

# Nachweis von RNA-Interferenz im Menschen nach systemischer Gabe von siRNAs

Jens Kurreck\*

Nanopartikel · RNA · RNA-Interferenz ·  
Interferierende RNA

Die rasanten Entwicklungen der RNA-Interferenz (RNAi) in den vergangenen Jahren haben die Hoffnung genährt, dass mit dieser Technik schon bald neue Möglichkeiten zur Therapie bislang nicht behandelbarer Erkrankungen zur Verfügung stehen könnten. Für die 1998 publizierte Entdeckung des RNAi-Mechanismus im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*<sup>[1]</sup> wurden Andrew Fire und Craig Mello 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin oder Physiologie geehrt. Bei der RNAi handelt es sich um einen evolutionär konservierten Mechanismus, bei dem die Expression von Genen sequenzspezifisch durch doppelsträngige RNA-Moleküle auf posttranskriptioneller Ebene inhibiert wird.<sup>[2,3]</sup> Die Anwendbarkeit der RNAi für medizinische Zwecke wurde realistisch, nachdem 2001 von Thomas Tuschl und seinen Mitarbeitern gezeigt werden konnte, dass sich kurze, nur 21 Basenpaare lange interferierende RNAs (small interfering RNAs, siRNAs) eignen, auch in Säugerzellen RNAi auszulösen, ohne eine Interferonantwort zu induzieren.<sup>[4]</sup> Nur gut drei Jahre nach dieser Entdeckung begannen bereits die ersten klinischen Studien auf Basis der RNAi.

Mit diesen raschen Fortschritten schien die RNAi endlich die Versprechungen einzulösen, die von Antisense- und Ribozym-basierten Ansätzen nie erfüllt wurden: Mithilfe der anti-mRNA-Strategien sollte sich die Expression eines beliebigen schädlichen Gens spezifisch blockieren lassen, sodass Krebsgene oder Viren einfach zu inhibieren sein sollten. Wie andere Felder der molekularen Medizin, beispielsweise die Gentherapie oder der Einsatz monoklonaler Antikörper, musste jedoch auch die RNAi-Forschung schwere Rückschläge hinnehmen. Zunächst zeigte sich, dass die RNAi weniger spezifisch ist als zunächst angenommen und unter Umständen sogar eine Interferon-Antwort auslösen kann,<sup>[5]</sup> und dann erwiesen sich intrazellulär hoch exprimierte kurze Haarnadel-RNAs (short hairpin RNAs, shRNAs) als lebertoxisch.<sup>[6]</sup> Einen weiteren Dämpfer stellte eine Arbeit dar, in der infrage gestellt wurde, ob klinisch eingesetzte siRNAs überhaupt über den RNAi-Mechanismus wirken oder nicht vielmehr eine unspezifische Antwort hervorrufen.<sup>[7]</sup> Für die

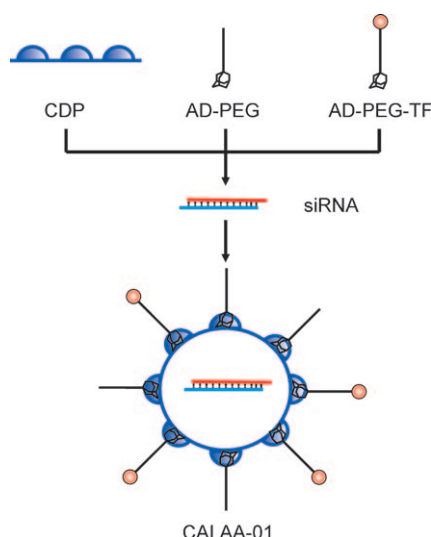
Studien wurde eine siRNA direkt ins Auge injiziert, die gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF oder dessen Rezeptor gerichtet ist und in Tierversuchen die Neubildung von Blutgefäßen (Neovaskularisierung) in der Makula verhindert, wodurch der Verlust der Sehfähigkeit aufgehoben wird. Nach der Studie von Kleinmann et al.<sup>[7]</sup> haben nun aber Kontroll-siRNAs dieselbe Wirkung wie die spezifischen siRNAs gezeigt, vermutlich weil sie den Toll-Like-Rezeptor 3 (TLR-3) aktivieren. Abgesehen von der zum Teil eingeschränkten Spezifität besteht eine der größten Hürden für die therapeutische Anwendung der RNAi im Transport der siRNAs in das Zielgewebe und in deren zellulärer Aufnahme (Delivery).

In einer kürzlich in *Nature* publizierten Arbeit konnten nun sowohl bezüglich des Transportes als auch des Nachweises der RNAi-Wirkung einer siRNA im Menschen maßgebliche Fortschritte erzielt werden: In einer klinischen Studie wurde eine siRNA mit speziellen Nanopartikeln in Tumorzellen eingebracht, und es konnte mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) der Nachweis erbracht werden, dass die siRNA den Abbau der Ziel-RNA über den RNAi-Mechanismus induziert hatte.<sup>[8]</sup>

In der Phase-I-Studie wurden Patienten mit Melanomen behandelt, bei denen die Standardtherapie nicht wirkte. Hierbei wurde eine siRNA eingesetzt, die gegen die mRNA eines etablierten Ziels für die Krebstherapie gerichtet ist, die M2-Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase (RRM2). Den Patienten wurden die siRNAs an den Tagen 1, 3, 8 und 10 eines 21-tägigen Zyklus verabreicht. Dabei wurden verschiedene Dosierungen verwendet.

Die Besonderheit des Ansatzes bestand in der Verwendung eines zielgerichteten Nanopartikel-Transportsystems (Abbildung 1). Diese Nanopartikel bestehen aus einer Schale aus einem linearen, Cyclodextrin-basierten Polymer. Des Weiteren enthält es Polyethylenglycol(PEG)-Moleküle mit Adamantan an den Enden, das mit dem Cyclodextrin einen Komplex bildet. Für einen zielgerichteten Transport waren die Nanopartikel an der Außenseite mit dem Transferrin-Protein bestückt. Dieses bindet an Transferrin-Rezeptoren, die sich besonders zahlreich auf der Oberfläche von Krebszellen befinden und so den Eintritt der Nanopartikel in die Zellen vermitteln. Zum Abschluss wird die siRNA in das Innere der Nanopartikel mit der Bezeichnung CALAA-01 eingebaut.

[\*] Prof. Dr. J. Kurreck  
Institut für Biotechnologie, Technische Universität Berlin  
Seestraße 13, 13353 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-314-27502  
E-Mail: jens.kurreck@tu-berlin.de  
Homepage: <http://www.angewbiochem.tu-berlin.de>



**Abbildung 1.** Aufbau des Nanopartikels CALAA-01 für den zielgerichteten Transport von siRNAs. Das Nanopartikel wird aus einem linearen Cyclodextrin-basierten Polymer (CDP), Polyethylenglycol mit Adamantan an den Enden (AD-PEG) und weiteren PEG-Molekülen, die das Transferrin (TF)-Protein tragen, sowie der umschlossenen siRNA aufgebaut.

In den meisten bislang laufenden klinischen Studien zur RNAi wurden die siRNAs lokal appliziert, beispielsweise direkt ins Auge, in die Lunge oder auf die Haut. Hier nun werden erstmals Ergebnisse einer systemischen Administration präsentiert, d.h., die Patienten erhielten die siRNAs durch eine 30-minütige intravenöse Infusion. Über das Transferrin sollten die Nanopartikel dann den Weg über den Blutstrom in das Tumorgewebe finden. In der Tat konnten die Nanopartikel intrazellulär in Tumorbiospien nachgewiesen werden. Hierbei korrelierte die detektierte Menge mit der applizierten Dosis.

Ein wichtiger Beleg für ein erfolgreiches RNAi-Experiment ist der Nachweis des Knockdowns des Zielgens. Mithilfe quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) konnten die Autoren zeigen, dass die Boten-RNAs der RRM2 nach der RNAi-Anwendung in geringeren Mengen vorlagen als zu Beginn der Behandlung. Auch das Protein-Niveau, das im Western Blot und mit Immunhistochemie untersucht wurde, war nach der Behandlung niedriger. Allerdings ist diese Verringerung noch kein endgültiger Beweis, dass die siRNAs über den RNAi-Mechanismus gewirkt haben. Denkbar wäre auch, dass es sich um einen unspezifischen Effekt handeln könnte. Außerdem können bei Versuchen mit Menschen aus ethischen Gründen keine kompletten Datensätze mit allen wünschenswerten Kontrollen erhoben werden.

Wegen dieser Unsicherheit haben Davis et al. in weiteren Experimenten nachgewiesen, dass tatsächlich ein RNAi-Effekt beobachtet wurde. Hierzu haben sie eine spezielle PCR-Methode eingesetzt, mit der die Spaltung der Ziel-mRNA direkt nachgewiesen werden kann. Im RNAi-Weg wird die siRNA in einen multimeren Proteinkomplex, den RNA-Induced Silencing Complex (RISC), eingebaut, wobei einer der beiden RNA-Stränge verloren geht. Der andere Strang führt

nun RISC zur Ziel-mRNA und hybridisiert mit dieser. Das Argonauten-Protein 2 im RISC spaltet daraufhin die Ziel-RNA zwischen dem zehnten und elften Nucleotid vom 5'-Ende der siRNA aus gerechnet.

Um diese Schnittstelle zu bestätigen, wurde die spezielle PCR-Technik eingesetzt, bei der zunächst ein Adapter an das 5'-Ende der RNA ligiert wird. Anschließend wird die RNA revers transkribiert und mit PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte können anschließend direkt sequenziert werden. Auf diese Weise ließen sich zwar keine quantitativen Aussagen über die Menge des mRNA-Fragmentes treffen, doch konnte die Spaltstelle in der Sequenzierungsreaktion genau nachgewiesen werden. Damit war gezeigt, dass der Abbau der Ziel-mRNA kein unspezifischer Prozess, sondern tatsächlich eine RNAi-vermittelte Wirkung der siRNA war.

Interessanterweise konnten bei einem Patienten mRNA-Fragmente zu Beginn der zweiten Behandlungsrunde nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass der RNAi-Mechanismus über den Zeitraum zwischen den beiden Behandlungsrunden von etwa einem Monat hinweg aktiv gewesen sein muss. Die Dauer der RNAi-Wirkung hängt von der Verdopplungszeit der Zellen ab. Da der Patient zwischen den siRNA-Infusionen einen stabilen Krankheitsverlauf hatte, ist die Annahme realistisch, dass sich die Zellen nur langsam geteilt haben und daher eine lang anhaltende Wirkung beobachtet wurde. Es ist auch noch nicht bekannt, wie lange die Nanopartikel in den Zellen siRNAs freisetzen.

Gerade wegen der Euphorie um die RNAi-Methode wurden die oben genannten, kritischen Arbeiten zum Teil als undifferenziertes Globalargument gegen diese Technik herangezogen. Dabei wurde beispielsweise häufig übersehen, dass sich die Arbeit von Kleinmann et al.<sup>[7]</sup> in der beschrieben wurde, dass die Blockade der Neovaskularisierung möglicherweise eher über eine Aktivierung von TLR-3 als über einen spezifischen RNAi-Effekt geschieht, ausschließlich auf nackte siRNAs bezieht. Es herrscht aber weitgehend Konsens, dass für effiziente RNAi-Anwendungen Transportagentien eingesetzt werden müssen. Hier sind die nun beschriebenen, zielgerichteten Nanopartikel ein großer Fortschritt. In der vorliegenden Arbeit werden noch keine Angaben über den klinischen Erfolg der RNAi-Behandlung gemacht. Diese Informationen sollen nach Abschluss der Studien separat veröffentlicht werden. Auch ist es dringend notwendig, dass die Befunde noch bei größeren Patientenzahlen bestätigt werden. In der vorliegenden Studie wurden nur drei Patienten untersucht, und nur bei einem Patienten aus der höchsten Dosierungsgruppe konnten mRNA-Spaltprodukte nach der Behandlung detektiert werden. Gewiss ist auf jeden Fall, dass der hier erbrachte Nachweis, dass eine spezifische RNAi-Wirkung im Menschen ausgelöst werden kann, die medizinische Entwicklung der RNAi weiter beflügeln wird.

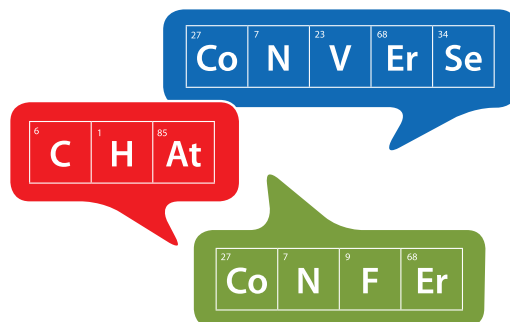
Eingegangen am 12. Mai 2010

Online veröffentlicht am 20. Juli 2010

[1] a) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, 391, 806–811; b) C. C. Mello, *Angew.*

- Chem.* **2007**, *119*, 7114–7124; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985–6994; c) A. Z. Fire, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7094–7113; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6966–6984.
- [2] K. Tiemann, J. J. Rossi, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 142–151.
- [3] J. Kurreck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1404–1426; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378–1398.
- [4] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [5] A. L. Jackson, P. S. Linsley, *Trends Genet.* **2004**, *20*, 521–524.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel, A. Ribas, *Nature* **2010**, *464*, 1067–1070.

## CONTENT FOR TODAY'S CHEMIST



Join **Chemistry by Wiley** on Facebook.

- Get news on latest conferences, products and free content
- Got an opinion – share it
- Meet other chemists



01308

Search for 'Chemistry by Wiley' and click the 'Become a Fan' link to get all the latest offers and free content from Wiley.

