

MicroRNAs – zukünftige Wirkstoff-Targets?*

Christoph Arenz*

Stichwörter:

Antisense-Wirkstoffe · Biokonjugate · Genexpression · microRNA · RNA

Ein großer Teil der Genregulation in Eukaryoten findet ganz offensichtlich auf der Ebene der RNA-Moleküle statt.^[1] Eine Gruppe von endogenen regulatorischen RNA-Molekülen, die microRNAs (miRNAs), wird zurzeit besonders intensiv untersucht. Diese kleinen RNA-Moleküle sollen an der Regulation von etwa 30% aller menschlichen Gene beteiligt sein;^[2] darüber hinaus gibt es immer mehr Hinweise, dass spezifische Veränderungen der miRNA-Expressionsmuster im Zusammenhang mit Krankheiten stehen.

MicroRNAs werden im Zellkern ausgehend von primären microRNAs (pri-miRNAs) gebildet (Abbildung 1). Diese Transkripte können autonom unter Kontrolle eines spezifischen Promotors oder auch als Intron eines proteinkodierenden Primärtranskripts durch die RNA-Polymerase II gebildet werden. Aus den pri-miRNAs werden durch die Ribonuclease Drosha eine oder mehrere Vorläufer-miRNAs (prä-miRNAs) gebildet. Diese prä-miRNAs bestehen aus 70–80 Nucleotiden und weisen eine typische haarnadelförmige Konformation auf. Mithilfe des Kerntransporters Exportin 5 werden die Vorläufer-miRNAs aus dem Kern ausgeschleust und gelangen so in das Cytosol. Dort werden sie von der Ribo-

nuclease Dicer an beiden Strängen des helicalen Stamms nucleolytisch gespalten. Die daraus resultierende doppelsträngige miRNA ist eine etwa 21 Basenpaare umfassende doppelsträngige RNA, die typischerweise 5'-Phosphatreste trägt und an den beiden 3'-Termini jeweils einen Überhang von zwei zusätzlichen Nucleotiden aufweist. Die miRNAs haben viele Gemeinsamkeiten mit den im Zusammenhang mit der RNA-Interferenz bekannt gewordenen siRNAs (= short interfering RNAs). Während die siRNAs in der Regel aus perfekt komplementären Doppelsträngen bestehen, haben die haarnadelförmigen miRNAs allerdings typischerweise eine oder mehrere Ausbuchtungen und Schleifen als Folge einer nur partiellen Selbstkomplementarität. Die reifen miRNAs binden anschließend an verschiedene Proteine unter Bildung eines miRNA-Protein-Komplexes (miRNP); dieser bewirkt eine Entwindung des miRNA-Doppelstranges und wird dadurch zum so genannten RISC („RNA-Induced Silencing Complex“, sww.: „RNA-induzierter Stilllegungskomplex“). Anders als die siRNAs, die perfekt komplementär zu den Ziel-mRNAs sind und so deren Degradation bewirken, sind miRNAs nicht völlig komplementär zu den entsprechenden mRNAs. Der miRNA-RISC bindet mRNA-Moleküle vorzugsweise innerhalb der 3'-gelegenen untranslatierten Regionen (3'-UTR). Diese teilweise komplementäre Bindung führt in der Regel zu einer Repression der Translation vieler unterschiedlicher mRNAs.

Zahlreiche Fragen zur Genregulation durch miRNAs sind derzeit noch unbeantwortet. So ist z.B. die Zahl der in verschiedenen Organismen vorkommenden miRNAs noch nicht abschließend geklärt. Bis zum heutigen Zeit-

punkt kennt man mehr als 320 validierte humane miRNAs, Schätzungen gehen allerdings von mindestens 400 und bis zu 1000 verschiedenen miRNAs im Menschen aus.^[3] Zudem ist, von wenigen Ausnahmen abgesehen, weder die Art noch die Zahl der durch die jeweiligen miRNAs regulierten Gene bekannt. Die Tatsache, dass die ersten entdeckten miRNAs die frühe Zellentwicklung über die Regulation von Proliferation, Differenzierung und programmiertem Zelltod (Apoptose) beeinflussen, nährte bei Biologen allerdings schon seit einigen Jahren den Verdacht, dass diese Substanzen auch eine Rolle bei der Entstehung von Krebs spielen könnten. Mittlerweile befassen sich zahlreiche Publikationen mit veränderten Expressionsmustern von miRNAs, die mit Krebserkrankungen wie dem Leberzellkarzinom und Schilddrüsen- oder Lungenkrebs korrelieren.^[4] Die krankheitsassoziierten Änderungen der miRNA-Expressionsmuster sind dabei oft so spezifisch, dass sich dadurch vollkommen neue diagnostische Möglichkeiten eröffnen.

So berichteten Croce und Mitarbeiter kürzlich über eine Assoziation von miRNA-Expressionsmustern mit mehreren diagnostischen und prognostischen Faktoren der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL).^[5] Die CLL ist die häufigste Art von Blutkrebs in den westlichen Industrienationen.^[6] Der Verlauf dieser Erkrankung variiert jedoch sehr stark von Patient zu Patient. Während einige Patienten einer frühen Behandlung bedürfen, vergehen andererseits oftmals mehr als zehn Jahre zwischen der erstmaligen Diagnose und einem plötzlich eintretenden, schnellen Fortschreiten der Krankheit, das eine therapeutische Behandlung erfordert. Verschiedene klinische Marker wie

[*] Prof. Dr. C. Arenz
Institut für Chemie
Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2
12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-8393
E-Mail:
christoph.arenz@chemie.hu-berlin.de

[**] Der Autor dankt dem Innovationsfonds der Humboldt-Universität zu Berlin und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

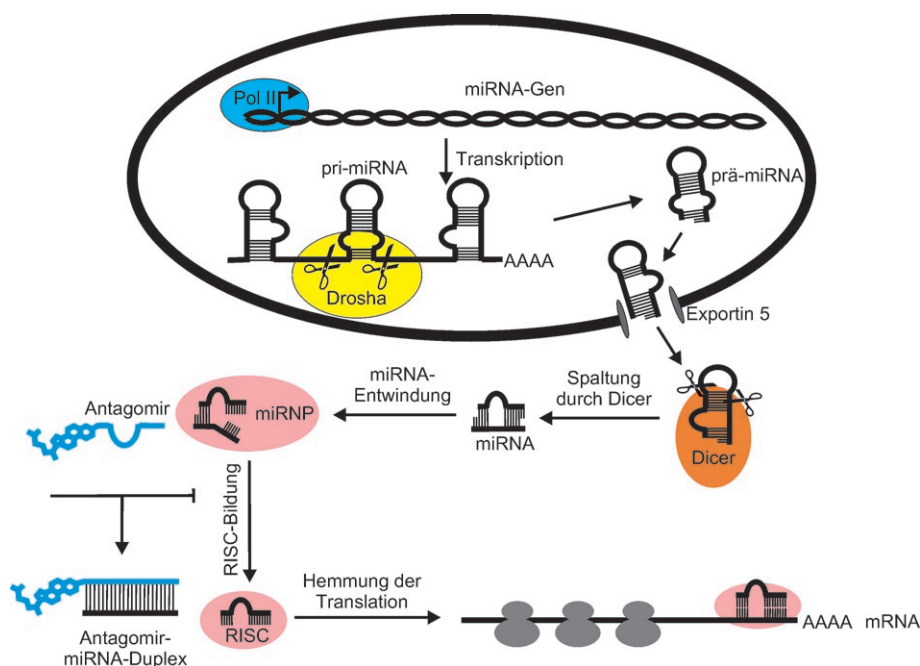


Abbildung 1. Bildung, Reifung und Wirkung von microRNAs (vereinfacht). Die Antagomir-Wirkstoffe hybridisieren mit den reifen miRNAs und verhindern so die Stilllegung der zugehörigen mRNAs.

ZAP-70 (Zeta-assoziiertes Protein, 70 kDa), eine Proteintyrosinkinase, können für eine Einteilung der Patienten in solche mit guter und solche mit schlechter Prognose herangezogen werden, um so die Notwendigkeit einer Behandlung beurteilen zu können. Anhand von speziell für menschliche miRNAs angefertigten Mikrochips^[7] konnte eine CLL-spezifische Veränderung in der Expression von 13 (aus 190 getesteten) miRNAs ausgemacht werden. In dieser Gruppe von miRNAs wiederum waren neun miRNAs jeweils bei den Patienten mit der aggressiveren Variante der CLL überexprimiert, bei denen nur eine kurze Zeitspanne zwischen Diagnose und initialer Behandlung lag. Patienten, bei denen dieser Zeitraum größer war, zeigten hingegen keine Überexpression der neun miRNAs. Im Rahmen dieser Studie konnte allerdings nicht beantwortet werden, ob die in ihrer Expression veränderten miRNAs ursächlich für das Auftreten der CLL sind.

Es gibt allerdings immer mehr Hinweise, dass zumindest einige miRNAs eine wichtige Rolle bei Entstehung und Progression von Krebserkrankungen einnehmen. So beschäftigen sich zwei aktuelle Publikationen mit dem Gen *miR-17-92*, das auf einem in B-Zell-

Lymphomen amplifizierten Chromosomenabschnitt liegt. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei dieser Krebsart die entsprechenden miRNAs im Vergleich zu denen gesunder Zellen tatsächlich hochreguliert sind. Außerdem bewirkt eine virale Expression von *miR-17-92* im Mausmodell, zusammen mit überexprimiertem c-Myc-Protein, dass die Entstehung von B-Zell-Lymphomen deutlich beschleunigt wird.^[8] Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist die Entdeckung, dass der in hohen Konzentrationen onkogen wirkende c-Myc-Transkriptionsfaktor offenbar auch die Transkription des *miR-17-92*-Clusters bewirkt.^[9]

Die vermehrten Berichte über eine Rolle von miRNAs im Zusammenhang mit Krankheiten wie Diabetes, neurologischen Erkrankungen und Krebs werfen automatisch die Frage auf, ob diese Erkenntnisse auch für die Entwicklung neuartiger therapeutischer Strategien genutzt werden könnten. Da viele Krebserkrankungen mit herabgesetzten miRNA-Spiegeln einhergehen, wird z.B. die Gabe von metabolisch stabilisierten miRNA-Analoga für eine Krebstherapie anvisiert.^[10] In den entgegengesetzten Fällen, in denen Erkrankungen durch eine erhöhte Expression einzelner miRNAs gekenn-

zeichnet sind, ist hingegen die Blockierung von miRNA-Funktionen angezeigt. So konnte z. B. mit gegen miRNAs gerichteten LNA-Antisense-Oligonucleotiden spezifisch die Funktion von miRNAs in *Drosophila*-Zellen inhibiert werden.^[11]

In einer kürzlich veröffentlichten Studie gelang es Krützfeldt et al., die Funktion definierter miRNAs in lebenden Mäusen durch die Gabe speziell entwickelter Antisense-Wirkstoffe stillzulegen.^[12] Eine Injektion dieser als Antagomire bezeichneten Moleküle in die Schwanzvenen von Mäusen führte jeweils zu einer spezifischen Reduktion von vier verschiedenen miRNAs in allen untersuchten Organen, mit Ausnahme des Gehirns. Eine genauere biochemische Untersuchung der mit Antagomir-122 behandelten Mäuse belegte, dass vor allem solche mRNA-Spiegel mindestens 1,4fach erhöht wurden (ca. 360 mRNAs), die über Erkennungssequenzen für die entsprechende miRNA-122 in ihren 3'-untranslatierten Regionen verfügten. Auf der Basis einer zuvor durchgeführten Bioinformatikanalyse wurde erwartet, dass mehrere Gene des Cholesterolfstoffwechsels durch miRNA-122 beeinflusst würden. In der Tat führte die Injektion von 240 mg kg⁻¹ der Antagomir-Wirkstoffe zu einer 40-proz.

Reduktion der HMG-CoA-Reduktase, dem Schrittmacherenzym der Cholesterolsynthese, sowie zu einer Reduktion der Plasma-Cholesterolspiegel in derselben Größenordnung.

Die als Antagomir bezeichneten Moleküle sind am 3'-Ende mit einem Cholesterolrest verknüpfte 2'-O-Methyloligoribonucleotide mit einem Phosphorthioatrückgrat.^[13] Derartige Modifikationen erleichtern nicht nur einen Eintritt der Nucleinsäuremimetika in die verschiedenen Gewebe und Zellen, sondern führen auch zu einer drastischen Erhöhung der biologischen Halbwertszeit der Substanzen. Durch die modifizierten Antisense-Moleküle, nicht aber durch Antisense-RNA, wurde sogar eine Degradation der entsprechenden miRNA-122 noch nach mehr als zwanzig Tagen beobachtet. Interessanterweise kam es neben der besagten Überexpression von mRNAs auch zu einer Herabregulation fast ebenso vieler mRNAs. Die Autoren spekulieren, dass es durch eine Degradation von miRNA-122 möglicherweise zu einer Heraufregulierung von Repressorproteinen kommt, wodurch die Expression von Effektorgenen inhibiert wird.

Die erste In-vivo-Studie mit gegen miRNAs gerichteten Wirkstoffen zeigt die prinzipielle Tragfähigkeit des Konzepts. Welche Auswirkungen die Antagomir-Wirkstoffe auf Proteinebene haben, wurde jedoch nur für wenige En-

zyme untersucht, die für den Cholesterolspiegel verantwortlich sind. Die physiologische Auswirkung einer kompletten, lang anhaltenden Degradation von miRNA-122 ist letztlich relativ gering. Möglicherweise bewirken miRNAs eher eine Feineinstellung als eine Aus- oder Anschaltung von assoziierten Genen. Daher bleibt die Frage, ob miRNAs tatsächlich geeignete Zielstrukturen für therapeutische Interventionen am Menschen sind, zum jetzigen Zeitpunkt offen.

-
- [1] Übersicht: E. Wienholds, R. H. Plasterk, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 5911–5922.
 - [2] B. P. Lewis, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Cell* **2005**, 120, 15–20.
 - [3] E. Berezikov, V. Gurjev, J. van de Belt, E. Wienholds, R. H. Plasterk, E. Cuppen, *Cell* **2005**, 120, 21–24.
 - [4] Ausgewählte Beispiele: a) S. Volinia, G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, C. M. Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 2257–2261; b) N. Yanaihara, N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R. M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G. A. Calin, C. G. Liu, C. M. Croce, C. C. Harris, *Cancer Cell* **2006**, 9, 189–198; c) Y. Murakami, T. Yasuda, K. Saigo, T. Urashima, H. Toyoda, T. Okanoue, K. Shimotohno, *Oncogene* **2006**, 25, 2537–2545; d) P. Pallante, R. Visone, M. Ferracin, A. Ferraro, M. T. Berlingieri, G. Troncone, G. Chiappetta, C. G. Liu, M. Santoro, M. Negrini, C. M. Croce, A. Fusco, *Endocr.-Relat. Cancer* **2006**, 13, 497–508.
 - [5] G. A. Calin, M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, C. M. Croce, *N. Engl. J. Med.* **2005**, 353, 1793–1801.
 - [6] M. J. Keating, N. Chiorazzi, B. Messmer, R. N. Damle, S. L. Allen, K. R. Rai, M. Ferrarini, T. J. Kipps, *Hematology* **2003**, 8, 153–175.
 - [7] C. G. Liu, G. A. Calin, B. Meloon, N. Gamliel, C. Sevignani, M. Ferracin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, S. Zupo, M. Dono, H. Alder, F. Bullrich, M. Negrini, C. M. Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 9740–9744.
 - [8] L. He, J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, S. M. Hammond, *Nature* **2005**, 435, 828–833.
 - [9] K. A. O'Donnell, E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang, J. T. Mendell, *Nature* **2005**, 435, 839–843.
 - [10] a) F. J. Slack, J. B. Weidhaas, *Future Oncol.* **2006**, 2, 73–82; b) C. M. Croce, G. A. Calin, *WO 2004043387*, **2004**.
 - [11] U. A. Orom, S. Kauppinen, A. H. Lund, *Gene* **2006**, 372, 137–141.
 - [12] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, 438, 685–689.
 - [13] M. Manoharan, V. Kesavan, K. G. Rajeev, *US 2005107325*, **2005**.