktiven antiretroviralnen Therapie (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART), bei der mehrere niedermolekulare Wirkstoffe gegen HIV-1 eingesetzt werden, können mehrere siRNAs oder shRNAs gegen das Virus angewendet werden. Durch die Kombination von vier shRNA-Expressionskassetten in einem lentiviralen Vektor konnte das bei einer einzelnen shRNA beobachtete Entkommen von HIV-1 vermieden werden.<sup>[164]</sup>

Die Alternative zur Verwendung von siRNAs gegen das Virus besteht darin, zelluläre Faktoren herunterzuregulieren, die das Virus zum Eindringen in die Zelle und zur Replikation benötigt. Bei zellulären Genen wird die Gefahr der Anpassung des Virus durch Mutationen drastisch verringert. Entscheidend ist jedoch, dass das entsprechende Protein für die Zelle verzichtbar ist. Dies ist beispielsweise beim HIV-1-Co-Rezeptor CCR5 der Fall: Mutationen im *CCR5*-Gen haben keine gesundheitlichen Konsequenzen, schützen die Betroffenen aber vor HIV-1-Infektionen. Durch den RNAi-vermittelten Knockdown von CCR5 ließen sich hämatopoetische Stammzellen gegen HIV-1 schützen.<sup>[165]</sup> Dieser Ansatz ist nicht für HIV-1 spezifisch – so führt die Stummschaltung des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors zu einer deutlichen Eindämmung der Replikation von CVB-3.<sup>[166–168]</sup>

Für einen möglichst umfassenden Schutz gegen Escape-Mutanten wurden bei einer kürzlich begonnenen klinischen Studie zur Behandlung von HIV-1-infizierten Patienten mehrere Zielstrukturen und RNA-basierte Strategien kombiniert: Von einem einzigen lentiviralen Vektor werden eine shRNA gegen *rev* und *tat* von HIV-1, ein Hammerhead-Ribozym gegen CCR5 und ein Decoy-Oligonucleotid, das über sterische Wechselwirkungen mit dem Transactivation-Response(TAR)-Element interagiert, exprimiert.<sup>[169,170]</sup> Hierbei findet der Gentransfer ex vivo statt, d.h., den Patienten werden zunächst blutbildende Stammzellen entnommen, die in Kulturschalen mit dem Vektor transduziert und dann wieder infundiert werden.

In einem therapeutischen Programm zur Behandlung von HBV-Infektionen entwickelt die Firma Nucleonics Inc. einen Vektor mit vier shRNAs gegen verschiedene Segmente des viralen Genoms. Hierdurch soll wiederum ein Entkommen des Virus verhindert werden. Eine klinische Studie der Phase I unter Verwendung des Vektors mit der Bezeichnung NUC B1000 wurde 2007 begonnen.

Die Lunge ist eines der Organe, in die sich siRNAs vergleichsweise problemlos einbringen lassen, sodass sich RNAi-Ansätze zur Behandlung von Atemwegsinfektionen anbieten. In einem Mausmodell konnten Infektionen mit RSV durch intranasal verabreichte siRNAs inhibiert werden.<sup>[110]</sup> Daraufhin wurde eine klinische Studie initiiert, um die Verträglichkeit der siRNA ALN-RSV01 in gesunden Probanden zu überprüfen. Nach kürzlich veröffentlichten Ergebnissen wurden keine schweren Nebenwirkungen beobachtet, und die systemische Bioverfügbarkeit der intranasal verabreichten

siRNA war erwartungsgemäß minimal.<sup>[171]</sup> Daher wurden in einer Phase-II-Studie die Sicherheit und virusinhibierende Wirkung von ALN-RSV01 in infizierten Erwachsenen untersucht. Die siRNA wurde nach Angaben der Firma Alnylam Pharmaceuticals wiederum gut toleriert und zeigte statistisch signifikante antivirale Aktivität.

### 6.3.3. Krebserkrankungen

Ein weiteres Feld, in dem große Hoffnungen in die RNAi gesetzt werden, ist die Krebsforschung.<sup>[172]</sup> Es ist naheliegend, Faktoren wie Onkogene zu inhibieren, die die ungehemmte Proliferation von Tumorzellen bewirken. Des Weiteren kann die Expression von Genen blockiert werden, die zur Tumangiogenese führen, also zum Wachstum von Blutgefäßen für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors. Außerdem können Ziele ausgewählt werden, die für die Metastasierung verantwortlich sind, da der Primärtumor in der Regel chirurgisch entfernt werden kann und die Metastasen oftmals das eigentliche Problem darstellen. Schließlich kann RNAi eingesetzt werden, um resistente Tumorzellen wieder für Chemotherapeutika oder Radiotherapie zu sensibilisieren. Der wichtigste Weg, über den Krebszellen resistent gegen Chemotherapeutika werden, ist die Expression des Multiwirkstoffresistenz(*mdr*)-Gens. Wird *mdr* durch siRNAs supprimiert, so werden die Zellen wieder empfindlich gegen die Chemotherapeutika.<sup>[173]</sup>

Es gibt mittlerweile eine ganze Reihe publizierter Studien, in denen in Tiermodellen gezeigt werden konnte, dass sich Tumorengewicht durch RNAi verlangsamen lässt. Beispielsweise inhibierten siRNAs gegen CD31 das Tumorengewicht in verschiedenen Xenograft-Mausmodellen (Mäusen mit transplantiertem Fremdgewebe).<sup>[174]</sup> Die siRNAs drangen als Lipoplexe in die Tumorendothelzellen ein und blockierten die Angiogenese.

Eine weitere interessante Option besteht darin, die Antitumorkompetenz onkolytischer Viren durch RNAi zu erhöhen. Während gewöhnliche virale Vektoren so verändert sind, dass sie sich nach ihrer Herstellung nicht mehr replizieren können (siehe Abschnitt 5.2), vermehren sich onkolytische Adenoviren spezifisch in Krebszellen und zerstören diese durch Zelltod. Wird ein solches Virus mit einer shRNA-Expressionskassette (beispielsweise gegen das mutierte *K-ras*<sup>V12</sup>-Onkogen) ausgestattet, so wird die inhibierende Wirkung auf das Tumorengewicht verstärkt.<sup>[175]</sup>

In einer ersten klinischen RNAi-Krebsstudie wurden Patienten mit *Glioblastoma multiforme* behandelt.<sup>[176]</sup> Diese Hirntumore sind mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln kaum zu behandeln, und die Prognose für die Betroffenen ist äußerst schlecht. Der RNAi-Ansatz richtete sich gegen Tenascin-C, das in Tumorgeweben stark exprimiert wird. Durch die RNAi-Behandlung wurde bei mehreren Patienten das Wiederauftreten operativ entfernter Glioblastome verhindert. Das Produkt wird nun von Senetek PLC weiterentwickelt. Calando Pharmaceuticals setzt nach eigenen Angaben eine unmodifizierte siRNA gegen die M2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase in einer Phase-I-Studie zur Behandlung solider Tumoren ein, wobei die siRNA über ein spezielles Nanopartikel transportiert wird. Silence

Therapeutics plant eine klinische Studie mit einem siRNA-Lipoplex (Atu027). Die liposomal formulierte 2'-O-Methyl-modifizierte siRNA (AtuPLEX) ist gegen die Expression von Proteinkinase N3 (PKN3) gerichtet. Für die nahe Zukunft haben weitere Firmen klinische Studien zu RNAi-Ansätzen gegen verschiedene Krebserkrankungen angekündigt.<sup>[177]</sup>

### 6.3.4. Weitere klinische Studien

In einer weiteren klinischen Studie soll RNAi als Therapiestrategie bei akutem Nierenversagen eingesetzt werden. Es war gezeigt worden, dass die temporäre Inhibition des Tumorsuppressors p53 Zellschädigungen verhindern kann.<sup>[178]</sup> Dies soll nun genutzt werden, indem die siRNA AKLi-5 die Expression von p53 zeitlich begrenzt inhibiert. In einer Phase-I-Studie soll die Sicherheit von AKLi-5 bei Patienten überprüft werden, für die wegen einer schweren kardiovaskulären Operation ein hohes Risiko für akutes Nierenversagen besteht.

Im Januar 2008 hat TransDerm Inc. eine klinische Studie zur Behandlung der autosomal-dominant vererbten Erkrankung Pachyonychia congenita begonnen, einer Störung der Verhornung. Die siRNA wird intradermal injiziert und inhibiert spezifisch die Expression der Keratinmutation K6a, die die Krankheit auslöst.<sup>[179]</sup>

Außerdem wird die Blockade einer endogenen miRNA als therapeutische Strategie getestet. In Versuchen mit nichthumanen Primaten konnte die leberspezifische miRNA-122 durch ein komplementäres LNA-Oligonukleotid inhibiert werden.<sup>[180]</sup> Die LNA wurde systemisch (intravenös) verabreicht und löste keine auffälligen toxischen Nebenreaktionen aus. Durch Inhibition der miRNA-122 wurde der Cholesterinspiegel im Plasma gesenkt. Diese miRNA ist noch für eine weitere Indikation ein interessantes Zielmolekül, da HCV sie für die Replikation benötigt. Gemäß einer Presseinformation der dänischen Firma Santaris Pharmaceuticals wurde im Mai 2008 eine klinische Studie mit dem LNA-Inhibitor der miRNA-122 begonnen.

### 6.4. Kommerzielle Aspekte der RNAi

Da RNAi eine stark anwendungsorientierte Technik ist, hat sie auch große kommerzielle Bedeutung. Die praktische Anwendung der RNAi unterliegt mehreren grundlegenden Patenten, zu deren wichtigsten die als Tuschl I und II bekannten Patente sowie das Patent Kreutzer-Limmer I gehören. Während das Patent Tuschl II, das sich auf die typischen, 19–21 Basenpaare langen siRNAs mit 3'-Überhängen bezieht, bereits erteilt wurde, steht die Entscheidung über Tuschl I noch aus. Das Patent Kreutzer-Limmer I wurde in Europa (aber noch nicht in den USA) erteilt, allerdings wurde über den genauen Umfang noch nicht entschieden.<sup>[153]</sup> Eine starke Patentposition hält die US-amerikanische Biotechnologiefirma Alnylam Pharmaceuticals. Außer den genannten Kernpatenten zur RNAi gehören hierzu auch Patente zu chemischen Modifikationen und zum Transport der siRNAs. Entsprechend konnte Alnylam mehrere große Deals machen, beispielsweise eine umfangreiche Forschungskooperation mit

Novartis im Jahre 2005. Im Juli 2007 hat die Roche AG für 331 Millionen Dollar nichtexklusive Lizizenzen von Alnylam erhalten und deren europäische Forschungseinheit gekauft. Viel Aufsehen erregt hat die Übernahme von Sirna Therapeutics durch Merck & Co. für 1.1 Milliarden Dollar Ende 2006. An diesen Transaktionen zeigt sich, dass auch die großen Pharmafirmen das Potenzial der RNAi erkannt haben und bereit sind, viel Geld in diese neue Technik zu investieren. Weitere Details zur Patentlage sowie den wichtigsten Geschäften im RNAi-Bereich sind in einer kürzlich erschienenen Übersicht zusammengestellt.<sup>[153]</sup>

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

RNA-Interferenz hat sich innerhalb weniger Jahre zu einer der wichtigsten Techniken in der biomedizinischen Forschung entwickelt. Die einfache und effiziente Möglichkeit zur Inhibition der Expression eines spezifischen Gens ermöglicht die Aufklärung der Funktion von Proteinen, deren Bedeutung bislang unbekannt ist. Doch ist die RNAi nicht nur zu einer Standardmethode in der Molekularbiologie geworden – vielmehr hat sie bereits Eingang in die Klinik gefunden. Rund ein Dutzend klinischer Studien auf RNAi-Basis laufen bereits, und die ersten Ergebnisse sind vielversprechend. Grundsätzlich lassen sich Knockdown-Techniken zur Behandlung sämtlicher Erkrankungen einsetzen, bei denen ein schädliches Gen überexprimiert wird (Krebs, Virusinfektionen, Entzündungen usw.). Allerdings müssen die zwei Hauptprobleme der RNAi gelöst werden, bevor sie zu einer breit anwendbaren Standardtherapie werden kann: die Fragen der Spezifität und des effizienten Transports zu den Zielzellen. Wie zuvor ausgeführt, können siRNAs unspezifische Nebenwirkungen auslösen und das Immunsystem aktivieren. Diese unerwünschten Effekte können jedoch durch geschickte Wahl der Sequenz und den Einsatz modifizierter Nucleotide verminder werden.

Es wird intensiv an der Entwicklung von Trägersystemen gearbeitet, mit denen die siRNAs in die Zielzellen gelangen können. Trotz der Fortschritte in den vergangenen Jahren sind noch Weiterentwicklungen vonnöten, um systemisch applizierte siRNAs effizient an den Wirkort zu bringen. Hier bieten auch virale Vektorsysteme für shRNA-Expressionskassetten zusätzliche Optionen des effizienten und organspezifischen Transportes. Allerdings muss dieser Ansatz zunächst Vorbehalte wegen der negativen Erfahrungen mit der Gentherapie überwinden. Dann könnten sich die beiden Strategien, der Transport chemisch synthetisierter siRNAs und die vektorvermittelte Expression von shRNAs, jedoch – je nach Anwendungsbereich – sinnvoll ergänzen.

Mit den in den kommenden Jahren zu erwartenden Fortschritten bei der Lösung der genannten Probleme könnte die Vision mancher RNAi-Forscher Wirklichkeit werden: Durch genomweite Screens mit siRNA-Bibliotheken könnten danach neue Zielstrukturen für Krankheiten wie Krebs identifiziert werden, die sich mit der beim Screening verwendeten siRNA funktionell untersuchen und validieren lassen. Anschließend würde dasselbe Molekül nach einem Standardschema durch chemische Modifikationen optimiert

und mit speziellen Transportagentien im Tiermodell getestet, bevor die siRNA (oder die entsprechende shRNA) direkt zur Therapie am Menschen eingesetzt werden könnte. Auf diese Weise wäre eine noch nie da gewesene Beschleunigung bei der Entwicklung neuer Therapieoptionen erreicht.

Mit siRNAs wird in der Regel versucht, ein einzelnes Zielmolekül spezifisch zu inhibieren, doch haben bereits die Erfahrungen im Antisense-Bereich gelehrt, dass dies gerade für komplexe Erkrankungen wie Krebs unter Umständen nicht ausreichend sein kann. Im Unterschied dazu wirken miRNAs auf zahlreiche Ziel-RNAs ein, sodass mit der Inhibition einer miRNA umfassendere Regulationen erreicht werden können. Möglicherweise erzielen die bereits ange laufenen oder für die nahe Zukunft geplanten klinischen Studien zur Inhibition von miRNAs sogar die größere therapeutische Wirkung. Die kommenden Jahre werden zeigen, ob die RNAi nach dem Siegeszug in den Forschungslabatorien auch die Versprechungen der Antisense-Strategie einlösen wird, eine neue medizinische Option für eine molekulär-kausale Therapie zu bieten.

*Mein besonderer Dank gilt meinen Mitarbeitern, deren unermüdlicher Einsatz zu den Fortschritten der Forschungsarbeiten meiner Gruppe beigetragen hat. Volker A. Erdmann möchte ich für die fortwährende Unterstützung während meiner Habilitation danken. Bei Henry Fechner, Jörg Kaufmann, Harry Kurreck, Hans-Peter Vornlocher und Denise Werk bedanke ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Der DFG (Ku-1436/1, SFB/TR19 TP C1), dem BMBF/RNA Netzwerk und dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungstätigkeiten.*

Eingegangen am 5. Mai 2008

Online veröffentlicht am 19. Januar 2009

- [1] C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell* **1990**, *2*, 279–289.
- [2] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [3] C. C. Mello, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7114–7124; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985–6994.
- [4] A. Z. Fire, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7094–7113; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6966–6984.
- [5] G. Taroncher-Oldenburg, A. Marshall, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 961.
- [6] S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188–200.
- [7] J. Liu, M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, G. J. Hannon, *Science* **2004**, *305*, 1437–1441.
- [8] J. J. Song, S. K. Smith, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Science* **2004**, *305*, 1434–1437.
- [9] T. Röhrl, J. Kurreck, *J. Neurochem.* **2006**, *99*, 371–380.
- [10] C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, P. D. Zamore, *Cell* **2005**, *123*, 607–620.
- [11] T. A. Rand, S. Petersen, F. Du, X. Wang, *Cell* **2005**, *123*, 621–629.
- [12] I. J. MacRae, E. Ma, M. Zhou, C. V. Robinson, J. A. Doudna, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 512–517.
- [13] M. J. Clemens, A. Elia, *J. Interferon Cytokine Res.* **1997**, *17*, 503–524.
- [14] M. R. Player, P. F. Torrence, *Pharmacol. Ther.* **1998**, *78*, 55–113.
- [15] L. Manche, S. R. Green, C. Schmedt, M. B. Mathews, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 5238–5248.
- [16] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, *Nature* **2001**, *409*, 363–366.
- [17] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [18] S. Weitzer, J. Martinez, *Nature* **2007**, *447*, 222–226.
- [19] D. R. Corey, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 8–11.
- [20] G. L. Sen, H. M. Blau, *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 633–636.
- [21] J. R. Bertrand, M. Pottier, A. Vekris, P. Opolon, A. Maksimenko, C. Malvy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 1000–1004.
- [22] A. Grunweller, E. Wysko, B. Bieber, R. Jahn, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3185–3193.
- [23] A. Watanabe, M. Arai, M. Yamazaki, N. Koitabashi, F. Wuytack, M. Kurabayashi, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2004**, *37*, 691–698.
- [24] T. Christoph, A. Grunweller, J. Mika, M. K. Schafer, E. J. Wade, E. Weihe, V. A. Erdmann, R. Frank, C. Gillen, J. Kurreck, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *350*, 238–243.
- [25] T. S. Zimmermann, A. C. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M. N. Fedoruk, J. Harborth, J. A. Heyes, L. B. Jeffs, M. John, A. D. Judge, K. Lam, K. McClinton, L. V. Nechev, L. R. Palmer, T. Racie, I. Rohl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A. J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, I. MacLachlan, *Nature* **2006**, *441*, 111–114.
- [26] M. Bühler, D. Moazed, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1041–1048.
- [27] Übersicht: W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, N. Sonenberg, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 102–114.
- [28] M. L. Yeung, Y. Bennasser, K. T. Jeang, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 191–197.
- [29] B. Berkhout, J. Haasnoot, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2896–2902.
- [30] P. Jin, R. S. Alisch, S. T. Warren, *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 1048–1053.
- [31] N. Bushati, S. M. Cohen, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, *23*, 175–205.
- [32] A. A. Aravin, G. J. Hannon, J. Brennecke, *Science* **2007**, *318*, 761–764.
- [33] T. Watanabe, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Obata, H. Chiba, Y. Kohara, T. Kono, T. Nakano, M. A. Surani, Y. Sakaki, H. Sasaki, *Nature* **2008**, *453*, 539–543.
- [34] O. H. Tam, A. A. Aravin, P. Stein, A. Girard, E. P. Murchison, S. Cheloufi, E. Hodges, M. Anger, R. Sachidanandam, R. M. Schultz, G. J. Hannon, *Nature* **2008**, *453*, 534–538.
- [35] C. A. Stein, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 737–738.
- [36] T. Holen, M. Amarzguioui, M. T. Wiiger, E. Babaie, H. Prydz, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1757–1766.
- [37] Übersicht: J. Kurreck, *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 83757.
- [38] A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, *Cell* **2003**, *115*, 209–216.
- [39] D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell* **2003**, *115*, 199–208.
- [40] Y. Tomari, C. Matranga, B. Haley, N. Martinez, P. D. Zamore, *Science* **2004**, *306*, 1377–1380.
- [41] A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall, A. Khvorova, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 326–330.
- [42] D. Huesken, J. Lange, C. Mickanin, J. Weiler, F. Asselbergs, J. Warner, B. Meloon, S. Engel, A. Rosenberg, D. Cohen, M. Labow, M. Reinhardt, F. Natt, J. Hall, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 995–1001.

- [43] J. Hong, N. Wei, A. Chalk, J. Wang, Y. Song, F. Yi, R. P. Qiao, E. L. Sonnhammer, C. Wahlestedt, Z. Liang, Q. Du, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *368*, 703–708.
- [44] V. Patzel, S. Rutz, I. Dietrich, C. Koberle, A. Scheffold, S. H. Kaufmann, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1440–1444.
- [45] U. Krueger, T. Bergauer, B. Kaufmann, I. Wolter, S. Pilka, M. Heider-Fabian, S. Kirch, C. Artz-Oppitz, M. Isselhorst, J. Konrad, *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 237–250.
- [46] R. Kretschmer-Kazemi Far, G. Szakiel, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4417–4424.
- [47] M. Overhoff, M. Alken, R. K. Far, M. Lemaitre, B. Lebleu, G. Szakiel, I. Robbins, *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 871–881.
- [48] S. Schubert, A. Grunweller, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 883–893.
- [49] Y. Shao, C. Y. Chan, A. Maliekkel, C. E. Lawrence, I. B. Roninson, Y. Ding, *RNA* **2007**, *13*, 1631–1640.
- [50] E. M. Westerhout, B. Berkhouit, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4322–4330.
- [51] Y. Ding, C. Y. Chan, C. E. Lawrence, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W135–141.
- [52] D. H. Kim, M. A. Behlke, S. D. Rose, M. S. Chang, S. Choi, J. J. Rossi, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 222–226.
- [53] D. Siolas, C. Lerner, J. Burchard, W. Ge, P. S. Linsley, P. J. Paddison, G. J. Hannon, M. A. Cleary, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 227–231.
- [54] Übersicht: F. Buchholz, R. Kittler, M. Slabicki, M. Theis, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 696–700.
- [55] D. R. Corey, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 3615–3622.
- [56] H. Y. Zhang, Q. Du, C. Wahlestedt, Z. Liang, *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 893–900.
- [57] M. Manoharan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 570–579.
- [58] J. Martinez, A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Luhrmann, T. Tuschl, *Cell* **2002**, *110*, 563–574.
- [59] A. Grunweller, C. Gillen, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 345–352.
- [60] C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H. P. Vornlocher, C. Unverzagt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4975–4977.
- [61] J. Harborth, S. M. Elbashir, K. Vandenberghe, H. Manninga, S. A. Scaringe, K. Weber, T. Tuschl, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2003**, *13*, 83–105.
- [62] D. A. Braasch, S. Jensen, Y. Liu, K. Kaur, K. Arar, M. A. White, D. R. Corey, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7967–7975.
- [63] Y. L. Chiu, T. M. Rana, *RNA* **2003**, *9*, 1034–1048.
- [64] F. Czauderna, M. Fechtner, S. Dames, H. Aygun, A. Klippe, G. J. Pronk, K. Giese, J. Kaufmann, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2705–2716.
- [65] A. Santel, M. Aleku, O. Keil, J. Endruschat, V. Esche, G. Fisch, S. Dames, K. Loffler, M. Fechtner, W. Arnold, K. Giese, A. Klippe, J. Kaufmann, *Gene Ther.* **2006**, *13*, 1222–1234.
- [66] A. Grünweller, R. K. Hartmann, *BioDrugs* **2007**, *21*, 235–243.
- [67] S. Kauppinen, B. Vester, J. Wengel, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, *173*, 405–422.
- [68] H. Kaur, B. R. Babu, S. Maiti, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4672–4697.
- [69] J. Elmen, H. Thonberg, K. Ljungberg, M. Frieden, M. Wettergaard, Y. Xu, B. Wahren, Z. Liang, H. Orum, T. Koch, C. Wahlestedt, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 439–447.
- [70] O. R. Mook, F. Baas, M. B. de Wissel, K. Fluiter, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 833–843.
- [71] S. Schubert, D. Rothe, D. Werk, H. P. Grunert, H. Zeichhardt, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *Antiviral Res.* **2007**, *73*, 197–205.
- [72] J. B. Bramsen, M. B. Laursen, C. K. Damgaard, S. W. Lena, B. R. Babu, J. Wengel, J. Kjems, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 5886–5897.
- [73] D. V. Morrissey, K. Blanchard, L. Shaw, K. Jensen, J. A. Lockridge, B. Dickinson, J. A. McSwiggen, C. Vargeese, K. Bowman, C. S. Shaffer, B. A. Polisky, S. Zinnen, *Hepatology* **2005**, *41*, 1349–1356.
- [74] Übersicht: Y. Shi, *Trends Genet.* **2003**, *19*, 9–12.
- [75] T. R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami, *Science* **2002**, *296*, 550–553.
- [76] M. A. Carmell, L. Zhang, D. S. Conklin, G. J. Hannon, T. A. Rosenquist, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 91–92.
- [77] G. Tiscornia, O. Singer, M. Ikawa, I. M. Verma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1844–1848.
- [78] J. Seibler, B. Kuter-Luks, H. Kern, S. Streu, L. Plum, J. Mauer, R. Kuhn, J. C. Bruning, F. Schwenk, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e67.
- [79] T. Christoph, G. Bahnenberg, J. De Vry, W. Englberger, V. A. Erdmann, M. Frech, B. Kogel, T. Rohl, K. Schiene, W. Schroder, J. Seibler, J. Kurreck, *Mol. Cell. Neurosci.* **2008**, *37*, 579–589.
- [80] P. Honore, C. T. Wismer, J. Mikusa, C. Z. Zhu, C. Zhong, D. M. Gauvin, A. Gomtsyan, R. El Kouhen, C. H. Lee, K. Marsh, J. P. Sullivan, C. R. Faltynek, M. F. Jarvis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314*, 410–421.
- [81] H. Hasuwa, K. Kaseda, T. Einarsdottir, M. Okabe, *FEBS Lett.* **2002**, *532*, 227–230.
- [82] M. C. Golding, C. R. Long, M. A. Carmell, G. J. Hannon, M. E. Westhusin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5285–5290.
- [83] Y. Zeng, E. J. Wagner, B. R. Cullen, *Mol. Cell* **2002**, *9*, 1327–1333.
- [84] D. Boden, O. Pusch, R. Silbermann, F. Lee, L. Tucker, B. Ramratnam, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1154–1158.
- [85] K. H. Chung, C. C. Hart, S. Al-Bassam, A. Avery, J. Taylor, P. D. Patel, A. B. Vojtek, D. L. Turner, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e53.
- [86] M. K. Rao, M. F. Wilkinson, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1494–1501.
- [87] S. Kappel, Y. Matthess, M. Kaufmann, K. Strehhardt, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3257–3269.
- [88] S. Kappel, Y. Matthess, B. Zimmer, M. Kaufmann, K. Strehhardt, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 4527–4536.
- [89] J. Seibler, A. Kleinridders, B. Kuter-Luks, S. Niehaves, J. C. Bruning, F. Schwenk, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e54.
- [90] H. Fechner, J. Kurreck in *Therapeutic Oligonucleotides* (Hrsg.: J. Kurreck), Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge **2008**, S. 267–295.
- [91] L. Fritsch, L. A. Martinez, R. Sekhri, I. Naguibneva, M. Gerard, M. Vandromme, L. Schaeffer, A. Harel-Bellan, *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 178–182.
- [92] S. Schubert, H. P. Grunert, H. Zeichhardt, D. Werk, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 457–465.
- [93] D. Semizarov, L. Frost, A. Sarthy, P. Kroeger, D. N. Halbert, S. W. Fesik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6347–6352.
- [94] A. L. Jackson, S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet, P. S. Linsley, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 635–637.
- [95] Y. Fedorov, E. M. Anderson, A. Birmingham, A. Reynolds, J. Karpilow, K. Robinson, D. Leake, W. S. Marshall, A. Khvorova, *RNA* **2006**, *12*, 1188–1196.
- [96] A. Birmingham, E. M. Anderson, A. Reynolds, D. Ilsley-Tyree, D. Leake, Y. Fedorov, S. Baskerville, E. Maksimova, K. Robinson, J. Karpilow, W. S. Marshall, A. Khvorova, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 199–204.
- [97] E. M. Anderson, A. Birmingham, S. Baskerville, A. Reynolds, E. Maksimova, D. Leake, Y. Fedorov, J. Karpilow, A. Khvorova, *RNA* **2008**, *14*, 853–861.
- [98] A. L. Jackson, J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova, P. S. Linsley, *RNA* **2006**, *12*, 1197–1205.
- [99] C. A. Sledz, M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, B. R. Williams, *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 834–839.
- [100] A. J. Bridge, S. Pebernard, A. Ducraux, A. L. Nicoulaz, R. Iggo, *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 263–264.

- [101] V. Hornung, M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougerolles, S. Endres, G. Hartmann, *Nat. Med.* **2005**, *11*, 263–270.
- [102] A. D. Judge, V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 457–462.
- [103] M. Schlee, V. Hornung, G. Hartmann, *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 463–470.
- [104] E. Uhlmann in *Therapeutic Oligonucleotides* (Hrsg.: J. Kurreck), Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge **2008**, S. 142–162.
- [105] M. E. Kleinman, K. Yamada, A. Takeda, V. Chandrasekaran, M. Nozaki, J. Z. Baffi, R. J. Albuquerque, S. Yamasaki, M. Itaya, Y. Pan, B. Appukuttan, D. Gibbs, Z. Yang, K. Kariko, B. K. Ambati, T. A. Wilgus, L. A. DiPietro, E. Sakurai, K. Zhang, J. R. Smith, E. W. Taylor, J. Ambati, *Nature* **2008**, *452*, 591–597.
- [106] S. Saxena, Z. O. Jonsson, A. Dutta, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44312–44319.
- [107] J. G. Doench, C. P. Petersen, P. A. Sharp, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 438–442.
- [108] D. Grimm, K. L. Streetz, C. L. Jopling, T. A. Storm, K. Pandey, C. R. Davis, P. Marion, F. Salazar, M. A. Kay, *Nature* **2006**, *441*, 537–541.
- [109] M. John, R. Constien, A. Akinc, M. Goldberg, Y. A. Moon, M. Spranger, P. Hadwiger, J. Soutschek, H. P. Vornlocher, M. Manoharan, M. Stoffel, R. Langer, D. G. Anderson, J. D. Horton, V. Koteliansky, D. Bumcrot, *Nature* **2007**, *449*, 745–747.
- [110] V. Bitko, A. Musiyenko, O. Shulyayeva, S. Barik, *Nat. Med.* **2005**, *11*, 50–55.
- [111] A. P. McCaffrey, L. Meuse, T. T. Pham, D. S. Conklin, G. J. Hannon, M. A. Kay, *Nature* **2002**, *418*, 38–39.
- [112] R. Juliano, M. R. Alam, V. Dixit, H. Kang, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4158–4171.
- [113] D. V. Morrissey, J. A. Lockridge, L. Shaw, K. Blanchard, K. Jensen, W. Breen, K. Hartsough, L. Machemer, S. Radka, V. Jadhav, N. Vaish, S. Zinnen, C. Vargeese, K. Bowman, C. S. Shaffer, L. B. Jeffs, A. Judge, I. MacLachlan, B. Polisky, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1002–1007.
- [114] Q. Ge, L. Filip, A. Bai, T. Nguyen, H. N. Eisen, J. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8676–8681.
- [115] Z. Medarova, W. Pham, C. Farrar, V. Petkova, A. Moore, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 372–377.
- [116] Z. Liu, M. Winters, M. Holodniy, H. Dai, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2069–2073; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2023–2027.
- [117] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racine, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, *Nature* **2004**, *432*, 173–178.
- [118] J. J. Turner, S. Jones, M. M. Fabani, G. Ivanova, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, *Blood Cells Mol. Dis.* **2007**, *38*, 1–7.
- [119] M. Overhoff, G. Sczakiel, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 1176–1181.
- [120] E. Song, P. Zhu, S. K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D. M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D. B. Weiner, P. Shankar, W. A. Marasco, J. Lieberman, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 709–717.
- [121] T. C. Chu, K. Y. Twu, A. D. Ellington, M. Levy, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e73.
- [122] J. O. McNamara, II, E. R. Andrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilboa, B. A. Sullenger, P. H. Giangrande, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1005–1015.
- [123] P. Kumar, H. Wu, J. L. McBride, K. E. Jung, M. H. Kim, B. L. Davidson, S. K. Lee, P. Shankar, N. Manjunath, *Nature* **2007**, *448*, 39–43.
- [124] K. Zhang, Q. Wang, Y. Xie, G. Mor, E. Sega, P. S. Low, Y. Huang, *RNA* **2008**, *14*, 577–583.
- [125] S. Akhtar, I. F. Benter, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 3623–3632.
- [126] C. Reinsch, E. Siepi, A. Dieckmann, S. Panzner in *Therapeutic Oligonucleotides* (Hrsg.: J. Kurreck), Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, **2008**, S. 226–240.
- [127] I. MacLachlan in *Therapeutic Oligonucleotides* (Hrsg.: J. Kurreck), Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, **2008**, S. 241–266.
- [128] M. L. Edelstein, M. R. Abedi, J. Wixon, *J. Gene Med.* **2007**, *9*, 833–842.
- [129] D. Grimm, M. A. Kay, *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2007**, 473–481.
- [130] M. Cavazzana-Calvo, S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist, A. Fischer, *Science* **2000**, *288*, 669–672.
- [131] S. Hacein-Bey-Abina, C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabitts, F. Le Deist, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, *Science* **2003**, *302*, 415–419.
- [132] T. Abbas-Terki, W. Blanco-Bose, N. Deglon, W. Pralong, P. Aebsicher, *Hum. Gene Ther.* **2002**, *13*, 2197–2201.
- [133] T. R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami, *Cancer Cell* **2002**, *2*, 243–247.
- [134] S. D. Henry, P. van der Wegen, H. J. Metselaar, H. W. Tilanus, B. J. Scholte, L. J. van der Laan, *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 485–493.
- [135] S. Lehrman, *Nature* **1999**, *401*, 517–518.
- [136] R. Alba, A. Bosch, M. Chillon, *Gene Ther.* **2005**, *12 Suppl 1*, S18–27.
- [137] W. Chen, M. Liu, Y. Jiao, W. Yan, X. Wei, J. Chen, L. Fei, Y. Liu, X. Zuo, F. Yang, Y. Lu, Z. Zheng, *J. Virol.* **2006**, *80*, 3559–3566.
- [138] H. Fechner, L. Suckau, J. Kurreck, I. Sipo, X. Wang, S. Pinkert, S. Loschen, J. Rekittke, S. Weger, D. Dekkers, R. Vetter, V. A. Erdmann, H. P. Schultheiss, M. Paul, J. Lamers, W. Poller, *Gene Ther.* **2007**, *14*, 211–218.
- [139] D. Grimm, M. A. Kay, *Curr. Gene Ther.* **2003**, *3*, 281–304.
- [140] Z. Wang, H. I. Ma, J. Li, L. Sun, J. Zhang, X. Xiao, *Gene Ther.* **2003**, *10*, 2105–2111.
- [141] J. D. Hommel, R. M. Sears, D. Georgescu, D. L. Simmons, R. J. DiLeone, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1539–1544.
- [142] Z. Han, M. Gorbatyuk, J. Thomas, Jr., A. S. Lewin, A. Srivastava, P. W. Stacpoole, *Mitochondrion* **2007**, *7*, 253–259.
- [143] C. Warnecke, Z. Zaborowska, J. Kurreck, V. A. Erdmann, U. Frei, M. Wiesener, K. U. Eckardt, *FASEB J.* **2004**, *18*, 1462–1464.
- [144] M. Chatterjee-Kishore, C. P. Miller, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1559–1565.
- [145] *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 489–490.
- [146] T. R. Brummelkamp, S. M. Nijman, A. M. Dirac, R. Bernards, *Nature* **2003**, *424*, 797–801.
- [147] H. M. Oosterkamp, H. Neering, S. M. Nijman, A. M. Dirac, W. J. Mooi, R. Bernards, T. R. Brummelkamp, *Br. J. Dermatol.* **2006**, *155*, 182–185.
- [148] A. L. Brass, D. M. Dykxhoorn, Y. Benita, N. Yan, A. Engelman, R. J. Xavier, J. Lieberman, S. J. Elledge, *Science* **2008**, *319*, 921–926.
- [149] M. R. Schlabach, J. Luo, N. L. Solimini, G. Hu, Q. Xu, M. Z. Li, Z. Zhao, A. Smogorzewska, M. E. Sowa, X. L. Ang, T. F. Westbrook, A. C. Liang, K. Chang, J. A. Hackett, J. W. Harper, G. J. Hannon, S. J. Elledge, *Science* **2008**, *319*, 620–624.

- [150] N. Wajapeyee, R. W. Serra, X. Zhu, M. Mahalingam, M. R. Green, *Cell* **2008**, *132*, 363–374.
- [151] S. T. Crooke, *Annu. Rev. Med.* **2004**, *55*, 61–95.
- [152] S. Schubert, J. Kurreck, *Curr. Drug Targets* **2004**, *5*, 667–681.
- [153] D. Hausecker, *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 451–462.
- [154] J. Shen, R. Samul, R. L. Silva, H. Akiyama, H. Liu, Y. Saishin, S. F. Hackett, S. Zinnen, K. Kossen, K. Fosnaugh, C. Vargeese, A. Gomez, K. Bouhana, R. Aitchison, P. Pavco, P. A. Campochiaro, *Gene Ther.* **2006**, *13*, 225–234.
- [155] V. Bitko, S. Barik, *BMC Microbiol.* **2001**, *1*, 34.
- [156] Übersicht: J. Haasnoot, E. M. Westerhout, B. Berkhouw, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1435–1443.
- [157] K. M. Brown, C. Y. Chu, T. M. Rana, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 469–470.
- [158] L. Gitlin, J. K. Stone, R. Andino, *J. Virol.* **2005**, *79*, 1027–1035.
- [159] D. Boden, O. Pusch, F. Lee, L. Tucker, B. Ramratnam, *J. Virol.* **2003**, *77*, 11531–11535.
- [160] A. T. Das, T. R. Brummelkamp, E. M. Westerhout, M. Vink, M. Madiredjo, R. Bernards, B. Berkhouw, *J. Virol.* **2004**, *78*, 2601–2605.
- [161] K. J. von Eije, O. ter Brake, B. Berkhouw, *J. Virol.* **2008**, *82*, 2895–2903.
- [162] S. Merl, R. Wessely, *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 44–53.
- [163] H. S. Lee, J. Ahn, Y. Jee, I. S. Seo, E. J. Jeon, E. S. Jeon, C. H. Joo, Y. K. Kim, H. Lee, *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 2003–2012.
- [164] O. T. Brake, K. Hooft, Y. P. Liu, M. Centlivre, K. Jasmijn von Eije, B. Berkhouw, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 557–564.
- [165] J. Anderson, R. Akkina, *Gene Ther.* **2007**, *14*, 1287–1297.
- [166] C. B. Coyne, J. M. Bergelson, *Cell* **2006**, *124*, 119–131.
- [167] H. Fechner, S. Pinkert, X. Wang, I. Sipo, L. Suckau, J. Kurreck, A. Dorner, K. Sollerbrant, H. Zeichhardt, H. P. Grunert, R. Vetter, H. P. Schultheiss, W. Poller, *Gene Ther.* **2007**, *14*, 960–971.
- [168] D. Werk, S. Schubert, V. Lindig, H. P. Grunert, H. Zeichhardt, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *Biol. Chem.* **2005**, *386*, 857–863.
- [169] M. J. Li, J. Kim, S. Li, J. Zaia, J. K. Yee, J. Anderson, R. Akkina, J. J. Rossi, *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 900–909.
- [170] L. Scherer, M. S. Weinberg, J. J. Rossi in *Therapeutic Oligonucleotides* (Hrsg.: J. Kurreck), Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, **2008**, S. 316–328.
- [171] J. Devincenzo, J. E. Cehelsky, R. Alvarez, S. Elbashir, J. Harborth, I. Toudjarska, L. Nechev, V. Murugaiah, A. V. Vliet, A. K. Vaishnav, R. Meyers, *Antiviral Res.* **2008**, *77*, 225–231.
- [172] S. I. Pai, Y. Y. Lin, B. Macaes, A. Meneshian, C. F. Hung, T. C. Wu, *Gene Ther.* **2006**, *13*, 464–477.
- [173] H. Wu, W. N. Hait, J. M. Yang, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1515–1519.
- [174] A. Santel, M. Aleku, O. Keil, J. Endruschat, V. Esche, B. Durieux, K. Löffler, M. Fechtnar, T. Rohl, G. Fisch, S. Dames, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel, J. Kaufmann, *Gene Ther.* **2006**, *13*, 1360–1370.
- [175] Y. A. Zhang, J. Nemunaitis, S. K. Samuel, P. Chen, Y. Shen, A. W. Tong, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9736–9743.
- [176] R. Zukiel, S. Nowak, E. Wyszko, K. Rolle, I. Gawronska, M. Z. Barciszewska, J. Barciszewski, *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5*, 1002–1007.
- [177] D. H. Kim, J. J. Rossi, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 173–184.
- [178] P. G. Komarov, E. A. Komarova, R. V. Kondratov, K. Christov-Tselkov, J. S. Coon, M. V. Chernov, A. V. Gudkov, *Science* **1999**, *285*, 1733–1737.
- [179] F. J. Smith, R. P. Hickerson, J. M. Sayers, R. E. Reeves, C. H. Contag, D. Leake, R. L. Kaspar, W. H. McLean, *J. Invest. Dermatol.* **2008**, *128*, 50–58.
- [180] J. Elmén, M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjarn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup, S. Kauppinen, *Nature* **2008**, *452*, 896–899.