



**RNA-Technologien:
Wirkmechanismen, Anwendungen
und Verabreichungsformen**

IMPRESSUM

HERAUSGEBERIN UND KONTAKT

Akademie der Naturwissenschaften Schweiz (SCNAT)
Forum Genforschung
Haus der Akademien · Laupenstrasse 7 · Postfach · 3001 Bern · Schweiz
+41 31 306 93 36 · geneticresearch@scnat.ch · geneticresearch.ch · [@scnatCH](https://x.com/scnatCH)

ZITIERVORSCHLAG

Kümin M, Eyer K, Hall J, Koch A, Pascolo S, Romeis J (2024)
RNA-Technologien: Wirkmechanismen, Anwendungen und Verabreichungsformen.
Swiss Academies Reports 19 (1)

AUTORINNEN

Michael Kümin (Forum Genforschung, SCNAT) · Klaus Eyer (ETH Zürich) · Jonathan Hall (ETH Zürich) ·
Aline Koch (Universität Regensburg) · Steve Pascolo (Universität Zürich) · Jörg Romeis (Agroscope)

PROJEKTLEITUNG

Franziska Oeschger (Forum Genforschung, SCNAT) · Michael Kümin (Forum Genforschung, SCNAT)

BEGLEITUNG BAFU UND EFBS

Christoph Lüthi (BAFU) · Basil Gerber (BAFU) · Franziska Bosshard (BAFU) · Julia Link (EFBS) · Elisabetta Peduzzi (EFBS)

REVIEW

Khalid Amari Baba (Julius Kühn-Institut) · Etienne Bucher (Agroscope) · Patrice de Werra (Schweizerische Gesellschaft für Phytomedizin) · Ursula Jenal (Jenal & Partners Biosafety Consulting), Rory Johnson (University College Dublin) · Roland Kölliker (Schweizerische Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften) · Oliver Yves Martin (ETH Zürich) · Hans-Peter Meyer (Schweizerische Akademie der Technischen Wissenschaften SATW) · Oliver Mühlemann (Universität Bern) · Barbara Rothen-Rutishauser (Adolphe Merkle Institut, Universität Freiburg) · Adrian Rügsegger (Stiftung für Technologiefolgen-Abschätzung TA-SWISS), Florian Steiner (Universität Genf) · Christina Weinberg (Universität Leipzig)

LAYOUT

Olivia Zwygart (SCNAT)

TITELBILD

Dr_Microbe – stock.adobe.com (generiert mit KI)

Dieser Bericht wurde mit finanzieller Unterstützung des Bundesamts für Umwelt und der Eidgenössischen Fachkommission für biologische Sicherheit verfasst. Für den Inhalt ist allein die SCNAT verantwortlich.

1. Auflage, 2024

ISSN (online) 2297-1807

DOI: doi.org/10.5281/zenodo.10926878



RNA-Technologien: Wirkmechanismen, Anwendungen und Verabreichungsformen

Im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU)
und der Eidgenössischen Fachkommission für biologische Sicherheit (EFBS)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Hintergrund	5
1.2	Ziel des Berichts	5
1.3	Vorgestellte Technologien.....	5
1.4	Aufbau des Berichts	6
2	Posttranskriptionelles Gen-Silencing	8
2.1	Einleitung	8
2.1.1	Antisense-Oligonukleotide	8
2.1.2	RNA-Interferenz	8
2.2	Therapeutische Anwendungen	9
2.2.1	Beschreibung der Verfahren	9
2.2.1.1	Antisense-Oligonukleotide	9
2.2.1.2	Small interfering RNA (siRNA)	10
2.2.1.3	miRNA-basierte Therapeutika.....	11
2.2.1.4	Chemische Modifikationen	11
2.2.1.4.1	ASOs.....	11
2.2.1.4.2	siRNAs	11
2.2.2	Stand der Entwicklung.....	12
2.2.2.1	ASOs	12
2.2.2.2	siRNAs	13
2.2.2.2.1	Herausforderungen	13
2.2.3	Unerwünschte Effekte	13
2.2.3.1	ASOs	13
2.2.3.1.1	Verunreinigungen	14
2.2.3.2	siRNAs	14
2.3	Anwendungen im Pflanzenschutz	14
2.3.1	Beschreibung des Verfahrens	14
2.3.2	Anwendungen.....	15
2.3.2.1	Schadinsekten.....	15
2.3.2.2	Viren	16
2.3.2.3	Pilze und Oomyzeten	16
2.3.2.4	Bakterien.....	16
2.3.3	Stand der Entwicklung.....	16
2.3.3.1	Herausforderungen	17
2.3.4	Unbeabsichtigte Wirkungen	17
2.3.4.1	Im Zielorganismus	17
2.3.4.1.1	Off-target Effekte	17
2.3.4.1.2	Resistenzen	18
2.3.4.2	Effekte auf Nicht-Zielorganismen	18
2.3.4.2.1	Stabilität in der Umwelt	18
2.3.4.2.2	Sequenz-spezifische Effekte.....	18
2.3.4.2.3	Sequenz-unspezifische Effekte.....	18
2.3.4.3	Kontaminationen	19
3	mRNA-Technologien	20
3.1	Einleitung	20
3.2	Beschreibung des Verfahrens	20
3.3	Anwendungen	21

3.3.1	mRNA-Impfstoffe	21
3.3.2	Antikörper	22
3.3.3	mRNA-basierte Proteinersatztherapien.....	22
3.4	Stand der Entwicklung.....	23
3.4.1	Impfstoffe.....	23
3.4.1.1	Ansteckende Krankheiten	23
3.4.1.2	Krebs	23
3.4.2	Antikörper	23
3.4.3	mRNA-basierte Protein-Ersatztherapien	23
3.4.4	Tiermedizin	23
3.4.5	Herausforderungen	24
3.5	Unerwünschte Wirkungen	24
4	RNA-Aptamere.....	25
4.1	Einleitung	25
4.2	Beschreibung des Verfahrens	25
4.2.1	Bindung an Zielmoleküle.....	25
4.2.2	Aptamere vs Antikörper.....	25
4.2.3	SELEX.....	25
4.2.4	Chemische Modifikationen	26
4.2.4.1	Nukleasenaktivität	26
4.2.4.2	Aptamer Diversität.....	26
4.2.4.3	Nierenfiltration.....	26
4.3	Anwendungen.....	26
4.3.1	Therapien.....	26
4.3.1.1	Zielinhibierung	26
4.3.1.2	Targeted-Drug-Delivery.....	27
4.3.2	Diagnostik	28
4.3.3	Anwendungen in der Landwirtschaft.....	28
4.4	Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen	28
4.5	Stand der Entwicklung	29
5	Lange nicht-codierende RNAs.....	30
5.1	Einleitung	30
5.2	Beschreibung des Verfahrens und Anwendungen	31
5.3	Stand der Entwicklung	31
5.3.1	Herausforderungen.....	31
5.4	Mögliche unerwünschte Wirkungen.....	31
6	RNA-vermittelte DNA-Methylierung.....	32
6.1	Einleitung	32
6.2	Beschreibung des Verfahrens	32
6.3	Mögliche Anwendungen und Stand der Entwicklung.....	33
7	RNA-Aktivierung.....	34
7.1	Einleitung	34
7.2	Beschreibung des Verfahrens	34
7.3	Anwendungen und Stand der Entwicklung.....	35
7.3.1	Herausforderungen	35

8	Zirkuläre RNAs	36
8.1	Einleitung	36
8.2	Beschreibung des Verfahrens und Anwendungen	37
8.3	Stand der Entwicklung.....	37
9	Ribozyme	38
9.1	Einleitung	38
9.2	Beschreibung des Verfahrens	38
9.3	Mögliche Anwendungen und Stand der Entwicklung.....	38
9.3.1	Herausforderungen	38
10	Verabreichung	39
10.1	Medizinische Verabreichungsmethoden.....	39
10.1.1	Nackte RNA.....	39
10.1.2	Nicht-virale Vektoren	39
10.1.2.1	Lipid-Nanopartikel und Liposome.....	39
10.1.2.2	Polymer-basierte Nanopartikel.....	40
10.1.2.3	Zellpenetrierende Peptide.....	40
10.1.3	Anwendungen und Stand der Entwicklung.....	41
10.1.3.1	Herausforderungen	41
10.1.4	Unerwünschte Wirkungen.....	41
10.2	Verabreichung im Pflanzenschutz	41
10.2.1	Nackte RNA.....	42
10.2.2	Minizellen.....	42
10.2.3	Nanopartikel	42
10.2.3.1	Layered double hydroxide.....	42
10.2.3.2	Carbon Quantum Dots.....	42
10.2.3.3	Gold-Nanopartikel.....	43
10.2.3.4	DNA-Nanostrukturen	43
10.2.3.5	Chitosan-Nanopartikel (CNP).....	43
10.2.3.6	Single-walled Carbon Nanotubes (SWCNT).....	43
10.2.4	Stand der Entwicklung	44
	Referenzen	45
	Glossar	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Einteilung nach Wirkmechanismus	6
Abbildung 2:	RNA-Silencing	8
Abbildung 3:	Funktionsweise von ASOs	10
Abbildung 4:	RNA-Modifikationen	12
Abbildung 5:	Wirkmechanismus von RNAi mittels eines RNA-Sprays als Pflanzenschutzmittel ..	15
Abbildung 6:	Funktionsweise der mRNA-Technologien	22
Abbildung 7:	SELEX.....	27
Abbildung 8:	Funktionsmechanismen von lncRNA	30
Abbildung 9:	RNA-vermittelte DNA-Methylierung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
Abbildung 10:	RNA-Aktivierung.....	34
Abbildung 11:	circRNA-basierte medizinische Anwendungen	36
Abbildung 12:	Medizinische Verabreichungsmethoden	43

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Ribonukleinsäuren (RNA) spielen eine essenzielle Rolle in sämtlichen Zellen aller Organismen. Trotzdem standen diese Moleküle in der öffentlichen Wahrnehmung bis vor kurzem im Schatten der sehr viel bekannteren Desoxyribonukleinsäure (DNA). Erst die Covid-19-Pandemie hat RNAs in Form von mRNA-Impfstoffen in das öffentliche Scheinwerferlicht gerückt: Weniger als ein Jahr nach Ausbruch der Pandemie standen in den meisten westlichen Ländern mRNA-Impfstoffe gegen Sars-CoV-2 zur Verfügung. Dies ist das Resultat jahrzehntelanger Forschung sowohl zur Struktur und Funktion von RNAs als auch zu deren Einsatz als Therapie. In der Schweiz waren im April 2023 etwa ca. 70 Prozent der Bevölkerung gegen Sars-CoV-2 geimpft, die allermeisten mit einem mRNA-Impfstoff.

RNAs kommen natürlicherweise in allen Zellen vor und übernehmen verschiedenste Funktionen. Eine prominente Rolle spielen RNAs in der Herstellung von Proteinen, indem zum Beispiel messenger RNAs (mRNAs) die genetische Information von der DNA im Zellkern ins Zytoplasma übertragen. RNAs nehmen aber auch viele regulatorische Funktionen in der Zelle wahr und können an unterschiedlichste Zielmoleküle binden. Dadurch eignen sie sich potentiell für eine Vielzahl von Anwendungen, insbesondere in der Medizin und der Landwirtschaft. RNA-Technologien, vor allem für therapeutische Anwendungen, werden seit über 30 Jahren entwickelt. Die ersten RNA-basierten Therapien wurden bereits um die Jahrhundertwende zugelassen (siehe Abschnitt 2.2.2.1 ASOs). Allerdings vermochten sich die Technologien damals noch nicht breit durchzusetzen. Erst in den letzten Jahren wurden entscheidende technische Fortschritte erzielt, etwa, um RNA zu stabilisieren und sie effizient in Zielzellen einzuschleusen. Dies hat dazu geführt, dass innerhalb weniger Jahre gleich mehrere neue RNA-Therapien entwickelt wurden und sich die öffentliche und industrielle Forschung zu RNA-Technologien stark intensiviert (Mollocana-Lara et al., 2021). Mit dem Erfolg der mRNA-Impfstoffe gegen Sars-CoV-2 sind RNA-Technologien nun noch stärker in den Fokus gerückt. Auch hierzulande arbeiten verschiedene Forschungsgruppen und -netzwerke, z. B. das Nationale Kompetenzzentrum für RNA & Krankheit (NCCR RNA & Disease), sowie private Unternehmen, an der Forschung und Entwicklung von RNA-Technologien, vor allem im therapeutischen Bereich.

1.2 Ziel des Berichts

Der vorliegende Bericht hat das Ziel, einen technischnaturwissenschaftlichen Überblick über die verschiedenen aktuell relevanten RNA-Technologien zu verschaffen. Er liefert Informationen zu den Wirkmechanismen der verschiedenen RNA-basierten Ansätze, ihren Anwendungsfeldern und Produkten und ihrem Entwicklungsstand. Der Bericht soll dazu dienen, Nutzen, Risiken und Grenzen der verschiedenen RNA-Technologien und ihrer Produkte einzuschätzen und zu diskutieren. Zudem soll er die rechtliche Einordnung von RNA-Produkten unterstützen.

1.3 Vorgestellte Technologien

Der Bericht diskutiert verschiedene Technologien, die auf RNA-Molekülen basieren. RNA steht für Ribonukleinsäure (Englisch «ribonucleic acid») und besteht aus dem Zucker Ribose sowie den vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil. Chemisch unterscheidet sich RNA von DNA (Desoxynukleinsäure, Englisch «deoxyribonucleic acid») dadurch, dass sie die Base Uracil (U) anstelle von Thymin (T) enthält und dass der DNA im Vergleich zu RNA eine Hydroxygruppe am Zucker-Phosphat-Rückgrat fehlt. Anders als DNA, die praktisch immer als Doppelstrang vorliegt, ist RNA oft einzelsträngig. RNA ist im Unterschied zu DNA ausserdem sehr anfällig für den Abbau durch Ribonukleasen genannte Enzyme, die in Organismen allgegenwärtig sind. Bei vielen RNA-Technologien werden die RNA-Moleküle dementsprechend chemisch modifiziert um, unter anderem, ihre Stabilität zu erhöhen. Diese modifizierten Nukleinsäuren lassen sich nicht eindeutig als RNA oder DNA klassifizieren, wenn sie die Hydroxygruppe, welche die beiden Stoffe unterscheidet, nicht aufweisen. Zudem gibt es Wirkstoffe, die sowohl aus RNA- als auch DNA-Molekülen bestehen können, beispielsweise Antisense-Oligonukleotide (ASOs) (siehe Abschnitt 2.1.1 Antisense-Oligonukleotide). RNA-Technologien sind somit nicht immer eindeutig von DNA-Technologien abzugrenzen. Wo es sinnvoll ist, werden daher im Bericht vereinzelt auch DNA-basierte Methoden erwähnt, wenn ihr Wirkmechanismus mit jenem der RNA-Technologien übereinstimmt.

Nicht Gegenstand des Berichts sind Technologien, die RNA-Moleküle verwenden, um das Erbgut der Zielzellen zu verändern. Dazu gehört insbesondere die CRISPR/Cas-Methode zur Genom-Editierung, die nebst dem Cas-Enzym zwei RNA-Moleküle verwendet. Auch nicht

behandelt werden RNA-Viren und Virus-ähnliche Vektoren, wie zum Beispiel Replicons, da sich diese in verschiedenen Aspekten – insbesondere in Bezug auf die biologische Sicherheit – von den hier vorgestellten Technologien deutlich unterscheiden.

Der Bericht fokussiert auf RNA-Technologien, die mit Blick auf Anwendungen in Therapie und Landwirtschaft erforscht und entwickelt werden. Es werden sowohl Technologien berücksichtigt, die bereits etabliert und mit ersten Produkten auf dem Markt sind (wie z.B. die mRNA-Impfstoffe), als auch Ansätze, die sich in einer frühen Forschungs- und Entwicklungsphase befinden. Die für den Bericht relevanten RNA-basierten Methoden wurden anhand der Fachliteratur sowie basierend auf Einschätzungen von Fachpersonen ermittelt und in acht Gruppen unterteilt:

1. Posttranskriptionelles Gen-Silencing,
2. mRNA-Technologien
3. RNA-Aptamere
4. Lange nicht-codierende RNAs
5. RNA-abhängige DNA-Methylierung
6. RNA-Aktivierung (RNAa)
7. Zirkuläre RNAs
8. Ribozyme

Die verschiedenen RNA-basierten Methoden können sich in der Art der verwendeten RNA-Moleküle, in den Zielmolekülen, an welche sie binden, und/oder im Wirkmechanismus unterscheiden (siehe Abbildung 1).

Die Abgrenzung der verschiedenen Methoden ist nicht immer eindeutig, und auch in der Literatur werden verschiedene Kategorien und Bezeichnungen verwendet. Die hier verwendete Gruppierung ist somit nur eine von meh-

ren Möglichkeiten, die unterschiedlichen RNA-Technologien zu klassifizieren.

1.4 Aufbau des Berichts

In den ersten Kapiteln (Kapitel 2–5) werden vier RNA-Technologien detailliert beschrieben, die bereits mit Produkten etabliert sind und/oder denen ein grosses Potential für zukünftige Anwendungen in Therapie oder Landwirtschaft zugeschrieben wird. Für jede Technologie werden ihr Wirkmechanismus, ihre möglichen Anwendungen sowie ihr Entwicklungsstand beschrieben.

Die Relevanz der verschiedenen Methoden wurde anhand der Literatur und der Einschätzung der involvierten Fachpersonen (siehe Impressum) ermittelt. Insgesamt werden das Posttranskriptionelle Gen-Silencing (Kapitel 2) und mRNAs (Kapitel 3) als die beiden zurzeit massgeblichsten Ansätze angesehen. Beide haben sich mit ersten therapeutischen Produkten bereits etabliert und haben ein grosses Potential für weitere medizinische Anwendungen. Basierend auf dem Ansatz des Posttranskriptionellen Gen-Silencing werden zudem Anwendungen für die Landwirtschaft erforscht und entwickelt. Ein erstes Pflanzenschutzmittel wurde in den USA bereits zur Zulassung angemeldet. Aptamere (Kapitel 4) sind ebenfalls eine etablierte Technologie mit zugelassenen Produkten. Allerdings wurden in den letzten Jahren keine Zulassungen mehr erteilt, und die Forschung beschränkte sich lange auf Nischenanwendungen. Die langen, nicht-codierenden RNAs (Kapitel 5) befinden sich noch in einer relativ frühen Entwicklungsphase. Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkmechanismen wird ihr Potential allerdings als gross eingeschätzt, auch wenn noch viele Herausforderungen bestehen.

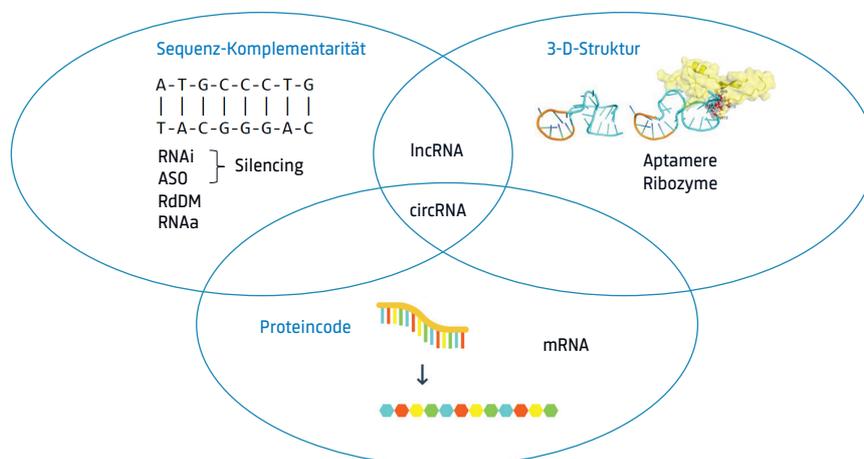


Abbildung 1: Einteilung nach Wirkmechanismus.

Die hier vorgestellten RNAs wirken entweder über die komplementäre Bindung an RNA- oder DNA-Moleküle; durch die Bindung an Moleküle über ihre dreidimensionale Struktur oder durch die Translation der codierten Information.

Die Kapitel 6–9 geben eine kurze Übersicht über vier weitere RNA-Technologien, die ebenfalls erforscht und entwickelt werden, aber noch in einer frühen Entwicklungsphase sind: Die RNA-abhängige DNA-Methylierung kann in Pflanzen die Aktivität von Genen durch das Anfügen von chemischen Gruppen an die DNA regulieren; die RNA-Aktivierung bewirkt eine erhöhte Genaktivität durch die Bindung von kurzen RNAs an RNA- oder DNA-Moleküle; zirkuläre RNAs sind ringförmige RNAs mit unterschiedlichen Funktionen; Ribozyme können chemische Reaktionen katalysieren.

Ein wichtiger Forschungs- und Entwicklungsbereich für alle RNA-Technologien sind Verabreichungsmethoden («delivery methods»), um die RNA-Moleküle gezielt zu den gewünschten Geweben und in die entsprechenden Zellen zu bringen. Da RNA-Moleküle anfällig für den Abbau durch Ribonukleasen sind und schlecht in Zellen eindringen können, müssen sie für die meisten Anwendungen verpackt werden, z. B. in Nanopartikel oder Liposomen. Die erfolgreiche Verbesserung der Formulierung dieser Partikel war ein entscheidender Schritt, der neueren RNA-Therapeutika, wie etwa der mRNA-Impfung gegen Sars-CoV-2, zum Durchbruch verholfen hat. Die Entwicklung noch effizienterer, sowie Gewebe- oder Zell-spezifischer, Verabreichungsmethoden ist ein sehr aktives, sich rasch entwickelndes Forschungsfeld. Das letzte Kapitel bietet eine Übersicht über die aktuell relevantesten Verabreichungsmethoden für therapeutische Anwendungen sowie landwirtschaftliche Anwendungen.

Erarbeitung des Berichts

Der Bericht wurde von einer sechsköpfigen Autorinnen- und Autorengruppe mit Fachwissen im Bereich RNA-Technologien unter der Leitung der Fachstelle des Forums Genforschung der SCNAT erarbeitet. Anschliessend wurde der gesamte Bericht von weiteren Fachpersonen mit unterschiedlichem Fachwissen in einem Review geprüft. Die Angaben zu den beteiligten Personen finden sich im Impressum.

Kategorien von RNAs

RNAs können auf verschiedene Weisen in unterschiedliche Gruppen unterteilt und entsprechend bezeichnet werden:

Sie können aufgrund ihrer **Länge** in kurze RNAs (small RNAs, sRNA) und lange RNAs (long RNAs) eingeteilt werden. Kurze RNAs haben eine ungefähre Länge von unter 200 Nukleotiden, lange RNAs von über 200 Nukleotiden. Zu den langen RNAs gehören vor allem die mRNAs und die «long non-coding RNAs».

Weiter kann die **Struktur** der RNAs entweder als einzelsträngig (single stranded RNA, ssRNA) oder doppelsträngig (double stranded RNA, dsRNA) bezeichnet werden. Gewisse RNAs werden zudem aufgrund ihrer **Form** klassifiziert, etwa als zirkuläre RNA (circular RNA, circRNA) oder Haarnadelförmige RNAs (z. B. die short hairpin RNA, shRNA).

Schliesslich können RNAs auch aufgrund ihrer **Funktion** klassifiziert werden. Auf einer obersten Ebene wird dabei zwischen codierender RNA und nicht-codierender RNA (non-coding RNA, ncRNA) unterschieden. Codierende RNAs enthalten die Information für die Herstellung eines Proteins und sind mit der mRNA gleichzusetzen. ncRNAs hingegen übernehmen eine Vielzahl anderer Zellfunktionen, etwa in der Regulation der Genexpression, der Produktion von Eiweissen, der Abwehr von Viren oder dem Schutz des Genoms. Die ncRNAs werden entsprechend weiter aufgrund ihrer spezifischen Funktionen differenziert. Dazu gehören bspw. die «small interfering RNAs» (siRNAs), welche spezifische Ziel-RNAs binden und hemmen, oder die Ribozyme, welche chemische Reaktionen katalysieren. Allerdings gibt es auch RNAs, die translatiert werden und trotzdem den langen nicht-codierenden RNAs zugeordnet werden.

2 Posttranskriptionelles Gen-Silencing

2.1 Einleitung

2.1.1 Antisense-Oligonukleotide

1978 synthetisierten Forscher ein Stück DNA (auch Oligonukleotid genannt), das komplementär zu einer kurzen RNA-Sequenz des Rous-Sarkom-Virus war. Als die Forscher das DNA-Stück in eine Zellkultur gaben, beobachteten sie, dass sich das Virus nicht mehr in den Zellen verbreiten konnte. Die synthetisierte DNA-Sequenz hatte die komplementäre RNA-Sequenz des Virus gebunden und dadurch das Virus an der Replikation gehindert. Später konnte gezeigt werden, dass Oligonukleotide auch zelleigene RNAs binden und dadurch Gene herunterregulieren können. Dies eröffnete die Möglichkeit, virale oder zelleigene RNAs zu Forschungszwecken oder für medizinische Anwendungen zu beeinflussen. Seither wurde diese Technologie stetig weiterentwickelt, um in bestimmten Zellen Zielgene spezifisch zu regulieren (Crooke et al., 2021).

2.1.2 RNA-Interferenz

In den 1990er-Jahren entdeckte man, dass auch doppelsträngige RNAs, die in eine Zelle eingebracht werden, die

Expression bestimmter Gene hemmen können. Es stellte sich heraus, dass dieser Mechanismus, RNA-Interferenz genannt, in fast allen eukaryotischen Lebensformen auftritt und bei der Regulation der Genexpression, bei der Abwehr von Viren und beim Schutz des Genoms eine wichtige Rolle spielt (Svoboda 2020).

In der Natur kommen verschiedene Arten von kurzen RNAs vor, die Gene regulieren können (Svoboda, 2020). Es handelt sich bei allen um nicht-codierende RNAs (ncRNA); das heisst, dass ihre genetische Information nicht für die Herstellung eines Proteins verwendet wird. Die zwei häufigsten kurzen, nicht-codierenden RNAs sind die small interfering RNAs (siRNA) und die microRNAs (miRNA). Andere kurze ncRNAs haben oft sehr spezifische Aufgaben, wie etwa piwi-interacting RNAs (piRNA), die sogenannte Retrotransposons in den Geschlechtszellen regulieren. Die verschiedenen kurzen nicht-codierenden RNAs unterscheiden sich durch ihre Länge, ihre Herkunft und die Art der Ziel-RNAs.

Die 21–24 Nukleotide (nt) langen siRNAs entstehen in der Natur durch die Spaltung einer langen dsRNA in kurze Stücke durch das Enzym Dicer (Dicer-like/DCL in Pflanzen). In Wirbeltieren stammt die ursprüngliche doppelsträngige RNA (dsRNA) meist von einem Virus, oder

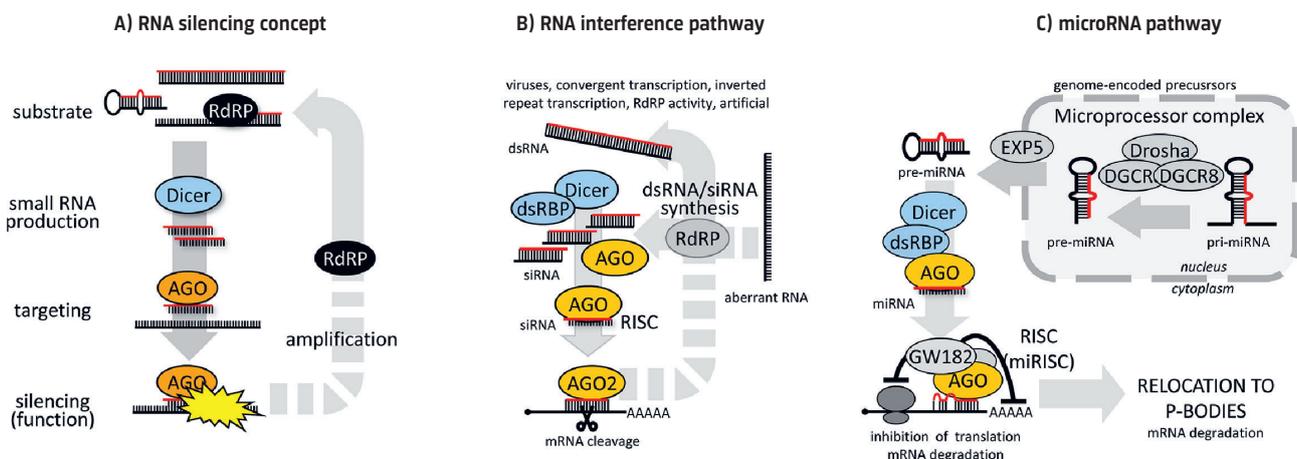


Abbildung 2: RNA-Silencing.

A) Grundlegender Ablauf: nicht-codierende RNA wird von Dicer in kürzere RNA gespalten und von einem Argonautenprotein (AGO) gebunden. Zusammen mit AGO bindet die kurze RNA eine Sequenz auf der Ziel-RNA. Der Effekt kann durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase verstärkt werden, welche die dsRNA amplifiziert. B) RNA Interferenz. Aus synthetischen dsRNAs oder dsRNAs von Viren oder aus zelleigenen Transkripten entstehen durch Dicer und dsRNA-bindende Proteine siRNAs, die bei der Bindung an die Ziel-mRNA zur enzymatischen Spaltung der mRNA führen. C) miRNA in Säugetieren: Im Zellkern wird die im Genom codierte pri-miRNA von den Proteinen Drosha und DGR8 zur prä-miRNA verkürzt und anschliessend in das Zytoplasma transportiert. Dort wird sie von Dicer zur miRNA verkürzt und bindet zusammen mit AGO und weiteren Proteinen an die Ziel-mRNA. Bei einer nicht vollständigen Sequenzkomplementarität wird die Translation blockiert und die mRNA degradiert (Svoboda, 2020).

einem virus-ähnlichen Element (z. B. einem Transposon). In Pflanzen und wirbellosen Tieren können siRNAs zudem im Genom codiert sein und eigene Gene regulieren (z. B. trans-acting siRNAs). Ausserdem können siRNAs in Pflanzenzellen durch spezielle Polymerasen vervielfacht werden und sich in der Pflanze verteilen (Svoboda, 2020).

Natürliche miRNAs sind dagegen stets im Genom codiert und liegen nach der Transkription als primary miRNAs (pri-miRNAs) vor, die hunderte Nukleotide (nt) lang sein können. Diese pri-miRNAs werden anschliessend zu 70–80 nt langen miRNA-Vorläufern (pre-miRNAs) prozessiert, vom Zellkern in das Zytoplasma der Zelle transportiert und dort von Dicer in 17–24 nt lange doppelsträngige miRNAs geschnitten (Svoboda, 2020).

Sowohl siRNAs als auch miRNAs werden anschliessend von einem Protein aus der Argonaut-Familie gebunden. Anschliessend wird einer der RNA-Stränge entfernt, und der dabei entstehende RNA-induced silencing complex (RISC) aus Argonaut und weiteren Proteinen und einzelsträngiger siRNA oder miRNA bindet an eine bestimmte Sequenz der Ziel-RNA. Wenn die Komplementarität zwischen der Ziel-RNA und der siRNA hoch ist, wird die Ziel-mRNA vom RISC-Komplex enzymatisch gespalten. Das ist bei siRNAs der Normalfall, kann aber, insbesondere in Pflanzen, auch bei miRNAs vorkommen. In Tieren ist die Komplementarität von miRNAs mit den Ziel-mRNAs hingegen meist nur partiell, was dazu führt, dass der RISC-Komplex die mRNA zwar bindet, aber nicht spaltet. Dadurch wird die Translation blockiert und die mRNA oftmals abgebaut (Svoboda, 2020).

Aufgrund ihrer höheren Komplementarität sind siRNAs spezifischer, weil sie meist nur eine Ziel-RNA binden können. miRNAs können dagegen mehrere mRNAs binden und so die Herstellung von verschiedenen Proteinen gleichzeitig hemmen (Svoboda, 2020).

Während in Pflanzen sowohl siRNAs als auch miRNAs eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Viren und bei der Genregulation spielen, kommt siRNAs in Tieren, insbesondere Säugetieren, nur eine untergeordnete Bedeutung zu. Das zeigt sich auch darin, dass die beiden dsRNA-Arten in Pflanzen von einem komplexen Netzwerk aus verschiedenen Proteinvarianten verarbeitet werden. In Säugetieren werden sie dagegen in getrennten Prozessen verarbeitet, wobei derjenige der siRNAs stark zurückgebildet ist. Synthetische siRNAs, die man in eine Säugetierzelle eingebracht hat, werden von denselben Faktoren wie miRNAs prozessiert (Svoboda, 2020).

Kurze doppelsträngige RNAs können nicht nur die Translation, sondern auch die Transkription hemmen (siehe Kapitel 6 RNA-vermittelte DNA-Methylierung).

2.2 Therapeutische Anwendungen

Die Eigenschaft von ncRNA-Molekülen, sich gezielt an bestimmte Sequenzen anderer RNAs zu binden und dadurch die Proteinsynthese zu beeinflussen, lässt sich auf mehrere Arten für therapeutische Zwecke nutzen. Einerseits können einzel- oder doppelsträngige RNA-Moleküle hergestellt werden, die in die betroffenen Zellen eindringen und dort die Menge einer Ziel-RNA reduzieren. Auf diese Weise kann die Menge krankheitsauslösender Proteine gesenkt werden. Andererseits kann die Produktion krankheitsverhindernder Proteine erhöht werden, indem schädliche miRNAs gebunden werden, welche die Herstellung des entsprechenden Proteins reduzieren. Neben mRNAs kommen auch lange nicht-codierende RNAs als Ziele für die Regulation in Frage (siehe Kapitel 5 Lange nicht-codierende RNAs).

miRNA-basierte Therapeutika gelten nicht als eigene Klasse von Molekülen, sondern sind ein Überbegriff für siRNAs oder ASOs, die entweder an miRNAs binden oder miRNAs ersetzen (siehe Abschnitt 2.2.1.3 miRNA-basierte Therapeutika).

2.2.1 Beschreibung der Verfahren

2.2.1.1 Antisense-Oligonukleotide

Antisense-Oligonukleotide (ASOs) sind synthetische, einzelsträngige, 12–24 nt-lange Nukleotidsequenzen. Es kann sich dabei um DNA, RNA oder künstliche Nukleotide – wie zum Beispiel LNA (locked nucleic acids) – handeln. Oftmals werden Ribonukleotide modifiziert und mit künstlichen Nukleotiden kombiniert, um Oligonukleotide mit den gewünschten pharmakologischen Eigenschaften zu erhalten (siehe Abschnitt 2.2.1.4 Chemische Modifikationen) (Crooke et al., 2021; Hall et al., 2022).

ASOs können über verschiedene Mechanismen wirken: Indem sie an die Ziel-mRNA binden, können einige ASOs deren Spaltung durch das Enzym Ribonuklease H einleiten. Dabei wird ein natürlicher Mechanismus der Zelle genutzt, der die Aufgabe hat, natürlich vorkommende DNA-RNA-Duplexe, etwa bei der Transkription oder bei Virusinfektionen, zu beseitigen. Dies geschieht vor allem bei DNA-basierten, modifizierten ASOs oder sogenannten Gapmeren. Gapmere bestehen aus einer DNA-Sequenz, die von modifizierten Oligonukleotiden umgeben ist. Zudem kann mit ASOs das Splicing modifiziert werden. Beim Splicing werden bestimmte Bereiche aus einer Vorform der mRNA, der pre-mRNA, herausgeschnitten und somit bei der Translation nicht in ein Protein übersetzt (siehe Abschnitt 3.1 Einleitung). Durch ASOs kann dieser Prozess so verändert werden, dass beispielsweise

ein Stop-Codon in die mRNA eingebaut wird, was zu einem zu frühen Abbruch der Translation und zum Abbau der Ziel-RNA führt. Oder es kann eine Sequenz mit einer schädlichen Mutation übersprungen werden, sodass die Mutation nicht in der fertigen mRNA enthalten ist (siehe Abbildung 3)

Ausserdem können modifizierte einzelsträngige RNAs wie siRNAs wirken und – in den RISC-Komplex eingebunden – zu einer enzymatischen Spaltung der Ziel-RNA führen (siehe Abschnitt 2.2.1.2 Small interfering RNA (siRNA) (Crooke et al., 2021).

Die Genexpression kann aber auch durch ASOs hochreguliert werden, indem sich diese zum Beispiel an miRNAs binden und damit deren Funktion beeinträchtigen (siehe Abschnitt 2.2.1.3 miRNA-basierte Therapeutika) oder die Translationsrate durch das Binden an bestimmte regulatorische Sequenzen in der mRNA erhöhen (Crooke et al., 2021).

Zu den therapeutisch weniger relevanten Mechanismen von ASOs gehört die Verhinderung der Translation der Ziel-mRNA durch das Blockieren des Ribosoms oder die Spaltung der sogenannten Cap-Struktur am Ende der mRNA. Zudem können ASOs die Länge des sogenannten Poly(A)-Schwanzes am anderen Ende der mRNA verändern und dadurch die Stabilität der mRNA beeinflussen (Crooke et al., 2021).

2.2.1.2 Small interfering RNA (siRNA)

Small interfering RNAs (siRNAs) sind 19–24 Nukleotide-lange doppelsträngige RNA-Moleküle. Zusammen mit mehreren Proteinen bilden sie den RNA-induced silencing complex (RISC). Eingebunden in den RISC-Komplex bindet einer der Stränge, Leitstrang genannt, eine komplementäre Sequenz auf der Ziel-mRNA durch Basenpaarung. Dies führt in den meisten Fällen zu einer enzymatischen Spaltung der Ziel-mRNA (Svoboda, 2020).

Durch das Einbringen von siRNAs in eine Zelle können mit diesem Mechanismus sowohl codierende als auch

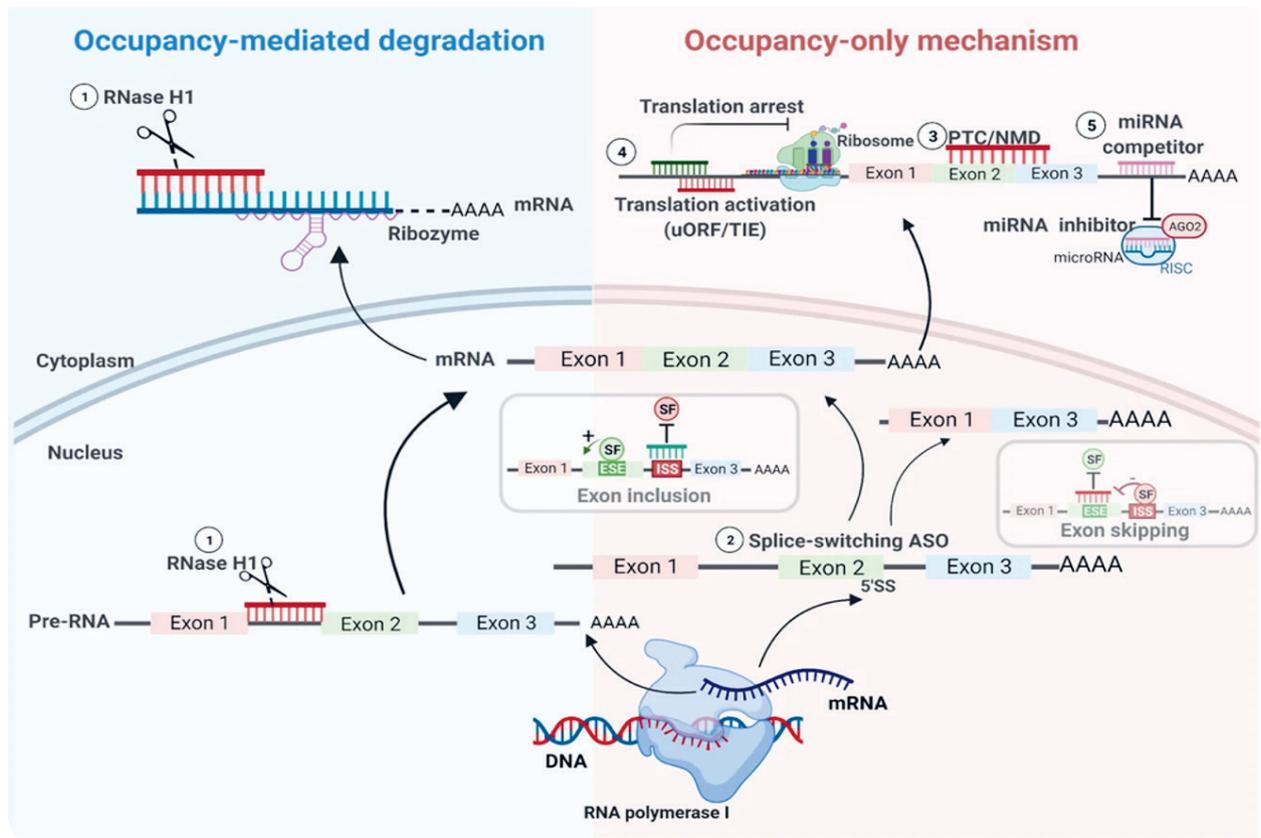


Abbildung 3: Funktionsweise von ASOs

- 1) ASOs, die Desoxynukleotide enthalten (Gapmere) binden eine komplementäre Sequenz einer mRNA und rekrutieren die RNase H1, die zum Blockieren der Translation und zur Degradation der mRNA führt.
- 2) ASOs können durch die Bindung an komplementäre Sequenzen in prä-mRNAs beeinflussen, wo Splicing-Faktoren (SF) binden können. Dadurch können sie zur Inklusion oder zum Überspringen eines Exons führen.
- 3) Sie können zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation und dem Abbau der mRNA führen.
- 4) Sie können die Translation blockieren.
- 5) Sie können die Bindung von miRNAs verhindern. (Y. Zhu et al., 2022)

nicht-codierende RNAs spezifisch abgebaut werden. Dadurch ermöglichen sie es, Gene herunterzuregulieren, die aufgrund einer Mutation oder einer Fehlregulation eine Krankheit verursachen. siRNAs, wie auch ASOs, zeichnen sich gegenüber anderen Biopharmazeutika dadurch aus, dass sie im Prinzip jede RNA, deren Sequenz bekannt ist, mit einer hohen Affinität und Spezifität binden können. Kleine Biomoleküle oder Antikörper, welche die Proteinfunktion beeinflussen sollen, müssen hingegen so gestaltet werden, dass sie korrekt in eine komplexe dreidimensionale Form passen, was bei vielen Proteinen schwer bis unmöglich zu erreichen ist. Diese höhere Bindungsfähigkeit trägt allerdings dazu bei, dass siRNAs auch leichter an nicht-Zielmoleküle binden können, was zu unbeabsichtigten (Off-target-)Effekten führen kann. Ausserdem sind siRNAs im Körper relativ kurzlebig. Um ihre pharmakologischen Eigenschaften zu verbessern, werden siRNAs für therapeutische Anwendungen meist chemisch modifiziert (Hu et al., 2020) (siehe Abschnitt 2.2.1.4 Chemische Modifikationen).

Bisher wurden vier RNA Interferenz (RNAi)-basierte Therapeutika von der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA zugelassen; weitere befinden sich in der klinischen Phase (siehe Abschnitt 2.2.2 Stand der Entwicklung).

2.2.1.3 miRNA-basierte Therapeutika

Bei miRNA-basierten Therapeutika werden zwei verschiedene Strategien unterschieden: miRNA-Antagonismus und miRNA-Ersatztherapien. Der miRNA-Antagonismus (anti-miR) zielt darauf ab, die Expression oder Funktion einer fehlerhaften Ziel-miRNA zu unterdrücken oder zu reduzieren. Antagomirs genannte, kurze einzelsträngige nicht-codierende RNAs (mit einer ähnlichen Struktur wie ASOs), binden die Ziel-miRNAs und stören so deren Funktion durch komplementäre Hybridisierung und sterische Hinderung. Das heisst, sie verhindern, dass die miRNA sich an die natürliche Ziel-mRNA binden kann. Eine miRNA-Ersatztherapie wiederum hat das Ziel, die Expression oder Funktion einer miRNA wiederherzustellen. Es kann sich dabei zum Beispiel um eine miRNA handeln, die bestimmte Gene herunterreguliert, welche die Entstehung von Krebs fördern. Wenn diese miRNA herunterreguliert wurde, erhöht sich das Risiko, dass ein Tumor entsteht. Bei der Ersatztherapie wird ein kurzes, doppelsträngiges RNA-Molekül (miRNA-Mimic) synthetisiert, das der endogenen miRNA ähnelt. Dieses wird anschliessend in die Zelle eingebracht und übernimmt dort die Funktion der natürlichen miRNA (Traber & Yu, 2022). miRNAs regulieren – anders als siRNAs, die sehr spezifisch sind – oft die Expression mehrerer Gene. Diese Eigenschaft ermöglicht es, mittels miRNA-basierter Therapeutika mehrere kritische Elemente in deregulierten zellulären Prozessen gleichzeitig zu beeinflussen (Traber & Yu, 2022).

Während sich einige Anti-miR Therapien bereits in der klinischen Phase befinden, sind miRNA-Ersatztherapien erst in der präklinischen Phase (siehe Abschnitt 2.2.2 Stand der Entwicklung).

2.2.1.4 Chemische Modifikationen

Da RNA *in vivo* sehr instabil ist und schnell durch Enzyme (Nukleasen) abgebaut werden kann, muss sie für viele medizinische Anwendungen chemisch modifiziert werden, um das Phosphodiester-Rückgrat vor Nukleasen zu schützen. Allerdings können Modifikationen auch die Bindungsfähigkeit an das Zielmolekül negativ beeinflussen. Die Suche nach Modifikationen, welche die Stabilität, die Bindungsfähigkeit, die zelluläre Aufnahme und weitere pharmakologische Eigenschaften verbessern, ohne dabei die Bindungsstärke und Spezifität zu stark zu reduzieren, gehört zu den Schwerpunkten der medizinischen Forschung in diesem Bereich.

2.2.1.4.1 ASOs

Die häufigste Modifikation bei ASOs, das Ersetzen der natürlichen Phosphodiester-Bindungen zwischen den Nukleotiden durch synthetische Phosphothioat (PS)-Bindungen, verhindert die Spaltung durch Nukleasen und erleichtert dem Oligonukleotid den Zelleintritt. Zudem unterstützt die stärkere Bindung an Serumproteine das Medikament bei seiner Ausbreitung in Geweben und Organen. Häufig wird auch die 2'-OH-Gruppe der Ribose, die einzige Stelle, wo sich DNA und RNA in der Nukleotidkette chemisch unterscheiden, durch eine 2'-O-Methoxyethyl-Gruppe (2'-MOE), eine Methyl-Gruppe (2'-OMe) oder eine eingeschlossene Ethyl-Gruppe (2'-cEt) ausgetauscht. Alternativ dazu kann die Ribose-Einheit mit einer zusätzlichen C-O-Brücke zu LNAs (locked nucleic acids) verbunden werden, um die Bindungsaffinität zur Ziel-RNA zu erhöhen. Der Ribose-Zucker kann auch durch einen synthetischen Methylenmorpholin-Ring ausgetauscht werden (phosphorodiamidate morpholino oligos, PMOs, auch Morpholinos genannt), der den Abbau durch Ribonukleasen verhindert. Um die Aufnahme in Leberzellen zu erleichtern, können die ASOs mit N-Acetylgalactosamin (GalNAc) verbunden werden. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Modifikationen, um die Oligonukleotide an die gewünschte Wirkungsweise und den Verabreichungsweg anzupassen (Adachi et al., 2021; Hall et al., 2022). Es ist ausserdem möglich, die Sequenz in eine zirkuläre RNA einzufügen, die stabiler ist als lineare RNA und seltener vom Immunsystem erkannt wird (siehe Kapitel 8 Zirkuläre RNAs).

2.2.1.4.2 siRNAs

Die ersten therapeutischen siRNAs (zum Beispiel Bevasiranib) waren grösstenteils unmodifiziert und wurden lokal verabreicht. Dabei zeigten sich allerdings eine geringe

Effektivität und Off-Target-Effekte. Ausserdem kann die angeborene Immunantwort ausgelöst werden. Deshalb werden viele der Modifikationen, die sich in ASOs bewährt hatten, auch bei siRNAs eingesetzt: Insbesondere 2'-O-Methyl (2'-OMe) und Phosphothioat (PS)-Bindungen, welche die Spaltung durch Nukleasen verhindern, und N-Acetylgalactosamin (GalNAc), das die Aufnahme in bestimmte Leberzellen (Hepatozyten) fördert (Hu et al., 2020).

2.2.2 Stand der Entwicklung

2.2.2.1 ASOs

Bisher wurden acht ASO-basierte Medikamente von der US-amerikanischen Arzneimittelbehörde (FDA) und vier von der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) zugelassen. Das erste, Fomivirsen (FDA: 1998, EMA: 1999, zurückgezogen 2006 bzw. 2002 aus wirtschaftlichen Gründen) zur Behandlung von Infektionen mit dem Cytomegalovirus, ist eine unmodifizierte DNA-ASO, die virale RNA bindet. Eteplirsen (FDA: 2016, EMA: abgelehnt), Golodirsen (FDA: 2019), Viltolarsen (FDA: 2020) und Casimersen (FDA: 2021) sind Morpholino-Oligomere und Nusinersen (FDA: 2016, EMA: 2017) ein 2'-MOE-modifiziertes ASO, die alle zum Überspringen eines codierenden RNA-Abschnittes (Exons) führen, der, wenn er eine bestimmte Mutation enthält, die Muskeldystrophie Typ Duchenne verursachen kann. Mipomersen (FDA: 2013,

EMA: abgelehnt) zur Behandlung der homozygoten familiären Hypercholesterinämie, Inotersen (FDA: 2018, EMA: 2018) zur Behandlung der hereditären Transthyretin-vermittelten Amyloidose und Volanesorsen (EMA: 2019) zur Behandlung des familiären Chylomikronämie-Syndroms sind 2'-MOE-modifizierte ASOs, die bei der Bindung an mRNA-Moleküle deren Abbau durch die Ribonuklease H bewirken (Crooke et al., 2021). Ausser Fomivirsen, das bei einer viralen Augenentzündung eingesetzt wurde, sind alle bisher zugelassenen Medikamente auf die Behandlung seltener Erbkrankheiten ausgerichtet; sie kommen also in einem Bereich zur Anwendung, in dem es wenig Konkurrenz durch niedermolekulare Verbindungen (small molecule drugs) und Biopharmazeutika (z. B. monoklonale Antikörper) gibt und deshalb eine Hochpreispolitik möglich ist (Hall et al., 2022).

2020 wurden sieben ASO-basierte Medikamente in der klinischen Phase III getestet und 31 in Phase II. Darunter befinden sich Medikamente gegen Krankheiten des Nervensystems; muskuläre, kardiovaskuläre, entzündliche und metabolische Erkrankungen; Augenkrankheiten; verschiedene Krebserkrankungen und ansteckende Krankheiten (Crooke et al., 2021).

Eine weitere potentielle Anwendung von ASOs liegt in der Behandlung sehr seltener Krankheiten durch personalisierte Medizin. Milasen wurde speziell für die Behandlung einer einzelnen Patientin entwickelt, indem ihr

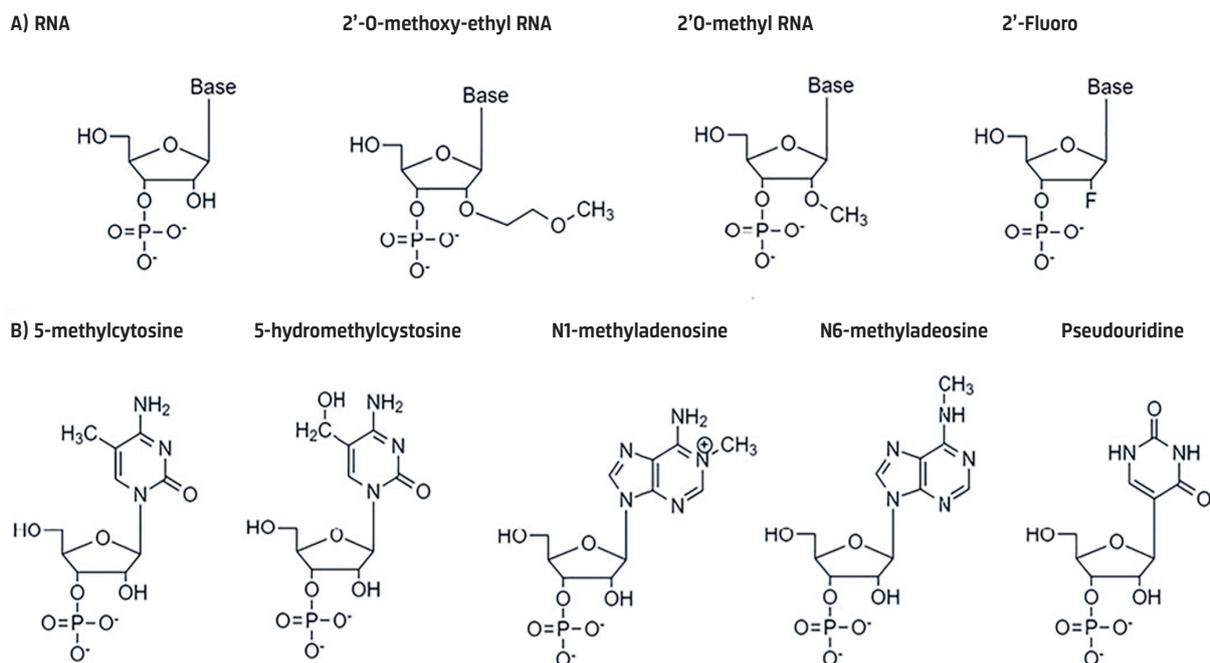


Abbildung 4: RNA-Modifikationen.

A) Modifikationen an der 2'-Position der Ribose B) Modifikationen der Base (Feng et al., 2021).

spezifischer Gendefekt ermittelt und ein PS-MOE-Oligonukleotid synthetisiert wurde, um den Splicing-Defekt zu beheben (Hall et al., 2022).

2.2.2.2 siRNAs

In Europa und den USA wurden bereits vier RNAi-basierte Therapeutika zugelassen: Patisiran (FDA & EMA, 2018; Swissmedic, 2019), Givosiran (FDA, 2019; EMA, 2020; Swissmedic, 2021), Lumasiran (FDA & EMA, 2020; Swissmedic 2021) und Inclisiran (EMA, 2020; FDA & Swissmedic, 2021).

Patisiran (Onpattro®) wurde 2018 als erstes RNAi-basiertes Medikament von der FDA für die Behandlung der familiären Amyloidpolyneuropathie zugelassen. Bei dieser Krankheit bilden sich Amyloid-Plaques aus fehlgefaltetem Transthyretin (TTR), einem Protein, das vor allem in Leberzellen gebildet wird. Patisiran bindet an die TTR-mRNA und reduziert dadurch die Entstehung der Amyloid-Plaques. Givosiram (Givlaari®) ist für die Behandlung von akuter hepatischer Porphyrie (AHP) zugelassen. Bei AHP sammeln sich wegen einer Überproduktion des Proteins Aminolevulinat-Synthase 1 (ALAS1) giftige Stoffe in der Zelle an. Givosiram bindet an die ALAS1-mRNA und reduziert dadurch die Proteinmenge. Inclisiran (Leqvio®) ist gegen familiäre Hypercholesterämie und klinische atherosklerotische Herz-Kreislauferkrankungen zugelassen und reduziert das Enzym Proproteinase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9) in der Leber (Hall et al., 2022; Traber & Yu, 2022). Lumasiran (Oxlumo®) wird zur Behandlung der primären Hyperoxalurie vom Typ 1 eingesetzt. Bei dieser Krankheit wird Oxalat in verschiedenen Organen abgelagert. Lumasiran reduziert das Enzym Glycolatoxidase (GO), das in der Leber eine Vorstufe von Oxalat produziert und senkt dadurch die Oxalat-Menge im Körper (Traber & Yu, 2022).

Patisiran besteht aus zwei mehrfach methylierten RNA-Strängen, die von einem Lipid-Nanopartikel umschlossen sind, der die Aufnahme in die Leberzellen erleichtert (siehe Abschnitt 10.1.2.1 Lipid-Nanopartikel und Liposome). Die siRNA-Medikamente der zweiten Generation – Givosiran, Lumisiran und Inclisiran – enthalten keine natürlichen Nukleotide mehr und sind für eine erhöhte Aufnahme in Leberzellen an N-Acetylgalactosamin (GalNAc) gebunden für die Aufnahme in bestimmte Leberzellen (sogenannte Hepatozyten) (Hall et al., 2022).

2.2.2.2.1 Herausforderungen

Therapeutische siRNAs müssen in das Zytoplasma und/oder den Zellkern der Zielzellen gelangen, um aktiv zu werden. Dafür müssen sie eine Reihe von Hindernissen überwinden: Sie müssen im Blut stabil bleiben, dürfen also nicht enzymatisch abgebaut werden, und sie müssen die Erkennung durch das Immunsystem umgehen.

Dann müssen sie sich im gewünschten Gewebe ansammeln und durch die Zellmembran transportiert werden (Y. Zhu et al., 2022).

In der Oligonukleotid-Medikamentenentwicklung wird versucht, den Transport in andere Zelltypen und andere Gewebe als in die Leber einerseits mit chemischen Modifikationen zu verbessern (siehe Abschnitt 2.2.1.4 Chemische Modifikationen). Andererseits werden verschiedene Verabreichungsvehikel – zum Beispiel aus Lipiden, Lipid-ähnlichen Materialien, Polymeren, Peptiden, Exosomen und Nanopartikeln – entwickelt (siehe Abschnitt 10.1 Medizinische Verabreichungsmethoden) (Hu et al., 2020). Mit der Konjugation von GalNAc-Liganden an die siRNA gibt es bisher eine erprobte Methode, um siRNAs in Leberzellen einzubringen. Methoden, um andere Zelltypen gezielt anzusteuern, sind noch nicht etabliert, werden aber intensiv erforscht. Deshalb konnten siRNAs bisher nur intravenös in Leberzellen geliefert werden (Crooke et al., 2021). Verabreichungssysteme, die siRNAs gezielt in das zentrale Nervensystem, die Augen, Nierenkrebszellen und Epithelzellen abgeben können, sind in ihrer Entwicklung inzwischen fortgeschritten (Hu et al., 2020).

2.2.3 Unerwünschte Effekte

2.2.3.1 ASOs

Welche unerwünschten Effekte auftreten können, hängt bei ASOs stark von ihrer chemischen Zusammensetzung ab, da diese den Wirkmechanismus und die Interaktionen mit anderen Molekülen beeinflussen kann (siehe Abschnitt 2.2.1.4 Chemische Modifikationen). Auch muss zwischen Off-Target-Effekten, die durch die komplementäre Basenpaarung ausserhalb der Zielsequenz entstehen, und unspezifischen Effekten, etwa Immunreaktionen oder Interaktionen mit zellulären Proteinen, unterschieden werden (Jason et al., 2004).

Die häufig eingesetzte Phosphothionat (PS)-Modifikation in ASOs kann durch die Bindung an Immunrezeptoren eine unspezifische entzündungsfördernde Reaktion hervorrufen. PS-ASOs können sowohl das Komplementsystem als auch das angeborene Immunsystem aktivieren und haben das Potential, immuno- und zytotoxisch zu wirken. Diese Gefahr lässt sich allerdings durch gewisse Modifikationen, wie 2'-MOE, stark reduzieren. Die Modifikationen können einerseits die Erkennung durch Immunrezeptoren verhindern, und andererseits durch bessere pharmakologische Eigenschaften die Menge an Molekülen, die für die Therapie benötigt wird, reduzieren (Crooke et al., 2021). Bei einigen PS-ASOs, die 2'-MOE-, cEt- oder LNA-Modifikationen enthalten, wurden zelltoxische Effekte beobachtet, die wahrscheinlich durch die Wech-

selwirkung mit zellulären Proteinen verursacht wurden. Durch das Anfügen von 2'-O-methyl (2'-OMe) konnte diese Wirkung allerdings stark abgeschwächt werden (Shen et al., 2019). Eigentliche Off-Target-Effekte durch eine unspezifische Bindung der RNase H1 sind dagegen eher selten zu erwarten, wenn die Zielsequenz sorgfältig gewählt wurde, da für die Spaltung eine hohe Komplementarität notwendig ist (Crooke et al., 2021).

2.2.3.1.1 Verunreinigungen

Neben organischen und anorganischen Verunreinigungen und Rückständen von Lösungsmitteln, die auch bei der Herstellung von anderen Therapeutika – etwa von niedermolekularen Verbindungen – entstehen können, treten bei Oligonukleotid-Therapeutika auch produktspezifische Verunreinigungen auf.

Zusätzlich zu den gewünschten Haupt-Oligonukleotiden entsteht bei deren Synthese ein komplexes Gemisch von Oligonukleotid-Nebenprodukten. Diese Nebenprodukte unterscheiden sich vom Haupt-Oligonukleotid entweder in der Nukleotidsequenz, der Struktur oder einzelnen Bindungen zwischen den Nukleotiden. Oligonukleotid-Nebenprodukte, die strukturell mit den Hauptprodukten identisch sind oder nur natürlich vorkommende strukturelle Elemente enthalten, können zwar prinzipiell Off-Target-Effekte und unter bestimmten Umständen Entzündungsreaktionen auslösen. Allerdings sind sie meist nur in Mengen vorhanden, die pharmakologisch nicht relevant sind. Nebenprodukte, die strukturelle Elemente aufweisen, die weder im Haupt-Oligonukleotid, noch in natürlich vorkommenden Nukleotiden enthalten sind, sind in ihren toxikologischen Eigenschaften schwer einzuschätzen. Capaldi und Kollegen empfehlen, Oligonukleotidverunreinigungen chemisch zu charakterisieren und sie an Tieren zu testen, falls ein bestimmter Qualifikationsschwellenwert überschritten wird, der von den strukturellen Elementen abhängt, die in der Verunreinigung vorhanden sind. Sie sind der Ansicht, dass sich die Ergebnisse dieser Tests auf chemisch ähnliche Oligonukleotide übertragen lassen, sodass die Tests nicht bei jedem neuen Oligonukleotid aus derselben Klasse wiederholt werden müssen (Capaldi et al., 2017).

2.2.3.2 siRNAs

siRNAs, die im RISC-Komplex gebunden sind, sollten eigentlich nur an eine bestimmte Ziel-RNA binden. Allerdings toleriert der Komplex gewisse Fehler bei der Komplementarität, weshalb auch Sequenzen, die der Zielsequenz ähnlich sind, gebunden werden können. Die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Off-Target-Effekt lässt sich durch bioinformatische Analysen und ein entsprechendes Design der siRNAs reduzieren. Eine weitere Quelle für Off-Target-Effekte ist der zweite Strang der siRNA, der sense-Strang, der nicht an die Ziel-mRNA bin-

den sollte. Es kann vorkommen, dass statt des beabsichtigten antisense-Strangs der sense-Strang im RISC-Komplex verbleibt und eine unerwünschte RNA bindet. Dies kann allerdings verhindert werden, indem der sense-Strang chemisch so verändert wird, dass er schwerer in den RISC-Komplex geladen werden kann (Hu et al., 2020).

Wie bei ASOs besteht auch bei siRNAs die Gefahr, dass das angeborene Immunsystem aktiviert wird. Auch bei hier wird versucht, die Wahrscheinlichkeit einer Immunreaktion durch chemische Modifikationen zu reduzieren (Hu et al., 2020).

2.3 Anwendungen im Pflanzenschutz

2.3.1 Beschreibung des Verfahrens

Nutzpflanzen werden durch eine Vielzahl von Viren, Pilzen, Bakterien und anderen Mikroorganismen bedroht; und auch tierische Schädlinge können grosse Ernteverluste verursachen. In der Landwirtschaft lassen sich diese Krankheitserreger und Schädlinge einerseits durch geeignete Bodenbearbeitung, vielfältige Fruchtfolgen und resistente Sorten in Schach halten, andererseits werden sie auch mit biologischen und chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln bekämpft. Diese wirken jedoch relativ unspezifisch, d.h. sie beeinträchtigen auch Nicht-Zielorganismen, und können sich negativ auf Ökosysteme, die Biodiversität und andere Schutzgüter auswirken. Durch den sequenzspezifischen Mechanismus bei RNAi können dsRNAs eingesetzt werden, um essenzielle Gene von Krankheitserregern und Schadorganismen relativ spezifisch herunterzuregulieren und diese dadurch zu schwächen oder zu töten (OECD, 2020; K. Y. Zhu & Palli, 2020; Zotti et al., 2018).

Die doppelsträngigen RNAs (dsRNAs), die den Silencing-Effekt auslösen, können entweder endogen, also in der Pflanze, exprimiert werden, indem entsprechende DNA-Sequenzen in das pflanzliche Genom eingebaut werden (durch Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen), oder sie werden in Bakterien oder zellfreien Systemen synthetisiert und von aussen (exogen) appliziert (Zotti et al., 2018). Die endogene Expression und Bildung von dsRNA wird auch als host-induced gene silencing (HIGS) bezeichnet. Sie hat den Vorteil, dass dsRNAs in ausreichender Menge in der Pflanze vorhanden sind und dort entweder gegen Pathogene wirken, oder von Schadorganismen aufgenommen werden können (Koch & Petschenka, 2022). Pflanzen, welche dsRNAs endogen exprimieren, sind jedoch transgene Organismen, da artfremde DNA ins Erbgut eingebaut wird. Sie sind deshalb nicht Gegenstand dieses Berichts und werden im Folgenden nicht ausführlich diskutiert, sondern nur dort

erwähnt, wo sie zum Verständnis der einzelnen Anwendungen und deren Entwicklungsstand beitragen.

Exogene dsRNA wird dagegen entweder durch Besprühen (Spray) auf die Pflanzenoberfläche appliziert – man spricht in diesem Fall von spray-induced gene silencing (SIGS) – oder z. B. durch Injektion oder mechanische Inokulation direkt in das Pflanzeninnere eingebracht (siehe Abbildung 5). Für viele Anwendungen ist eine systemische Verteilung der dsRNA in der Pflanze erforderlich (siehe Abschnitt 2.3.3.1 Herausforderungen). Die systemische Verbreitung wird durch die Injektion oder mechanische Inokulation der dsRNA in die Pflanze erleichtert, da die dsRNA nicht erst die Pflanzenoberfläche durchdringen muss. Allerdings sind diese Methoden unter anderem wegen des hohen manuellen Aufwands bisher nur für den Einsatz im Labor geeignet (Rank and Koch 2021).

2.3.2 Anwendungen

2.3.2.1 Schadinsekten

In Experimenten konnte gezeigt werden, dass RNAi in Insekten durch dsRNAs ausgelöst werden kann, wenn sie diese beim Fressen aufnehmen. Indem entsprechende dsRNAs von der Nutzpflanze selbst exprimiert oder auf diese gesprüht werden, ist es möglich, dass die dsRNA von Schadinsekten beim Fressen aufgenommen werden und bestimmte Gene herunterzuregulieren, die für die Entwicklung und physiologische Prozesse dieser Insekten essenziell sind. Mit diesem Ansatz lassen sich sequenzspezifische, auf bestimmte Zielinsekten angepas-

te Insektizide herstellen, die sehr selektiv wirken und sich schnell anpassen lassen (siehe als Beispiel Bachman et al., 2013, 2016). Inzwischen wurden bei einer Reihe von Schädlingen umfangreiche RNAi-Screenings durchgeführt, um essenzielle Gene zu identifizieren, die sich als Ziele für diese Methode eignen könnten (Koch & Petschenka, 2022; Zotti et al., 2018).

Die Effektivität solcher dsRNAs hat sich dabei allerdings als sehr variabel erwiesen. Während gewisse Insektenordnungen wie die Orthoptera (Heuschrecken), Blattodea (Schaben und Termiten) und die meisten Coleoptera (Käfer) nach der Aufnahme von dsRNAs eine starke RNAi-Reaktion zeigen, ist diese in Lepidoptera (Schmetterlinge und Motten) und Diptera (Fliegen) deutlich schwächer. In den Hemiptera (Pflanzenläuse, Zikaden und Wanzen) variiert die Reaktion stark (Huvenne & Smaghe, 2010; Koch & Petschenka, 2022; OECD, 2020).

Die Effektivität der dsRNA wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dazu gehört die Stabilität der RNA, die Effizienz der Aufnahme der dsRNA durch die Insekten, sowie die Expressionsstärke der Gene, die für den RNAi-Prozess nötig sind (siehe Abschnitt 2.1.2 RNA-Interferenz). Auch die Geschwindigkeit, mit der dsRNAs prozessiert oder durch Nukleasen degradiert werden, hat einen Einfluss auf die Effektivität. RNAs können sich in einigen Insektenarten systemisch verbreiten, während sie in anderen Arten lokal bleiben (S. Liu et al., 2020). In einigen Insektenarten, die sich asexuell fortpflanzen (insbesondere Blattläuse), konnte RNAi-Aktivität mit abnehmender Stärke auch in nachfolgenden Generationen

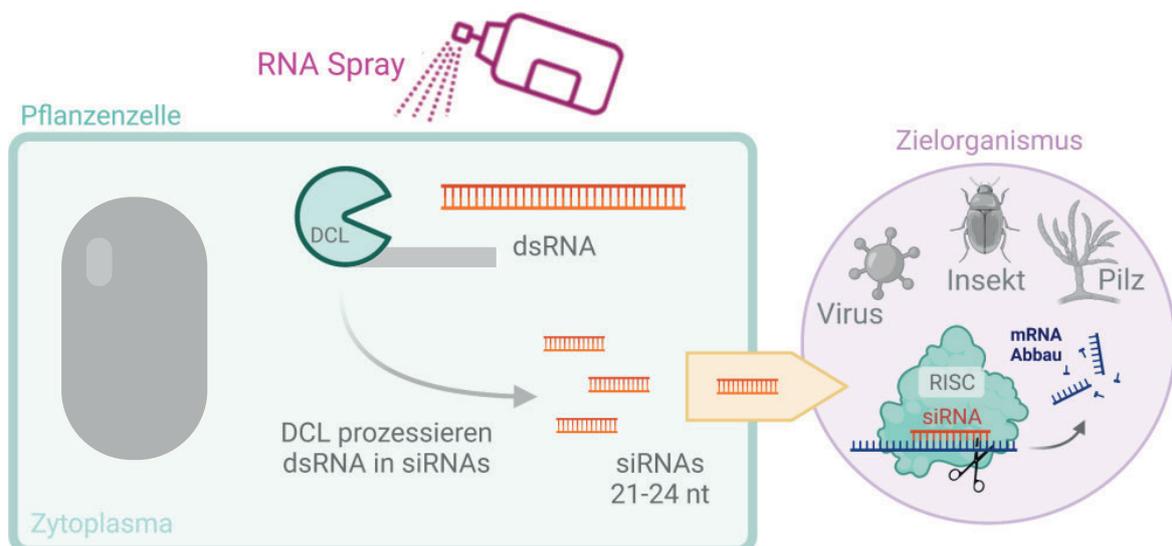


Abbildung 5: Wirkmechanismus von RNAi mittels eines RNA-Sprays als Pflanzenschutzmittel

Eine lange dsRNA wird nach dem Eintritt in die Pflanze von DCL in kürzere siRNAs gespalten, die vom Zielorganismus aufgenommen werden und zum Abbau einer Ziel-mRNA führen (Koch & Petschenka, 2022).

beobachtet werden. Dies beruht wahrscheinlich auf der direkten Weitergabe von dsRNA von der Mutter zu ihren Nachkommen, während sie diese in sich trägt (Abdellatef et al., 2015).

Beim Einsatz von dsRNA in Sprayform gilt es, aufgrund der unterschiedlichen Ernährungsweisen der Schadinsekten zwischen zwei Haupt-Expositionsrouten zu unterscheiden: RNA-Wirkstoffe, die besonders gegen blattfressende Insekten, wie den Kartoffelkäfer, wirksam sein sollen, müssen so angepasst werden, dass sie eine hohe Oberflächenstabilität und -anhaftung zeigen. dsRNAs gegen saugend-stechende Insekten müssen dagegen ins Blattinnere (Apoplast/Interzellularraum) und in die Leitgewebe (Phloem/Xylem) aufgenommen werden. Eine Schwierigkeit besteht darin, die RNA auf der Pflanze vor Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung oder Regen zu schützen. Sowohl in der Pflanze als auch im Insekt muss die RNA stabil bleiben, bis sie die Ziel-mRNA binden kann (Christiaens et al., 2020; Koch & Petschenka, 2022). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die dsRNA in geringer Masse auch über die Aussenhaut (Cuticula) von Insekten aufgenommen werden kann (Christiaens et al., 2018; Hoang et al., 2022; Huang et al., 2019; Romeis & Widmer, 2020).

RNA-Sprays wurden unter Laborbedingungen bereits erfolgreich gegen verschiedene Schadinsekten bzw. Spinnentiere eingesetzt. Dazu gehören der Marienkäfer *Henosepilachna vigintioctopunctata*, der Kartoffelkäfer *Leptinotarsa decemlineata* und der Rapsglanzkäfer *Brassicoglyphus aeneus*. Allerdings gibt es noch kaum verlässliche Daten aus Feldversuchen (Koch & Petschenka, 2022) (siehe Abschnitt 2.3.3 Stand der Entwicklung).

2.3.2.2 Viren

RNAi ist ein wichtiger natürlicher Abwehrmechanismus der Pflanzen gegen Viren (siehe Abschnitt 2.1.2 RNA-Interferenz). Deshalb ist es nicht überraschend, dass sich dsRNAs als wirksames Mittel zur Kontrolle viraler Pathogene erwiesen haben. Sowohl bei transgen-basierten als auch exogenen RNAi Verfahren zeigte sich eine sehr hohe Effektivität von 90 Prozent gegen Viren (Koch & Wassenegger, 2021). Es liess sich auch nachweisen, dass sich exogene dsRNAs systemisch in der Pflanze ausbreiten können, was für ihre Wirksamkeit gegen Viren entscheidend ist. Viele dieser Anwendungen erfordern jedoch eine aufwendige Vorbehandlung der Pflanzen, etwa durch mechanische Verletzung der Blätter, wobei eine dsRNA-Schleifmittel-Lösung manuell auf die Blätter eingerieben wird. Deshalb wird aktuell nach möglichen Formulierungen gesucht, welche die zelluläre Aufnahme erleichtern (siehe Abschnitt 2.3.3.1 Herausforderungen) (Rank & Koch, 2021).

2.3.2.3 Pilze und Oomyzeten

Verschiedene HIGS-basierte Studien konnten belegen, dass der RNAi-Ansatz auch gegen phytopathogene Pilze und Oomyzeten wirkt (letztere werden auch Eipilze genannt; eine Organismengruppe, die den Pilzen zwar physiologisch ähnelt, aber nicht näher mit ihnen verwandt ist). dsRNA-Sprays wurden im Labor erfolgreich gegen *Fusarium graminearum*, den Erreger der Ährenfusariose eingesetzt (Höfle et al., 2020; Koch et al., 2016, 2019; Werner et al., 2020). Die Fähigkeit, dsRNAs aufzunehmen, variiert allerdings beträchtlich zwischen den getesteten Pilz- und Oomyzeten-Arten. Nekrotrophe Pilze, die sich von abgestorbenen Pflanzenzellen ernähren, scheinen dabei deutlich sensitiver auf exogene RNAs zu reagieren als biotrophe Pilze, welche die RNAs ausschließlich aus dem Zellinneren ihrer Wirtspflanzen aufnehmen können. Daher wird vermutet, dass Pilze in Abhängigkeit von ihrer Lebensweise dsRNAs sowohl aus dem extrazellulären als auch aus dem inter- und intrazellulären Raum der Pflanze aufnehmen können. Wie bei anderen RNA-basierten Anwendungen stellt die oft unzureichende Stabilität und begrenzte zelluläre Aufnahme der RNA ein Hindernis bei der Entwicklung von RNA-Sprays gegen Pilze dar (siehe Abschnitt 2.3.3.1 Herausforderungen).

2.3.2.4 Bakterien

Die meisten bakteriellen Krankheiten bei Pflanzen lassen sich nur schwer bekämpfen. Der Einsatz von Antibiotika in der direkten Bekämpfung ist wegen der Gefahr der Resistenzbildung und der damit verbundenen Problematik in der Human- und Veterinärmedizin nicht erwünscht. Oft sind deshalb einzig vorbeugende Massnahmen gegen bakterielle Pflanzenkrankheiten möglich. Zurzeit existieren nur einige wenige Studien zur Anwendung von HIGS gegen bakterielle Erreger, insbesondere gegen durch *Agrobacterium tumefaciens* ausgelöste Pflanzentumore (Escobar et al., 2001) und gegen *Pectobacterium carotovorum* (Mahmoudi & Soleimani, 2019). Versuche mit SIGS-basierten Methoden sind keine bekannt.

2.3.3 Stand der Entwicklung

Der Fokus beim RNAi-basierten Pflanzenschutz lag lange auf gentechnisch veränderten, transgenen Pflanzen, welche dsRNAs endogen exprimieren. Deren Effektivität konnte in vielen Studien gezeigt werden, und mehrere Pflanzensorten sind schon marktreif (Rank & Koch, 2021). Bereits zugelassen für den Handel (z.B. EU) oder auch den Anbau (z.B. USA, China) ist der Mais MON87411 («SmartStax Pro»). Dieser exprimiert neben mehreren Cry-Proteinen aus dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* auch eine dsRNA, die ihn gegen den Maiswurzelbohrer resistent macht (S. Liu et al., 2020).

RNA-Sprays galten lange als nicht wirtschaftlich, weil die Kosten für die Herstellung von synthetischen dsRNAs sehr hoch waren. Für die Anwendung auf dem Feld werden ca. 20 g/ha benötigt (Koch & Petschenka, 2022), was zwar im Vergleich zu herkömmlichen Pestiziden wenig ist, aber bei Preisen von mehreren Tausend Dollar pro Gramm ein RNA-basiertes Mittel deutlich teurer macht als diese. Inzwischen ist der Preis dank neuer zellfreier Syntheseverfahren allerdings auf weniger als einen Dollar pro Gramm gesunken. Dadurch ist das Interesse an der Entwicklung von RNAi-basierten Pestiziden angestiegen (Rank and Koch 2021; Hoang et al. 2022).

Bisher wurden in der Europäischen Union umfangreiche Feldtests mit dem dsRNA-basierten Insektizid Ledprona der Firma GreenLight Biosciences (Produktname «Calantha») gegen den Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) im Feldversuch durchgeführt. Die Wirkung auf die Mortalität der Käferlarven war dabei vergleichbar mit den konventionellen Insektiziden Spinosad und Chlorantraniliprol (Pallis et al., 2022). GreenLight Biosciences stellte bereits im Jahr 2021 einen Antrag bei der US-Umweltschutzbehörde EPA zur Registrierung von Ledprona als neuen Wirkstoff (EPA, 2021) und erhielt im Frühjahr eine Toleranzausnahme. Im Dezember 2023 wurde eine vorläufige Zulassung für drei Jahre erteilt, die anschliessend überprüft wird (EPA 2023). Ein Antrag zur Registrierung in der EU wird ebenfalls erwartet.

Nachdem GreenLight Biosciences die spraybasierte RNAi-Plattform «BioDirect» zur Bekämpfung der Bienennilbe *Varroa destructor* von Bayer/Monsanto erworben hatte, entwickelte sie diese zu einem gebrauchsfertigen Produkt (Pollinator) weiter. Dieses wurde erfolgreich in mehreren groß angelegten Versuchen getestet, was zur Einreichung einer Produktkennzeichnung zur Registrierung bei der EPA führte (de Schutter et al., 2022).

Zusätzlich hat GreenLight Biosciences bereits weitere dsRNA-basierte Pflanzenschutzkonzepte gegen Rebemehltau (*Erysiphe necator*), *Botrytis*, *Sclerotinia* und *Fusarium* entwickelt und im Feld erfolgreich evaluiert (allerdings noch nicht publiziert).

2.3.3.1 Herausforderungen

Um wirksam zu sein, muss dsRNAs unter ganz unterschiedlichen Bedingungen lange stabil bleiben. dsRNA, die auf Pflanzenoberflächen aufgetragen wird, ist Regen und UV-Strahlung ausgesetzt. dsRNA, die systemisch in der ganzen Pflanze wirken soll, muss von der Pflanze aufgenommen und in entfernte Gewebe transportiert werden. Je nach Anwendung muss sie auch in das Innere der Pflanzenzellen gelangen. Nach der Aufnahme durch ein Insekt muss sie den Verdauungstrakt passieren, in die Zellen aufgenommen werden und dort ihre Wirkung ent-

falten. RNA ist jedoch ein relativ instabiles, kurzlebige Molekül. Das führt dazu, dass die gesprühte dsRNA die Zielzellen oft nicht oder nicht in ausreichender Menge erreicht. Wie bei den medizinischen Anwendungen der RNAi stellen der Schutz vor Nukleasen und extremen pH-Werten sowie der gezielte Transport der RNA grosse Herausforderungen dar (Hoang et al., 2022; Rank & Koch, 2021).

Für viele dieser Probleme werden Lösungen auf Basis von Nanomaterialien gesucht: dsRNA, die an Ton-Nanoschichten (BioClay/LDH) angeheftet ist, lässt sich weniger leicht abwaschen (siehe Abschnitt 10.2.3.1 Layered double hydroxide). «Single-walled carbon nanotubes» (SWNTs) und «Carbon Quantum Dot» Nanopartikel könnten dabei helfen, dsRNA in Pflanzenzellen einzuschleusen und vor Enzym-Aktivität zu schützen (siehe Abschnitt 10.2.3.6 Single-walled Carbon Nanotubes (SWCNT) und Abschnitt 10.2.3.2 Carbon Quantum Dots). Um die Stabilität zu verbessern, kann – wie bei den medizinischen Anwendungen – die RNA chemisch modifiziert werden. Die Tatsache, dass diese Nanomaterialien und chemischen Modifikationen die Stabilität und die chemischen Wechselwirkungen in der Pflanze, in den Zielorganismen und in der Umwelt beeinflussen können, führt gleichzeitig zu neuen potenziellen Risiken, die vor einer Zulassung untersucht werden sollten (Christiaens et al. 2020; Rank and Koch 2021; Hoang et al. 2022; S. Liu et al. 2020; Romeis and Widmer 2020). Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass noch nicht vollständig geklärt ist, wie dsRNAs in die Blätter und die Zellen aufgenommen werden und welche Faktoren an der RNAi-Aktivierung beteiligt sind (Hoang et al., 2022; Rank & Koch, 2021).

2.3.4 Unbeabsichtigte Wirkungen

Da RNA-Spray-Anwendungen bisher vor allem gegen Schadinsekten getestet wurden, werden in den folgenden Abschnitten nur die bekannten unbeabsichtigten Wirkungen für diese Anwendungen beschrieben.

2.3.4.1 Im Zielorganismus

2.3.4.1.1 Off-target Effekte

Für ein effektives Silencing werden meist relativ lange dsRNAs verwendet, die vom Dicer in mehrere kurze siRNAs gespalten werden. Da die siRNAs bei der Basenpaarung nicht vollständig komplementär zur Zielsequenz sein müssen, ist es wahrscheinlich, dass nicht nur die Ziel-mRNA gebunden wird, sondern auch andere mRNAs, die eine ähnliche Sequenz enthalten (OECD, 2020). Im zu schädigenden Zielorganismus sind solche Off-Target-Effekte jedoch unproblematisch, da sie höchstens zu einer weiteren Schädigung dieses Organismus führen (S. Liu et al., 2020; OECD, 2020).

2.3.4.1.2 Resistenzen

Es gibt die Befürchtung, dass Mutationen einzelner Basen im Zielgen, die in der Insektenpopulation vorhanden sind, die Effektivität der RNAi senken und zu einer Evolution von Resistenzen führen könnten (Scott et al., 2013). Diese Gefahr ist allerdings gering, wenn ein Pool an verschiedenen siRNA oder lange dsRNAs eingesetzt werden, sodass das Nicht-Binden einzelner siRNAs kompensiert werden kann. Ausserdem wird spekuliert, dass Mutationen in Molekülen, welche im RNAi-Prozess eine Rolle spielen, und Viren, die für RNAi-Suppressoren codieren, gewissen Insekten einen evolutionären Vorteil verschaffen könnten (Scott et al., 2013). Da die Insekten aber auf einen funktionierenden RNAi-Mechanismus angewiesen sind, ist es unwahrscheinlich, dass die Störung dieses Mechanismus durch Mutationen oder Viren zu einem selektiven Vorteil führen würde.

Die grössere Gefahr scheint allerdings darin zu liegen, dass Insektenpopulationen resistent werden, indem die Aufnahme der dsRNA über den Darm verhindert wird. Dieser Mechanismus wurde für resistente Populationen vom Maiswurzelbohrer *Diabrotica virgifera virgifera* (Khajuria et al., 2018) sowie dem Kartoffelkäfer (Mishra et al., 2021) berichtet, die unter künstlichen Laborbedingungen selektiert wurden. Damit wären diese Populationen auch gegen dsRNA resistent, die sich gegen andere Gene richten.

2.3.4.2 Effekte auf Nicht-Zielorganismen

Wie bei allen Pflanzenschutzmitteln gilt es auch bei RNAi-basierten Pflanzenschutzmitteln zu klären, welche möglichen Auswirkungen sie auf Nicht-Zielorganismen – einschliesslich des Menschen als Anwender und Verbraucher – eines Ökosystems haben (P. M. Bachman et al., 2016; Christiaens et al., 2018; Romeis & Widmer, 2020). Hierfür ist entscheidend, ob andere Organismen mit biologisch aktiven dsRNAs in Kontakt kommen und diese aufnehmen. Dies hängt unter anderem davon ab, wie lange diese Moleküle in der Umwelt stabil bleiben. Ausserdem muss zwischen Effekten, die spezifisch für die RNA-Sequenz sind, und unspezifischen Effekten wie Immunreaktionen, unterschieden werden (Romeis and Widmer 2020).

2.3.4.2.1 Stabilität in der Umwelt

Generell bleibt nackte (also unformulierte) RNA in der Umwelt nicht lange stabil. Mehrere Studien haben gezeigt, dass nackte dsRNAs nach der Anwendung auf lehmigen Böden schon nach 48 Stunden und in aquatischen Systemen mit verschiedenen Sedimenttypen nach sieben Tagen nicht mehr nachweisbar waren (P. Bachman et al., 2020). Nackte dsRNA, die auf die Blätter von Kartoffeln gesprüht worden war, liess sie sich nach dem Trocknen nur schwer von den Blättern abwaschen und erwies sich

als deutlich UV-resistenter als auf Glasflächen. Auch vier Wochen nach dem Aufsprühen war diese dsRNA noch biologisch aktiv. Allerdings ist unklar, ob die dsRNAs tatsächlich auf der Oberfläche blieben, oder ob sie in die Pflanze aufgenommen worden waren (S. Liu et al., 2020).

Wenn die dsRNA formuliert eingesetzt wird, beeinflussen die Formulierungen (siehe Abschnitt 10.2 Verabreichung im Pflanzenschutz) deren Stabilität deutlich. So konnten etwa dsRNAs gebunden an BioClay/LDH auf der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) noch 30 Tage nach dem Aufsprühen nachgewiesen werden, während nackte dsRNAs schon nach 20 Tagen kaum mehr nachweisbar waren (Mitter et al., 2017). Es konnte auch gezeigt werden, dass Carbon Quantum Dots dsRNAs mindestens 30 Tage lang vor dem Abbau durch RNase A schützen (Wang et al., 2023).

2.3.4.2.2 Sequenz-spezifische Effekte

Wenn Nicht-Zielarthropoden mit biologisch aktiver dsRNA in Kontakt kommen, ist es möglich, dass sie diese aufnehmen und mit Hilfe ihrer RNAi-Maschinerie verarbeiten. Wie wahrscheinlich dies ist, hängt stark von verschiedenen Faktoren ab, wie etwa der Spezies oder der Länge der RNA (Romeis & Widmer, 2020). Falls der Nicht-Zielarthropod eine mRNA exprimiert, deren Sequenz der Ziel-Sequenz genügend ähnelt, kann es zu einem ungewollten Gen-Silencing kommen. Die Wahrscheinlichkeit hierfür kann durch die Wahl von geeigneten Sequenzen für die dsRNAs reduziert werden. Wenn zukünftig eine grössere Anzahl Insekten-Genome entschlüsselt und verfügbar sind, sollten sich potentielle Übereinstimmungen der Sequenzen in Nicht-Zielorganismen bioinformatisch besser vorhersagen lassen. Reine bioinformatische Vorhersagen können allerdings die Effekte überschätzen. Es gilt zusätzlich zu berücksichtigen, ob die Nicht-Zielorganismen die dsRNAs tatsächlich aufnehmen und ob sie eine für sie schädliche Wirkung entfalten. Ausserdem können die Effekte von siRNAs durch die Präsenz anderer, natürlich vorkommender, siRNAs positiv oder negativ beeinflusst werden (S. Liu et al., 2020).

2.3.4.2.3 Sequenz-unspezifische Effekte

Es ist bekannt, dass dsRNAs bei Säugetieren, einschliesslich des Menschen, eine Immunreaktion auslösen können. Ob die Aufnahme von dsRNAs über Nahrungs- und Futterpflanzen, die zuvor mit RNA besprüht wurden, einen Effekt auf das Immunsystem hat, ist noch unklar. Frühe Berichte über das Vorkommen von mit der Nahrung aufgenommener dsRNA in Körperflüssigkeiten und -geweben von Säugetieren konnten bisher jedoch nicht bestätigt werden (Kang et al., 2017). Dies erscheint aufgrund der verschiedenen physikalischen und biochemischen Barrieren, die dafür überwunden werden müssten,

auch eher unwahrscheinlich. Allerdings steigt die Wahrscheinlichkeit für solche unerwünschten Effekte, wenn die dsRNAs modifiziert werden (siehe Abschnitt 2.2.1.4 Chemische Modifikationen), um ihre Stabilität und zelluläre Aufnahme zu erhöhen (S. Liu et al., 2020). Unspezifische Immunreaktionen werden auch bei Nicht-Zielinsekten beobachtet, wenn hohe Dosen von dsRNA aufgenommen oder injiziert wurden (Christiaens et al., 2018; OECD, 2020; Romeis & Widmer, 2020; Weinstock et al., 2006).

2.3.4.3 Kontaminationen

dsRNA für den Einsatz in RNA-Sprays kann entweder durch chemische Synthese, durch in-vitro-Transkription, in bakteriellen Zellkulturen oder in zellfreien Systemen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese, der In-vitro-Transkription und den meisten bakteriellen Methoden wird zuerst ein Einzelstrang synthetisiert und anschliessend ein komplementärer Strang ergänzt. Mittels RNA-Bakteriophagen – also Viren, die Bakterien befallen – können dsRNAs auch direkt synthetisiert werden. Bei allen diesen Methoden können Kontaminationen auftreten, wenn die dsRNA nicht sorgfältig gereinigt wird. Dies kann jedoch durch Qualitätskontrollmassnahmen verhindert werden. Zudem kann dsRNA mittlerweile mit zellfreien Systemen kostengünstig und rückstandsfrei in grossen Mengen hergestellt werden (Dietz-Pfeilstetter, 2021).

3 mRNA-Technologien

3.1 Einleitung

Messenger RNAs (mRNAs) sind einzelsträngige Ribonukleinsäuren, die die Information für die Herstellung eines Proteins tragen. Im Zytoplasma der Zelle wird daraus ein Protein erzeugt. Die Möglichkeit, künstlich produzierte mRNAs in eine Zelle einzuschleusen und praktisch jedes gewünschte Protein herzustellen, eröffnet viele potentielle Anwendungen.

Bisher am besten etabliert sind mRNA-basierte Impfstoffe. Diese schleusen eine mRNA, welche die genetische Information für ein bestimmtes Protein eines Krankheitserregers enthält, in Körperzellen ein, wo dieses Protein anschliessend produziert wird. Dieses wird daraufhin vom Immunsystem als fremd erkannt und regt eine Immunantwort an, die letztlich zur Immunisierung gegen den Krankheitserreger führt. Im Vergleich zu konventionellen Impfstoffen lassen sich mRNA-Impfstoffe sehr schnell mit zellfreien Verfahren herstellen. Auch an Mutationen des Erregers können sie rasch angepasst werden. Ausserdem eignet sich das Verfahren auch bei Krankheitserregern, gegen die es bisher keine konventionellen Impfungen gibt. Die Methode lässt sich sogar gegen Krebszellen einsetzen (Chaudhary et al., 2021).

Eine weitere Anwendung synthetischer mRNAs ist die passive Immuntherapie. Antikörper haben sich bei der Behandlung verschiedenster Krankheiten – von Autoimmunkrankheiten über ansteckende Krankheiten bis hin zu verschiedenen Krebsarten – als ausserordentlich wirksam erwiesen. Ihre Herstellung ist jedoch sehr aufwendig, und sie müssen immer wieder neu verabreicht werden. Die Verabreichung der Antikörper-Sequenz als mRNAs, die anschliessend im Körper zu Proteinen übersetzt werden, verspricht eine einfachere Herstellung und eine länger anhaltende Wirkung im Vergleich zur Vergabe als Protein (Schlake et al., 2019).

In der Entwicklung befindet sich auch eine mRNA-basierte Methode zum Ersetzen oder Ergänzen von körpereigenen Proteinen, die nicht in der benötigten Menge produziert werden oder ihre Funktion eingebüsst haben. Hierbei wird das entsprechende Gen-Produkt als mRNA in die Zellen eingefügt, wo das Ersatzprotein hergestellt wird, das sodann das körpereigene Protein ersetzt oder ergänzt (Qin et al., 2022).

Nicht behandelt wird in diesem Bericht die Möglichkeit, das Genom mittels synthetischer mRNAs zu verändern. Dabei wird eine mRNA in die Zelle eingebracht, die an-

schliessend ein Protein exprimiert, welches DNA spalten, bzw. Basen ändern kann (Genom-Editierung). Dazu gehören Cas-Enzyme, TALEN oder Zinkfinger-Nukleasen.

3.2 Beschreibung des Verfahrens

Natürliche mRNAs nehmen eine essenzielle Funktion bei der Herstellung von Proteinen in der Zelle wahr. Sie entstehen im Zellkern während der Transkription durch die Umwandlung der genetischen Information auf der DNA zu einer Vorstufe der mRNA, pre-mRNA genannt. Anschliessend wird die pre-mRNA prozessiert. Die daraus entstehende mRNA wird nachfolgend aus dem Zellkern in das Zytoplasma befördert, wo sie von Molekülkomplexen (Ribosomen) abgelesen wird. Durch diesen Prozess, Translation genannt, werden verschiedene Aminosäuren gemäss der in der mRNA enthaltenen Sequenzinformation zu einem bestimmten Protein zusammengefügt (Qin et al., 2022).

Während der Prozessierung im Zellkern werden bestimmte Sequenzen, sogenannte Introns, aus der pre-mRNA herausgeschnitten, sodass nur die Exon genannten Bereiche übrigbleiben. Dieser Schritt wird als Splicing bezeichnet. Indem unterschiedliche Sequenzen aus der pre-mRNA geschnitten werden (Alternatives Splicing), können aus einer pre-mRNA verschiedene mRNAs entstehen. Zusätzlich werden der pre-mRNA an einem Ende (5'-Ende) eine Cap genannte Struktur und am anderen Ende (3'-Ende) eine Reihe von Adenin-Nukleotiden – Poly(A)-Schwanz genannt – angehängt. Diese schützen die RNA vor dem enzymatischen Abbau durch Nukleasen. Zudem sind sie eine Voraussetzung für den Transport aus dem Zellkern und für die Translation. Die Sequenz, die den Bauplan für das Protein enthält – Open Reading Frame (ORF) genannt – wird von zwei kürzeren Sequenzen flankiert, die nicht in ein Protein übersetzt werden. Diese Sequenzen werden als nicht-translatierte Regionen (Englisch UTR) bezeichnet und sind wichtig für die Stabilität und die korrekte Funktion der mRNA. In ihnen befinden sich insbesondere Bindestellen für Proteine, die die Stabilität und den Transport der mRNA beeinflussen und die Translation einleiten. Ausserdem können in der 3'-UTR miRNAs binden und dadurch die Stabilität und die Translation der mRNA regulieren (siehe Abschnitt 2.1.2 RNA-Interferenz) (Qin et al., 2022).

Für medizinische Anwendungen wird der Open Reading Frame zusammen mit den beiden nicht-translatierten Regionen zuerst als DNA synthetisiert, die anschliessend

transkribiert wird. Der Poly(A)-Schwanz wird oft mit dem Open Reading Frame zusammen synthetisiert, kann aber auch durch ein spezialisiertes Enzym an die mRNA angefügt werden. Die Cap-Struktur kann entweder während der Transkription oder später mit Enzymen hinzugefügt werden. Die synthetische mRNA wird anschliessend in die Körperzellen eingebracht, wo sie im Zytoplasma der Zelle in ein Protein translatiert wird (Qin et al., 2022).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie die mRNA in Körperzellen eingebracht werden kann. Die einfachste Art ist die Injektion von «nackter» mRNA – also einem mRNA-Molekül ohne Umhüllung – zum Beispiel in den Muskel, die Haut oder einen Tumor. Allerdings ist mRNA, wie alle RNAs, instabil und wird schnell von Enzymen abgebaut, oftmals bevor sie ihre Primärwirkung in der Zielzelle entfalten kann. Deshalb wurden und werden verschiedene Verabreichungssysteme entwickelt, welche die mRNAs effizient in die gewünschten Zellen einbringen können. Am meisten genutzt werden aktuell Liposomen oder lipidbasierte Vektoren wie Lipid-Nanopartikel, die aus natürlichen und künstlichen Lipiden zusammengesetzt sind. Im Unterschied zu Liposomen haben Lipid-Nanopartikel einen Kern aus Lipiden und Molekülen mit ähnlichen Eigenschaften, worin die Wirkstoffe eingeschlossen werden. Auch an polymer- oder peptid-basierten Nanopartikeln oder Lipid-Polymer Hybrid-Nanopartikeln wird geforscht. Der Abschnitt, der für das Protein codiert, kann ausserdem auch in das Genom eines Virus eingebaut werden, das die genetische Information dann in die Zelle einschleust (siehe Abschnitt 3.4.5 Herausforderungen und Abschnitt 10.1 Medizinische Verabreichungsmethoden) (Gupta et al., 2021).

3.3 Anwendungen

3.3.1 mRNA-Impfstoffe

Konventionelle Impfstoffe enthalten einen abgeschwächten oder abgetöteten Krankheitserreger – oder Teile davon –, der nach der Impfung vom Immunsystem erkannt wird und dadurch zu einer Immunisierung gegen den Krankheitserreger führt (Krammer, 2020). Dieses Verfahren hat sich zwar bei einer Reihe von ansteckenden Krankheiten, wie den Pocken oder der Poliomyelitis, als sehr erfolgreich erwiesen. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass die Methode bei vielen Pathogenen nur beschränkt oder gar nicht wirksam ist. Dies insbesondere wenn diese in der Lage sind, schnell zu mutieren und so der Immunantwort zu entgehen. Da die Entwicklung neuer konventioneller Impfstoffe relativ lange dauert, kann eine Reaktion auf einen neuen oder mutierten Erreger nur zeitverzögert erfolgen.

Bei mRNA-Impfungen werden keine Krankheitserreger verabreicht, sondern nur der Bauplan für gewisse Proteine des Erregers. Diese als Antigene bezeichneten Proteine werden danach in den Körperzellen durch die Translation der mRNA hergestellt und vom Immunsystem als fremd erkannt (siehe Abbildung 6).

mRNAs weisen gegenüber herkömmlichen Impfungen verschiedene Vorteile auf: Anders als diese, können sie sehr schnell in einem zellfreien Verfahren hergestellt, skaliert und angepasst werden. Dadurch ist es möglich, schnell auf Mutationen zu reagieren. Eine mRNA kann zudem die Information von mehreren Proteinen gleichzeitig tragen, und sie integriert sich nicht ins Genom, das sich im Zellkern befindet. Da die Proteine von körpereigenen Zellen hergestellt werden, entspricht auch die Glykosylierung derjenigen von natürlichen Proteinen. Ausserdem haben mRNA-Impfstoffe das Potential, das Immunsystem nicht nur gegen ansteckende Krankheiten zu aktivieren, sondern auch gegen Krebszellen (Chaudhary et al., 2021).

Eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Antigenen und der darauffolgenden Immunantwort spielen Antigen-präsentierende Zellen, wie zum Beispiel dendritische Zellen. Sie nehmen Antigene in sich auf und präsentieren sie den B- und T-Zellen des Immunsystems. Anstatt die mRNA in den Muskel zu injizieren, ist es daher auch möglich, den Patientinnen und Patienten dendritische Zellen zu entnehmen und die mRNA direkt in diese Zellen einzufügen. Anschliessend werden die dendritischen Zellen unter die Haut gespritzt, wo sie die Immunantwort auslösen. Dieser Ansatz ist viel aufwendiger als die direkte Injektion von mRNAs, hat sich aber vor allem bei Impfungen gegen Krebszellen als potentiell effektiv erwiesen (Qin et al., 2022).

Man kann grob zwischen drei Kategorien von mRNA-Impfstoffen unterscheiden: 1) nicht-Nukleosid-modifizierte mRNAs, 2) mRNAs und 3) selbst-amplifizierende nicht-Nukleosid-modifizierte mRNAs. Nicht-Nukleosid-modifizierte mRNAs enthalten nur die vier kanonischen Basen A, C, G und U. In Nukleosid-modifizierten mRNAs wurden eine oder mehrere kanonische Basen durch modifizierte Basen ersetzt, um die Erkennung der mRNA durch das angeborene Immunsystem zu verhindern und die Translation zu verbessern. Es handelt sich vor allem um Pseudouridin, 1-Methylpseudouridin oder 5-Methylcytidin. Selbst-amplifizierende mRNAs unterscheiden sich von konventionellen mRNAs dadurch, dass sie nicht nur die genetische Information für das Antigen enthalten, sondern auch für mehrere Proteine, die von Viren für die Replikation ihrer RNA gebraucht werden. Dadurch kann sich die mRNA nach dem Einbringen in die Zelle selbst vervielfältigen. Deshalb reicht bei diesem Verfahren sehr

wenig anfängliche mRNA aus, um eine Immunisierung zu erzielen. Ausserdem entstehen bei der Vervielfältigung dsRNA-Strukturen, die vom angeborenen Immunsystem erkannt werden und dadurch die Wirkung des Impfstoffes verstärken (Pardi et al., 2018).

3.3.2 Antikörper

Antikörper-basierte Therapien gehören seit einigen Jahren zu den erfolversprechendsten medizinischen Interventionen gegen eine Reihe von Krankheiten, die vorher nur schwer therapierbar waren. Sie haben sich als effektiv gegen virale und bakterielle Infektionen, Autoimmunkrankheiten und verschiedene Krebsarten erwiesen. Bei dieser Therapieform werden sogenannte monoklonale Antikörper eingesetzt, die spezifisch einen bestimmten Abschnitt (Epitop) eines Zielmoleküls binden und dieses dadurch gezielt blockieren. Die Antikörper werden meist in Zelllinien von Mäusen oder Menschen, die mit dem Antigen in Kontakt gekommen sind, produziert. Alternativ gibt es auch sogenannte rekombinante monoklonale Antikörper. Diese können auch in vitro ohne vorherige Immunisierung, und dadurch schneller, hergestellt wer-

den. Diese Herstellungsmethoden sind allerdings sehr aufwendig, und die aufgereinigten Antikörper müssen anschliessend bis zu ihrer Verabreichung ständig gekühlt gelagert und transportiert werden (Lu et al., 2020). Indem stattdessen nur die genetische Information in Form mRNA in die Körperzellen eingebracht und dort kurzzeitig eine gewisse Menge an Antikörpern produziert wird, die anschliessend ihre Funktion im Körper ausführen können, lässt sich dieser aufwendige und teure Herstellungsprozess umgehen (Qin et al., 2022).

3.3.3 mRNA-basierte Proteinersatztherapien

Bei mRNA-Ersatztherapien werden zelleigene Proteine, die nicht in genügender Menge hergestellt oder nicht korrekt reguliert werden, ersetzt oder ergänzt. Dies geschieht, indem die mRNA des entsprechenden Proteins in die Zelle eingebracht und exprimiert wird. Ersatztherapien eignen sich vor allem für die Behandlung von seltenen genetischen Stoffwechselkrankheiten und Erbkrankheiten wie z. B. Muskeldystrophien oder Mukoviszidose (Xiao et al., 2022).

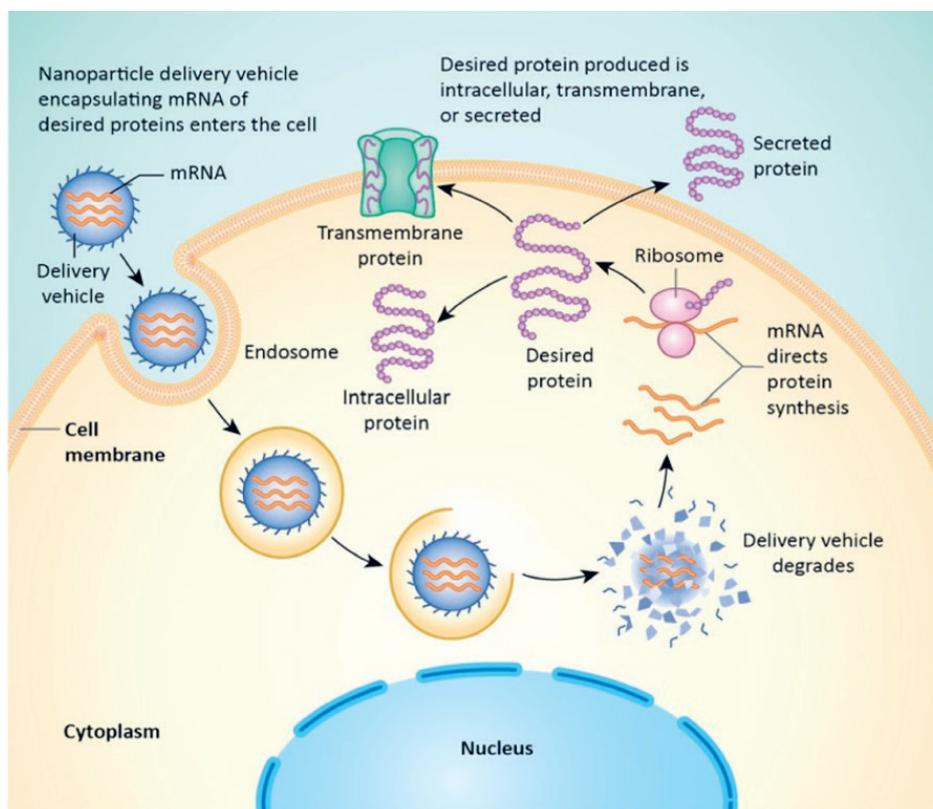


Abbildung 6: Funktionsweise der mRNA-Technologien.

mRNAs werden in Nanopartikel verpackt und per Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die mRNA wird aus dem Endosom freigesetzt und das Nanopartikel wird aufgelöst. Im Zytoplasma wird die mRNA translatiert und das dabei entstehende Protein bleibt entweder im Zytosol, wird in die Zellmembran integriert oder abgesondert (Bhat et al., 2021).

3.4 Stand der Entwicklung

3.4.1 Impfstoffe

Die Möglichkeit, mRNAs als Impfung zu nutzen, wurde bereits vor mehr als 30 Jahren in Betracht gezogen. Erste vielversprechende Versuche wurden bei Tieren anfangs der 1990er-Jahre und bei Menschen anfangs der 2000er-Jahre durchgeführt (Pascolo, 2021). Trotz dieser frühen Erfolge und aller potentieller Vorteile galt diese Technologie allerdings lange Zeit als wenig aussichtsreich. Dies lag vor allem daran, dass die mRNA-Moleküle als zu wenig stabil angesehen wurden, um effektiv als Medizinprodukte eingesetzt zu werden. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, eine adäquate Stimulation des Immunsystems zu erreichen. Während der Sars-CoV-2-Pandemie haben sich die mRNA-Impfstoffe schliesslich in kurzer Zeit als aussichtsreichster Ansatz durchgesetzt und ihre Wirksamkeit bewiesen. Nicht zuletzt wegen dieses Erfolges hat die Forschung an mRNA-Impfungen auch gegen andere Krankheitserreger und Krebszellen in den letzten Jahren stark zugenommen (Chaudhary et al., 2021).

3.4.1.1 Ansteckende Krankheiten

Bisher wurden mRNA-Impfstoffe erst gegen das Coronavirus Sars-CoV-2 zugelassen. Die ersten beiden mRNA-Impfstoffe erhielten 2020 von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel FDA eine Notfallzulassung und wurden kurz darauf auch in der EU und in der Schweiz zugelassen. Sowohl das von BioNTech entwickelte Vakzin Comirnaty als auch Spikevax von Moderna enthalten die mRNA des Spike-Glykoproteins von Sars-CoV-2. Die mRNAs wurden in Lipid-Nanopartikel eingebettet und die Uridin-Basen durch N1-Methylpseudouridin ersetzt. Seither wurden mehrere Milliarden Impfdosen weltweit verabreicht (Qin et al., 2022). An neue Virusvarianten angepasste Impfstoffe dieser Hersteller sind bereits zugelassen oder noch in der klinischen Testphase. Stand Februar 2024 sind neben den Impfstoffen von BioNTech und Moderna die selbstamplifizierende nicht-modifizierte mRNA HGCO19 von Gennovo in Indien, ARCoV (Academy of Military Sciences/Walvax Biotechnology/Suzhou Abogen Biosciences) in Indonesien und SYS6006 (CSPC Pharmaceutical Group) in China zugelassen. Vier weitere befinden sich in der klinischen Phase III und sechs in Phase II. In der klinischen Phase III befinden sich ausserdem Impfungen gegen Cytomegaloviren, Influenzaviren und das humane respiratorische Synzytial-Virus (RSV). Impfungen gegen eine Reihe weiterer Viren, darunter das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), Tollwut und Eppstein-Barr, sowie gegen verschiedene Bakterien und Parasiten sind noch in der vorklinischen oder frühen klinischen Phase (vfa, 2023).

3.4.1.2 Krebs

mRNA-Impfungen zur Krebsbehandlung wurden in präklinischen und klinischen Studien untersucht und zeigten dabei bei verschiedenen Krebsarten erfolgversprechende Resultate. Bisher wurden neun klinische Studien mit mRNA-Impfungen gegen Krebszellen abgeschlossen. 17 weitere Phase I- und II-Studien mit lipidumhüllter mRNA laufen bereits oder rekrutieren noch Probanden. Merck und Moderna kündigten im Juli 2023 den Start einer Phase-III-Studie ihres personalisierten Impfstoffs mRNA-4157 gegen Melanome an (Carvalho, 2023). mRNA-basierte Impfungen mit dendritischen Zellen sind teilweise bereits weiter fortgeschritten: Unter den 19 geplanten oder laufenden Studien sind zwei in Phase III (Lorentzen et al., 2022).

3.4.2 Antikörper

Die meisten mRNA-basierten Antikörper-Therapien sind noch in der vorklinischen Phase. Einzig ein Antikörper gegen das Chikungunya-Virus wird aktuell klinisch getestet. Antikörper gegen das Zika-Virus, HIV und das humane RSV wurden in Mäusen erfolgreich getestet. Der gegen gewisse Arten von Brust- und Magenkrebs zugelassene monoklonale Antikörper Trastuzumab konnte Mäusen erfolgreich als mRNA verabreicht werden (Qin et al., 2022).

3.4.3 mRNA-basierte Protein-Ersatztherapien

An Protein-Ersatztherapien wird aktuell intensiv geforscht. Es werden insbesondere Therapien gegen Herz- und Lungenkrankheiten, Blutbildungsstörungen, orthopädische Krankheiten, neurologische Erkrankungen, metabolische Krankheiten und Krebs gesucht. Die allermeisten dieser Therapien haben allerdings noch präklinischen Status. Die einzigen beiden mRNAs, die sich in der klinischen Phase befinden, codieren für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), um Blutgefäße am Herzen nachwachsen zu lassen, und für das Zelloberflächenprotein «Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator» (CFTR) zur Behandlung von zystischer Fibrose (Qin et al., 2022).

3.4.4 Tiermedizin

Obwohl viele der Krankheiten, für die mRNA-Impfstoffe entwickelt werden, von Tieren übertragen werden können, gibt es bisher noch keine Anwendungen von mRNA-Technologien in der Tiermedizin. Anders als in der Humanmedizin wurden für die Impfung von Haus- und Zootieren gegen Sars-CoV-2 keine mRNA-Impfstoffe zugelassen, sondern Proteinimpfstoffe und attenuierte Viren

(Sharun et al., 2021). In der Entwicklung befindet sich aktuell ein experimenteller Impfstoff gegen Tollwut, der bereits erfolgreich in Mäusen und Hunden getestet worden ist (Li et al., 2022). Die Fortschritte bei der Entwicklung von mRNA-Impfstoffen für den Menschen und die erfolgreichen Versuche mit verschiedenen Impfungen an Labortieren lassen erwarten, dass diese Technologie in Zukunft auch vermehrt in der Tiermedizin zur Anwendung kommen wird (Aida et al., 2021).

3.4.5 Herausforderungen

Eine grosse Herausforderung bleibt der Transport der mRNA zu den und in die gewünschten Zellen. mRNA ist – wie alle einzelsträngigen Nukleinsäuren – negativ geladen und kann deshalb die negativ geladene Zellmembran schlecht durchdringen. Ausserdem ist sie in Zellen sehr instabil und wird innerhalb weniger Stunden abgebaut. Sogar wenn sie erfolgreich in die Zelle eingedrungen ist, ist die Wahrscheinlichkeit gross, dass sie in ein Endosom, ein membranumschlossenes Organell, eingeschlossen und dadurch deaktiviert wird. Geeignete Verabreichungssysteme aus Liposomen oder Polymeren schützen die mRNA vor ihrem Abbau, fördern die Aufnahme durch die Zelle und erlauben es der mRNA, aus den Endosomen zu entkommen. Diese Systeme dürfen allerdings nicht schädlich sein und keine Immunantwort hervorrufen. Auf diesem Weg können mRNAs inzwischen zuverlässig und spezifisch in verschiedene Leberzellen (Hepatozyten, Kupferzellen und Endothelzellen) eingebracht werden. Am häufigsten werden hierfür Lipid-Nanopartikel eingesetzt, die aus verschiedenen Lipiden mit unterschiedlichen Eigenschaften zusammengesetzt sind. Auch Nanopartikel aus biologisch abbaubaren Polymeren und kationische Nanoemulsionen können verwendet werden (siehe Abschnitt 10.1 Medizinische Verabreichungsmethoden) (Qin et al., 2022).

Nicht-körpereigene mRNA und insbesondere auch Beiprodukte der In-vitro-Produktion, die in den Präparationen vorhanden sein können (wie zum Beispiel dsRNA), werden von verschiedenen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt. Dies kann einerseits die Proteinherstellung und damit die Effektivität der Immunisierung behindern. Andererseits ist bei mRNA Impfstoffen aber auch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems ein wichtiger Faktor für die Aktivierung und Reifung der dendritischen Zellen, die für eine effektive und langanhaltende Immunität sorgen. Die Herausforderung besteht deshalb darin, die immunanregenden Eigenschaften der mRNA so zu optimieren, dass eine Reaktion des Immunsystems ausgelöst wird, ohne dass die Translation negativ beeinflusst wird und ohne dass schwere Nebenwirkungen auftreten. Auch die Wahl des Transportsystems

kannte die Immunreaktion beeinflussen. So gibt es Lipid-Nanopartikel mit zyklischen Lipiden, die eine bestimmte Immunreaktion auslösen (Pardi et al., 2018). Bei der intramuskulären Verabreichung ist diese Aktivierung des Immunsystems ohne gravierende negative Nebenwirkungen sowohl bei Nukleosid-modifizierten als auch bei den nicht-modifizierten Covid-19-Impfstoffen gelungen (Barbier et al., 2022).

Die bisher zugelassenen mRNA-Impfstoffe müssen tiefgekühlt bei -90 °C bis -60 °C gelagert werden und sind nur während einer relativ beschränkten Zeit haltbar. Auch wenn die Haltbarkeit inzwischen verbessert werden konnte, schränken die Anforderungen an die Lagerung die Anwendungsgebiete ein. Auch hier ist zu erwarten, dass mittels verbesserten Verabreichungsmethoden, wie z. B. lyophilisierten Liposomen, die Stabilität bei höheren Raumtemperaturen verbessert werden kann (Barbier et al., 2022).

3.5 Unerwünschte Wirkungen

Bis vor der Corona-Pandemie wurden die meisten mRNA-Technologien erst im Tierversuch getestet, und viele der klinischen Studien sind noch in einem frühen Stadium. Nach dem Ausbruch der Pandemie wurden global viele Mittel in Forschung und Entwicklung der Impfstoffe investiert und die Zulassungsprozesse beschleunigt, was klinische Studien und die anschliessende Zulassung des Impfstoffes innerhalb kurzer Zeit ermöglichte. Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von mRNA-Wirkstoffen betrifft die Immunreaktion: Bei mRNA-Impfstoffen muss diese so optimiert werden, dass sie stark genug für die Immunisierung ist, die Nebenwirkungen aber gleichzeitig möglichst gering bleiben. Bei mRNA-basierten Antikörpern und Proteinersatztherapien ist hingegen eine möglichst geringe Immunantwort gefragt, um Nebenwirkungen zu minimieren (Barbier et al., 2022). Im Rahmen der Impfung gegen Sars-CoV-2 wurden nur selten schwere Nebenwirkungen beobachtet. Registriert wurden allerdings vermehrt Fälle von Herzmuskelentzündungen, Bell's Palsy, Zerebraler Venen- und Sinusthrombose, Guillain-Barré-Syndrom und einer Reihe weiterer Störungen des Gefäss- und Immunsystems. Da diese auch nach einer Infektion mit Sars-CoV-2 vermehrt auftreten, wird spekuliert, dass das auf der mRNA codierte Spike-Protein dafür verantwortlich ist (Trogakos et al., 2022). Ausserdem sind anaphylaktische Reaktionen aufgetreten. Es wird vermutet, dass diese auf das Vorhandensein des Polymers Polyethylen (PEG) in der Lipid-Hülle zurückzuführen sind (Chaudhary et al., 2021). Neue Formulierungen (Liposomen, LNP, Polyplexe) von mRNA (modifiziert oder nicht modifiziert) und alternative Injektionsstellen (z. B. subkutan) werden getestet, um mRNA-Impfstoffe weiter zu verbessern.

4 RNA-Aptamere

4.1 Einleitung

Bereits 1967 konnte gezeigt werden, dass RNA, die für ein Protein codiert, das dann wiederum die RNA vervielfältigt, in einem zellfreien Medium durch zufällige Mutationen und anschließende Selektion evolvieren und so für bestimmte Anforderungen optimiert werden kann (Mills et al., 1967). 1990 wurde dann ein Verfahren namens SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) (siehe Abschnitt 4.2.3 SELEX) entwickelt, mit dem durch eine Reihe von Selektionsschritten RNAs erzeugt werden können, die dank ihrer dreidimensionalen Struktur sehr spezifisch an ein Molekül binden (Tuerk & Gold, 1990). In den frühen 2000er-Jahren wurden auch in Bakterien natürliche RNAs (Riboswitches) entdeckt, die auf diese Weise bestimmte Metaboliten erkennen und den Stoffwechsel regulieren (Nudler & Mironov, 2004).

4.2 Beschreibung des Verfahrens

RNA-Aptamere sind kurze (10-120 nt), nicht-codierende, einzelsträngige RNA-Sequenzen (RNA Oligonukleotide). Anders als nicht-codierende RNAs beim posttranskriptionellen Silencing (siehe Abschnitt 2.1.2 RNA-Interferenz) binden sie nicht durch Basenpaarung an andere Ribonukleinsäuren, sondern erkennen und binden – ähnlich wie monoklonale Antikörper – durch ihre dreidimensionale Konfiguration ein bestimmtes Zielmolekül. Dieses kann dadurch entweder aktiviert oder inaktiviert werden. Neben RNA-Aptameren gibt es auch DNA-Aptamere und Peptid-Aptamere. Nachfolgend sind mit Aptameren immer RNA-Aptamere gemeint.

4.2.1 Bindung an Zielmoleküle

Die Aptamere binden sich durch van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbindungen, elektrostatische Interaktionen, Stapelung von flachen aromatischen Liganden und Formkomplementarität an ihre Zielmoleküle. Dabei werden kleine Zielmoleküle in das Aptamer integriert, während bei grossen Zielmolekülen, wie Oberflächenproteinen, das Aptamer in die Struktur des Moleküls eingefügt wird (Kohlberger & Gadermaier, 2021).

4.2.2 Aptamere vs Antikörper

Aptamere haben eine ähnliche Funktion wie Antikörper, zeichnen sich diesen gegenüber aber durch bestimmte

Vorteile aus, die sie für therapeutische und diagnostische Anwendungen besonders interessant machen: RNA-Aptamere können sich auch nach mehreren Denaturierungen (d. h. dem Verlust ihrer Struktur) wieder in ihre funktionelle Struktur zurückfalten. Dadurch bleiben sie auch bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen mehrere Jahre haltbar. Antikörper dagegen sind deutlich temperaturempfindlicher, müssen kalt (2–8 °C) gelagert werden und denaturieren bei zu hohen Temperaturen unumkehrbar. Aptamere können chemisch synthetisiert werden. Zudem dauert ein In-vitro-SELEX-Prozess in der Regel nur 2–8 Wochen. Dadurch sind sie günstig zu produzieren, und es gibt zwischen verschiedenen Chargen kaum Unterschiede in der Qualität. In diesem Prozess können sie auch relativ einfach chemisch modifiziert werden (siehe Abschnitt 4.2.4 Chemische Modifikationen). Während die Produktion von Antikörpern eine starke Immunantwort gegen das Zielmolekül bedingt, können Aptamere für verschiedenste Ziele von kleinen Molekülen bis hin zu Zellen optimiert werden und lösen unmodifiziert kaum eine Immunantwort aus. So können auch Aptamere gegen Moleküle gewonnen werden, die evolutionär konserviert sind und deshalb in Tieren keine Immunreaktion auslösen. Aptamere sind deutlich kleiner als Antikörper und können viele Gewebe besser durchdringen als diese. Sie haben eine hohe Affinität und Spezifität gegenüber dem Zielmolekül (Chen et al., 2015). Bei Antikörpern hingegen hängt die Affinität von der Anzahl Bindungsstellen (Epitope) auf dem Antigen ab, und verschiedene Antikörper können das gleiche Antigen binden (Kohlberger & Gadermaier, 2021).

4.2.3 SELEX

Aptamere, die an bestimmte Moleküle binden, werden durch ein Verfahren namens SELEX selektiert. Hierbei wird das Zielmolekül zusammen mit 10^{14} – 10^{16} zufälligen einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden (Aptamer-Bibliothek genannt) inkubiert. Diese Oligonukleotide bestehen üblicherweise aus 40–100 Nukleotiden mit zufälligen Regionen im Zentrum und gleichbleibenden Sequenzen an den Enden mit Bindungsstellen für die Vervielfältigung durch die Polymerasen Kettenreaktion (PCR). Die nicht-bindenden Oligonukleotide werden anschliessend gewaschen, während die bindenden reverse-transkribiert, d. h. in DNA umgewandelt, und anschliessend per PCR vervielfältigt werden. Diese DNA-Oligonukleotide werden dann transkribiert und als Bibliothek für den nächsten Selektionsdurchgang verwendet. In mehreren Zyklen werden so diejenigen Aptamere herausgefiltert,

die eine besonders hohe Affinität und Spezifität für das Zielmolekül haben. Am Ende des Prozesses werden sie schliesslich sequenziert. Zusätzlich können auch Aptamere ausselektiert werden, die ein unerwünschtes Molekül binden (Counter-Selection). Bei dem SELEX-Verfahren werden keine Vorkenntnisse über das Zielmolekül benötigt (Kohlberger & Gadermaier, 2021).

SELEX wird häufig mit anderen Verfahren kombiniert, um die Spezifität für bestimmte Zielmoleküle oder die Effizienz des Prozesses zu optimieren (z. B. Capillary Electrophoresis-SELEX, Microfluidic-SELEX oder Atomic Force Microscopy-SELEX) (Y. Zhang et al., 2019).

Eine Weiterentwicklung, die besondere Beachtung gefunden hat, ist Cell-SELEX. Mit Cell-SELEX werden Aptamere ausgewählt, die *in vitro* an Oberflächenproteine lebender Zellen binden. Die Methode basiert darauf, dass die Zielzellen (z. B. Tumorzellen) ein spezifisches Expressionsmuster der Oberflächenproteine aufweisen. Die Aptamerselektion wird zuerst an einer Negativ-Kontrolle (meist gesunde Zellen) ausgeführt. Die nicht gebundenen Aptamere werden anschliessend als Pool für SELEX mit der Zielzelllinie eingesetzt. Es können auch gezielt Aptamere selektiert werden, die von den Zielzellen aufgenommen werden, wenn sie ein Oberflächenprotein binden (cell-internalization SELEX) (Sola et al., 2020).

Für das In-vivo-SELEX werden die Aptamer-Bibliotheken in krebserkrankte oder pathogen-infizierte Tiere, meist Mäuse, gespritzt und anschliessend diejenigen Aptamere amplifiziert, die an das befallene Gewebe gebunden haben (Sola et al., 2020).

4.2.4 Chemische Modifikationen

Aptamere können durch Modifikationen spezifischer und affiner für die Zielmoleküle gemacht und für In-vivo-Anwendungen optimiert werden. Daher werden sie bei therapeutischen Anwendungen sehr selten unmodifiziert eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.1.4 Chemische Modifikationen).

4.2.4.1 Nukleasenaktivität

Unmodifizierte Aptamere bleiben *in vivo* oft nur wenige Minuten aktiv, weil sie sehr schnell von Nukleasen verdaut werden. Um ihre Halbwertszeit im Körper zu verlängern, werden die meisten Aptamere chemisch so modifiziert, dass sie nicht mehr von den Nukleasen erkannt werden.

Aptamere können während (In-SELEX) oder nach der Selektion (Post-SELEX) chemisch modifiziert werden. In-SELEX hat den Vorteil, sicherzustellen, dass die RNA

trotz Modifikation funktional bleibt. Allerdings werden für die Amplifikation spezielle Polymerasen benötigt, weil die modifizierte RNA von natürlichen Polymerasen nicht erkannt wird. Macugen (ein Wirkstoff gegen Makuladegeneration), das erste zugelassene Aptamer-Therapeutikum, wurde auf diese Weise modifiziert. Post-SELEX werden meist die Nukleotide an den Enden des Aptamers (5' oder 3'-Position) modifiziert (Chandola & Neerathilagam, 2019).

Eine weitere Möglichkeit, die Hydrolyse durch Nukleasen zu umgehen, ist die Verwendung von L-Enantiomeren der Ribonukleotide (L-RNA-Aptamere oder Spiegelmerer genannt). Hierbei wird eine gespiegelte Version des Zielmoleküls synthetisiert. Dieses L-Molekül wird als Zielmolekül im SELEX-Verfahren verwendet. Das D-Oligonukleotid, das am besten bindet, wird anschliessend sequenziert und mit L-Nukleotiden synthetisiert. Das resultierende L-Aptamer sollte das natürliche D-Molekül gleich stark binden wie das D-Aptamer das L-Molekül. Da natürliche Nukleasen nur D-Oligonukleotide binden können, sind L-Aptamere vor Hydrolyse geschützt (Vater & Klussmann, 2015).

4.2.4.2 Aptamer Diversität

Ein weiterer Grund für chemische Modifikationen ist die Vergrösserung der Oligonukleotid-Diversität, welche die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein Aptamer eine hohe Affinität zum Zielmolekül hat. Das kann entweder über das Anfügen von hydrophoben Seitenketten (SOMAmere), über nicht-natürliche Nukleotide oder über Glykosylierungen erreicht werden (Byun, 2021).

4.2.4.3 Nierenfiltration

Wegen ihrer geringen Grösse werden Aptamere rasch von der Niere aus dem Blut filtriert und ausgeschieden. Dies lässt sich durch das Anhängen grosser Moleküle (etwa Polyethylenglykol (PEG), Liposome, Proteine, Cholesterin oder verschiedene Nanomaterialien) verhindern (Kohlberger & Gadermaier, 2021).

4.3 Anwendungen

4.3.1 Therapien

4.3.1.1 Zielinhibierung

Aptamere können an ein Zielmolekül binden und entweder aktivierend (agonistischer Ligand) oder inaktivierend (antagonistischer Ligand) wirken. Ein Aptamer, welches das HIV-Tat-Protein bindet und deaktiviert, wurde schon 1990 entwickelt. Seither ist der Katalog von agonistischen und antagonistischen Aptameren stetig angewachsen. 2004 wurde das erste Aptamer-Therapeutikum (Macugen) gegen altersbedingte feuchte Makuladegene-

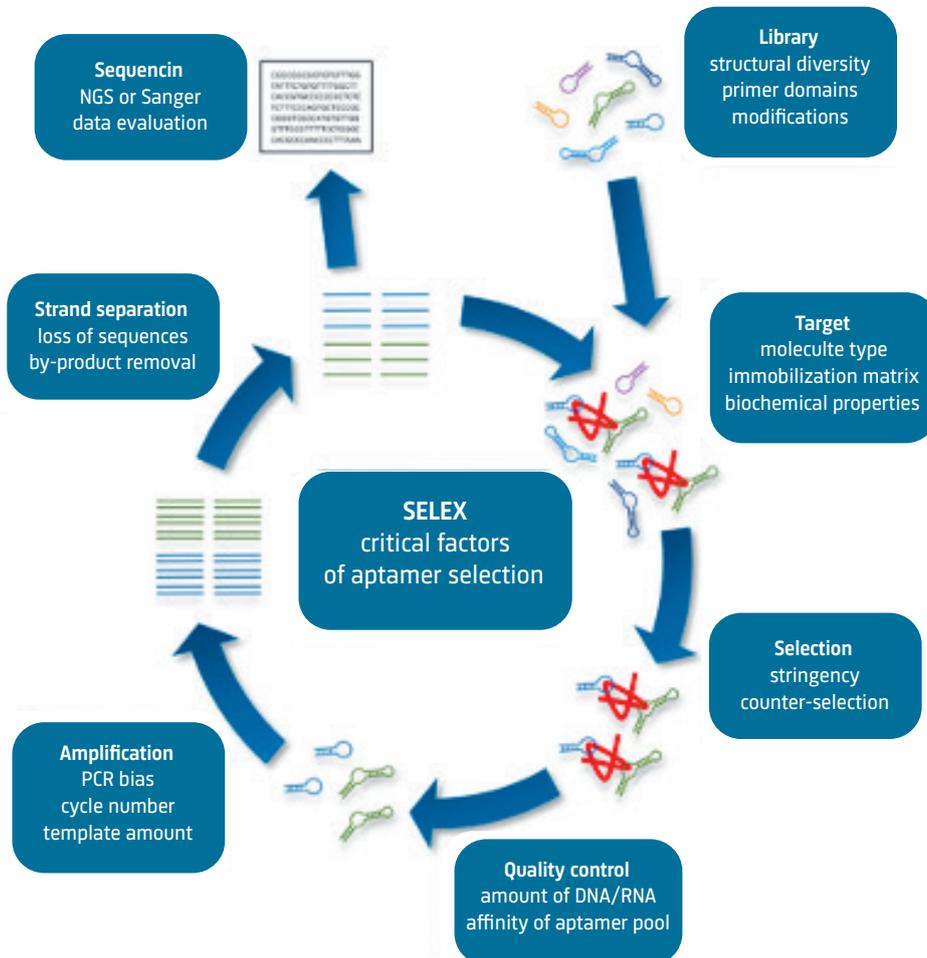


Abbildung 7: SELEX.

Zuerst wird eine Bibliothek mit Aptameren synthetisiert. Dann werden die Aptamere mit dem Ziel-Molekül in Kontakt gebracht. Anschliessend werden diejenigen Aptamere selektiert, die das Ziel am stärksten binden. Diese werden amplifiziert und für den nächsten Durchgang verwendet, bis die Bindung stark und spezifisch genug ist. Die resultierenden Aptamere werden sequenziert (Kohlberger & Gadermaier, 2021).

ration, eine schwere Augenerkrankung, zugelassen. Dieses Aptamer bindet eine bestimmte Isoform des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) und hindert sie damit an der Bindung an den VEGF-Rezeptor. Bei allen neun RNA-Aptamer-Medikamenten, die bisher klinisch getestet wurden, bindet das Aptamer ein Signalmolekül (Byun, 2021).

In der Entwicklung befinden sich aber auch Aptamere, die verhindern können, dass ein Virus in eine Zelle eindringt. Hierfür binden sie an Proteine, die für die Anheftung an die Zelle notwendig sind. Sie können auch den Replikationszyklus des Virus unterbinden, indem sie an für die Replikation essenzielle Proteine binden (z. B. Kapsid-Proteine). Sie können aber auch mit viraler mRNA um eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle konkurrieren (Zou et al., 2019). In der Entwicklung befindet sich ausserdem

ein RNA-Aptamer-basiertes Medikament gegen Sars-CoV-2. Es handelt sich dabei um mehrere RNA-Aptamere, die an einem Gold-Nanopartikel befestigt sind und das Zelloberflächenprotein ACE2 an verschiedenen Stellen binden. Dadurch verhindern sie, dass das Virus sich an ACE2 binden und so in die Zelle eindringen kann (Sun et al., 2021, 2022).

4.3.1.2 Targeted-Drug-Delivery

Eine der grössten Herausforderungen bei der Entwicklung von zell- oder gewebespezifischen Therapeutika besteht darin, dass die Wirkstoffe die Zielzellen erreichen und von diesen aufgenommen werden. Durch Cell-SELEX können Aptamere selektiert werden, die für bestimmte Zellarten typische Oberflächenproteine binden (siehe Abschnitt 4.2.3 SELEX) und nach der Bindung von der Zelle aufgenommen werden. Allerdings befinden sich

diese Methoden noch in der frühen Entwicklungsphase. Es gibt zwei Varianten, wie Aptamere diese Funktion wahrnehmen können:

Aptamere können mit einem Medikament konjugiert (Aptamer-drug Conjugates [ApDC]) oder komplexiert werden. In ApDCs sind die beiden Moleküle durch ein Linker-Molekül verbunden. Dieses kann so gewählt werden, dass es unter bestimmten chemischen Bedingungen instabil wird oder von einem Enzym geschnitten werden kann und so das Medikament freigibt. Dadurch soll es möglich sein, das Medikament gezielt in einem bestimmten Zellkompartiment oder in der sauren Umgebung eines Tumors einzusetzen. ApDCs werden getestet, um Zytotoxine oder Radioisotope gezielt in Krebszellen einzubringen und dadurch Chemo- und Strahlentherapien zu verbessern. Es werden auch ApDCs entwickelt, die das Immunsystem modulieren und für eine Immuntherapie eingesetzt werden könnten (G. Zhu & Chen, 2018).

Aptamere können zudem mit Liposomen verbunden werden, die den Wirkstoff transportieren. Wenn das Aptamer in die Zelle aufgenommen wird, verschmilzt das Liposom mit der Zellmembran und gibt das Cargo-Molekül frei (siehe Abschnitt 10.1.2.1 Lipid-Nanopartikel und Liposome). Schliesslich können Aptamere auch virale Vektoren zu einem bestimmten Ziel führen (Chandola & Neerathilingam, 2019).

4.3.2 Diagnostik

Aptamere haben durch ihre Ähnlichkeit mit Antikörpern das Potential, diese in verschiedenen Anwendungen in der Diagnostik (ELISA, Affinitätschromatographie, etc.) zu ersetzen. Durch ihre hohe Stabilität, Flexibilität und Affinität eignen sie sich besonders für patientennahe Labordiagnostik (Point-of-Care-Instrumente) und Test-Kits für Analysen in der Feldforschung (Y. Zhang et al., 2019).

Durch SELEX mit ganzen Pathogenen oder aufgereinigten Proteinen als Zielen wurden Aptamere selektiert, die eine Reihe verschiedener Bakterien (Saad & Faucher, 2021), Viren (z. B. SARS-CoV) (Kim & Lee, 2021) und Parasiten (z. B. *Trypanosoma cruzi*) binden können (Ospina-Villa et al., 2020). Durch Cell-SELEX können auch neue Krebs-Biomarker entwickelt werden (Yan & Levy, 2018).

Die am weitesten verbreiteten Aptamer-basierten Biosensoren (Aptasensoren) sind sogenannte Duplexed Aptamers (DA), die aus zwei hybridisierten Aptameren zusammengesetzt sind. Eines der beiden Aptamere kann neben dem anderen Aptamer auch das Zielmolekül binden. Wenn das geschieht, trennen sich die Aptamere und

ein optisches oder elektrochemisches Signal wird generiert, das gemessen werden kann (Munzar et al., 2019).

Bis auf wenige Ausnahmen befinden sich alle diese Technologien in der Entwicklungsphase und sind noch nicht marktreif (siehe Abschnitt 4.5 Stand der Entwicklung).

4.3.3 Anwendungen in der Landwirtschaft

In Pflanzen gibt es bisher noch keine Anwendungen. Es laufen allerdings erste Versuche mit RNA-Aptameren in der Grundlagenforschung: So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass sich RNA-Aptamere in Pflanzenzellen als Transgen exprimieren lassen und die Proteinfunktion hemmen können (Abdeeva et al., 2019).

4.4 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen

Aptamere haben eine kurze Halbwertszeit im Körper und eine hohe Spezifität. Bisher wurden keine Off-Target-Effekte durch die Bindung an Nicht-Zielmoleküle beobachtet. Auch Interaktionen mit anderen Medikamenten sind bisher keine bekannt. In toxikologischen Studien wurde bei unmodifizierten Aptameren bisher keine Aktivierung des Immun- oder des Komplementsystems beobachtet (Kovacevic et al., 2018). Chemische Modifikationen oder Bindungen an andere grosse Moleküle (Konjugationen) können allerdings eine immunogene oder zytotoxische Wirkung auslösen. Zum Beispiel haben LNA (locked nucleic acids) – Nukleinsäuren, bei denen der Zuckeranteil auf nicht natürliche Weise chemisch modifiziert ist – eine starke Hepatoxizität gezeigt. 2'-Fluoropyrimidin-modifizierte RNA-Aptamere führen zu Cytotoxizität und induzieren die Expression von Interferon-Beta in menschlichen Krebszellen *in vitro*. PEG, das an viele Aptamere angefügt wird, um eine längere Halbwertszeit im Blut zu erreichen, kann in seltenen Fällen allergische Reaktionen auslösen (Chandola & Neerathilingam, 2019). In klinischen Phase IIb-Studien der Aptamere Pegnivacogin und Anivamersen, die mit PEG konjugiert waren, traten bei einem Prozent der Probanden und Probandinnen Fälle von allergischen Reaktionen gegen PEG auf, und die klinischen Versuche mit dem Antikoagulator Reg1 wurden wegen schwerer allergischer Reaktionen abgebrochen (Povsic et al., 2016).

Weil bei Cell-SELEX die Expressionslevel der Oberflächenproteine unbekannt sind, kann es vorkommen, dass Aptamere gegen Oberflächenproteine selektiert werden, die auch häufig auf gesunden Zellen vorhanden sind und deshalb ebenfalls zum Ziel werden. Dieses Risiko lässt sich durch mehrere Runden von Negativ-Selektion mi-

nimieren (Chandola & Neerathilingam, 2019). Wenn die Aptamere an Liposome gebunden werden, können zusätzliche unerwünschte Wirkungen auftreten (siehe Abschnitt 10.1.2.1 Lipid-Nanopartikel und Liposome).

4.5 Stand der Entwicklung

In der Grundlagenforschung werden Aptamere relativ breit eingesetzt. Dennoch schaffen es nur wenige Aptamer-basierte Medikamente in die klinische Phase. Macugen, das bisher einzige RNA-Aptamer-Medikament, das auf dem Markt erhältlich ist, erhielt 2004 die FDA-Zulassung für Makuladegeneration. Nach einer erfolgreichen Markteinführung ging die Nachfrage wegen konkurrierender Medikamente schnell zurück und es wurde zu einem Nischenprodukt. Seither hat kein Aptamer-basiertes Medikament mehr den Markt erreicht. Insbesondere nach dem Scheitern des Antikoagulators Reg1 in Phase III-Studien gelangten nur noch wenige Aptamer-Medikamente in die klinische Phase. Dafür gibt es verschiedene Gründe: Die pharmakokinetischen Eigenschaften sind relativ schwierig zu kontrollieren. Aptamere können degradieren, ausgeschieden oder in metabolische Prozesse involviert werden, was die Dauer der Wirkung stark beeinflussen kann. Um den Abbau durch Nukleasen und die schnelle Ausscheidung über die Niere zu verhindern, werden Aptamere chemisch modifiziert, was jedoch die Verträglichkeit negativ beeinflussen kann (siehe Abschnitt 2.3.4 Unbeabsichtigte Wirkungen). Ein weiterer wichtiger Grund ist, dass Aptamer-Bindungen an das Zielmolekül und therapeutische Effekte oftmals nicht reproduzierbar sind, worunter das Vertrauen in die Technologie leidet (Yan & Levy, 2018). Die Auswahl der Aptamere hängt stark von den Bedingungen während des SELEX-Prozesses ab. Schon kleine Unterschiede im pH, der Temperatur der Pufferlösung oder der Dauer der Inkubation können die Auswahl beeinflussen. Die Bedingungen im SELEX-Prozess unterscheiden sich auch stark von denen in der natürlichen Umgebung des Moleküls. Insbesondere die Anwesenheit von Ionen oder Molekülen, mit denen das Aptamer elektrostatisch interagiert, können die Struktur, die Bindungsaffinität und die Spezifität stark beeinflussen. Deshalb garantiert eine hohe Bindungsaffinität *in vitro* nicht, dass auch *in vivo* eine ähnlich hohe Affinität erreicht wird (Byun, 2021).

Interesse hat in den letzten Jahren vor allem die Nutzung von Aptameren für die gezielte Abgabe von Medikamenten (siehe Abschnitt 4.3.1.2 Targeted-Drug-Delivery) erregt. Allerdings werden die Aptamer-Nanopartikel-Verbindungen *in vivo* schnell abgebaut. Vermutet wird, dass die Nanopartikel vom Immunsystem erkannt werden, die Nanopartikel aggregieren oder die Aptamere enzymatisch geschnitten werden (Byun, 2021).

Aptamerbasierte Instrumente für die Diagnostik und für Umweltanalysen (z. B. Nachweissysteme für Mikroben in Wasserproben) sind sowohl für die Forschung als auch für die Industrie von grossem Interesse, weil Aptasensoren relativ einfach, schnell und günstig herzustellen sind. Eine Hürde beim Einsatz in der Diagnostik ist jedoch das Fehlen von standardisierten Protokollen. Aptamere, die durch den gleichen Prozess gegen das gleiche Zielmolekül generiert wurden, können sich in ihren Primärstrukturen, den Bindungsaffinitäten, Spezifitäten und anderen chemischen Parametern unterscheiden. Deshalb kann ein Protokoll, das für ein Aptamer entwickelt wurde, nicht für ein anderes verwendet werden. Für den Einsatz in der Humandiagnostik sind jedoch standardisierte Kits und Protokolle – basierend auf gut charakterisierten Aptameren – unabdingbar (Byun, 2021). Deshalb werden Aptamer-Biosensoren bis jetzt hauptsächlich in der Grundlagenforschung eingesetzt. Bisher wurde noch kein RNA-Aptamer-Biosensor für den klinischen Einsatz zugelassen. In Indonesien ist allerdings seit 2022 das DNA-Aptamer-basierte SARS-CoV-2-Diagnosekit «Aptamex» auf dem Markt, und die Firma SomaLogic bietet mit der «SomaScan»-Plattform ein SOMAmer-basiertes Proteom-Assay für die nicht-klinische Forschung an (Grand View Research, 2023).

5 Lange nicht-codierende RNAs

5.1 Einleitung

Als lange nicht-codierende RNAs (lncRNAs) werden alle RNAs bezeichnet, die mehr als 200 nt lang sind und nicht für ein Protein codieren. Durch diese weite Definition umfasst diese Klasse eine sehr vielfältige Sammlung von Transkripten. Stand Februar 2024 sind mehr als 20 000 lncRNAs im menschlichen Genom bekannt (Frankish et al. 2021). Auch wenn für die meisten dieser lncRNAs bisher keine biologische Funktion bekannt ist, wird immer klarer, dass einige lncRNAs eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse spielen (Esposito et al., 2022; S. J. Liu et al., 2017; S. Zhu et al., 2016).

lncRNAs weisen ein breites Spektrum an möglichen Interaktionsmechanismen auf, da sie dank ihrer Länge nicht nur andere Ribonukleinsäuren durch Basenpaarung bin-

den, sondern auch verschiedene dreidimensionale Strukturen bilden können (siehe Abbildung 8). So sind sie in der Lage, ähnlich wie siRNAs oder miRNAs (siehe Kapitel 2 Posttranskriptionelles Gen-Silencing), bestimmte mRNAs durch Basenpaarung zu binden und ihre Stabilität oder die Übersetzung in Proteine zu beeinflussen. Sie können aber auch komplementäre DNA-Sequenzen binden und dabei entweder eine sogenannte Triplex-Struktur mit beiden DNA-Strängen oder eine als R-Loop bezeichnete Schleife bilden. Schliesslich können sie sich durch ihre dreidimensionale Struktur auch an bestimmte Proteine binden (Mercer et al., 2022; Statello et al., 2020).

lncRNAs werden ähnlich wie mRNAs gebildet: Durch das Ablesen von DNA durch ein als RNA-Polymerase bezeichnetes Protein entsteht ein Transkript, das meist gespleisst wird und an einem Ende eine Cap-Struktur

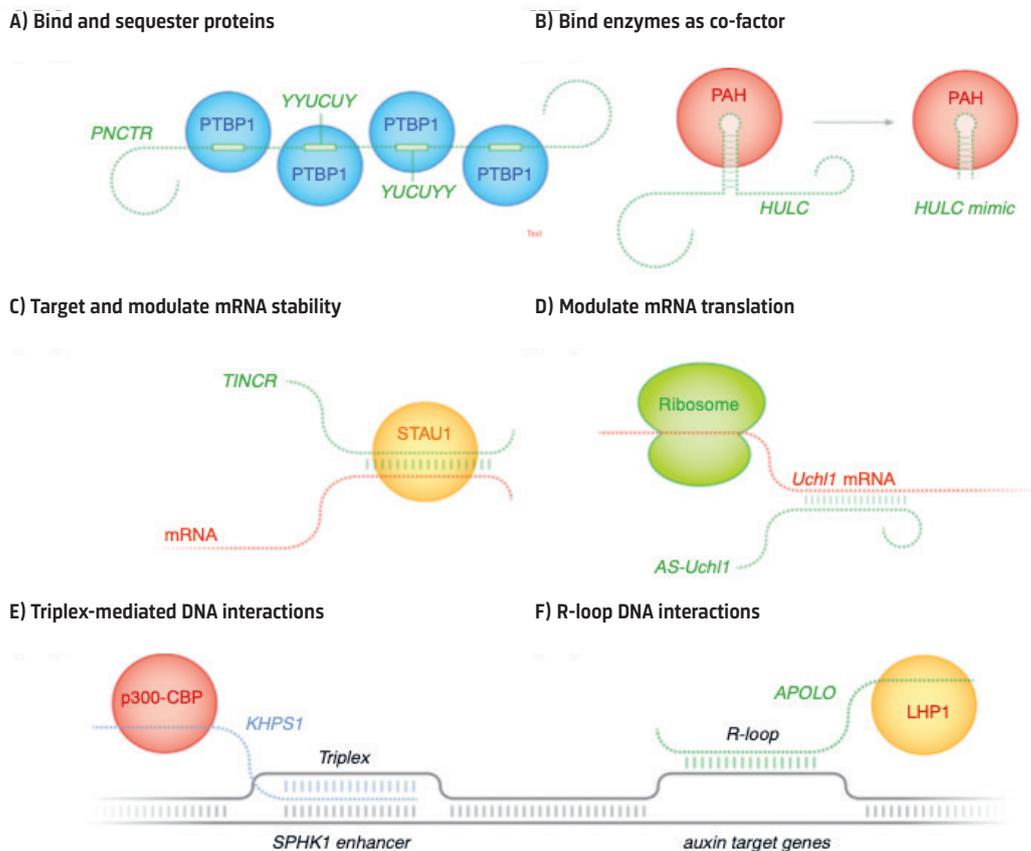


Abbildung 8: Funktionsmechanismen von lncRNA.

A) Eine lncRNA mit mehreren Proteinbindungsstellen bindet Proteine. B) Eine lncRNA bindet ein Enzym als Co-Faktor und verhindert die Bindung eines funktionellen Co-Faktors. C) Eine lncRNA bindet eine mRNA und beeinflusst deren Stabilität. D) Eine lncRNA bindet eine mRNA und beeinflusst deren Translation. E) Eine lncRNA interagiert mit einem DNA-Doppelstrang. F) Eine lncRNA bindet DNA-Strang und bildet dadurch eine R-Schleife (Mercer et al., 2022).

und am anderen Ende meist einen Poly(A)-Schwanz erhält (siehe Abschnitt 3.2 Beschreibung des Verfahrens). Anders als mRNAs werden allerdings nicht alle lncRNAs aus dem Zellkern in das Zellplasma transportiert (Statello et al., 2020).

Im Zellkern verbleibende lncRNAs können mit der DNA oder mit an der Transkription beteiligten Proteine interagieren. Dadurch aktivieren oder unterdrücken sie die Transkription bestimmter Gene. Viele der bisher bekannten Gene, die auf diese Weise reguliert werden, sind für verschiedene Entwicklungsphasen, wie zum Beispiel bestimmte Phasen der Embryonalentwicklung von Tieren oder der Blüte von Pflanzen. Teilweise bewirken sie eine Veränderung der Struktur und Funktion von Chromosomen im Zellkern. Die lncRNA XIST zum Beispiel leitet in weiblichen Säugetieren die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen ein. Durch die Interaktion mit mRNAs können lncRNAs ähnlich wie kurze nicht-codierende RNAs (siRNAs und miRNAs), das Splicing von mRNAs regulieren. lncRNAs regulieren auch verschiedene Proteine, die für die Reparatur der DNA und die Kontrolle der Zellteilung zuständig sind (Statello et al., 2020).

Daneben sind auch viele lncRNAs im Zytoplasma beziehungsweise in Organellen lokalisiert. Dort können sie zum Beispiel durch die Bindung an mRNAs deren Stabilität und Translationsrate verändern oder die Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle beeinflussen. Andere lncRNAs binden miRNAs oder Proteine und reduzieren deren Verfügbarkeit (Noh et al., 2018).

Die verschiedenen Funktionen der lncRNAs bei der Regulation essenzieller zellulärer Prozesse – wie der Entwicklung, DNA-Reparatur und Zellteilung – sind der Grund dafür, dass einige falsch regulierte lncRNAs zur Entstehung von Krebs beitragen können. Diese spielen insbesondere bei der Metastasenbildung, bei der Immunflucht, der Veränderung des Zellmetabolismus und der Gefässbildung bei Tumoren eine Rolle. Auch bei Erkrankungen des Gefäss- und Nervensystems und bei Diabetes sind sie von Bedeutung (Mercer et al., 2022).

5.2 Beschreibung des Verfahrens und Anwendungen

Da lncRNAs zelluläre Prozesse regulieren können, verfügen sie auch über das Potential, selber als Wirkstoffe genutzt zu werden. Allerdings erschwert die Grösse der Moleküle die Abgabe in die Zelle; zusätzlich können sie das Immunsystem aktivieren. Dies liesse sich verhindern, indem die funktionellen Regionen isoliert würden und daraus eine kürzere RNA mit denselben Eigenschaften

konstruiert würde. Dies ist im Mausmodell bereits mit der lncRNA NRON gelungen, die den Knochenschwund bei Osteoporose verlangsamen kann (Mercer et al., 2022).

5.3 Stand der Entwicklung

Bisher wurden lncRNA-basierte Therapien erst in präklinischen Studien getestet. Auch wenn bereits in verschiedenen Maus-Studien gezeigt werden konnte, dass lncRNA-basierte Therapien prinzipiell möglich sind, hat es bisher noch kein Kandidat in die klinische Phase geschafft (Mercer et al., 2022).

5.3.1 Herausforderungen

Der Transport von langen RNAs in genügender Menge in die richtigen Gewebe und Zellen, und zusätzlich in die gewünschten Zellkompartimente, hat sich als schwierig erwiesen. Zudem sind Off-Target-Effekte relativ häufig. Studien an Tieren werden dadurch erschwert, dass lncRNAs evolutionär relativ schlecht erhalten sind und sich deshalb lncRNAs in Versuchstieren teilweise stark von ihrem Gegenstück in Menschen unterscheiden. In solchen Fällen ist es oft erforderlich, Modellorganismen entsprechend genetisch zu verändern. In präklinischen Krebsstudien werden auch menschliche Gewebe in Modellorganismen transplantiert oder künstliche Organe, sogenannte Organoiden, aus menschlichen Zellen eingesetzt (Mercer et al., 2022).

5.4 Mögliche unerwünschte Wirkungen

Wegen ihrer Länge ist die Gefahr relativ gross, dass lncRNAs unbeabsichtigte RNA- oder DNA-Sequenzen binden. Da lncRNAs normalerweise nur in kleinen Mengen vorhanden sind, besteht auch das Risiko, dass eine zu hohe Dosis zur Bindung von Proteinen führt, die für andere zelluläre Aufgaben gebraucht werden. Zudem können die lncRNAs in Nicht-Zielzellen gelangen. Wie stark das menschliche Immunsystem auf lncRNAs reagiert, ist noch unklar (Mercer et al., 2022).

6 RNA-vermittelte DNA-Methylierung

6.1 Einleitung

In Pflanzen können kurze nicht-codierende RNAs die Genexpression nicht nur nach der Transkription regulieren, wie in Kapitel 2 «Post-transkriptionelles Gen-Silencing» beschrieben, sondern bereits vor der Transkription. Dieser Prozess wird als RNA-vermittelte DNA-Methylierung (RNA-directed DNA methylation, RdDM) bezeichnet. Dabei werden der DNA Methylgruppen angefügt, wodurch Gene, die sich in dieser DNA-Region befinden, weniger gut zugänglich für Proteine und somit seltener transkribiert werden. Dieser Prozess dient natürlicherweise oft dazu, Transposons genannte Gene zu unterdrücken, die andernfalls im Genom herumspringen und andere Gene beeinflussen können. Es können aber auch Gene reguliert werden, die an der Entwicklung oder Reproduktion der Pflanze beteiligt sind. Schliesslich kann RdDM auch eine Reaktion der Pflanze auf Stress sein. Die DNA-Methylierung kann über mehrere Generationen vererbt werden (Erdmann & Picard, 2020). Wie bei Menschen und ande-

ren Tieren die DNA neu methyliert wird, ist bisher noch vergleichsweise wenig verstanden.

6.2 Beschreibung des Verfahrens

Wie bei der RNA-Interferenz wird eine doppelsträngige RNA zuerst gekürzt und dann von einem Protein aus der Argonaut-Familie (AGO) gebunden. Anders als beim posttranskriptionellen Gen-Silencing bindet der RNA-AGO-Komplex aber keine funktionsfähige mRNA, sondern eine RNA, die gerade transkribiert wird und sich deshalb in der Nähe der komplementären DNA-Sequenz befindet. Nach der Bindung werden von diesem Komplex verschiedene Proteine rekrutiert, die DNA in dieser Region methylieren (siehe Abbildung 9). Die Methylierungen können zusätzlich zu Veränderungen von mit der DNA verbundenen Proteinen (sogenannten Histonen) führen. Dies modifiziert die Struktur der Chromosomen und kann die DNA in dieser Region für Proteine unzugänglicher machen (Erdmann & Picard, 2020).

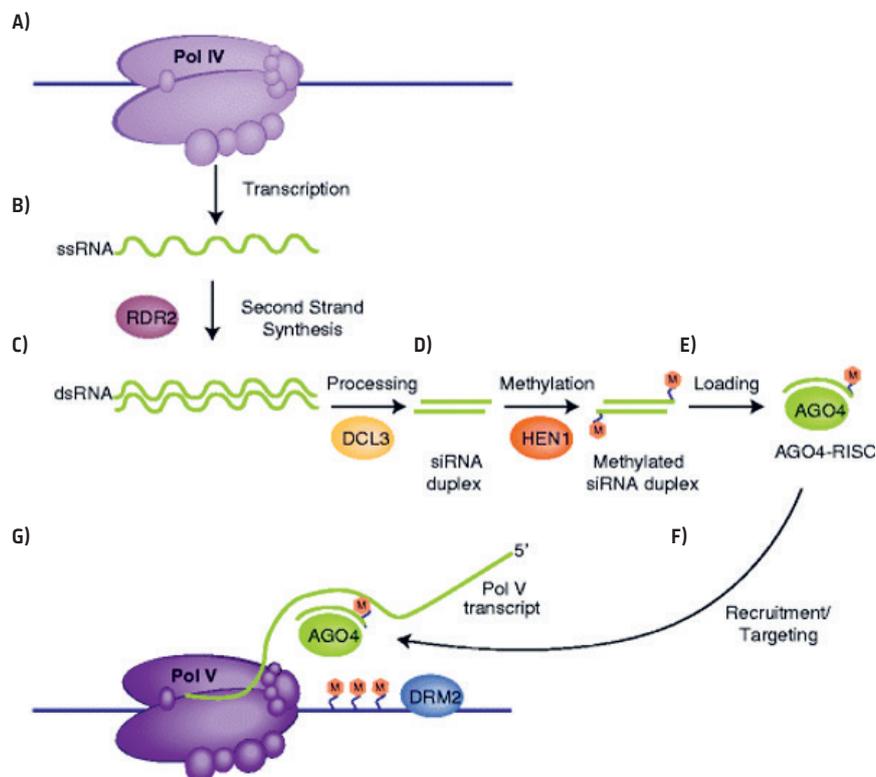


Abbildung 9: RNA-vermittelte DNA-Methylierung in *Arabidopsis thaliana*.

- A) Eine DNA-Sequenz wird von der Polymerase IV transkribiert. B) Das Enzym RDR2 synthetisiert einen zweiten Strang für die einzelsträngige RNA. C) Die dsRNA wird von DCL3 zu siRNAs prozessiert und von HEN1 methyliert. d) Zusammen mit AGO4 bindet die siRNA ein Pol-V-Transkript und rekrutiert das Protein DRM2, welches die DNA-Sequenz methyliert (Kumar & Mohapatra, 2021).

6.3 Mögliche Anwendungen und Stand der Entwicklung

Der RdDM-Prozess kann dazu genutzt werden, um bestimmte Gene spezifisch und über mehrere Generationen zu unterdrücken, ohne dabei die DNA-Sequenz zu verändern. Dies kann zum Beispiel durch das Integrieren einer kurzen, für das Zielgen spezifischen RNA-Sequenz, die spezifisch dem Zielgen entspricht, in ein Virus erreicht werden. Das Virus schleust die kurze RNA-Sequenz anschließend in die Pflanzenzellen ein.

Bisher konnte auf diese Weise die Blütenfarbe von Petunien und die Fruchtreifung von Tomaten verändert werden. Allerdings ist noch keine Anwendung marktreif (Erdmann & Picard, 2020).

DNA-Methylierungsmuster können ausserdem mit dem CRISPR-Cas9-System verändert werden. Dabei wird ein Cas9-Protein eingesetzt, das so verändert wurde, dass es keine DNA-Moleküle spalten kann. Stattdessen kann es mit Proteinen verbunden werden, die eine Methylierung der DNA bewirken. Indem die Guide-RNA eine bestimmte DNA-Sequenz bindet, bringt sie den Komplex in die Nähe jener DNA-Region, die methyliert werden soll (Papikian et al., 2019). Dieses System wird auch in menschlichen Zellkulturen getestet, um auf diesem Weg zum Beispiel krebsauslösende Gene in Krebszellen zu unterdrücken (McDonald et al., 2016). Diese als «Epigenetic Editing» bekannte Technik unterscheidet sich allerdings deutlich von der oben beschriebenen natürlichen RdDM.

7 RNA-Aktivierung

7.1 Einleitung

Damit Zellen korrekt funktionieren, muss eine Vielzahl von Genen so reguliert werden, dass zur richtigen Zeit am richtigen Ort in der Zelle die richtigen Proteine in der richtigen Menge produziert werden. Viele Krankheiten sind auf eine fehlerhafte Genregulierung und eine dadurch verursachte Über- oder Unterproduktion bestimmter Proteine zurückzuführen. Eine Korrektur dieser Fehlregulierungen bietet sich deshalb für gezielte Therapien an. In Kapitel 2 Post-transkriptionelles Gen-Silencing werden Verfahren vorgestellt, die mit kurzen RNA-Stücken, small interfering RNAs (siRNAs) und Anti-sense Oligonukleotiden (ASOs) genannt, die Aktivität von Genen reduzieren oder ganz abschalten. Kurze RNA-Oligonukleotide können aber im Gegenteil die Transkription eines Gens auch erhöhen. Diese Verfahren werden entsprechend zur RNA Interference (RNAi) als RNA Activation oder RNA Aktivierung (RNAa) bezeichnet, und die daran beteiligten kurzen nicht-codierenden RNAs als small activating

RNAs (saRNAs). Dabei wird ein natürlicher Regulierungsmechanismus der Zelle genutzt (Tan et al., 2021).

7.2 Beschreibung des Verfahrens

saRNAs sind chemisch synthetisierte, 21 Nukleotide lange, doppelsträngige RNA-Oligonukleotide. Wie siRNAs werden auch saRNAs von einem Protein der Argonaut-Familie (meistens AGO2) gebunden, und ein RNA-Strang wird daraufhin entfernt [siehe Abschnitt 2.2.1.2 Small interfering RNA (siRNA)]. Die saRNA und das AGO-Protein werden anschliessend zusammen in den Zellkern importiert, wo sich die saRNA durch Basenpaarung an eine bestimmte DNA-Sequenz bindet. Es handelt sich dabei um eine sogenannte Promotor-Sequenz. Promotor-Sequenzen sind essenziell für die Regulation und Einleitung der Transkription eines bestimmten Gens. Nach der Bindung an den Promotor bilden die saRNA und das AGO-Protein zusammen mit anderen Proteinen den RNA-induced tran-

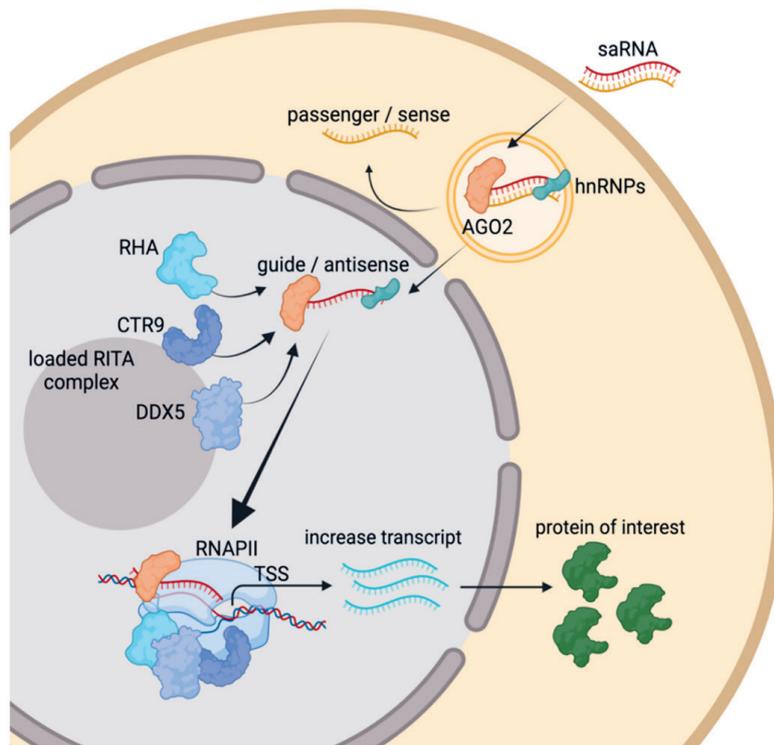


Abbildung 10: RNA-Aktivierung.

Die saRNA wird als dsRNA durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und an AGO2 gebunden. Anschliessend wird ein RNA-Strang entfernt. Nach dem Verlassen des Endosoms binden die saRNA und AGO2 eine DNA-Sequenz und bilden zusammen mit RHA, CTR9 und DDX5 den RITA-Komplex, der zu einer Erhöhung der Transkription eines Gens führt (Tan et al., 2021).

scriptional activation (RITA)-Komplex, der die Transkription des Gens fördert. Ausserdem werden dabei oft auch bestimmte Proteine, die mit der DNA interagieren, sogenannte Histone, so verändert, dass das Gen einfacher abgelesen werden kann (siehe Abbildung 10). Was bei dem Vorgang der RNA-Aktivierung genau passiert und welche Proteine involviert sind, ist bis jetzt allerdings nur ansatzweise bekannt (Portnoy et al., 2016).

7.3 Anwendungen und Stand der Entwicklung

Eine Reihe von saRNAs wurde bereits in Zellkulturen oder Tiermodellen getestet. In den meisten dieser Studien hat man versucht, die Expression tumorunterdrückender Gene in Krebszellen zu erhöhen. Dabei zeigte sich bei verschiedenen Krebsarten eine Verlangsamung des Tumorwachstums. Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung der saRNA MTL-CEBPA, die das CEBPA-Gen aktiviert, das in vielen Krebszellen herunterreguliert ist. Klinische Phase Ia- und Ib-Studien wurden an Patientinnen und Patienten mit myeloider Leukämie durchgeführt. Die Behandlung mit Lipid-Nanopartikeln umhüllten MTL-CEBPA verlief dabei erfolgreich. Eine Phase-II-Studie ist für 2022 geplant (Tan et al., 2021).

saRNAs können im Prinzip für alle Gene entwickelt werden, bei denen eine Promotor-Sequenz bekannt ist. Die Identifikation der Zielsequenz und das Design der saRNA ist mit bioinformatischen Methoden möglich. Vielversprechend sind neben den erwähnten Krebstherapien Behandlungen von Krankheiten des Nervensystems oder des Stoffwechsels, die durch die Fehlregulation von einzelnen Genen verursacht werden (Tan et al., 2021).

Wie bei siRNAs werden auch bei saRNAs chemische Modifikationen eingesetzt, um die Stabilität zu erhöhen und die Immunantwort zu reduzieren. Für die zellspezifische Verabreichung werden Lipid-Nanopartikel, Hybrid-Nanopartikel und GalNac genutzt [siehe Abschnitt 2.2.1.2 Small interfering RNA (siRNA)] (Tan et al., 2021).

7.3.1 Herausforderungen

Da saRNAs chemisch und strukturell den siRNAs stark ähneln, stellen sich ähnliche Herausforderungen in Bezug auf die Stabilität und Spezifität der Moleküle (siehe Kapitel 2 Posttranskriptionelles Gen-Silencing).

8 Zirkuläre RNAs

8.1 Einleitung

Zirkuläre RNAs (circRNAs) sind einzelsträngige kreisförmige RNAs, die in der Zelle vor allem beim Splicing von pre-mRNAs zu mRNA entstehen (siehe Abschnitt 3.3.1 mRNA-Impfstoffe) und in der Zelle relativ stabil sind. Sie können sowohl für Proteine kodieren als auch nicht-kodierend sein. Von long non-coding RNAs (lncRNAs) und messenger RNAs (mRNAs) unterscheiden sich circRNAs dadurch, dass ihre Enden nicht durch Cap- und Poly(A)-Strukturen abgeschlossen werden, sondern sich gegenseitig kovalent binden. In menschlichen Zellen bilden vor allem repetitive Sequenzen kreisförmige Strukturen. Obwohl erste zirkuläre RNAs bereits in den Siebzigerjah-

ren entdeckt worden waren, realisierte die Forschung erst in den letzten zehn Jahren, wie häufig diese Klasse von RNAs in der Zelle vorkommt (C. X. Liu & Chen, 2022).

Seither wurde entdeckt, dass nicht-codierende circRNAs sowohl mit anderen RNAs als auch mit DNA und Proteinen interagieren können. Dadurch spielen sie sehr vielfältige Rollen bei der Gen- und Zellregulation (siehe Abbildung 11): Einige circRNAs können wie lncRNAs DNA-Abschnitte binden und sogenannte R-Schleifen (R-loops) bilden (siehe Kapitel 5 Lange nicht-codierende RNAs). Diese Schleifen beeinflussen die Replikation, Reparatur und/oder Transkription der DNA. Durch die Bindung an Proteine können sie auf verschiedene

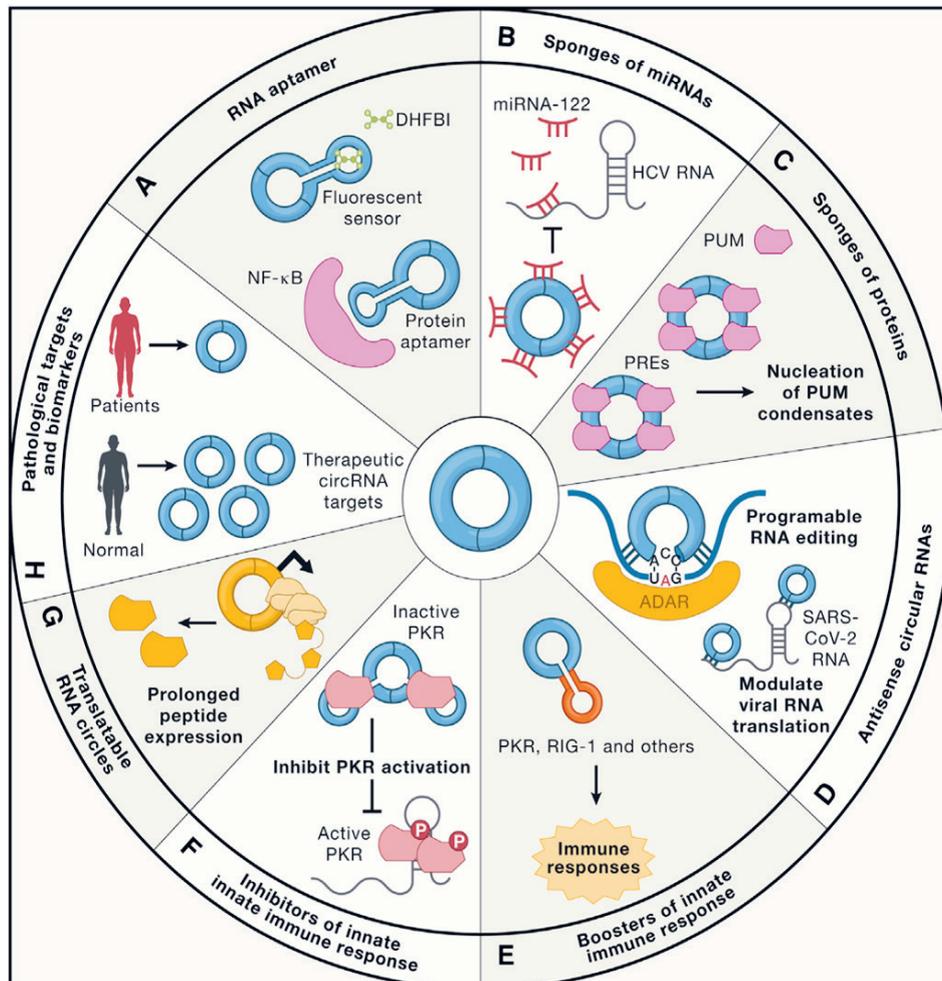


Abbildung 11: circRNA-basierte medizinische Anwendungen.

A) RNA-Aptamer B) miRNA-Schwamm C) Protein-Schwamm D) Zirkuläre Antisense-RNA E) Immunantwort-Booster (nicht Teil des Berichts)
F) Immunantwort-Inhibitoren (nicht Teil des Berichts) G) translatierbare circRNAs H) circRNAs als Ziele einer Therapie (C. X. Liu & Chen, 2022).

zelluläre Prozesse einwirken. Auch die Translation und das Splicing von mRNAs kann durch circRNAs reguliert werden. circRNAs, die mehrere Bindungsstellen für bestimmte Proteine oder miRNAs (siehe Kapitel 2 Posttranskriptionelles Gen-Silencing) haben, werden als Protein-beziehungsweise miRNA-Schwämme bezeichnet. Sie können die Konzentration dieser Proteine oder miRNAs in der Zelle reduzieren. Neben den nicht-codierenden circRNAs gibt es auch Protein-codierende circRNAs (C. X. Liu & Chen, 2022).

8.2 Beschreibung des Verfahrens und Anwendungen

Weil circRNAs in der Zelle stabiler sind und seltener vom Immunsystem erkannt werden als lineare RNAs, sind sie für medizinische Anwendungen besonders interessant. Künstliche zirkuläre RNAs werden für verschiedene solcher Anwendungen getestet: Sie können mehrere Bindungsstellen für bestimmte miRNAs oder Proteine enthalten und dadurch als molekulare Schwämme dienen, die diese Moleküle in der Zelle reduzieren. miRNA-Bindungsstellen können ähnlich wie Antagomirs konzipiert und synthetisiert werden (siehe Abschnitt 2.2.1.3 miRNA-basierte Therapeutika). Protein-Bindungsstellen werden durch das SELEX-Verfahren selektiert (siehe Abschnitt 4.2.3 SELEX). Zirkuläre Antisense-RNAs sind durch ihre hohe Stabilität eine mögliche Alternative zu ASOs (siehe Abschnitt 2.2.1.1 Antisense-Oligonukleotide). Bestimmte circRNAs können auch das angeborene Immunsystem modulieren. Ausserdem haben in-vitro-transkribierte, proteinkodierende circRNAs das Potential, als Alternative für mRNAs zu dienen. Da einige circRNAs zur Krebsentstehung beitragen können, kommen sie auch als mögliches Ziel für Therapien in Frage. Ausserdem werden circRNAs bei gewissen Krankheiten über- oder unterexprimiert, wodurch sie als Biomarker für diese Leiden dienen könnten (C. X. Liu & Chen, 2022).

circRNAs können entweder in vitro oder in vivo hergestellt werden. Bei der In-vitro-Synthese wird zuerst eine lineare RNA hergestellt und deren Enden entweder chemisch oder biochemisch, mittels Enzymen oder Ribozymen (siehe Kapitel 9 Ribozyme), miteinander verbunden. Bei der In-vivo-Methode wird das genetische Material auf einem Plasmid in eine Zelle eingebracht, wo die RNAs exprimiert und durch die natürlichen zellulären Mechanismen zirkulär gemacht werden (Obi & Chen, 2021).

8.3 Stand der Entwicklung

Künstliche circRNAs sind eine sehr neue Technologie, die noch in der Anfangsphase steht. Die meisten Anwendungen wurden bisher in Zellkulturen entwickelt und getestet. Da circRNAs aber je nach Design der Funktionsweise anderer, bereits besser erforschter RNAs ähneln, etwa siRNAs, Aptameren oder mRNAs, ist anzunehmen, dass sich viele Erkenntnisse aus der Erforschung dieser RNAs übertragen lassen (C. X. Liu & Chen, 2022).

9 Ribozyme

9.1 Einleitung

In den 1980er-Jahren wurde entdeckt, dass nicht nur Proteine, sondern auch RNAs chemische Reaktionen katalysieren können. Diese RNAs wurden in Anlehnung an Enzyme Ribozyme getauft. Allerdings ist das Reaktionsspektrum von natürlich vorkommenden Ribozymen relativ schmal: Sie katalysieren vor allem die Bildung von Proteinen und die Spaltung beziehungsweise Ligation von RNA. Das Repertoire an möglichen Bindungspartnern und das Reaktionsspektrum konnte seither durch die Entwicklung von synthetischen Ribozymen jedoch deutlich erhöht werden (Balke & Müller, 2019).

9.2 Beschreibung des Verfahrens

Ribozyme für therapeutische Anwendungen können entweder durch In-vitro-Selektion oder rationales Design für eine bestimmte Funktion hergestellt werden. Die In-vitro-Selektion geschieht mit dem SELEX-Prozess, der für Aptamere entwickelt wurde. Dabei werden aus einem Pool von zufälligen RNA-Stücken diejenigen ausgewählt, die die gewünschten Eigenschaften (siehe Abschnitt 4.2.3 SELEX). Beim rationalen Design werden natürliche Ribozyme gezielt an eine neue Funktion angepasst. Dafür muss allerdings viel über die anderen an der katalysierten Reaktion beteiligten Moleküle bekannt sein. Bisher wurden dafür vor allem drei aus Viren stammende Ribozyme eingesetzt: Hammerhead (HH), Hairpin (Hp) und Hepatitis Delta Virus (HDV). Diese drei Ribozyme können so modifiziert werden, dass sie, ähnlich wie siRNAs, spezifische RNA-Sequenzen spalten und dadurch inaktivieren. Sie können aber auch genutzt werden, um schädliche Mutationen durch alternatives Splicing einer pre-mRNA zu entfernen und dadurch die Proteinfunktion wieder herzustellen (siehe Abschnitt 3.2 Beschreibung des Verfahrens). Auch die Reparatur anderer RNAs, etwa mRNAs, durch das Austauschen von mutierten Sequenzen ist möglich. Diese Anwendungen von Ribozymen, die RNAs als Zielmoleküle haben, verändern das Erbgut nicht. Allerdings ist es prinzipiell auch möglich, mittels Ribozymen bestimmte DNA-Sequenzen auszutauschen und somit das Erbgut zu verändern (Balke & Müller, 2019).

9.3 Mögliche Anwendungen und Stand der Entwicklung

Ribozyme wurden in Zellkulturen und Tiermodellen bereits erfolgreich zur Bekämpfung von Viren eingesetzt, darunter HIV und Hepatitis B und C. Auch bei der Behandlung verschiedener Krebszellen zeigten sich erfolgsversprechende Ergebnisse. Alle darauffolgenden klinischen Studien wurden allerdings zwischen 2002 und 2009 wegen fehlender Wirksamkeit oder der Gefahr schwerer Nebenwirkungen spätestens in Phase III abgebrochen. Seither wird kaum mehr Forschung in diesem Bereich betrieben. Das hat einerseits mit den Schwierigkeiten bei der Anwendung von Ribozymen zu tun (siehe Abschnitt 9.3.1 Herausforderungen), aber auch mit der Entwicklung von RNAi und CRISPR-Cas als Methoden zur Genregulation beziehungsweise Geneditierung. Diese neuen Verfahren gelten in diesen Anwendungsgebieten als effektiver und die entsprechenden Konstrukte als einfacher herzustellen als Ribozyme. Ribozyme könnten sich aber trotzdem für gewisse Anwendungen wie die Reparatur von mRNAs eignen (Balke & Müller, 2019).

9.3.1 Herausforderungen

Wie bei allen RNA-basierten Therapeutika stellen die Stabilität, der Transfer in die Zelle und die Erkennung durch das Immunsystem Hürden für die Wirksamkeit dar. Wie bei ASOs oder siRNAs werden auch bei Ribozymen 2'-O-Methyl, 2'-Fluoro oder 2'-O-Methoxyethyl-Modifikationen oder künstliche Nukleotide wie LNAs (locked nucleic acids) eingesetzt, um der enzymatischen Spaltung und der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Das kann auch durch Ribozyme aus L-Enantiomeren der natürlichen RNA erreicht werden. Eine weitere Schwierigkeit ist die Ionenkonzentration im Innern von Zellen, die für die Funktion der Ribozyme nicht ideal ist und eine aufwendige Optimierung nötig macht (Balke & Müller, 2019).

10 Verabreichung

Alle vorgestellten RNA-Technologien basieren darauf, dass die daraus resultierenden Konstrukte ihre Funktion in bestimmten Zellen ausführen – oder an diese binden – können. RNA-Moleküle sind jedoch sehr instabil und anfällig für enzymatischen Abbau. Ausserdem können sie wegen ihrer negativen Ladung Zellmembranen nicht durchdringen. Bei pflanzlichen Zellen stellen die Zellwände eine zusätzliche Barriere dar. Die Schwierigkeit, RNAs in die Zielzellen einzubringen, hat lange Zeit den erfolgreichen Einsatz dieser Technologien ausserhalb der Petrischale verhindert. Erst die Entwicklung von Verabreichungsmethoden, die den RNAs den Transport an den Zielort und das Eindringen in die Zielzellen ermöglichen, hat diesen Technologien zum Durchbruch verholfen.

10.1 Medizinische Verabreichungsmethoden

Für den medizinischen Einsatz müssen RNA-basierte Therapeutika eine Reihe von Voraussetzungen erfüllen: Sie müssen in das anvisierte Gewebe eindringen, ohne von anderen Geweben absorbiert zu werden oder eine zu starke Immunreaktion auszulösen; sie müssen mit dem korrekten Zelltyp im Zielgewebe interagieren, und sie müssen in die Zielzellen aufgenommen werden (Pauvovska et al., 2022).

10.1.1 Nackte RNA

RNA kann im Prinzip «nackt», also ohne Umhüllung, unter die Haut, in den Muskel oder in das Nervenwasser injiziert werden. Kleine RNAs wie siRNAs können zur Stabilisierung chemisch modifiziert und mit Molekülen verbunden werden, die an Rezeptoren an der Zelloberfläche binden und so den Zelleintritt ermöglichen. Insbesondere die Konjugation mit N-Acetylgalactosamin für den Eintritt in Leberzellen hat sich bewährt, aber auch andere kleine Biomoleküle, Lipide, Antikörper oder Aptamere kommen dafür in Frage. Allerdings werden siRNAs oft vom Immunsystem erkannt und abgebaut oder über die Nieren ausgeschieden, was ihre Effektivität stark reduziert (siehe Abschnitt 2.3.3.1 Herausforderungen). Auch nackte mRNA kann über einen noch unbekanntem Mechanismus in die Zelle aufgenommen werden. Es wurde zudem ein Verfahren entwickelt, bei dem mRNA *in vitro* direkt in dendritische Zellen injiziert wird, um die Herstellung von Antigenen anzuregen (Xiao et al. 2022).

10.1.2 Nicht-virale Vektoren

Schon in den 1970er-Jahren wurde damit begonnen, alternative medizinische Verabreichungsmethoden zu erforschen. Diese sollen es ermöglichen RNAs und andere biologisch aktive Moleküle – zum Beispiel Krebsmedikamente – zu stabilisieren und vor dem Abbau durch Enzyme zu schützen. Dabei haben sich insbesondere die kugelförmigen Lipid-Nanopartikel als vielversprechend erwiesen.

10.1.2.1 Lipid-Nanopartikel und Liposome

Lipid-Nanopartikel (LNPs) und Liposomen sind kugelförmige Partikel, die aus Lipiden (Fett-ähnlichen Stoffen) aufgebaut sind und Moleküle umschliessen können. Sie werden über den Prozess der Endozytose in die Zellen aufgenommen. Dabei werden sie in eine weitere Doppellipidschicht, Endosom genannt, eingeschlossen, aus der sie jedoch wieder entkommen müssen, um die transportierten Moleküle in das Zytoplasma abzugeben, wo die RNA funktional wird (siehe Abbildung 11). Lipid-Nanopartikel sind aktuell die wichtigste Auslieferungsmethode für RNA-Therapeutika. Sie sind bereits klinisch getestet und in verschiedenen Formulierungen für die Verabreichung von siRNAs und mRNA-Impfstoffen zugelassen worden.

Lipide bestehen aus einer wasseranziehenden Kopfgruppe und einer wasserabweisenden Schwanzgruppe und kommen in allen Membransystemen in Zellen vor. Auf Grund ihrer Eigenschaften reihen sie sich in einer wässrigen Umgebung mit der Kopfgruppe nach aussen und der Schwanzgruppe nach innen aneinander und formen kugelförmige Strukturen aus einer oder zwei Lipidschichten. Die Lipidschichten können aus verschiedenen Arten von Lipiden bestehen. Das Verhältnis zwischen der Grösse der Kopf- und der Schwanzgruppe, die Ladung der Kopfgruppe und die Sättigung der Schwanzgruppe dieser Lipide bestimmt, welche Strukturen geformt werden. In der Natur kommen die kleinen einschichtigen Mizellen und die grösseren zweischichtigen Liposome vor, die einen Hohlraum bilden. In diesem Hohlraum können hydrophile Moleküle transportiert werden. Hydrophobe Moleküle können in der Doppellipidschicht eingeschlossen werden. Liposome können eine (unilamellare Vesikel) oder mehrere Doppellipidschichten (multilamellare Vesikel) haben und einen Durchmesser von 20 bis über 1000 Nanometer aufweisen. Die Grösse der Liposomen hat einen Einfluss darauf, wie schnell sie vom Immunsystem erkannt werden. Natürlich vorkommende Lipide sind entweder negativ oder neutral geladen. Die Art und

Stärke der Ladung hängt dabei von den Kopfgruppen ab (Paunovska et al., 2022; Tenchov et al., 2021).

Für die Verabreichung von RNA-Wirkstoffen eignen sich positiv geladene (kationische) Lipide. Da RNAs negativ geladen sind, interagieren sie in wässriger Umgebung durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen mit diesen. Allerdings haben sich positiv-geladene Lipide als schädlich für Körperzellen erwiesen. Deshalb werden heute hauptsächlich ionisierbare Lipide eingesetzt, die in saurer Umgebung positiv sind, unter den physiologischen Bedingungen im Körper jedoch neutral werden. Dies erlaubt es der mRNA, sich während der Herstellung im sauren Milieu an die kationischen Lipide zu binden. Nach der Injektion sind die Lipide neutral, bis sie im Endosom bei tieferem pH wieder positiv geladen werden und die RNA so ins Zytosol gelangen kann. Im Zytosol herrscht dann wieder ein höherer pH, und die Lipide sind ungeladen. Anders als negative oder zwittrig geladene Lipide, die auch natürlich vorkommen, werden sowohl positiv geladene als auch ionisierbare Lipide synthetisch hergestellt. Daneben werden zusätzlich auch verschiedene Hilfssubstanzen eingesetzt, wie zum Beispiel Cholesterin zur Vereinfachung des Zelleintritts und zur Erhöhung der Stabilität. Das Anfügen des Polymers PEG an Lipide dient unter anderem zur Stabilisierung der Lipidhülle und Umgehung des Immunsystems. Allerdings kann PEG paradoxerweise auch eine starke Immunreaktion auslösen (siehe Abschnitt 3.5 Unerwünschte Wirkungen). Die Zusammensetzung der Hülle kann für verschiedene Anwendungen und Verabreichungsformen (intravenös, intramuskulär, subkutan etc.) und Zielgewebe optimiert werden (Zak et al., 2021).

10.1.2.2 Polymer-basierte Nanopartikel

Eine weitere Möglichkeit, RNAs in Zellen zu bringen, sind Polymer-Nanopartikel. Diese bestehen aus Ketten von gleichartigen Einheiten, die sich chemisch modifizieren lassen. Dadurch lassen sich die elektrische Ladung, die Stabilität und das molekulare Gewicht der Partikel relativ einfach verändern. Ein häufig verwendetes Trägermaterial ist der biologisch abbaubare Polyester Poly(lactid-co-Glycolid) (PLGA), der auch in Implantaten und chirurgischem Nahtmaterial zur Anwendung kommt. Da PLGA neutral ist, werden positive chemische Gruppen angefügt, damit es elektrostatisch mit der negativ geladenen RNA interagieren kann. Andere Polymere, wie Polyethylenimin (PEI), Polylysine (PLL) und Poly(Beta-Aminoester) (PBAE) sind bereits positiv geladen. Allerdings sind PEI und PLL schlecht verträglich und müssen vor der Anwendung chemisch modifiziert werden (Paunovska et al., 2022). Die schlechte Verträglichkeit von kationischen Partikeln kann auch durch die Verwendung von ionisierbaren Polymeren wie Aminopolyester (APE) umgangen werden. Polymer-Nanopartikel werden,

ähnlich wie Lipid-Nanopartikel, durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Sie weisen aber den Vorteil auf, dass sie grössere RNA-Moleküle einbinden können und dass sie leichter aus dem Endosom entkommen und die RNA in das Zellinnere abgeben können (Gupta et al., 2021).

10.1.2.3 Zellpenetrierende Peptide

Zellpenetrierende Peptide sind eine Gruppe von linearen und verzweigten Peptiden aus fünf bis 30 Aminosäuren, die die Zellmembran durchdringen können. Gemeinsam ist ihnen, dass sie eine positive Ladung haben und sowohl Wasser- als auch Fett-anziehend sind. Diese Eigenschaften ermöglichen ihnen, wahrscheinlich über Endozytose, in die Zelle aufgenommen zu werden. Indem sie entweder durch eine kovalente Bindung oder Komplexbildung mit einem Wirkstoff verbunden werden, können sie diesen in das Zellinnere transportieren. Um die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Peptide zu verbessern, werden sie oft mit Polymeren (z.B. PEG) oder Fettsäuren modifiziert. Zellpenetrierende Peptide werden vor allem zur Verabreichung von siRNAs benutzt (Falato et al., 2021).

Die siRNA kann mittels einer auftrennbaren Verbindung kovalent an das Peptid gebunden werden. Diese Verbindung, zum Beispiel eine Disulfidbindung, kann nach dem Transport durch die Zellmembran im Zellplasma aufgetrennt werden, wodurch die siRNA vom Peptid gelöst wird und sich an ein AGO-Protein binden kann. Eine solche Bindung ist in der Praxis allerdings schwierig zu erreichen, und die Effizienz des Silencings war bisher in den meisten Versuchen ungenügend (Falato et al., 2021).

Dagegen gestaltet sich die Komplexbildung der negativ-geladenen siRNA mit dem positiv-geladenen Peptid relativ einfach und benötigt keine chemische Reaktion und Aufreinigung. Allerdings kann die eher schwache Bindung durch elektrostatische Interaktion zu Instabilität und einer verfrühten Abgabe der siRNA führen. Es ist deshalb wichtig, das richtige Verhältnis zwischen Peptid und RNA zu finden. Die Struktur des eingesetzten Peptids ist für die Stabilität des Komplexes ebenfalls wichtig. Deshalb wird mit verschiedenen Peptiden experimentiert. In Experimenten zeigte diese Methode einige vielversprechende Ergebnisse sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Falato et al., 2021). Durch den Einsatz der richtigen Peptide ist es sogar gelungen, siRNAs in bestimmte Zelltypen des Gehirns einzubringen (Youn et al., 2014).

Zellpenetrierende Peptide können ausserdem mit Lipiden zu Lipid-Peptid-Hybridnanopartikeln komplexiert werden. Diese können ähnlich wie die oben beschriebenen Lipid-Nanopartikel eine siRNA umschliessen und in das Zellinnere transportieren (Falato et al., 2021).

Die Methode zeigt zwar vielversprechender Forschungsergebnisse, und es hat seit dem Jahr 2000 mehrere klinische Studien mit zellpenetrierenden Peptiden gegeben. Aber bisher ist noch keines der etwa 1850 bekannten zellpenetrierenden Peptide für therapeutische Zwecke zugelassen (Tripathi et al., 2018). Das ist wohl unter anderem auf die oft noch ungenügende Stabilität *in vivo*, mangelnde Spezifität und Immunreaktionen zurückzuführen (Falato, Gestin, and Langel 2021).

10.1.3 Anwendungen und Stand der Entwicklung

Bereits in den 1970er-Jahren wurde versucht, in Nanopartikel eingepackte Nukleinsäuren als Medikamente einzusetzen. Zuerst wurden dafür Polymer-Nanopartikel verwendet. Später konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, RNAs mit kationischen Liposomen zu umhüllen. Diese Partikel tendierten allerdings zur Aggregation, oder sie wurden vom Immunsystem erkannt und abgebaut. Erst in den 2010er-Jahren waren die meisten Probleme bei der Anwendung von Lipid-Nanopartikeln gelöst. 2018 wurde mit Patisiran das erste Medikament mit in Lipid-Nanopartikel gehüllten siRNAs in den USA und Europa zugelassen. Ein weiterer grosser Schritt gelang im Dezember 2020 mit der FDA-Zulassung der beiden mRNA-Impfstoffe Comirnaty und Spikevax gegen Sars-CoV-2 von Pfizer und Moderna, die beide Lipid-Nanopartikel verwenden. Neben diesen beiden zugelassenen Impfstoffen befindet sich eine Reihe weiterer Sars-CoV-2-Impfstoffe in der Entwicklung (Gupta et al., 2021). In der Entwicklung befinden sich ausserdem mRNA-Impfstoffe gegen verschiedene andere Viren, unter anderem gegen alle Influenza-Viren (Arevalo et al., 2022). In der klinischen Phase befinden sich bereits mehrere mRNA-Impfungen (Lorentzen et al., 2022) und siRNAs, miRNA-Mimics und ASOs gegen verschiedene Krebsarten (Gupta et al., 2021). Es wird ausserdem an neuen Möglichkeiten zur Verabreichung von mRNAs geforscht, wie zum Beispiel durch Nasensprays (Xiao et al., 2022).

10.1.3.1 Herausforderungen

Für viele Funktionen ist es essenziell, dass die RNAs in die gewünschten Gewebe und Zellen gelangen. Nanopartikel tendieren allerdings dazu sich in der Leber anzusammeln, wenn sie intravenös verabreicht werden, was die Anwendungen der Technologien einschränkt. Deshalb wird an Methoden geforscht, die es ermöglichen, die Nanopartikel in die gewünschten Gewebe und Zellen zu lenken. Das Targeting kann entweder passiv oder aktiv geschehen. Beim passiven Targeting werden die Grösse und Zusammensetzung der Partikel so gewählt, dass sie einerseits lange in der Blutzirkulation bleiben, ohne sich in der Leber anzureichern oder ausgeschieden

bzw. vom Immunsystem erkannt zu werden (z. B. durch die Bindung von PEG an die Nanopartikeloberfläche). Andererseits lässt sich mit der Formulierung der Partikel auch erreichen, dass die Partikel von zelleigenen Mechanismen in das Zielgewebe befördert werden. Dies geschieht vor allem dadurch, dass sich bestimmte Proteine an die Oberfläche der Partikel anheften. Die Erkennung durch das Immunsystem kann dazu führen, dass die Partikel in lymphatische Organe wie die Milz transportiert werden. Somit werden die Partikel aus der Zirkulation entfernt, aber eine Immunreaktion gegen Bestandteile der Partikel ist weiterhin möglich. Beim aktiven Targeting werden Moleküle verwendet, die an Oberflächenproteine der Zielzellen binden. Diese Bindung ermöglicht es den Nanopartikeln, anschliessend durch Endozytose in das Zellinnere zu gelangen (Paunovska et al., 2022). Für die Behandlung von Tumorzellen etwa werden tumorspezifische Antikörper an die Nanopartikel angeheftet (Zak et al., 2021). Besonders schwierig ist dabei die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke für RNA-Anwendungen in Gehirnzellen (Xiao et al., 2022). Nusinersen wird deshalb direkt in die Spinalflüssigkeit der Wirbelsäule gespritzt (Claborn et al., 2018). Es wird an Möglichkeiten geforscht, die Blut-Hirn-Schranke durch Ultraschall kurzzeitig zu schwächen (Kovacs et al., 2017) oder ASOs so zu modifizieren, dass sie durch die Blut-Hirn-Schranke hindurch diffundieren können (Relizani et al., 2017).

10.1.4 Unerwünschte Wirkungen

Bei der mRNA-Impfung traten neben vereinzelt schweren Nebenwirkungen häufig starke Immunreaktionen auf, die vor allem auf die Lipidkomponenten zurückgeführt werden können (Klimek et al., 2021). Diese liessen sich durch eine verbesserte Zusammensetzung der Liposomen reduzieren. Unter anderem wird versucht, ionisierbare Lipide mit Exosomen und Zellmembranen von menschlichen Zellen zu kombinieren (Xiao et al., 2022). Auch die Wahl der Injektionsstelle spielt eine Rolle.

10.2 Verabreichung im Pflanzenschutz

Pflanzenzellen sind von einer festen Zellwand umgeben und nach aussen hin zusätzlich durch eine Wachsschicht geschützt. Diese Hindernisse erschwerten bislang die Verabreichung von RNA in Pflanzen beträchtlich und sind einer der Gründe, wieso lange vor allem an transgen exprimierten RNAs für den Pflanzenschutz geforscht wurde. Dieser Ansatz wird in diesem Bericht allerdings nicht behandelt. Bei der Verabreichung von exogener RNA müssen die oben genannten Hindernisse überwunden werden.

Durch RNA-Sprays werden doppelsträngige RNAs auf die Pflanzenoberfläche gesprüht. Wenn die RNA durch ein kauend-beissendes Insekt aufgenommen werden soll, reicht es, wenn die RNA auf der Blattoberfläche verbleibt. Dort muss sie UV-Strahlung und Regen standhalten. Sollen aber stechend-saugende Insekten bzw. Viren oder Pilze erreicht werden, ist eine systemische Verbreitung in der Pflanze erforderlich. Dafür müssen RNAs zuerst die Kutikula, einen wasserundurchlässigen, wachsartigen Überzug des Blattes, überwinden und in die Epidermis gelangen. Alternativ kann dsRNA auch über die Wurzeln oder durch Injektion verabreicht werden (Zotti et al., 2018). In jedem Fall müssen die Moleküle anschliessend die Zellwand und die Zellmembran durchdringen. Dabei muss die RNA stabil bleiben und darf nicht durch Nukleasen abgebaut werden. Wenn die RNA in einem Insekt wirken soll, muss sie zusätzlich im Darmtrakt stabil bleiben (Hoang et al., 2022). Der Formulierung und Verabreichungsmethode kommt daher eine herausragende Bedeutung zu (Christiaens et al., 2020; K. Y. Zhu & Palli, 2020).

10.2.1 Nackte RNA

Doppelsträngige RNA kann in einer Lösung auf die Blätter gesprüht werden. Auf der Blattoberfläche bleibt sie je nach Umweltbedingungen und Beschaffenheit des Blattes unterschiedlich lange intakt. Nackte RNA kann in das Zellinnere gelangen, vor allem wenn die RNA-Lösung mit hohem Druck aufgesprüht wird. Jedoch ist die Aufnahme nicht sehr effektiv und hängt von der Zielpflanze ab. Um das Hindernis der Kutikula zu umgehen, werden die Blätter daher im Labor vor dem Auftragen oft mechanisch inokuliert. Das heisst, die dsRNA-Lösung wird von Hand auf die Blätter gerieben, sodass die Wände von oberflächlichen Zellen aufbrechen und diese die RNA aufnehmen. Diese Methode eignet sich allerdings nicht für einen grossflächigen Einsatz auf dem Feld (Rank & Koch, 2021).

10.2.2 Minizellen

Escherichia coli Bakterien können durch das Ausschalten der sogenannten min-Gene dazu gebracht werden, kleine Zellen zu produzieren, die Proteine, Lipide und RNAs, aber kein Chromosom enthalten. Diese Minizellen können nicht wachsen und sich auch nicht teilen. Wenn das Bakterium zugleich auch dsRNAs produziert, kann diese somit in Minizellen verpackt werden. Eingeschlossen in Minizellen, sind die dsRNAs vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt (Islam et al., 2021).

10.2.3 Nanopartikel

Synthetische Nanopartikel werden bereits für die Verabreichung von RNAi in tierische Zellen eingesetzt (siehe Abschnitt 10.1.2.2 Polymer-basierte Nanopartikel). Allerdings haben diese Partikel einen Durchmesser von 100 bis 200 Nanometer und sind damit 10- bis 20-mal zu gross, um durch die Zellwand hindurch zu diffundieren. Wie bei tierischen Zellen müssen die Nanopartikel in der Lage sein, durch Endozytose in die Zelle zu gelangen, das Endosom anschliessend wieder zu verlassen und die RNA in das Zellinnere abzugeben. Zu diesem Zweck wurden Partikel in verschiedenen Grössen und Formen entwickelt, von denen sich jedoch die meisten noch in der frühen Entwicklung befinden (Schwartz et al., 2020; Shidore et al., 2021).

10.2.3.1 Layered double hydroxide

Layered double hydroxide (LDH), auch BioClay oder NanoClay genannt, ist ein Nanomaterial, das aus Schichten einer positiv geladenen Magnesiumlegierung besteht. Die Nanoschichten binden RNA und können in Wasser gelöst auf die Blätter gesprüht werden. Zuerst wurde als metallische Komponente Aluminium verwendet (MgAl-LDH). Weil man vermutete, Aluminium könnte giftig sein, wurde es inzwischen durch Eisen (MgFe-LDH) ersetzt. Diese Legierung gilt als ungiftig und biologisch abbaubar (Jain et al., 2022). Die saure Umgebung auf der Blattoberfläche, die entsteht, wenn in der Nacht das von der Pflanze abgegebene Kohlendioxid mit Wasser aus der Luftfeuchtigkeit zu Kohlensäure reagiert, hilft beim Abbau des NanoClays und führt zur Abgabe der dsRNA auf oder in die Pflanze. In Tabakpflanzen zeigten an NanoClay gebundene dsRNAs mindestens 20 Tage lang eine Wirkung gegen das PMMo-Virus, verglichen mit nur fünf Tagen nach dem Sprühen von nackten dsRNAs (Shidore et al., 2021).

10.2.3.2 Carbon Quantum Dots

Carbon Quantum Dots sind Nanopartikel aus Kohlenstoff, die durch das Anfügen von positiven organischen Verbindungen mit RNA einen Komplex bilden können. Dadurch wird die RNA vor dem enzymatischen Abbau durch Nukleasen geschützt, und die Aufnahme durch die Zellen wird optimiert. Ein Nanokomplex mit siRNA hat einen Durchmesser von durchschnittlich 3,5 Nanometern und kann durch die Zellwand diffundieren. In ersten Versuchen mit siRNA in *Nicotiana benthamiana* zeigte sich eine gute Silencing-Wirkung. Allerdings stellte sich heraus, dass kleine Nanokomplexe, die gut durch die Zellwand diffundieren konnten, von der Zelle schlecht aufgenommen wurden und umgekehrt grosse Komplexe nur schlecht durch die Zellwand diffundieren konnten (Schwartz et al., 2020). Quantum Dots, die aus PEG synthetisiert wurden, werden als unschädlich eingeschätzt.

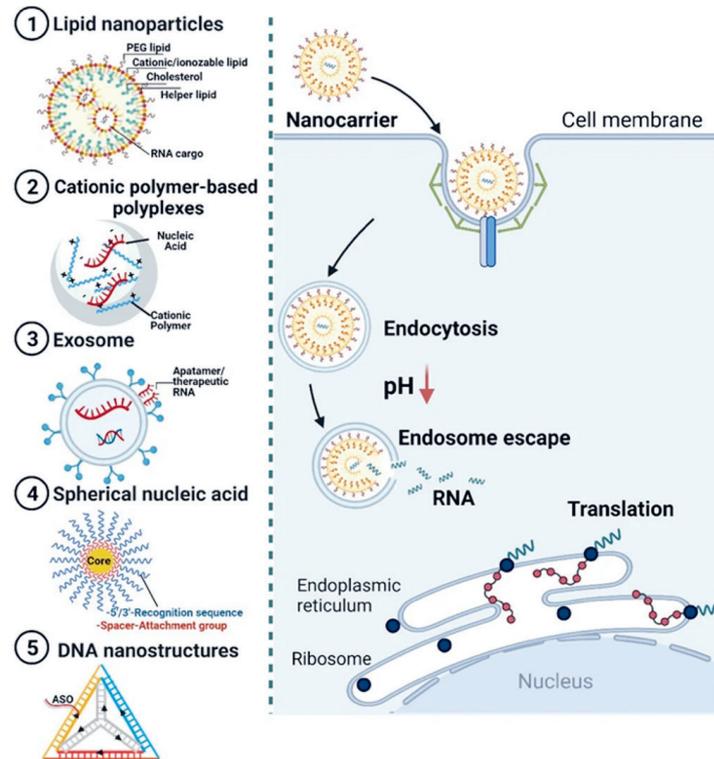


Abbildung 12: Medizinische Verabreichungsmethoden.

Links: 1) Ein Lipid-Nanopartikel mit ionisierbaren Lipiden, Helfer-Lipiden, PEG, und Cholesterin 2) Ein Polymer-Nanopartikel 3) Ein Liposom mit Aptamer 4) Eine spherische Nucleic Acid (wird nicht im Bericht besprochen) 5) Eine DNA-Nanostruktur. Rechts: Endozytose. Ein Lipid-Nanopartikel mit RNA bindet an ein Oberflächenprotein und wird in ein Endosom eingeschlossen. Durch den tieferen pH im Endosom wird die RNA aus dem Nanopartikel entlassen und entkommt aus dem Endosom. Die RNA wird im Endoplasmatischen Retikulum von den Ribosomen translatiert (Y. Zhu et al., 2022).

Jedoch müssen die für diesen Einsatz notwendige Konzentration und die Toxizität in dieser Konzentration noch evaluiert werden (Shidore et al., 2021).

10.2.3.3 Gold-Nanopartikel

Goldpartikel mit einem Durchmesser von weniger als 20 Nanometer können die Zellwand durchdringen. An die Oberfläche der Partikel werden modifizierte DNA-Stränge angeheftet, die siRNAs binden können. Während stabförmige Partikel durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, ist das bei kugelförmigen Partikeln nicht der Fall. Jedoch können beide Formen die gebundenen siRNAs in die Zelle abgeben (H. Zhang et al., 2021).

10.2.3.4 DNA-Nanostrukturen

DNA-Moleküle formen in der Natur Doppelhelixstrukturen. Es ist aber möglich, DNA-Stränge so zu konzipieren, dass sie andere Strukturen – zum Beispiel ein Tetraeder – formen. Zusätzlich können Bindungsstellen für RNA, DNA oder Proteine eingebaut werden. Es konnte gezeigt werden, dass an solche DNA-Nanostrukturen gebundene siRNAs in Zellen aufgenommen werden können.

Die Effizienz der Aufnahme hängt von der Grösse und der mechanischen Steifheit der Struktur ab. Je kleiner und steifer diese ist, desto einfacher wird sie aufgenommen. Überraschenderweise lösen die siRNAs verschiedene Silencing-Prozesse aus, abhängig davon, an welche Struktur sie gebunden waren (H. Zhang et al. 2019).

10.2.3.5 Chitosan-Nanopartikel (CNP)

Chitosan ist die deacetylierte Form des Biopolymers Chitin, das in der Natur vor allem im Aussenskelett von Insekten und in einigen Pilzen vorkommt. Das positiv geladene Chitosan bildet einen sehr stabilen Komplex mit RNA, der diese vor dem enzymatischen Abbau schützt. CNPs sind biologisch abbaubar und nicht giftig (Shidore et al., 2021). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass es vor dem sauren Milieu im Darm von Insekten schützt (Kolge et al., 2021).

10.2.3.6 Single-walled Carbon Nanotubes (SWCNT)

SWCNTs sind Nanoröhrchen aus Kohlenstoff, die durch das Aufrollen einer Graphen-Schicht in einem bestimmten Winkel hergestellt werden. Durch ihren geringen

Durchmesser von weniger als 20 Nanometern können sie durch die Zellwand in Pflanzenzellen gelangen. siRNAs können von den SWCNTs absorbiert werden, indem der sense- vom antisense-Strang gelöst wird und die beiden Stränge getrennt an das SWNT binden. In der Zelle lösen sich die Stränge wieder vom Nanoröhrchen und bilden eine doppelsträngige siRNA. Bedenken bezüglich der Toxizität in Säugetieren schränken die Anwendbarkeit insbesondere in essbaren Pflanzen ein (Shidore et al., 2021).

10.2.4 Stand der Entwicklung

Nanopartikel oder Mikrozellen verfügen über das Potential, die Stabilität und Spezifität von exogener RNA deutlich zu erhöhen und damit zwei der grössten Hürden für eine erfolgreiche Anwendung von RNAi im Pflanzenschutz zu senken. Bisher handelt es sich bei den meisten Anwendungen der oben beschriebenen Technologien aber erst um Proof-of-Concept-Experimente, die zeigen, dass die Methoden im Prinzip funktionieren. Diese Experimente wurden isoliert und im kleinen Umfang durchgeführt. Es gibt jedoch erst wenige Daten dazu, wie sich diese Präparate unter Realbedingungen verhalten und wie lange sie in der Natur intakt bleiben (Rank & Koch, 2021).

Bisher ist auch noch wenig darüber bekannt, wieso RNA-Sprays bei einigen Pflanzen effektiv sind und bei anderen nicht. Es fehlt ausserdem das Wissen darüber, wie die verschiedenen Nanopartikel in die Pflanze aufgenommen werden und welche unbeabsichtigten Wirkungen sie möglicherweise auslösen können (Rank & Koch, 2021).

Referenzen

- Abdeeva IA, Maloshenok LG, Pogorelko GV, Mokrykova MV, Bruskin SA (2019) **RNA-aptamers—As targeted inhibitors of protein functions in plants.** *Journal of Plant Physiology*, 232, 127–129. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2018.10.026>
- Abdellatef E, Will T, Koch A, Imani J, Vilcinskas A, Kogel KH (2015) **Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*.** *Plant Biotechnology Journal*, 13 (6), 849–857. <https://doi.org/10.1111/PBI.12322>
- Adachi H, Hengesbach M, Yu YT, Morais P (2021) **From antisense RNA to RNA modification: Therapeutic potential of RNA-based technologies.** *In Biomedicines* (Vol. 9, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050550>
- Aida V, Pliasis VC, Neasham PJ, North JF, McWhorter KL, Glover SR, Kyriakis CS (2021) **Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines.** *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 340. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.654289>
- Arevalo CP, Bolton MJ, Le Sage V, Ye N, Furey C, Muramatsu H, Alameh M-G, Pardi N, Drapeau EM, Parkhouse K, Garretson T, Morris JS, Moncla LH, Tam YK, Fan SHY, Lakdawala SS, Weissman D, Hensley SE (2022) **A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes.** *Science*, 378 (6622), 899–904. <https://doi.org/10.1126/science.abm0271>
- Bachman P, Fischer J, Song Z, Urbanczyk-Wochniak E, Watson G (2020) **Environmental Fate and Dissipation of Applied dsRNA in Soil, Aquatic Systems, and Plants.** *Frontiers in Plant Science*, 11, 508351. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00021>
- Bachman PM, Bolognesi R, Moar WJ, Mueller GM, Paradise MS, Ramaseshadri P, Tan J, Uffman JP, Warren J, Wiggins BE, Levine SL (2013) **Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte).** *Transgenic Research*, 22 (6), 1207–1222. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9716-5>
- Bachman PM, Huizinga KM, Jensen PD, Mueller G, Tan J, Uffman JP, Levine SL (2016) **Ecological risk assessment for DvSnf7 RNA: A plant-incorporated protectant with targeted activity against western corn rootworm.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81, 77–88. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2016.08.001>
- Balke D, Müller S (2019) **Therapeutic Potential of Ribozymes.** *In Agrawal S, Gait MJ (Eds.), Advances in Nucleic Acid Therapeutics* (pp. 434–452). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788015714-00434>
- Barbier AJ, Jiang AY, Zhang P, Wooster R, Anderson DG (2022) **The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies.** *Nature Biotechnology* 2022 40:6, 40 (6), 840–854. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01294-2>
- Bhat B, Karve S, Anderson DG (2021) **mRNA therapeutics: beyond vaccine applications.** *Trends in Molecular Medicine*, 27 (9), 923–924. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2021.05.004>
- Byun J (2021) **Recent progress and opportunities for nucleic acid aptamers.** *Life*, 11 (3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/LIFE11030193>
- Capaldi D, Teasdale A, Henry S, Akhtar N, den Besten C, Gao-Sheridan S, Kretschmer M, Sharpe N, Andrews B, Burm B, Foy J (2017) **Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products.** *Nucleic Acid Therapeutics*, 27 (6), 309–322. <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0691>
- Carvalho T (2023) **Personalized anti-cancer vaccine combining mRNA and immunotherapy tested in melanoma trial.** *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/D41591-023-00072-0>
- Chandola C, Neerathilingam M (2019) **Aptamers for Targeted Delivery: Current Challenges and Future Opportunities.** *Role of Novel Drug Delivery Vehicles in Nanobiomedicine*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.84217>
- Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA (2021) **mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:11, 20 (11), 817–838. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>
- Chen L, Rashid F, Shah A, Awan HM, Wu M, Liu A, Wang J, Zhu T, Luo Z, Shan G (2015) **The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (32), 10002–10007. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1502159112>
- Christiaens O, Tardajos MG, Martinez Reyna ZL, Dash M, Dubrue P, Smaghe G (2018) **Increased RNAi Efficacy in *Spodoptera exigua* via the Formulation of dsRNA With Guanylated Polymers.** *Frontiers in Physiology*, 9(APR), 342048. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00316>
- Christiaens O, Whyard S, Vélez AM, Smaghe G (2020) **Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges.** *In Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00451>
- Claborn MK, Stevens DL, Walker CK, Gildon BL (2018) **Nusinersen: A Treatment for Spinal Muscular Atrophy.** <https://doi.org/10.1177/1060028018789956>, 53 (1), 61–69. <https://doi.org/10.1177/1060028018789956>
- Crooke ST, Baker BF, Crooke RM, Liang X hai (2021) **Antisense technology: an overview and prospectus.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:6, 20 (6), 427–453. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00162-z>
- de Schutter K, Taning CNT, van Daele L, van Damme EJM, Dubrue P, Smaghe G (2022) **RNAi-Based Biocontrol Products: Market Status, Regulatory Aspects, and Risk Assessment.** *Frontiers in Insect Science*, 0, 22. <https://doi.org/10.3389/FINSC.2021.818037>
- Dietz-Pfeilstetter A (2021) **Relevance of rna interference (Rnai) as a new mode of action for plant protection with high specificity.** *In Journal für Kulturpflanzen* (Vol. 73, Issues 1–2, pp. 1–8). Verlag Eugen Ulmer. <https://doi.org/10.5073/JfK.2021.01-02.02>
- EPA (2021) **Pesticide Product Registration; Receipt of Application from GreenLight Biosciences to Register Ledprona as a New Active Ingredient (94614-R; 94614-E).** <https://www.regulations.gov/docket/EPA-HQ-OPP-2021-0271>
- Erdmann RM, Picard CL (2020) **RNA-directed DNA Methylation.** *PLoS Genetics*, 16 (10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009034>
- EPA (2023) **Registration Decision for the New Active Ingredient. Ledprona (*Leptinotarsa decemlineata*-specific recombinant double-stranded interfering Oligonucleotide GS2).** (CAS Number: 2433753-68-3). <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2021-0271-0196>
- Escobar MA, Civerolo EL, Summerfelt KR, Dandekar AM (2001) **RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (23), 13437–13442. <https://doi.org/10.1073/PNAS.241276898>

- Esposito R, Polidori T, Meise DF, Pulido-Quetglas C, Chouvardas P, Forster S, Schaerer P, Kobel A, Schlatter J, Kerkhof E, Roemmele M, Rice ES, Zhu L, Lanzós A, Guillen-Ramirez HA, Basile G, Carozzo I, Vancura A, Ullrich S, ... Johnson R (2022) **Multi-hallmark long noncoding RNA maps reveal non-small cell lung cancer vulnerabilities.** *Cell Genomics*, 2 (9), 100171. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100171>
- Falato L, Gestin M, Langel Ü (2021) **Cell-Penetrating Peptides Delivering siRNAs: An Overview.** In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2282, pp. 329–352). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1298-9_18
- Feng R, Patil S, Zhao X, Miao Z, Qian A (2021) **RNA Therapeutics – Research and Clinical Advancements.** *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 913. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.710738>
- Frankish A, Diekhans M, Jungreis I, Lagarde J, Loveland JE, Mudge JM, Sisu C, Wright JC, Armstrong J, Barnes I, Berry A, Bignell A, Boix C, Sala SC, Cunningham F, Domenico T di, Donaldson S, Fiddes IT, Girón CG, ... Flicke P (2021) **GENCODE 2021.** *Nucleic Acids Research*, 49 (D1), D916–D923. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1087>
- Grand View Research (2023) **Global Aptamers Market Size, Share & Growth Report.** <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/aptamers-industry>
- Gupta A, Andresen JL, Manan RS, Langer R (2021) **Nucleic acid delivery for therapeutic applications.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 178, 113834. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.113834>
- Hall J, Ashkinadze A, Becker JP, Laski A, Manz EM, Moravčík Š, Sjöström S, Vincent M (2022) **Medicinal Chemistry of Oligonucleotide Drugs – Milestones of the Past and Visions for the Future.** *CHIMIA*, 76 (5), 466. <https://doi.org/10.2533/chimia.2022.466>
- Hoang BTL, Fletcher SJ, Brosnan CA, Ghodke AB, Manzie N, Mitter N (2022) **RNAi as a Foliar Spray: Efficiency and Challenges to Field Applications.** *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (12). <https://doi.org/10.3390/IJMS23126639>
- Höfle L, Biedenkopf D, Werner BT, Shrestha A, Jelonek L, Koch A (2020) **Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the Fusarium CYP51 genes.** *RNA Biology*, 17 (4), 463–473. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1700033>
- Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, Liang XJ (2020) **Therapeutic siRNA: state of the art.** *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, 5 (1), 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>
- Huang ZY, Bian G, Xi Z, Xie X (2019) **Genes important for survival or reproduction in Varroa destructor identified by RNAi.** *Insect Science*, 26 (1), 68–75. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12513>
- Huvenne H, Smagghe G (2010) **Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review.** *Journal of Insect Physiology*, 56 (3), 227–235. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2009.10.004>
- Islam MT, Davis Z, Chen L, Englaender J, Zomorodi S, Frank J, Bartlett K, Somers E, Carballo SM, Kester M, Shakeel A, Pourtaheri P, Sherif SM (2021) **Minicell-based fungal RNAi delivery for sustainable crop protection.** *Microbial Biotechnology*, 14(4), 1847–1856. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13699>
- Jain RG, Fletcher SJ, Manzie N, Robinson KE, Li P, Lu E, Brosnan CA, Xu ZP, Mitter N (2022) **Foliar application of clay-delivered RNA interference for whitefly control.** *Nature Plants* 2022 8:5, 8 (5), 535–548. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01152-8>
- Jason TLH, Koropatnick J, Berg RW (2004) **Toxicology of antisense therapeutics.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 201 (1), 66–83. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2004.04.017>
- Kang W, Bang-Berthelsen CH, Holm A, Houben AJS, Müller AH, Thymann T, Pociot F, Estivill X, Friedländer MR (2017) **Survey of 800+ data sets from human tissue and body fluid reveals xenomiRs are likely artifacts.** *RNA*, 23 (4), 433–445. <https://doi.org/10.1261/RNA.059725.116>
- Khajuria C, Ivashuta S, Wiggins E, Fligel L, Moar W, Pleau M, Miller K, Zhang Y, Ramaseshadri P, Jiang C, Hodge T, Jensen P, Chen M, Gowda A, McNulty B, Vazquez C, Bolognesi R, Haas J, Head G, Clark T (2018) **Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, Diabrotica virgifera virgifera LeConte.** *PLOS ONE*, 13 (5), e0197059. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0197059>
- Kim TH, Lee SW (2021) **Aptamers for Anti-Viral Therapeutics and Diagnostics.** *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (8). <https://doi.org/10.3390/IJMS22084168>
- Klimek L, Eckrich J, Hagemann J, Casper I, Huppertz J (2021) **Allergische Reaktionen auf COVID-19-Impfstoffe – Evidenz und praxisorientiertes Vorgehen.** *Der Internist*, 62 (3), 326–332. <https://doi.org/10.1007/s00108-021-00959-5>
- Koch A, Biedenkopf D, Furch A, Weber L, Rossbach O, Abdellatif E, Linicus L, Johannsmeier J, Jelonek L, Goesmann A, Cardoza V, McMillan J, Mentzel T, Kogel KH (2016) **An RNAi-Based Control of Fusarium graminearum Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery.** *PLOS Pathogens*, 12 (10), e1005901. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005901>
- Koch A, Höfle L, Werner BT, Imani J, Schmidt A, Jelonek L, Kogel KH (2019) **SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence Fusarium FgCYP51 genes in infected host and non-host plants.** *Molecular Plant Pathology*, 20 (12), 1636. <https://doi.org/10.1111/MPP.12866>
- Koch A, Petschenka G (2022) **Exogene Anwendung von RNA zur umweltfreundlichen Bekämpfung von Schadinsekten.** *Journal Für Kulturpflanzen*, 74 (03–04), 75–84. <https://doi.org/10.5073/JFK.2022.03-04.05>
- Koch A, Wassenegger M (2021) **Host-induced gene silencing – mechanisms and applications.** *New Phytologist*, 231 (1), 54–59. <https://doi.org/10.1111/NPH.17364>
- Kohlberger M, Gadermaier G (2021) **SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/BAB.2244>
- Kolge H, Kadam K, Galande S, Lanjekar V, Ghormade V (2021) **New Frontiers in Pest Control: Chitosan Nanoparticles-Shielded dsRNA as an Effective Topical RNAi Spray for Gram Podborer Biocontrol.** *ACS Applied Bio Materials*, 4 (6), 5145–5157. <https://doi.org/10.1021/ACSABM.1C00349>
- Kovacevic KD, Gilbert JC, Jilma B (2018) **Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of aptamers.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 134, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.008>
- Kovacs ZI, Kim S, Jikaria N, Qureshi F, Milo B, Lewis BK, Bresler M, Burks SR, Frank JA (2017) **Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (1), E75–E84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614777114>
- Krammer F (2020) **SARS-CoV-2 vaccines in development.** *Nature* 2020 586:7830, 586 (7830), 516–527. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
- Kumar S, Mohapatra T (2021) **Dynamics of DNA Methylation and Its Functions in Plant Growth and Development.** *Frontiers in Plant Science*, 12, 858. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.596236>

- Li J, Liu Q, Liu J, Wu X, Lei Y, Li S, Zhao D, Li Z, Luo L, Peng S, Ou Y, Yang H, Jin J, Li Y, Peng Y (2022) **An mRNA-based rabies vaccine induces strong protective immune responses in mice and dogs.** *Virology Journal*, 19 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12985-022-01919-7/>
- Liu CX, Chen LL (2022) **Circular RNAs: Characterization, cellular roles, and applications.** *Cell*, 185 (12), 2016–2034. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.04.021>
- Liu S, Jaouannet M, Dempsey DA, Imani J, Coustau C, Kogel K-H (2020) **RNA-based technologies for insect control in plant production.** *Biotechnology Advances*, 39, 107463. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107463>
- Liu SJ, Horlbeck MA, Cho SW, Birk HS, Malatesta M, He D, Attenello FJ, Villalta JE, Cho MY, Chen Y, Mandegar MA, Olvera MP, Gilbert LA, Conklin BR, Chang HY, Weissman JS, Lim DA (2017) **CRISPRi-based genome-scale identification of functional long non-coding RNA loci in human cells.** *Science (New York, N.Y.)*, 355 (6320). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAH7111>
- Lorentzen CL, Haanen JB, Met Ö, Svane IM (2022) **Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment.** *The Lancet Oncology*, 23 (10), e450–e458. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00372-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00372-2)
- Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, Wu HC (2020) **Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases.** *Journal of Biomedical Science* 2020 27:1, 27 (1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/S12929-019-0592-Z>
- Mahmoudi E, Soleimani R (2019) **Host-induced gene silencing of *Pectobacterium carotovorum* quorum sensing gene enhances soft rot disease resistance in potato plants.** *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52 (3–4), 371–384. <https://doi.org/10.1080/03235408.2019.1623503>
- McDonald JI, Celik H, Rois LE, Fishberger G, Fowler T, Rees R, Kramer A, Martens A, Edwards JR, Challen GA (2016) **Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation.** *Biology Open*, 5 (6), 866–874. <https://doi.org/10.1242/bio.019067>
- Mercer TR, Munro T, Mattick JS (2022) **The potential of long noncoding RNA therapies.** *Trends in Pharmacological Sciences*, 43 (4), 269–280. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2022.01.008>
- Mills DR, Peterson RL, Spiegelman S (1967) **An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58 (1), 217. <https://doi.org/10.1073/PNAS.58.1.217>
- Mishra S, Dee J, Moar W, Dufner-Beattie J, Baum J, Dias NP, Alyokhin A, Buzza A, Rondon SI, Clough M, Menasha S, Groves R, Clements J, Ostlie K, Felton G, Waters T, Snyder WE, Jurat-Fuentes JL (2021) **Selection for high levels of resistance to double-stranded RNA (dsRNA) in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using non-transgenic foliar delivery.** *Scientific Reports* 2021 11:1, 11 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85876-1>
- Mitter N, Worrall EA, Robinson KE, Li P, Jain RG, Taochy C, Fletcher SJ, Carroll BJ, Lu GQ, Xu ZP (2017) **Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses.** *Nature Plants*, 3. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.207>
- Mollocana-Lara EC, Ni M, Agathos SN, Gonzales-Zubieta FA (2021) **The infinite possibilities of RNA therapeutics.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48 (9–10). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab063>
- Munzar JD, Ng A, Juncker D (2019) **Duplexed aptamers: history, design, theory, and application to biosensing.** *Chemical Society Reviews*, 48 (5), 1390–1419. <https://doi.org/10.1039/C8CS00880A>
- Noh JH, Kim KM, McClusky WG, Abdelmohsen K, Gorospe M (2018) **Cytoplasmic functions of lncRNAs.** *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 9 (3), e1471. <https://doi.org/10.1002/WRNA.1471>
- Nudler E, Mironov AS (2004) **The riboswitch control of bacterial metabolism.** *Trends in Biochemical Sciences*, 29 (1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.004>
- Obi P, Chen YG (2021) **The design and synthesis of circular RNAs.** *Methods (San Diego, Calif.)*, 196, 85. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2021.02.020>
- OECD (2020) **Considerations for the Environmental Risk Assessment of the Application of Sprayed or Externally Applied ds-RNA-Based Pesticides.** *Series on Pesticides*, 104.
- Ospina-Villa JD, Cisneros-Sarabia A, Sánchez-Jiménez MM, Marchat LA (2020) **Current advances in the development of diagnostic tests based on aptamers in parasitology: A systematic review.** *Pharmaceutics*, 12 (11), 1–22. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12111046>
- Pallis S, Alyokhin A, Manley B, Rodrigues TB, Buzza A, Barnes E, Narva K (2022) **Toxicity of a novel dsRNA-based insecticide to the Colorado potato beetle in laboratory and field trials.** *Pest Management Science*, 78 (9), 3836–3848. <https://doi.org/10.1002/PS.6835>
- Papikian A, Liu W, Gallego-Bartolomé J, Jacobsen SE (2019) **Site-specific manipulation of *Arabidopsis* loci using CRISPR-Cas9 SunTag systems.** *Nature Communications* 2019 10:1, 10 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08736-7>
- Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D (2018) **mRNA vaccines – a new era in vaccinology.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2018 17:4, 17 (4), 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Pascolo S (2021) **Impfstoffe gegen COVID-19 – Aertzeverlag medinfo AG.** *Der Informierte @rzt.* <https://www.medinfo-verlag.ch/impfstoffe-gegen-covid-19>
- Paunovska K, Loughrey D, Dahlman JE (2022) **Drug delivery systems for RNA therapeutics.** *Nature Reviews Genetics* 2022 23:5, 23 (5), 265–280. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>
- Portnoy V, Lin SHS, Li KH, Burlingame A, Hu ZH, Li H, Li LC (2016) **saRNA-guided Ago2 targets the RITA complex to promoters to stimulate transcription.** *Cell Research* 2016 26:3, 26 (3), 320–335. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.22>
- Povsic TJ, Lawrence MG, Lincoff AM, Mehran R, Rusconi CP, Zelenkofske SL, Huang Z, Sailstad J, Armstrong PW, Steg PG, Bode C, Becker RC, Alexander JH, Adkinson NF, Levinson AI (2016) **Pre-existing anti-PEG antibodies are associated with severe immediate allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated aptamer.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138 (6), 1712–1715. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.058>
- Qin S, Tang X, Chen Y, Chen K, Fan N, Xiao W, Zheng Q, Li G, Teng Y, Wu M, Song X (2022) **mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases.** *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1, 7 (1), 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01007-w>
- Rank AP, Koch A (2021) **Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications – How Far Are We?** *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.755203>
- Relizani K, Griffith G, Echevarría L, Zarrouki F, Facchinetti P, Vaillend C, Leumann C, García L, Goyenvalle A (2017) **Efficacy and Safety Profile of Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy Mouse Model.** *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 8, 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.013>
- Romeis J, Widmer F (2020) **Assessing the Risks of Topically Applied dsRNA-Based Products to Non-target Arthropods.** *Frontiers in Plant Science*, 11, 679. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00679>
- Saad M, Faucher SP (2021) **Aptamers and Aptamer-Coupled Biosensors to Detect Water-Borne Pathogens.** *Frontiers in Microbiology*, 12, 304. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643797>
- Schlake T, Thess A, Thran M, Jordan I (2019) **mRNA as novel technology for passive immunotherapy.** *Cell. Mol. Life Sci.*, 76 (2), 301–328. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2935-4>

- Schwartz SH, Hendrix B, Hoffer P, Sanders RA, Zheng W (2020) **Carbon Dots for Efficient Small Interfering RNA Delivery and Gene Silencing in Plants.** *Plant Physiology*, 184 (2), 647–657. <https://doi.org/10.1104/PP.20.00733>
- Scott JG, Michel K, Bartholomay LC, Siegfried BD, Hunter WB, Smagge G, Zhu KY, Douglas AE (2013) **Towards the elements of successful insect RNAi.** *Journal of Insect Physiology*, 59 (12), 1212–1221. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2013.08.014>
- Sharun K, Tiwari R, Saied ARA, Dhama K (2021) **SARS-CoV-2 vaccine for domestic and captive animals: An effort to counter COVID-19 pandemic at the human-animal interface.** *Vaccine*, 39 (49), 7119. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2021.10.053>
- Shen W, De Hoyos CL, Migawa MT, Vickers TA, Sun H, Low A, Bell TA, Rahdar M, Mukhopadhyay S, Hart CE, Bell M, Riney S, Murray SF, Greenlee S, Crooke RM, Liang X hai, Seth PP, Crooke ST (2019) **Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index.** *Nature Biotechnology* 2019 37:6, 37 (6), 640–650. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0106-2>
- Shidore T, Zuverza-Mena N, White JC, da Silva W (2021) **Nanoenabled Delivery of RNA Molecules for Prolonged Antiviral Protection in Crop Plants: A Review.** *ACS Applied Nano Materials*, 4 (12), 12891–12904. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c03512>
- Sola M, Menon AP, Moreno B, Meraviglia-Crivelli D, Soldevilla MM, Cortón-García F, Pastor F (2020) **Aptamers Against Live Targets: Is In Vivo SELEX Finally Coming to the Edge?** *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 21, 192–204. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2020.05.025>
- Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M (2020) **Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 22:2, 22 (2), 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Sun M, Liu S, Song T, Chen F, Zhang J, Huang J, Wan S, Lu Y, Chen H, Tan W, Song Y, Yang C (2021) **Spherical Neutralizing Aptamer Inhibits SARS-CoV-2 Infection and Suppresses Mutational Escape.** *Journal of the American Chemical Society*, 143 (51), 21541–21548. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c08226>
- Sun M, Wu Z, Zhang J, Chen M, Lu Y, Yang C, Song Y (2022) **Spherical neutralizing aptamer suppresses SARS-CoV-2 Omicron escape.** *Nano Today*, 44, 101499. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2022.101499>
- Svoboda P (2020) **Key Mechanistic Principles and Considerations Concerning RNA Interference.** *Frontiers in Plant Science*, 11, 1237. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01237>
- Tan CP, Sinigaglia L, Gomez V, Nicholls J, Habib NA (2021) **RNA Activation—A Novel Approach to Therapeutically Upregulate Gene Transcription.** *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 6530, 26 (21), 6530. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26216530>
- Tenchov R, Bird R, Curtze AE, Zhou Q (2021) **Lipid Nanoparticles from Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement.** *ACS Nano*, 15 (11), 16982–17015. <https://doi.org/10.1021/ACS.NANO.1C04996>
- Traber GM, Yu A-M (2022) **RNAi Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, JPET-MR-2022-001234. <https://doi.org/10.1124/JPET.122.001234>
- Tripathi PP, Arami H, Banga I, Gupta J, Gandhi S, Tripathi PP, Arami H, Banga I, Gupta J, Gandhi S (2018) **Cell penetrating peptides in preclinical and clinical cancer diagnosis and therapy.** *Oncotarget*, 9 (98), 37252–37267. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.26442>
- Trougakos IP, Terpos E, Alexopoulos H, Politou M, Paraskevis D, Scorilas A, Kastritis E, Andreaskos E, Dimopoulos MA (2022) **Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis.** *Trends in Molecular Medicine*, 28 (7), 542–554. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2022.04.007>
- Tuerk C, Gold L (1990) **Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase.** *Science*, 249 (4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2200121>
- Vater A, Klussmann S (2015) **Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer® therapeutics.** *Drug Discovery Today*, 20 (1), 147–155. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2014.09.004>
- vfa (2023) **mRNA-Impfstoffe für Schutzimpfungen.** <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/coronavirus/rna-basierte-impfstoffe-in-entwicklung-und-versorgung>
- Wang Z, Li Y, Zhang B, Gao X, Shi M, Zhang S, Zhong S, Zheng Y, Liu X, Wang Z, Li Y, Zhang B, Gao X, Shi M, Zhang S, Zhong S, Zheng Y, Liu X (2023) **Functionalized Carbon Dot-Delivered RNA Nano Fungicides as Superior Tools to Control Phytophthora Pathogens through Plant RdRPI Mediated Spray-Induced Gene Silencing.** *Advanced Functional Materials*, 33 (22), 2213143. <https://doi.org/10.1002/ADFM.202213143>
- Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, Worley KC, Evans JD, Maleszka R, Robertson HM, Weaver DB, Beye M, Bork P, Elsik CG, Hartfelder K, Hunt GJ, Zdobnov EM, Amdam G V., Bitondi MMG, Collins AM, Cristino AS, Lattorff HMG, ... Wright R (2006) **Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera.** *Nature*, 443 (7114), 931–949. <https://doi.org/10.1038/NATURE05260>
- Werner BT, Gaffar FY, Schuemann J, Biedenkopf D, Koch AM (2020) **RNA-Spray-Mediated Silencing of Fusarium graminearum AGO and DCL Genes Improve Barley Disease Resistance.** *Frontiers in Plant Science*, 11, 476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00476>
- Xiao Y, Tang Z, Huang X, Chen W, Zhou J, Liu H, Liu C, Kong N, Tao W (2022) **Emerging mRNA technologies: delivery strategies and biomedical applications.** *Chemical Society Reviews*, 51 (10), 3828–3845. <https://doi.org/10.1039/D1CS00617G>
- Yan AC, Levy M (2018) **Aptamer-Mediated Delivery and Cell-Targeting Aptamers: Room for Improvement.** *Nucleic Acid Therapeutics*, 28 (3), 194. <https://doi.org/10.1089/NAT.2018.0732>
- Youn P, Chen Y, Furgeson DY (2014) **A Myristoylated Cell-Penetrating Peptide Bearing a Transferrin Receptor-Targeting Sequence for Neuro-Targeted siRNA Delivery.** *Molecular Pharmaceutics*, 11 (2), 486–495. <https://doi.org/10.1021/mp400446v>
- Zak MM, Zangi L, Kowalski P, Boros G, Karikó K (2021) **Lipid Nanoparticles for Organ-Specific mRNA Therapeutic Delivery.** *Pharmaceutics* 2021, Vol. 13, Page 1675, 13 (10), 1675. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13101675>
- Zhang H, Demirer GS, Zhang H, Ye T, Goh NS, Aditham AJ, Cunningham FJ, Fan C, Landry MP (2019) **DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116 (15), 7543–7548. https://doi.org/10.1073/PNAS.1818290116/SUPPL_FILE/PNAS.1818290116.SM02.MP4
- Zhang H, Goh NS, Wang JW, Pinals RL, González-Grandío E, Demirer GS, Butrus S, Fakra SC, del Rio Flores A, Zhai R, Zhao B, Park SJ, Landry MP (2021) **Nanoparticle cellular internalization is not required for RNA delivery to mature plant leaves.** *Nature Nanotechnology* 2021 17:2, 17 (2), 197–205. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-01018-8>
- Zhang Y, Lai BS, Juhas M (2019) **Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications.** *Molecules*, 24 (5). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24050941>
- Zhu G, Chen X (2018) **Aptamer-based targeted therapy.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 134, 65. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2018.08.005>
- Zhu KY, Palli SR (2020) **Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference.** *Annual Review of Entomology*, 65, 293. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-011019-025224>

Zhu S, Li W, Liu J, Chen CH, Liao Q, Xu P, Xu H, Xiao T, Cao Z, Peng J, Yuan P, Brown M, Liu XS, Wei W (2016) **Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR library.** *Nature Biotechnology*, 34 (12), 1279. <https://doi.org/10.1038/NBT.3715>

Zhu Y, Zhu L, Wang X, Jin H (2022) **RNA-based therapeutics: an overview and prospectus.** *Cell Death & Disease* 2022 13:7, 13 (7), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05075-2>

Zotti M, dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT, Smagghe G (2018) **RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes.** *Pest Management Science*, 74 (6), 1239–1250. <https://doi.org/10.1002/PS.4813>

Zou X, Wu J, Gu J, Shen L, Mao L (2019) **Application of aptamers in virus detection and antiviral therapy.** *Frontiers in Microbiology*, 10 (JULY), 1462. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01462>

Glossar

Antigen	Protein (oder Teil davon) eines Krankheitserregers, welches das Immunsystem aktiviert.
Antikörper	Protein, welches sich spezifisch an ein bestimmtes Zielmolekül (→ Antigen) bindet. Sie haben eine wichtige Funktion bei der Immunantwort von Wirbeltieren.
Antisense Oligonukleotid (ASO)	Kurze, einzelsträngige RNA-Sequenz mit einer Länge von 12–24 Nukleotiden. ASOs werden synthetisch hergestellt, um als Pharmazeutika die Genexpression zu regulieren. ASOs binden sich an ihre Ziel-RNA und beeinflussen sie dadurch auf unterschiedliche Weisen.
Arthropoden	Auch Gliederfüßer genannt. Sind ein Stamm des Tierreiches. Zu den Arthropoden gehören Insekten, Tausendfüßer, Krebstiere und Spinnentiere.
Aptamer	Einzelsträngiges RNA- oder DNA-Oligonukleotid bzw. Peptid, das sich durch seine dreidimensionale Struktur an andere Moleküle binden kann.
CRISPR/Cas	Werkzeug der Genom-Editierung, um DNA an einer bestimmten Stelle zu verändern. Der CRISPR/Cas-Komplex besteht aus RNA-Molekülen und einem Protein (Enzym).
Denaturierung	Verlust der funktionellen Struktur eines Moleküls, z. B. bei hohen Temperaturen.
DNA	«deoxyribonucleic acid», Desoxyribonukleinsäure: Ein Makromolekül, das aus einer Kette von Desoxyribonukleotiden (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin) besteht. Bei allen Organismen liegt die Erbinformation in Form von DNA vor.
dsRNA	«double stranded RNA», doppelsträngige RNA: Natürlich vorkommende dsRNAs spielen in fast allen Eukaryoten eine wichtige Rolle bei der RNA-Interferenz und somit der Genregulation. Synthetisch hergestellte dsRNAs zur Genregulation werden als Pharmazeutika (in der Form von → siRNA) oder für landwirtschaftliche Anwendungen entwickelt bzw. genutzt.
Enantiomer	Enantiomere sind Moleküle, welche die gleiche zweidimensionale Struktur haben, aber in ihrer räumlichen Struktur spiegelbildlich zueinander sind.
Eukaryoten	Lebewesen, deren Zellen einen Zellkern besitzen, insbesondere Tiere, Pflanzen und Pilze.
Exon	Codierender Abschnitt der mRNA, der bei Splicing erhalten bleibt, während → Introns aus der pre-mRNA herausgeschnitten werden.
Genom-Editierung	Verfahren zur zielgerichteten Veränderung des Erbguts an einer bestimmten Stelle. Zu den häufigsten Werkzeugen der Genom-Editierung gehören CRISPR/Cas, TALEN und Zink-Finger-Nukleasen.
Host-induced gene silencing (HIGS)	Eine Form des posttranskriptionellen Gen-Silencings bei Pflanzen. Dabei wird die DNA-Sequenz für eine → dsRNA ins Pflanzenerbgut eingefügt und es entsteht eine transgene Pflanze. Die Pflanzenzellen exprimieren anschliessend selber (endogen) die entsprechende dsRNA.
Intron	Abschnitt der → pre-mRNA, der beim Splicing – im Gegensatz zu Exons – herausgeschnitten wird und nicht in der mRNA enthalten ist.
Liposom	Kugelförmiges Partikel mit einer Hülle, die aus einer Doppelschicht von Lipiden besteht. Liposome können verwendet werden, um Moleküle wie z. B. RNA zu umschliessen und ins Zellinnere zu transportieren.
LNAs	«locked nucleic acids»: Nukleotide, bei denen das Zuckermolekül chemisch modifiziert wurde, um die Stabilität zu erhöhen.
miRNA	«microRNA»: Kurze, doppelsträngige RNA-Sequenz mit einer Länge von 17–24 Nukleotiden, welche natürlicherweise durch RNA-Interferenz die Genexpression regulieren kann.

mRNA	«messenger RNA», Boten-RNA: RNA, welche die genetische Information für den Bau eines bestimmten Proteins trägt.
nicht-codierende RNA (ncRNA)	RNA, die keine genetische Information zur Herstellung eines Proteins enthält.
Nuklease	Enzym, welches Nukleinsäuren abbaut, indem es die Hydrolyse der Bindungen zwischen den einzelnen Nukleotiden katalysiert.
Nukleosid	Verbindung einer Nukleinbase und einem Zuckermolekül. Durch Phosphorylierung entsteht aus dem Nukleosid ein Nukleotid, der Grundbaustein der Nukleinsäuren.
Nukleotid	Chemischer Grundbaustein der Nukleinsäure. Ein Nukleotid besteht aus einer von vier spezifischen Nukleinbasen, einem Zuckermolekül und mindestens einer Phosphatgruppe.
Off-Target-Effekt	Unbeabsichtigter Effekt ausserhalb der Zielsequenz.
Oligonukleotid	Kurze DNA- oder RNA-Sequenz aus wenigen Nukleotiden (normalerweise etwa bis zu 10–200 Nukleotiden)
Phosphorothioat (PS)	Um RNAs zu stabilisieren, werden insbesondere bei → ASOs die natürlichen Phosphodiester-Bindungen zwischen den Nukleotiden durch synthetische Phosphorothioat-Bindungen ersetzt.
Polyethylenglycol (PEG)	PEG ist ein wasserlösliches Polymer, das in der Medizin, der Forschung und der Industrie vielfältige Anwendungen hat. Es wird üblicherweise als ungiftig eingestuft, kann aber allergische Reaktionen auslösen.
pre-mRNA	Vorform der mRNA, welche direkt nach der Transkription entsteht. Die pre-mRNA wird auf verschiedene Weisen modifiziert und zur → mRNA weiterverarbeitet. Zu den Modifikationen gehören das Anhängen des Poly(A)-Schwanzes und der Cap-Struktur an den beiden Enden der pre-mRNA sowie das Splicing.
pre-miRNA (Precursory miRNA)	Vorform der → miRNA, welche durch die Prozessierung von → pri-miRNA entsteht (siehe pri-miRNA).
Primer	Sequenz, welche als Startpunkt für die Replikation der DNA dient.
pri-miRNA	Vorform der miRNA, die bei der Transkription entsteht. Sie ist deutlich länger als die miRNA und lagert sich in einer Schlaufe zusammen.
Ribosom	Komplex aus RNA und Proteinen, welcher in den Zellen die Translation und somit die Herstellung von Proteinen katalysiert.
RNA	«ribonucleic acid», Ribonukleinsäure: ein Makromolekül, das aus einer Kette von Nukleotiden besteht. Im Gegensatz zur DNA enthält die RNA die Base Uracil anstelle von Thymin und besitzt eine zusätzliche Hydroxygruppe am Zucker-Phosphat-Rückgrat.
RNA-Aktivierung (RNAa)	Verfahren zur Erhöhung der Transkription eines Gens.
RNA-Aptamer	Kurze, nicht-codierende, einzelsträngige RNA, welche sich durch ihre dreidimensionale Form spezifisch an ein Zielmolekül bindet.
RNA-Interferenz (RNAi)	Mechanismus zur Regulation der Genexpression, der in fast allen eukaryotischen Lebewesen natürlicherweise vorkommt. Bei der RNAi binden sich kleine RNA-Sequenzen an ihre komplementäre Ziel-RNA und hemmen die Herstellung des entsprechenden Proteins.
saRNA	«small activating RNA»: Kurze, chemisch synthetisierte, doppelsträngige RNA, die sich spezifisch an eine Zielsequenz im Erbgut bindet und dadurch via «RNA-Aktivierung» eine erhöhte Transkription bewirkt.

shRNA	«short hairpin RNA»: Kurze, doppelsträngige RNA mit einer haarnadelförmigen Struktur. shRNAs werden in Zellen zu → siRNAs verarbeitet und spielen somit eine Rolle in der RNA-Interferenz.
siRNA	«small interfering RNA»: kurze, doppelsträngige RNA-Sequenz mit einer Länge von 21–24 Nukleotiden, welche sowohl natürlicherweise durch → RNA-Interferenz als auch in synthetischer Form als Pharmazeutika die Genexpression regulieren kann. siRNAs binden komplementäre Ziel-RNA und hemmen sie dadurch.
Spiegelmer	Spiegelmere sind Enantiomere von Aptameren.
Splicing/Spleissen	Entfernen von bestimmten Sequenzen (→ Introns) aus der pre-mRNA. Das Splicing ist ein wichtiger Schritt bei der Weiterverarbeitung von pre-mRNA zu mRNA. Wenn durch Splicing unterschiedliche Sequenzen aus der pre-mRNA geschnitten werden, können unterschiedliche mRNAs und somit unterschiedliche Proteine entstehen.
Spray-induced gene silencing (SIGS)	Eine Form des → Gen-Silencings bei Pflanzen. Dabei wird die → dsRNA mittels eines Sprays von aussen (exogen) auf die Pflanze gesprüht.
sRNA	«small RNA»: Kurze, nicht-codierende RNA mit einer ungefähren Länge von weniger als 200 Nukleotiden.
Transkript	Von der Erbinformation abgelesene (transkribierte) RNA-Sequenz.
Transkription	Überschreiben der DNA in → pre-mRNA, die Vorform der mRNA.
Translation	Übersetzung von mRNA in Aminosäuren und somit Proteine.

SCNAT - vernetztes Wissen im Dienste der Gesellschaft

Die **Akademie der Naturwissenschaften Schweiz (SCNAT)** engagiert sich regional, national und international für die Zukunft von Wissenschaft und Gesellschaft. Sie stärkt das Bewusstsein für die Naturwissenschaften als zentralen Pfeiler der kulturellen und wirtschaftlichen Entwicklung. Ihre breite Abstützung macht sie zu einem repräsentativen Partner für die Politik. Die SCNAT vernetzt die Naturwissenschaften, liefert Expertise, fördert den Dialog von Wissenschaft und Gesellschaft, identifiziert und bewertet wissenschaftliche Entwicklungen und legt die Basis für die nächste Generation von Naturwissenschaftlerinnen und Naturwissenschaftlern. Sie ist Teil des Verbundes der Akademien der Wissenschaften Schweiz.

Das **Forum Genforschung** der Akademie der Naturwissenschaften Schweiz (SCNAT) befasst sich mit Entwicklungen in der Genforschung und ihren Auswirkungen auf die Gesellschaft. Dabei fördert das Forum den Austausch zwischen Wissenschaftler:innen, Entscheidungsträger:innen und der Öffentlichkeit.

