

Biochemie und Molekularbiologie 2002

RNA-Interferenz, der selektive Abbau von Messenger-RNA durch homologe Doppelstrang-RNA, hat als neue gentherapeutische Methode großes Potential in der Behandlung von Infektionskrankheiten oder Tumoren beim Menschen. Eine der vielversprechendsten spektroskopischen Techniken für die direkte Beobachtung biomolekularer Wechselwirkungen analysiert den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, kurz FRET.

RNA-Interferenz

„Loss-of-function“-Phänotyp als Untersuchungsstrategie

◆ Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms einzelner Organismen, darunter auch dem des Menschen, steht die biologische Funktionsanalyse entschlüsselter Gene für viele Forschungsgruppen im Mittelpunkt des Interesses. Wenn die biologische Bedeutung eines Proteins in der Zelle untersucht werden soll, ist die Ausschaltung des Proteins und die Analyse des daraus resultierenden Phänotyps schon seit vielen Jahren eine gängige Strategie. Durch die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der

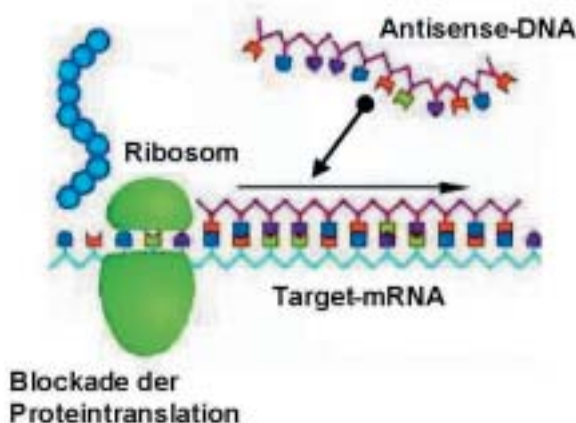
Maus können einzelne Gene auch im gesamten Mausorganismus oder auch nur gewebe- oder organspezifisch „ausgeknockt“ werden. Die Herstellung einer solchen „Knock-out-Maus“ ist jedoch technisch anspruchsvoll und zeit- und kostenintensiv. Es ist nicht ungewöhnlich, dass nach z. B. zwei Jahren intensiver Arbeit die gezüchtete Knock-out-Maus keinen Phänotyp zeigt, der auf eine entsprechende Manipulation hindeutet, da viele essentielle Genfunktionen durch mehrere Gene mit überlappender Funktion von der Zelle gesichert werden. Somit stehen die Untersuchungsergebnisse oft in keinem Verhältnis zum Aufwand. Alternativ kann die Funktion einzelner Gene in der Zellkultur durch inhibierende Antisense-RNA- oder DNA-Moleküle erforscht werden (Abbildung 1). Diese Antisense-Methoden sind zwar ohne größeren Zeitaufwand und technisch einfacher durchzuführen, oft fehlt es ihnen jedoch an der nötigen Spezifität und Sensitivität. Auch wird auf diese Weise häufig nur eine graduelle Verminderung des Proteins in der Zelle erreicht, jedoch kein kompletter Protein-„knock-down“. In jüngster Zeit wurde eine neue Technik zur Herstellung eines solchen „Loss-of-function“-Phänotyps zur Anwendungsreife entwickelt, die RNA-Interferenz (RNAi). Mit RNA-Interfe-

renz lässt sich nahezu jedes Genprodukt (auch in der eukaryontischen Zelle) innerhalb von 24 – 48 Stunden drastisch herunterregulieren oder gar komplett abschalten. Die methodischen Voraussetzungen sind praktisch in jedem molekularbiologisch-zellbiologischem Labor gegeben und haben innerhalb kürzester Zeit zu einer rasanten Verbreitung der Technik geführt. Dabei überrascht die Spezifität und Effektivität dieses „Gene-silencing“-Mechanismus, die deutlich über die Potenz von gängigen Antisense-Strategien hinausgehen.

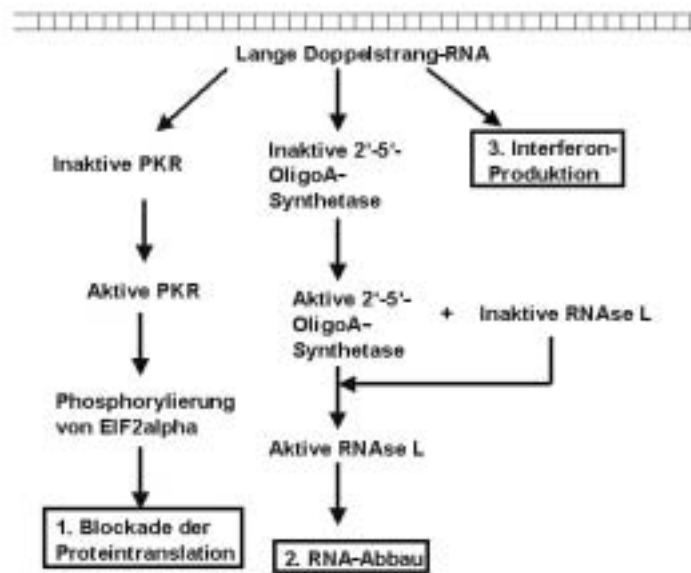
Entdeckung eines faszinierenden biologischen Mechanismus durch den „Zufall“

◆ Die Wissenschaftsgeschichte kennt viele Beispiele dafür, wie bahnbrechende Erkenntnisse auf einem zunächst unerwünschten experimentellen Befund basieren. Dazu gehört z. B. die Entdeckung des Penicillins. Auf die RNA-Interferenz stießen Guo und Kemphues im Jahr 1995 auch eher zufällig, als sie in ihren Untersuchungen am Fadenwurm *C. elegans* versuchten, das *par-1*-Gen mit Antisense-RNA auszuschalten.¹⁾ Der erwartete Phänotyp in *C. elegans*, Letalität im Embryonalstadium, konnte erzielt werden. Die Autoren beobachteten jedoch ein merk-

Abb. 1.
Konventioneller Antisense-Mechanismus. Die Antisense-RNA hybridisiert über Watson-Crick-Basenpaarung mit der mRNA in Leserichtung. Dadurch wird die Translation des Zielproteins an den Ribosomen blockiert.



würdiges Paradoxon: Das Einbringen von Sense-RNA – ursprünglich als Kontrollexperiment gedacht – löste ebenfalls den selben Phänotyp aus. Eigentlich sollte diese in mRNA-Leserichtung eingebrachte Nukleinsäure keinerlei negative Auswirkung auf die Proteintranslation haben. Als Ursache für diesen Effekt stellte sich die Kontamination der Sense-RNA mit einigen Molekülen Antisense-RNA heraus, die zur Bildung von homologer Doppelstrang-RNA (dsRNA) in der Probe geführt hatte. Guo und Kemphues konnten die Ursache ihres paradoxen Phänotyps durch die Sense-RNA nicht erklären und interpretierten, wie man heute weiß, ihre Untersuchungsergebnisse fehlerhaft. Drei Jahre später, 1998, entdeckten Fire und Mello, dass dsRNA in *C. elegans* mehr als zehnmal effektiver als Antisense-RNA ist, um ein Gene-silencing zu bewirken.²⁾ Sie nannten den Vorgang RNA-Interferenz (RNAi). In Säugerzellen, inklusive humanen Zellen, schlugen jedoch alle Versuche, RNA-Interferenz auszulösen und damit einen spezifischen „Knock-out-Phänotyp“ zu erzeugen, zunächst fehl. Dies lag vor allem daran, dass sehr lange (meistens ca. 50 – 1600 Basenpaare) dsRNA-Moleküle in die Zelle eingebracht worden waren. Ähnliche Konstrukte erwiesen sich in *C. elegans* zwar als sehr effektiv, in höheren Zellen kam es jedoch zur Induktion einer starken Interferonantwort und damit zum Absterben der Zellen. Die in Säugerzellen durch die intrazellulären Proteinkinasen vermittelte Interferonproduktion, die sich im Verlaufe der Evolution als Schutzmechanismus gegen die Infektion mit Viren herausgebildet hatte, erwies sich als ein starkes Hemmnis für die Erzeugung von RNAi. Sie verhinderte die Nutzung von RNAi im Säugerzellsystem, obgleich zeitgleich zu solchen Versuchen nahezu jedes Gen in *C. elegans* damit „ausgeknockt“ wurde, worüber ganze Datenbanken entstanden sind. Erst nach Arbeiten der Arbeitsgruppe um Tuschl gelang es durch Verwendung sehr kurzer dsRNA (von 21 Nukleotiden Länge),



RNAi auch in menschlichen Tumorzellen und anderen Säugerzellen auszulösen.^{3,4)} Im Gegensatz zu langen dsRNA-Molekülen führen diese sehr kurzen RNA-Doppelstränge nicht zu einer sequenzunabhängigen (unspezifischen) Aktivierung der doppelstrangabhängigen Proteinki-

nase PKR und der 2'-5'-OligoA-Synthetase/RNase L. Diese beiden Enzymsysteme sind physiologisch wichtige „Detektorproteine“, die die Interferonproduktion vermitteln. Daneben startet die betroffene Zelle ein Apoptoseprogramm, sobald lange dsRNA in die Zelle eingedrungen ist

Abb. 2. Lange (> 30 Basenpaare) dsRNA aktiviert unabhängig von der jeweiligen Basensequenz in Säugerzellen eine Reihe von Enzymen und löst damit im Wesentlichen drei Reaktionen aus. Die Aktivierung von Proteinkinase R (PKR) und OligoA-Synthetase führt zur Inhibierung der Proteintranslation bzw. zum mRNA-Abbau. EIF2alpha ist dabei ein Schlüsselenzym für die Proteinsynthese durch Bindung an die 40S-Ribosomen-Untereinheit. Seine Phosphorylierung durch Doppelstrang-RNA-aktivierete PKR verhindert die zelluläre Proteintranslation. Daneben kommt es zur Produktion von Interferon, was sich evolutionär als antiviraler Schutzmechanismus herausgebildet hat.

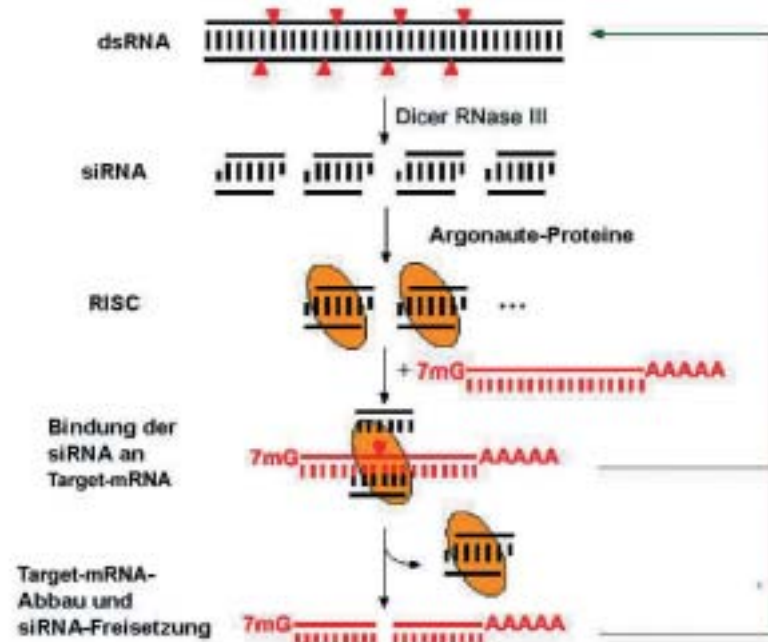
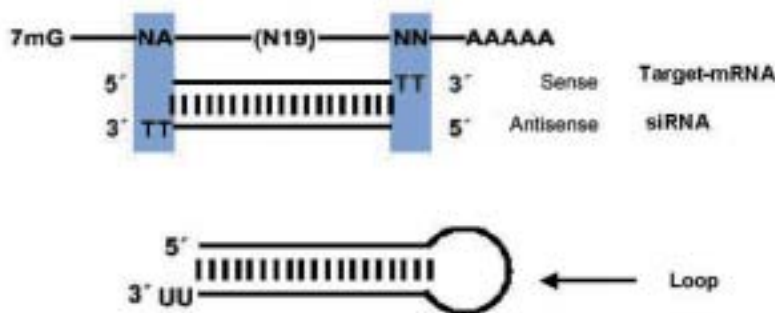


Abb.3. Zum Auslösen eines selektiven sequenzspezifischen mRNA-Abbaus durch RNAi muß lange dsRNA in 21–23 Nukleotide lange dsRNA gespalten werden. Diese Aufgabe übernimmt die RNase III Dicer. Das Ergebnis sind 21–23 Nukleotide lange siRNAs, die als Einzelstränge in einen „RNAi-inducing-silencing-complex (RISC)“ eingebaut werden. RISC ist ein großer Multiproteinkomplex, der, durch den Antisense-Strang der siRNA geführt, sequenzkomplementär an die Ziel-mRNA angelagert wird. Es erfolgt die Spaltung der mRNA, wodurch wieder neue 21–23 Nukleotide lange RNA-Stücke entstehen, die in Folgezyklen wieder als siRNA dienen. Dies erklärt die große Effektivität der RNAi-Reaktion.

Abb. 4.
Struktur von siRNAs (oben) oder kleinen einzelsträngigen Haarnadel-RNA-Molekülen (unten) in schematischer Darstellung. Die Haarnadel-Struktur wird am Ende durch den nicht sequenzkomplementären Bereich, den „Loop“, zusammengehalten.



(z. B. durch eine Virusinfektion) oder fälschlich intrazellulär gebildet wird (durch Transgene oder Transposons) (Abbildung 2).

RNAi-Mechanismus

◆ Intrazelluläre dsRNA wird durch ein Schlüsselenzym für die RNAi, die RNase III Dicer, erkannt und in 21–23 Nukleotide lange Stücke geschnitten. Durch die Aktion von Dicer entstehen charakteristische RNA-Doppelstränge mit einer Phosphatgruppe am 5'-Ende und einer freien Hydroxygruppe am 3'-Ende. Außerdem verbleiben an jedem Ende zwei bis drei Überhang-Nukleotide, die keine Basenpaarung mit dem Komplementärstrang aufweisen („overhang“). Die RNA-Stücke werden als Einzelstrang in einen Komplex aus mehreren Proteinen mit unbekannter biochemischer Funktion inkorporiert. Diese Proteine gehören zur Familie der „Argonaute-Proteine“, die stark basisch sind und ein Molekulargewicht von ca. 100 kD haben. Dieser Ribonukleoproteinkomplex, der „RNAi-inducing-silencing-complex (RISC)“ wird ATP-abhängig aktiviert und löst die sequenzspezifische Degradation der Ziel-mRNA aus. Dabei ist ausschließlich der Antisense-RNA-Strang für die homologe Basenpaarung mit der endogenen Ziel-mRNA und den nachfolgenden enzymatischen Abbau entscheidend (Abbildung 3). Der RNAi-Prozess läuft im Zytoplasma der Zelle ab. Die hierfür notwendigen kleinen RNA-Moleküle werden siRNAs (small interfering RNAs) genannt. Von den siRNAs abzugrenzen sind natürlich vorkommende, endogen exprimierte 21–23 Nukleotide lange RNA-Mole-

küle, die in Zellen von verschiedensten Organismen (Mensch, Maus, Fruchtfliege, Fadenwurm) vorliegen und microRNAs (miRNAs) genannt werden.^{5–7} Bisher sind ca. 200 solcher miRNAs entdeckt worden.⁸ MiRNAs und siRNAs nutzen den gleichen Ribonukleoproteinkomplex RISC, aber durch unterschiedliche Mechanismen. MiRNAs wirken über die unvollständige Basenpaarung an terminale mRNA-Sequenzen (3'-UTR) als Translationsinhibitor, während die siRNA diese durch voll komplementäre Bindung an die target mRNA diese zum enzymatischen Abbau führt.

RNAi als zukünftige Methode der Gentherapie beim Menschen ?

◆ Die großen Hoffnungen, die zu Beginn der 90er Jahre in die Antisense-Technologie zur Gentherapie am Menschen gesetzt worden sind, haben sich nur partiell erfüllt. Bisher ist lediglich ein Medikament, dessen Wirkung auf einem Antisense-Mechanismus beruht, zugelassen worden: Formivirsen wird zur Behandlung der Cytomegalie-Virusinfektion der Netzhaut bei Patienten mit AIDS eingesetzt.⁹ Einige weitere befinden sich in klinischen Studien. Nach der Entdeckung der RNA-Interferenz sind neue Hoffnungen in der RNAi-basierten Gentherapie geweckt worden. Dazu muss die dsRNA zunächst jedoch in die Zielzelle eingebracht werden, was nach den Erfahrungen der Antisense-Studien unter Umständen kein trivialer Schritt ist, oder es müssen Vektoren konstruiert werden, die die intrazelluläre Expression der RNA ermöglichen. Dies kann auch Einzelstrang-RNA sein, die jedoch eine Haarnadel-Struktur aus-

bilden muß, um RNA-Interferenz auszulösen (Abbildung 4). Als potenzielle Zielgene für RNAi-basierte Gentherapie bieten sich z. B. alle pathologisch aktivierten Onkogene in Tumoren und Leukämien an.¹⁰ In entsprechenden Tiermodellen konnte das Tumorstadium schon teilweise signifikant reduziert werden.¹¹ In der Onkologie wurden siRNAs auch schon erfolgreich gegen aktivierte RAS- und p53-mRNA eingesetzt, wie sie häufig in Pankreaskarzinomen, Harnblasentumoren, Bronchialkarzinomen oder Leukämien vorkommt. Sehr vielversprechende Ergebnisse liegen daneben für die Reduktion der Viruslast bei HIV-Infektion vor. Der Einsatz von siRNAs, die spezifisch gegen fünf verschiedene Gene des Virus gerichtet waren, konnte die Viruslast in Zellkulturstudien um den Faktor 50 reduzieren.^{12,13} Ähnlich erfolgversprechend war der Einsatz von siRNA gegen das Poliovirus (Erreger der Kinderlähmung) und das „Respiratory-Syncytial“ (RS)-Virus, welches schwere Atemwegserkrankungen bei Säuglingen verursacht.^{14,15} Ob diese noch im Zellkulturstadium befindliche molekulare Therapieform sich auch in erfolgreiche klinische Studien umsetzen lässt, werden die nächsten Jahre zeigen.

Arndt Borkhardt
Universitäts-Kinderklinik Gießen,
Hämatologie und Onkologie
arndt.borkhardt@
paediat.med.uni-giessen.de



Arndt Borkhardt
(Jahrgang 1963) studierte von 1984 bis 1990 Medizin in Dresden und Magdeburg. Von 1991 bis 1997 arbeitete er als Assistenzarzt in der Kinderklinik Gießen. Seit 1997 ist er Oberarzt der Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie einschließlich Blutstammzelltransplantation; das molekularbiologische Labor der Abteilung leitete er bereits seit 1996. Seine Forschungsschwerpunkte sind Chromosomenaberration bei Leukämien und Lymphomen im Kindesalter.

- 1) „*par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed“: S. Guo, K. J. Kemphues, *Cell* 1995, 81, 611.
- 2) „Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*“: A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* 1998, 391, 806.
- 3) „RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs“: S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev* 2001, 15, 188.
- 4) „Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells“: S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* 2001, 411, 494.
- 5) „MicroRNA maturation, stepwise processing and subcellular localization“: Y. Lee, K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim, V. N. Kim, *EMBO J.* 2002, 21, 4663.
- 6) „An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*“: N. C. Lau, L. P. Lim, E. G. Weinstein, D. P. Bartel, *Science* 2001, 294, 858.
- 7) „Identification of novel genes coding for small expressed RNAs“: M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Science* 2001, 294, 853.
- 8) „New micro RNAs from mouse and human“: M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt, T. Tuschl, *RNA*, im Druck.
- 9) „Technology evaluation, fomivirsen, Isis Pharmaceuticals Inc/CIBA vision“: R. M. Orr, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2001, 3, 288.
- 10) „Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference – New hope for a highly specific cancer treatment?“: A. Borkhardt, *Cancer Cell* 2002, 2, 167.
- 11) „Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference“: T. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami, *Cancer Cell* 2002, 2, 243.
- 12) „RNA interference – a new weapon against HIV and beyond“: M. Kitabwalla, R. M. Ruprecht, *New Engl. J. Med.* 2002, 347, 1364.
- 13) „siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection“: C. D. Novina, M. F. Murray, D. M. Dykxhoorn, P. J. Beresford, J. Riess, S. K. Lee, R. G. Collman, J. Lieberman, P. Shankar, P. A. Sharp, *Nat. Med.* 2002, 8, 681.
- 14) „Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses“: V. Bitko, S. Barik, *BMC Microbiol* 2001, 1, 34.
- 15) „Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells“: L. Gitlin, S. Karelsky, R. Andino, *Nature* 2002, 418, 430.

FRET in der Biochemie

◆ Eine der vielversprechendsten spektroskopischen Techniken für die Analyse von Biopolymeren in Aktion und in Interaktion analysiert den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, kurz FRET. Die hohe Spezifität des FRET-Signals ermöglicht die Beobachtung molekularer Wechselwirkungen und Veränderungen der Konformation mit hoher zeitlicher (<1 ns) und räumlicher Auflösung (1–10 nm)¹⁾ und lässt sich auch mit Einzelmolekül-Detektionstechniken kombinieren.²⁾ FRET-Mikroskopie ist darüber hinaus eine exzellente Methode, um zelluläre Strukturen sowie Proteine unter physiologischen Bedingungen zu lokalisieren und abzubilden. Dies bedeutet einen signifikanten Vorteil gegenüber Röntgenbeugungsmethoden oder Elektronenmikroskopie, bei denen die zu untersuchenden Proben aus ihrem physiologischen Kontext entfernt bzw. fixiert werden müssen.

Was ist FRET?

◆ FRET ist ein erstmals 1948 von Theodor Förster beschriebener, quantenmechanischer Prozess, bei dem ein strahlungsloser Energietransfer von einem Donor- zu einem Acceptorchromophor erfolgt, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Acceptors hinreichend überlappt, die beiden Farbstoffe sich in räumlicher Nähe befinden (10–100 Å) und ihre Übergangsdipolmomente annähernd parallel orientiert sind. Lubert Stryer und Richard Haugland bestätigten 1967 eine wichtige Aussage der Theorie Försters, als sie demonstrierten, daß die Effizienz des FRET-Effekts umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands R_0 der beiden Chromophore und damit nützlich im Bereich der Dimensionen biologischer Makromoleküle ist.³⁾ Eine Messung des FRET-Effekts ist vor allem dann wertvoll, wenn Phänomene untersucht werden sollen, die mit einer Änderung molekularer Abstände einhergehen. FRET wird deshalb auch als „spektroskopisches Lineal“ bezeichnet.

Donor-Acceptor-Paare

◆ In den meisten Fällen dienen verschiedene Chromophore als Donor und Acceptor, so daß ein FRET-Signal entweder als Auftreten Donorstimulierter Fluoreszenz des Acceptors oder als Löschung der Fluoreszenz des Donors aufgezeichnet werden kann. Alternativ setzt man aber auch als Donor und Acceptor denselben Farbstoff ein und detektiert dann die resultierende Depolarisation der Fluoreszenz. Gelegentlich ist es sinnvoll, ein unerwünschtes Hintergrundsignal durch Nicht-FRET-stimulierte Fluoreszenz des Acceptors zu unterdrücken; dies gelingt mit nicht-fluoreszierenden Acceptoren. Für Übersichten über gebräuchliche Donor-Acceptor-Paare siehe Lit.^{4,5)}

Mit den 1997 eingeführten „Big Dyes“ als Markierungen von Kettenabbruchnucleotiden für die automatische DNA-Sequenzierung⁶⁾ wurden FRET-Fluorophore in kurzer Zeit unentbehrlich – vor allem für die großen Genomprojekte. Die Popularität von FRET-Messungen steigt seitdem ständig an, was wiederum die Entwicklung geeigneter Chromophore stimulierte. Mittlerweile sind diese für den Spektralbereich von 350–750 nm, d. h. von Ultraviolett bis Infrarot, verfügbar (z. B. Alexa Fluor Dyes von Molecular Probes, oder CyDyes von Amersham Pharmacia). Von diesen sind insbesondere die IR-Farbstoffe von großem Interesse, weil sie die direkte Detektion in lebenden Organismen nahezu ohne störende

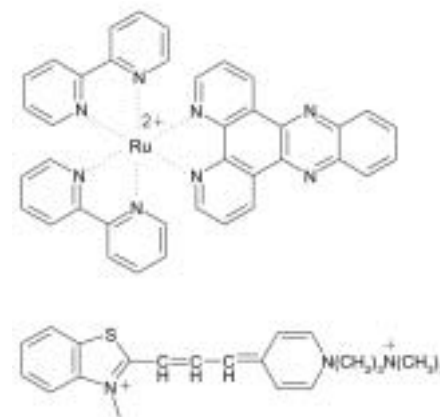


Abb. 1. Strukturen des FRET-Donors $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ (Gegenion PF_6^-) und des FRET-Acceptors BO-PRO-3 (Gegenion Γ^-).