



Foto: Gregor Bucher

Drosophila melanogaster

Institut für Infektionsbiologie mit RNAi Moleküle auf, die Erregern den Eintritt in ihre Wirtszellen ermöglichen. „Wir sind daran gewöhnt, für Erkrankungen von Kopfschmerzen bis zu Herzrhythmusstörungen Medikamente einzusetzen, die sich gegen körpereigene Strukturen richten“, sagt Abteilungsdirektor Meyer. „Aber Präparate gegen Infektionen zielen bisher ausschließlich auf die Erreger ab.“ Meyer will dieses Prinzip durchbrechen: Er sucht nach Wirtsfaktoren, die blockiert werden können, um Eintritt und Vermehrung krankmachender Mikroorganismen zu verhindern.

So identifizierte Meyers Team in einem genomweiten RNAi-Screen 287 menschliche Gene, welche die Vermehrung von Grippeviren beeinflussen (*Nature* 2010, 463: 818). Für diesen Screen transfizierten

die Forscher doppelsträngige siRNA in eine Lungenzelllinie, die sie mit saisonalen Grippeviren, pandemischen Schweinegrippeerreger oder Vogelgrippevirus infiziert hatten. Die Virusvermehrung ermittelten sie über die Produktion des viralen NP-Proteins. Zur Bestimmung des Virustiters gaben sie Überstände infizierter Zellen zu einer Zelllinie mit Influenza-induzierbarem Luziferase-Gen.

Zwei der gefundenen Wirtsfaktoren prüften die Infektionsbiologen inzwischen im Detail: Sie blockierten die Kinase CLK1 pharmakologisch *in vitro* und untersuchten Knockout-Mäuse ohne den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor 1B. In beiden Fällen war die Virusproduktion vermindert.

Therapeutische RNAi

Meyer und Co. setzen nun die Jagd nach zelleigenen Molekülen, die sich als Ansatzpunkt für die Entwicklung neuartiger Grippemittel eignen, auch im Rahmen eines EU-Projekts fort. „Zusammen mit anderen europäischen Arbeitsgruppen und Pharmafirmen verfolgen wir hier konventionelle Therapieansätze sowie den Einsatz therapeutischer RNAi“, berichtet Meyer.

Darüber hinaus nimmt er mit seinen Mitarbeitern weitere Erreger ins Visier. Als nächstes will die Gruppe per genomweitem RNAi-Screen Wirtsfaktoren bei Infektionen mit dem Chikungunya-Virus aufdecken. Das über Moskitos übertragene Virus löst Denguefieber-ähnliche Symptome aus und hält derzeit verstärkt in Europa Einmarsch.

Nicht mit Mücken, sondern der Taufliege *Drosophila melanogaster* arbeitet Gunter Merdes' Gruppe an der ETH Zürich. Der gebürtige Deutsche untersucht den zwischen Fliege und Mensch hoch konservierten Notch-Signalweg. Dieser ist nach dem Rezeptor Notch benannt, einem Transmembranprotein, das wiederum die Transmembranproteine Delta oder Serrate auf anderen Zellen bindet. Da er auf diese Weise eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung spielte, wird der Notch-Signalweg beim Mensch mit verschiedenen Krebsformen in Verbindung gebracht.

Gen-Identifizierung

In einem kombinierten *In vitro*- und *In vivo*-RNAi-Screen fahndeten Merdes und Mitarbeiter nun nach Regulatoren des Signalwegs (*Dev Cell* 2010, 18:862). „In einem genomweiten RNAi-Screen einer Fliegen-Zelllinie haben wir 900 mögliche Kandidatengene aufgespürt“, teilt Merdes mit. „500 der Gene haben wir anschließend in lebenden Fliegen getestet.“

In vitro beobachteten die Schweizer den Einfluss transfizierter siRNAs auf die Expression des Reportergens Luziferase unter einem Notch-spezifischen Promotor. Für die *In vivo*-Analysen kreuzten sie transgene Fliegen, deren Nachkommen im Auge oder im Flügel die jeweilige siRNA sowie *Green Fluorescent Protein* (GFP) unter einem Notch-spezifischen Promotor exprimierten. Die leuchtenden Organe analysierten die Wissenschaftler anschließend mikroskopisch. Sie entdeckten 401 Gene, die den Notch-Signalweg beeinflussen.

„Da wir die Kandidatengene *in vitro* eingegrenzt hatten, konnten wir anschließend aufwendigere *In vivo*-Tests durchführen“, schildert Merdes. „So haben wir beispielsweise die Stärke des RNAi- ▶“

riboxx
RNA-INTERFERENCE IN A BOX

Your Gene Silencing Guarantee

riboxx® siRNA

- stronger gene silencing
- higher serum stability
- less off-target effects



www.riboxx.com

en sie mit Fluoreszenz-Imaging untersuchen, ob das Verstummen des jeweiligen Gens Auswirkungen auf die Zellteilung hat. Etwa 600 zellteilungsrelevante Gene haben die Forscher mit ihrem genetischen Rundumschlag gefunden. Die Ergebnisse ihrer Arbeit veröffentlichten sie in diesem Jahr (Neumann, B. *et al.*, Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature* 2010; 464(7289):721-727).

Ein Team vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried hat auf ähnliche Art und Weise sage und schreibe 2.785 Gene identifiziert, die die Muskelfunktion der Taufliege steuern. Auch diese Arbeiten wurden kürzlich in *Nature* veröffentlicht (Schnorrer F. *et al.*, Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in *Drosophila*. *Nature* 2010; 464, 287-291). Die Wissenschaftler erhoffen sich von den Untersuchungen, dass sich einige ihrer Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen und Aufschluss über die Entstehung von Muskelerkrankungen bringen.

Newcomer und alte Hasen

Fast genauso lang wie Wissenschaftler die RNAi-Technologie in ihre Experimente einbeziehen, gibt es Firmen, die für diese Untersuchungen die nötigen Forschungsreagenzien, Assay-Systeme, Analysegeräte, Computersoftware und Synthese-Dienstleistungen anbieten. Viele dieser Laborausstatter sind alte Hasen im Geschäft und im Anbieterüberblick auf Seite 62 dieser Ausgabe aufgeführt.

Es gibt allerdings auch einige Newcomer im RNAi-Business. Etwa die Riboxx GmbH aus Radebeul bei Dresden. Die Produkte und Dienstleistungen des erst vor neun Monaten gegründeten Start-ups seien geeignet, um die beim RNAi-Screening drei limitierenden „S“ (Selektivität, Stabilität und Synthese) zu überwinden, erzählt Jacques Rohayem, Geschäftsführer von Riboxx, Anfang Oktober auf der Biotechnica. Der Virologe und Go-Bio-Preisträger hat, noch als akademischer Forscher an der TU Dresden, eine neuartige RNA-Polymerase aus in Stuhlproben enthaltenen Viren isoliert. Diese könnte das bisherige, chemisch-aufwändige und vergleichsweise teure Verfahren zur Produktion doppelsträngiger RNA ersetzen, hofft der Franzose.

Mehr über die „Calicivirus RNA-dependent RNA polymerase“ der ostdeutschen Firma und über die Idee, diese künftig in einer automatisierten Methode zur siRNA-Produktion für die Industrie zu etablieren, lesen Sie auf den Seiten 58-59).

RNAi-Screening bei der Medikamentsuche

Riboxx ist nur eines von unzähligen Unternehmen, die Technologien rund um die RNA-Interferenz anbieten. Rund 150 weitere Unternehmen machen weltweit kleine und große Geschäfte mit RNAi, will die britische Online-Plattform „Lead-

Discovery“ herausgefunden haben. Fast die Hälfte davon seien Reagenzien- und Technologie-Lieferanten.

Eines der ersten Unternehmen weltweit, das sich die RNA-Interferenz zur Aufgabe gemacht hat, kommt aus Dresden: Die Cenix Bioscience GmbH hat sich auf RNAi-basierte Screenings spezialisiert. Gegründet 1999 vom kanadischen EMBL-Forscher Christophe Echeverri, betätigen sich inzwischen in der sächsischen Metropole gut 30 Mitarbeiter als Dienstleister unter anderem für Arzneimittel-entwickelnde Pharmakonzerne.

In der Praxis läuft ein derartiges Projekt zum Beispiel folgendermaßen ab: Aus einer Bibliothek, die viele tausend siRNAs enthält, werden in riesigen Versuchsansätzen diejenigen Gene ermittelt, die für eine Erkrankung relevant sind. Diese sollten somit ein sinnvolles Ziel für einen potenziellen Wirkstoff darstellen. In einem zweiten Schritt wird dann nach einem solchen gesucht. Der Vorteil des RNAi-Ansatzes ist es, dass man schneller Kandidaten identifizieren kann als mit bisherigen Methoden. Zumindest theoretisch.

Cenix Bioscience bietet – neben Hochdurchsatz-Projekten für die Entdeckung von Wirkstoff-Zielmolekülen wie oben geschildert – und der Target-Validierung seit einigen Jahren auch Screening-Dienste an. Letztere sind speziell für Pharmafirmen interessant, deren Präparate sich in späten Phasen der Arzneimittelentwicklung befinden.

Ungeahnte Möglichkeiten tun sich auf

Besonders dann, wenn Wirkstoffe in der klinischen Prüfung bei bestimmten Patienten eine unerwünschte Wirkung auslösen, erhofft man sich durch die Suche nach siRNAs, die diesen Phänotyp günstig beeinflussen, einiges. Im Extremfall könnten derartige siRNAs darüber mitentscheiden, ob das Präparat weiter entwickelt oder das Projekt aufgegeben wird – eine Entscheidung, an der bis zu zehnstellige Summen hängen.

Cenix-Boss Echeverri verdeutlicht: „Viele halten RNAi in erster Linie für ein leistungsfähiges Werkzeug in frühen Phasen der Medikamentenentwicklung. In Wirklichkeit gewinnen aber solche RNAi-Anwendungen an Bedeutung, die auch in späteren Phasen der klinischen Entwicklung sinnvoll sein können, beispielsweise um neue Wirkstoffkandidaten besser zu charakterisieren.“ (siehe hierzu auch das Interview mit Echeverri auf den Seiten 60-61).

Auch Big Pharma hat die RNA-Interferenz für sich entdeckt. Die kleinen doppelsträngigen RNA-Schnipsel scheinen als Therapeutika gegen Krebs, Viruserkrankungen und eine ganze Reihe anderer Krankheiten bestens geeignet. „Meiner Meinung nach könnten sie wahre Super-Medikamente werden“, schwärmte Judy Lieberman, Immunologin am Immune Disease Institute der Harvard Medical School in Boston, letztes Jahr in *Science*.

siRNA-Therapeutika: die Super-Medikamente?

Damit hinkt die Gute der Zeit jedoch ein wenig hinterher. Vor Jahren, als die Technologie bekannt wurde und die Entdeckung der Grundlagen mit einem Nobelpreis geehrt wurde, hörte man derartig lobhudelnde Aussagen andauernd. Inzwischen ist jedoch hinsichtlich der einst mit Vorschusslorbeeren überschütteten RNAi-Technologie Ernüchterung eingetreten. Nicht nur, weil man inzwischen weiß: Unerwünschte Nebeneffekte sind eher die Regel als die Ausnahme.



Jacques Rohayem will mit seiner Firma Riboxx ein neues Herstellungsverfahren für siRNAs etablieren.

Foto: W. Kappelle

Das **Riboxx-Team** vor historischer Kulisse: Im (kürzlich renovierten) Firmengebäude im Hintergrund legte einst Friedrich von Heyden den Grundstock für die industrielle Aspirin-Produktion.



Foto: Riboxx

Firmenportrait: Riboxx (Radebeul)

RNA aus der Kiste

■ Ein Franzose aus Beirut gründet in der ostdeutschen Provinz eine Biotechfirma und fährt nach zwei Jahren Gewinne ein. Eine tolle Geschichte, an der nur ein kleines Detail noch nicht stimmt.

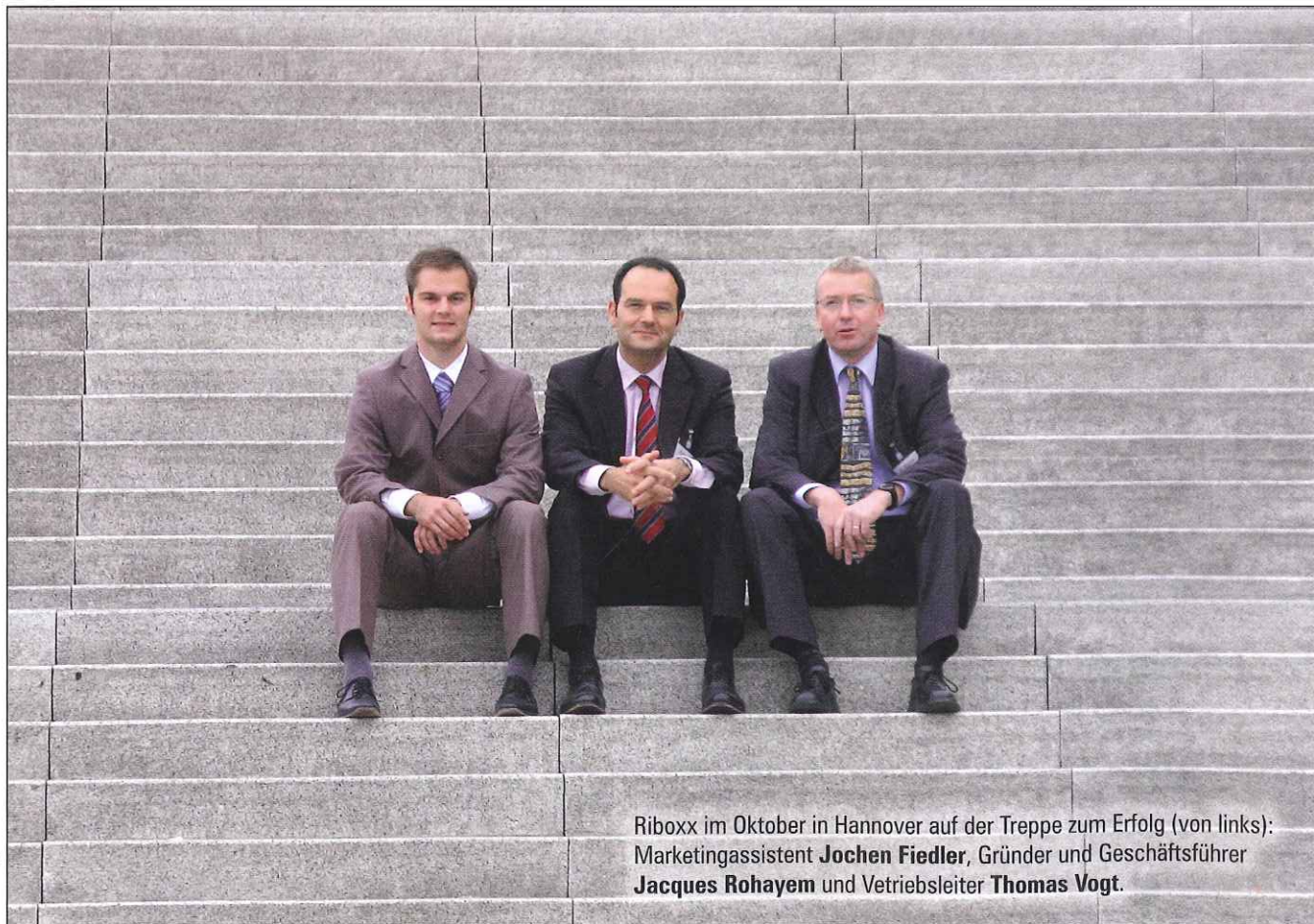
Jacques Rohayem ist ein Mensch, der sich nicht schämt, das schlimme Wort zu sagen. Und dann sagt er es wirklich: Scheiße. Jacques Rohayem sagt, er sei dabei, Scheiße zu Geld zu machen. Wobei das nicht ganz richtig ist. Er macht Geld aus dem, was in der braunen Masse steckt. Beziehungsweise steckt. Aber der Reihe nach.

Begonnen hat alles in Beirut. Dort wurde Rohayem geboren und erlebte seine Kindheit vorwiegend in Flugzeugen, die zwischen dem Libanon (der Heimat seines Vaters) und Paris (der Heimat seiner Mutter) hin und her pendelten. Mit 19 hatte Rohayem genug von Bürgerkrieg und Bombenexplosionen und wanderte nach Montpellier aus, wo er sechs Semester Medizin studierte. Und dann zeigte sich, dass studentische Austauschprogramme nicht nur dem wissenschaftlichen Austausch dienen: „Erasmus brachte eine Gruppe Heidelberger Studenten nach Südfrankreich“. In kürzester Zeit kam der junge französische Medizinstudent so zu einer jungen deutschen Gattin und zu einem gemeinsamen Kind. Er wechselte nach Straßburg, seine Frau

ins 90 Kilometer entfernte Freiburg, und als der mittlerweile zweifache Vater genug vom ewigen Pendelverkehr über den Rhein hatte, fand seine Frau in Dresden eine Stelle – und Jacques Rohayem wenig später ebenfalls: am virologischen Institut der TU Dresden. Dort promovierte er, arbeitete als Laborarzt, forschte und habilitierte. Und er entdeckte um 2004 ein seltsames Enzym. In Stuhlproben.

RNA-Polymerase im Stuhl

Die Ausscheidungen von Patienten, die mit Noroviren (aus der Familie Caliciviridae) infiziert sind, sehen nicht anders aus als die von anderen Menschen, die an Brechdurchfall leiden. Spannend ist das,



Riboxx im Oktober in Hannover auf der Treppe zum Erfolg (von links): Marketingassistent **Jochen Fiedler**, Gründer und Geschäftsführer **Jacques Rohayem** und Vertriebsleiter **Thomas Vogt**.

was nicht zu sehen ist. Es ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase mit ungewöhnlichen Eigenschaften, kurz „NS7“ genannt.

Diese RNA-Polymerase entdeckte Rohayem in den Noroviren. In den folgenden Jahren isolierte und charakterisierte er das Enzym; zusammen mit Kollegen aus Stockholm veröffentlichte Rohayem 2009 dann auch noch die kristallstrukturanalytisch bis auf 2,3 Ångström aufgelöste Struktur.

Schon längst war da dem Franzosen eine Idee gekommen: „Weil dieses Enzym so effizient arbeitet, auch im Reagenzglas, könnte man damit doch siRNA herstellen.“ Von Vorteil dabei ist, dass RNA-Polymerasen generell keine Primer benötigen; bei ihnen läuft eine *de-novo*-Initiation ab.

„siRNA-Moleküle selbst sind ja auch nur gut 20 Nukleotide lang, und da ist es toll, wenn Sie ohne Primer arbeiten können“, sagt Rohayem. Doch toll allein reicht nicht. Um die NS7-Polymerase und die biokatalytische Herstellung von siRNA weiter erforschen zu können, benötigte der Franzose Geld. Er bekam es 2007 aus dem GoBio-Förderprogramm des BMBF: 1,2 Millionen Euro über drei Jahre. Rohayems Arbeitsgruppe machte weiter.

Geldgeber schnell gefunden

Herausgekommen ist seitdem einiges – zum einen die erwähnte und weitere Publikationen über NS7, zum anderen der anwendungsnahe Grundstock für eine Firmengründung: Acht Patentfamilien, die das technische Know-How der Dresdener absichern sollen. Manches geht fast zu schnell. Die junge, erst vor einem Jahr gegründete Firma hat, zusätzlich zur GoBio-Förderung, mit dem Technologie Gründer Fonds Sachsen auch bereits einen Wagniskapitalgeber gefunden und kann vorerst bis Ende 2011 weiterarbeiten.

Rohayem jedoch spricht davon, 2012 bereits profitabel zu werden. Ist das nicht ein wenig, nun ja, ambitioniert? Nein, versichert er, immerhin erwirtschaftete sein Unternehmen bereits kräftig Umsatz: „Wir sind doch keine typische Biotechfirma, die nur Geld verbrennt. Wir haben Produkte, wir verkaufen unsere Kits, wir sind seit Juli 2010 auf dem Markt und haben bereits 30

Kunden, darunter zwei namhafte Firmen aus der Schweiz.“

So spricht der junge Unternehmer mit französischem Akzent und fügt an: „Sie müssen bedenken: Im Januar 2010, da hatten wir noch gar nichts, da war bei uns grüne Wiese. Und jetzt haben wir einen Katalog mit einer Menge Produkte drin, Umsätze, 15 Mitarbeiter, Controlling, Vertrieb und so weiter.“

Um das Geschäft anzukurbeln, kam im Mai der ehemalige Vertriebsleiter von Eurogentec, Thomas Vogt, dazu. Ein erfahrener Mann, der den „jungen Wilden“ unter die Arme greifen soll.

Weniger Menge dank GC-Trick

Die biokatalytische Herkunft der von Riboxx hergestellten siRNA ist nicht deren einzige Besonderheit. Rohayem weist auch auf deren patentierte Sequenz-Charakteristika hin. Die siRNA besitze keine Einzelstrang-Überhänge (sei also „blunt-ended“) und sei dazu an einem Ende GC-reich, was dem Molekül hohe Stabilität und somit Effizienz verleihe. Rohayem verspricht, dass so für ein typisches Knock-down-Experiment eine zehnfach niedrigere siRNA-Konzentration als normalerweise üblich ausreiche. Geringere siRNA-Mengen würden zudem unerwünschte Off-Target-Effekte, also Fehlpaarungen zwischen siRNA und Ziel-mRNA, „dramatisch reduzieren“. Für Wissenschaftler, die RNA-Interferenz als Werkzeug nutzen, werde die Technologie berechenbarer und damit standardisierbar. „Man erhält besser reproduzierbare Ergebnisse“, sagt Rohayem.

Das neuartige Sequenzmotiv ist natürlich patentiert. Scherzhaft wirft Rohayem ein, dass die Konkurrenz die acht Riboxx-Patente ruhig verletzen könne: Kostpflichtige Abmahnung als lukratives Geschäftsmodell quasi. Er meint es nicht ernst.

Kunden können sich die von Riboxx patentierte RNA-Polymerase, zusammen mit allen für die siRNA-Herstellung nötigen Reagenzien, als Fertigkit in der Pappschachtel kaufen. „Alternativ stellen wir siRNA auch bei uns in Dresden her, als Dienstleistung“, so Rohayem. Das sei aber eigentlich nicht nötig: „Nehmen wir einen x-beliebigen

Wissenschaftler, der hat ein bestimmtes Einzelstrang-Template im Kühlschrank und möchte damit nachmittags noch ein bestimmtes RNAi-Experiment starten. Er macht also um 15 Uhr den Kühlschrank auf, mischt die Reaktion in unserem Kit an, lässt das Ganze zwei Stunden bei 30 Grad im Wasserbad, und um 17 Uhr ist seine siRNA fertig und er kann loslegen.“

Daher auch der Name: *RNA interference in a box*. Riboxx.

„RNA-Reaktor“ in Planung

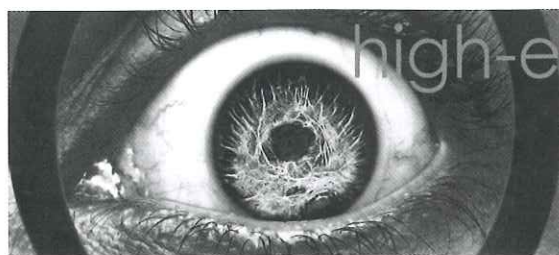
Beim „Butter-und-Brot-Geschäft“, wie er es nennt, dem Kit-Verkauf, ergänzt durch Dienstleistungen, soll es nicht bleiben. Rohayem plant bereits den nächsten Schritt, und der soll gewaltig sein: „Wir planen einen Reaktor, der im Großmaßstab siRNA erzeugt.“ In den derzeitigen Riboxx-Kits laufen die Synthesereaktionen in Volumina der Größenordnung 60 bis 300 µl ab; das entspricht siRNA-Ausbeuten von etwa 12 bis 60 µg. Künftige „RNA-Reaktoren“ sollen bis zu 50 Liter Reaktionsansatz enthalten und würden, so Rohayem, „grammweise siRNA“ liefern.

Wer braucht soviel? Rohayems Antwort kommt wie aus der Pistole geschossen: Derzeit würden so gut wie alle größeren Pharmaunternehmen RNAi-Medikamente entwickeln – „und wenn Sie diese auf den Markt bringen wollen, müssen Sie sie ja auch irgendwo produzieren lassen.“

Derzeit seien dazu nur wenige Firmen in der Lage: „Sie brauchen eine Halle in wasserfreier Argon-Atmosphäre samt einer ausgewachsenen Festphasenchemie-Anlage. Die Herstellung von einem Kilo siRNA verbraucht 5000-Liter giftiges Acetonitril und dauert zwei Tage.“ Biokatalyse hingegen, so Rohayem, sei billiger, schneller und dazu umweltfreundlich.

Der Förderantrag ans BMBF sei bereits gestellt: „Unser Ziel ist es, 2013 auf der Biotechnica einen Reaktor zur siRNA-Herstellung präsentieren zu können.“ Rohayem rechnet damit, dass in den kommenden Jahren die ersten RNAi-Medikamente zur Zulassung kommen werden. „Spätestens dann braucht man unseren Reaktor“, ist er sicher.

WINFRIED KÖPPELLE



high-end optical filters

ANALYSENTECHNIK

www.ahf.de - info@ahf.de

