

Die Wiederentdeckung der RNA

◆ Gerade als die Forscher dachten, sie hätten mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms die Rolle der wichtigsten Moleküle der Zelle entschlüsselt, tauchte eine lange missachtete Molekülspezies in einer Vielzahl von unterschiedlichen Formen auf: die RNA. Die lange gehegte Vorstellung, RNA sei lediglich eine Zwischenstufe auf dem Weg von der DNA zum Protein, wurde durch die Charakterisierung und Kristallisation des Ribosoms revidiert.¹⁾ Neben strukturbildenden Eigenschaften im Ribosom konnten der RNA erstmals „enzymatische“ Funktionen zugewiesen werden.

Erst als zu Beginn der 90er Jahre eine neue Form der Genregulation entdeckt wurde, die auf einer RNA-RNA-Bindung beruht, kam der Verdacht auf, dass RNA weit mehr Funktionen ausüben kann, als bisher angenommen.²⁾ Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi)³⁻⁷⁾ und mehrerer hundert kleiner regulatorischer RNAs⁸⁻¹⁵⁾ führt heute zu ei-

nem Umdenken über viele Regulationsprozesse bei der Expression von Genen. Es ergeben sich neue Fragen nach Auswirkungen dieser Regulationsmechanismen auf Krankheiten, deren Entstehung wir bis heute nicht erschöpfend erklären können.

Abhängig von ihrer Entstehung sind diese kleinen RNAs bekannt als short interfering RNAs (siRNAs) oder microRNAs (miRNAs). Sie regulieren die Umschreibung von DNA in Protein meist als Repressoren, indem sie entweder komplementäre Messenger-RNAs (mRNAs) binden und zu deren Abbau beitragen (siRNAs → RNAi) oder durch Bindung z.B. an den 3' nichttranslatierten Bereich (3'-UTR) der mRNA zu einem Stopp der Translation führen (miRNAs → RNAu).^{16,17)} (Abbildung 1)

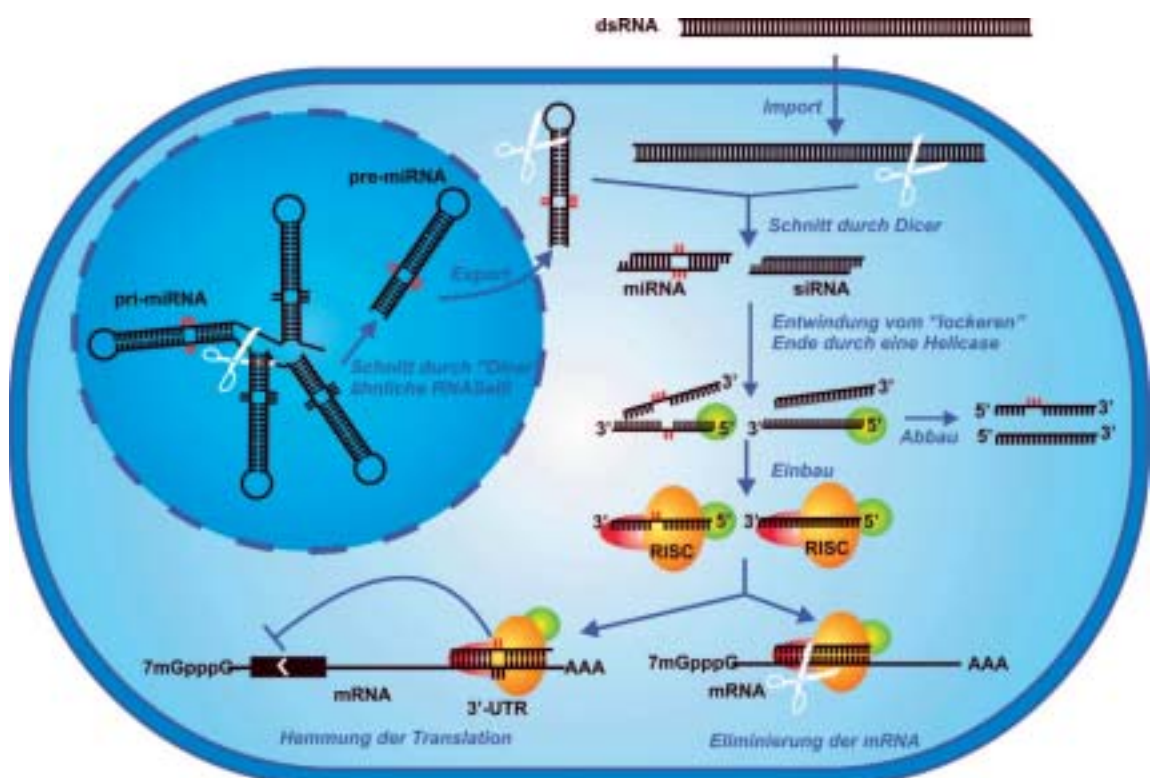
Short interfering RNAs und RNA-Interferenz

◆ Short interfering RNAs (siRNAs) entstehen bei der Prozessierung von langen, doppelsträngigen RNAs (dsRNA) durch Dicer, einer Nuclea-

se aus der RNaseIII-Familie,¹⁸⁾ und bilden die aktive RNA-Spezies bei der RNA-Interferenz (RNAi) [s. Trendberichte 2003, *Nachr. Chem.* 2003, 51, 316]. Charakteristische einzelsträngige Überhänge von zwei Nucleotiden an beiden 3'-Enden prägen den siRNA-Duplex von 21 bis 25 Nucleotiden.⁷⁾ Sind solche siRNAs homolog zu mRNAs in der Zelle, so dienen beide Stränge der siRNA als komplementäre Sonden zum Aufspüren dieser mRNAs.¹⁹⁾ Der doppelsträngige Komplex aus siRNA und mRNA wird durch eine Nuclease vom RNaseIII-Typ geschnitten, was zur Eliminierung der mRNA und zum Stopp der jeweiligen Proteinbildung führt.²⁰⁾

Seit entdeckt wurde, dass sich perfekt paarende siRNAs auch bei Säugetieren dazu verwenden lassen, homologe mRNAs zu eliminieren, wird RNAi zum Ausschalten von Genfunktionen verwendet.²¹⁾ Die Anwendung dieser Technik erstreckt sich von der Analyse von Proteinfunktionen ganzer Genome (Functionomix) bis hin zum Ausschalten von viralen und parasitären Genen sowie von Onkogenen. Die

Abb. 1.
Nach dem Export aus dem Kern werden partiell doppelsträngige pre-miRNAs und siRNA von Dicer in 18–25 nt lange miRNA- und siRNA-Duplexe prozessiert. Diese Intermediate werden durch eine Helicase entwunden, die nur einen Strang des Doppelstrangs an den RISC-Komplex übergibt, während der andere abgebaut wird. Der Grad der Basenpaarung entscheidet über die Funktion der Einzelstränge als siRNAs oder miRNAs.



Bedeutung der therapeutischen Anwendungen von RNAi ist noch nicht abzusehen. Sie beschränken sich nicht auf Infektionskrankheiten^{22,23)} und Krebs,²⁴⁾ auch entzündliche Prozesse, Morbus Crohn und Überfunktionen verschiedener Organe können sich möglicherweise so behandeln lassen.

Kleine RNAs für die Genregulation: microRNAs

◆ Bereits Anfang der 90er Jahre wurde eine andere Spezies von kleinen, nicht-kodierenden RNAs gefunden, die vermutlich eine erhebliche Rolle bei der Regulation der Differenzierung von Stammzellen spielen können. Eine Mutation in einer sehr kleinen RNA führt zu einer veränderten Genexpression im Fadenwurm *C.elegans*, wie Victor Ambros 1993 entdeckte.²⁾ Die Bindung dieser kleinen RNA an das Ende einer messenger-RNA (mRNA) führte zur Stopp der Translation verschiedener mRNAs und damit zur Fehlentwicklung des Wurms. Sieben Jahre später wurde in *C.elegans* eine weitere kleine RNA mit genregulatorischen Eigenschaften gefunden.²⁵⁾

Erst mit der Entschlüsselung der Genome verschiedener Spezies wurde deutlich, dass das Genom Hunderte von kleinen RNAs codiert, deren Bedeutung nicht darin liegt, in Protein umgeschrieben zu werden, sondern die regulatorische Eigenschaften aufweisen. Diese kleinen RNAs besitzen eine Größe von 18 bis 25 Nucleotiden und sind hochkonserviert von der Pflanze bis zum Menschen.^{26–28)} Sie werden heute unter dem Begriff microRNAs (miRNAs) zusammengefasst.

Der Mechanismus der miRNA-Biogenese ist weitgehend unbekannt. Sie werden im Zellkern aus langen primären Vorläufer-RNAs (pri-miRNA) geschnitten, die haarnadelförmige Strukturen von etwa 70 Nucleotiden ausbilden (pre-miRNAs) (Abbildung 1). Diese pre-miRNAs verlassen den Zellkern und werden im Cytosol von einer Nuclease weiter bis auf ihre endgültige Länge gestutzt.^{27,29)}

Die Funktion der miRNAs

◆ Sequenzvergleiche von miRNAs mit bekannten Pflanzen-mRNAs ergaben als Zielmoleküle hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, die in entwicklungsbiologische Prozesse eingreifen.²⁸⁾ Sie regulieren die Genexpression nach einer Zellteilung, bei der zwei unterschiedliche Zellen entstehen (asymmetrische Zellteilung), sowie Zellvermehrung (Proliferation) und Zelltod (Apoptose). *In vivo*- und *in vitro*-Studien in verschiedenen Organismen haben diese Vermutungen bestätigt.

Studien über die Morphogenese von Pflanzenblättern haben gezeigt, dass Mutationen im *CINCINNATA*-Gen (*CIN*-Gen) eine Kräuselung der Blätter von Löwenmäulchen zur Folge haben,³⁰⁾ da die Regulation der Zellteilung im Blatt gestört ist. Das *CIN*-Gen kodiert den Transkriptionsfaktor TCP, der wiederum die Expression verschiedener Gene während der Zellteilung einschaltet. In nicht-teilen Zellen wird die Bildung von TCP unterdrückt. Die Mutanten mit den deformierten Blättern leiden unter Überproduktion von TCP und können daher die Zellteilung nicht stoppen. Der Überschuss von Zellen am Blattrand bewirkt, dass sich das normalerweise glatte Blatt kräuselt. Weigel und Mitarbeiter zeigten, dass die JAW-miRNA diese Feinregulation der TCP-Bildung auf mRNA-Ebene steuert. Diese bindet durch perfekte komplementäre Basenpaarung an den 3'-nichttranslatierten Bereich (3'-UTR) der TCP-mRNA. Dadurch bildet sich ein ein doppelsträngiges RNA-Fragment, das den Abbau der TCP-mRNA durch Nucleasen erleichtert und die Bildung des Proteins verhindert. Ohne TCP teilen sich die Zellen nicht mehr, und es entwickelt sich ein glattes Blatt.

miRNAs bei Säugetieren

◆ miRNAs spielen nicht nur eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Pflanzen und Invertebraten (Wirbellosen), sondern auch bei Säugetieren wie dem Menschen. Im Gegensatz zur Pflanzenwelt, in der

perfekt paarende miRNAs den Abbau der Ziel mRNA durch einen RNAi-ähnlichen Mechanismus stimulieren, weisen tierische miRNAs in der Regel keine perfekte Basenpaarung mit der Ziel-mRNA auf. Dies erschwert Auffinden von solchen miRNAs und deren Interaktionspartner deutlich.^{31,32)} Tierische miRNAs führen durch imperfekte Basenpaarung am 3'-UTR der mRNA zu einem Translationsstopp im Ribosom.

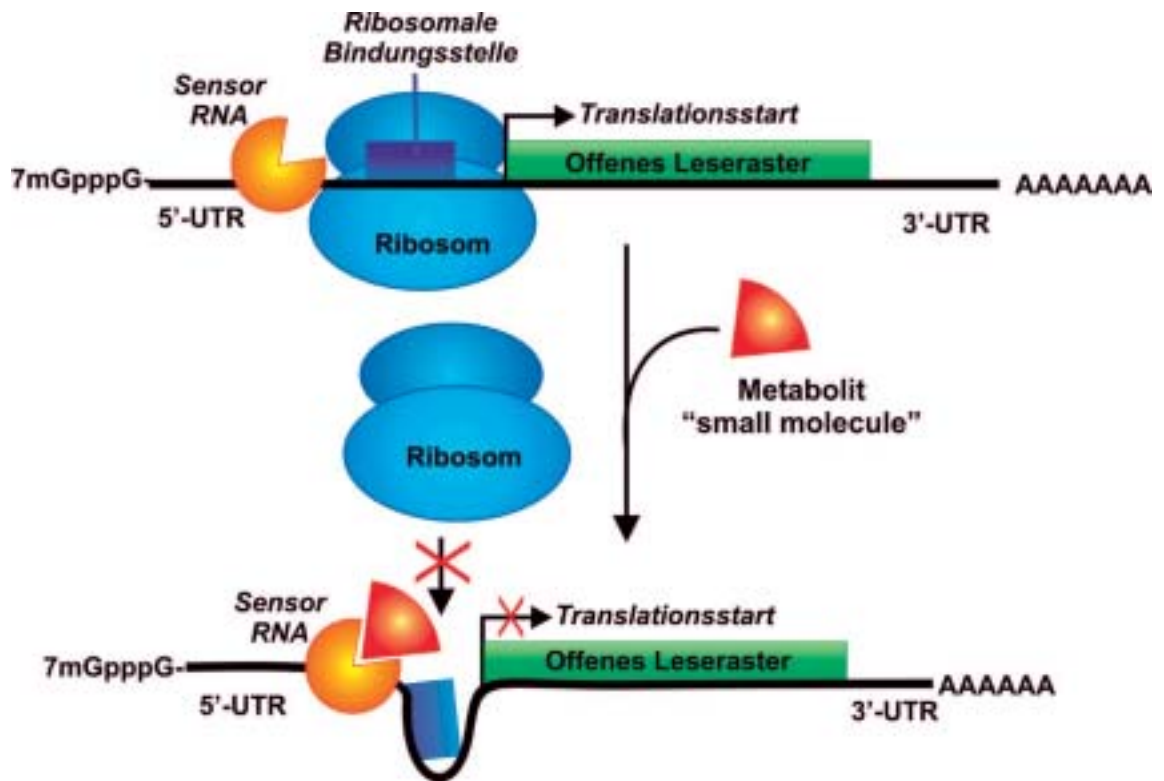
Beim Menschen wurden bisher weit über 200 miRNAs gefunden, deren Funktionen noch unbekannt sind.⁸⁾ Mit der Bedeutung von miRNAs bei der Entwicklung von Säugern befassten sich Kawasaki und Taira.³³⁾ Sie identifizierten mit *HES1* das Zielgen einer miRNA (miR-23). *HES1* ist ein Transkriptions-Repressor und wird hauptsächlich in neuronalen Stammzellen gebildet, wo es die Differenzierung zu neuronalen Zellen verhindert. Durch Bindung an die mRNA von *HES1* blockiert miR-23 dessen Expression und ermöglicht damit eine Differenzierung zu neuronalen Zellen.

miRNAs und Feinregulation

◆ Wahrscheinlich werden die microRNAs unsere Vorstellung über die Entstehung von Krebs grundlegend verändern. Ein Merkmal von Krebs ist der Verlust der Zellidentität und die unkontrollierte Vermehrung (Proliferation) von Zellen. Bisher herrschte die Ansicht, dass die Anreicherung von Mutationen in der Proteinsequenz von Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen dafür verantwortlich sind, dass Krebs entsteht. Die Identifizierung der miRNAs, die gerade für die Entwicklung von Organismen und Zellhomöostase wichtig sind, könnte diese Auffassung korrigieren. Da die miRNAs die Kontrolle der Zellteilung beeinflussen, kann eine gestörte Regulation der Genexpression in entwicklungsspezifischen Genen bei der Entstehung von unkontrolliertem Wachstum eine Rolle spielen, wie neuere Daten zeigen.^{13,34)}

siRNAs und miRNAs sind eng miteinander verknüpft, da die Pro-

Abb. 2.
RNA als Metaboliten-Sensor und Translationsregulator. Die Abbildung zeigt schematisch die Regulation in Riboswitches. Der Metabolit bindet an den 5'-UTR und verändert die Struktur, so dass es nicht mehr zur Anbindung des Ribosoms kommen kann.



zessierung beider Spezies über den gleichen Mechanismus verläuft. Wie dsRNA als Vorläufer der siRNAs, werden auch die Vorläufer (pri-miRNA, pre-miRNA) der miRNAs mit ihren vielen Haarnadelstrukturen als partielle, doppelsträngige RNAs angesehen. Daher liegt eine Beteiligung des RNAi-Mechanismus an der Prozessierung der miRNAs nahe. Sowohl Dicer als auch der RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC) spielen bifunktionale Rollen bei der Regulation der Genexpression (Abbildung 1).¹⁹⁾ Fehlt Dicer im Organismus reichern sich die langen hairpin-RNAs (pri-miRNAs) in der Zelle an, wodurch es zu unregulierter Zellteilung kommt. siRNAs und miRNAs sind funktionell austauschbar. Nur der Grad der Basenpaarung mit der Ziel-mRNA entscheidet über ihren Abbau oder den Translationsstopp.^{31,35)}

Natürliche Riboswitches

◆ Eine wesentliche Errungenschaft der letzten zehn Jahre ist die Entwicklung synthetischer RNAs, die durch ihre individuelle Faltung spe-

zielle Funktionen übernehmen. Diese gefalteten RNAs, auch Aptamere genannt, können hypothetisch fast jede molekulare Zielstruktur von Proteinen bis hin zu „small molecules“ binden.³⁶⁾ Solche RNAs können so entworfen werden, dass sie enzymatische Eigenschaften besitzen (Ribozyme) und sogar allosterisch durch kleine Moleküle reguliert werden können. Möglicherweise kommen auch in vivo mRNAs vor, die ihre Translation durch kleine Metaboliten zu regulieren können. Warum solche RNAs bisher nicht gefunden wurden, ist unbekannt.

Erst 2002 gelang es Ron Breaker und Mitarbeitern, die erste RNA aus Bakterien zu charakterisieren, die direkt mit kleinen Metaboliten interagieren kann und dadurch die Translation des entsprechenden Proteins reguliert.³⁷⁾ mRNAs, die in *E. coli* an der Vitamin-B1-(Thiaminpyrophosphat)-Biosynthese beteiligt sind, können direkt und ohne die Hilfe von Protein-Kofaktoren mit Thiaminderivaten interagieren. Durch Bindung von Thiaminpyrophosphat kommt es zur Umfaltung der mRNA, zur Behinderung der Ribo-

somenbindungsstelle und schließlich zum Abbruch der Proteinexpression. Breaker nennt diese Art von direkter Interaktion einen Riboswitch. Warum bisher nur sehr wenige solcher Elemente bekannt sind, liegt an ihrer Herkunft. Es wird spekuliert, dass solche RNA-Kontrollelemente im 5'-nichttranslatierten Bereich (5'-UTR) der mRNA aus einer Zeit in der Entwicklung des Lebens stammen, in der Proteine noch nicht existierten.³⁸⁾ Heute sind mehrere Riboswitches in bakteriellen RNAs bekannt (Abbildung 2).³⁹⁻⁴³⁾

Neben der Entdeckung Hunderter von microRNAs, die die Translation von mRNAs durch Bindung an nicht translatierte Bereiche auf verschiedenen Arten regulieren, revolutionieren Riboswitch-Domänen im 5'-nichttranslatierten Bereich von mRNAs das gesamte Feld der RNA-vermittelten Genregulation und öffnen neue Forschungsperspektiven.⁴⁴⁾

Ute Schepers
Universität Bonn
schepers@uni-bonn.de

- 1) N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* 2000, 289, 905–920.
- 2) R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* 1993, 75, 843–854.
- 3) A. Fire, S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* 1998, 391, 806–811.
- 4) A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe, *Science* 1999, 286, 950–952.
- 5) S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, *Nature* 2000, 404, 293–296.
- 6) P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, D. P. Bartel, *Cell* 2000, 101, 25–33.
- 7) S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* 2001, 411, 494–498.
- 8) M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt, T. Tuschl, *RNA* 2003, 9, 175–179.
- 9) M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Science* 2001, 294, 853–858.
- 10) N. C. Lau, L. P. Lim, E. G. Weinstein, D. P. Bartel, *Science* 2001, 294, 858–862.
- 11) V. Ambros, R. C. Lee, A. Lavanway, P. T. Williams, D. Jewell, *Curr. Biol.* 2003, 13, 807–18.
- 12) R. C. Lee, V. Ambros, *Science* 2001, 294, 862–864.
- 13) J. Brennecke, D. R. Hipfner, A. Stark, R. B. Russell, S. M. Cohen, *Cell* 2003, 113, 25–36.
- 14) L. P. Lim, N. C. Lau, E. G. Weinstein, A. Abdelhakim, S. Yekta, M. W. Rhoades, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Genes Dev.* 2003, 17, 991–1008.
- 15) B. J. Reinhart, E. G. Weinstein, M. W. Rhoades, B. Bartel, D. P. Bartel, *Genes Dev.* 2002, 16, 1616–1626.
- 16) J. C. Carrington, V. Ambros, *Science* 2003, 301, 336–338.
- 17) A. M. Denli, G. J. Hannon, *Trends Biochem. Sci.* 2003, 28, 196–201.
- 18) E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, *Nature* 2001, 409, 363–366.
- 19) D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell* 2003, 115, 199–208.
- 20) A. A. Caudy, R. F. Ketting, S. M. Hammond, A. M. Denli, A. M. Bathoorn, B. B. Tops, J. M. Silva, M. M. Myers, G. J. Hannon, R. H. Plasterk, *Nature* 2003, 425, 411–414.
- 21) C. Arenz, U. Schepers, *Naturwissenschaften* 2003, 90, 345–359.
- 22) J. M. Jacque, K. Triques, M. Stevenson, *Nature* 2002, 418, 435–438.
- 23) 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, 681–686.
- 24) D. P. Cioca, Y. Aoki, K. Kiyosawa, *Cancer Gene Therapy* 2003, 10, 125–133.
- 25) B. J. Reinhart, F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz, G. Ruvkun, *Nature* 2000, 403, 901–906.
- 26) C. Llave, Z. X. Xie, K. D. Kasschau, J. C. Carrington, *Science* 2002, 297, 2053–2056.
- 27) Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V. N. Kim, *Nature* 2003, 425, 415–419.
- 28) M. W. Rhoades, B. J. Reinhart, L. P. Lim, C. B. Burge, B. Bartel, D. P. Bartel, *Cell* 2002, 110, 513–520.
- 29) Y. Lee, K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim, V. N. Kim, *EMBO J.* 2002, 21, 4663–4670.
- 30) J. F. Palatnik, E. Allen, X. Wu, C. Schommer, R. Schwab, J. C. Carrington, D. Weigel, *Nature* 2003, 425, 257–263.
- 31) G. Hutvagner, P. D. Zamore, *Science* 2002, 1, 1.
- 32) V. Ambros, B. Bartel, D. P. Bartel, C. B. Burge, J. C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun, T. Tuschl, *RNA* 2003, 9, 277–279.
- 33) H. Kawasaki, K. Taira, *Nature* 2003, 423, 838–842.
- 34) M. T. McManus, *Seminars in Cancer Biology* 2003, 13, 253–258.
- 35) A. A. Caudy, M. Myers, G. J. Hannon, S. M. Hammond, *Genes Dev.* 2002, 16, 2491–2496.
- 36) M. Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999, 9, 324–329.
- 37) W. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker, *Nature* 2002, 419, 952–956.
- 38) H. B. White, *J. Mol. Evol.* 1976, 7, 101–104.
- 39) N. Sudarsan, J. K. Wickiser, S. Nakamura, M. S. Ebert, R. R. Breaker, *Genes Dev.* 2003, 17, 2688–2697.
- 40) W. C. Winkler, A. Nahvi, N. Sudarsan, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Biol.* 2003, 10, 701–707.
- 41) W. C. Winkler, S. Cohen-Chalamish, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 15908–15913.
- 42) D. A. Rodionov, A. G. Vitreschak, A. A. Mironov, M. S. Gelfand, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 6748–6757.
- 43) J. Vogel, V. Bartels, T. H. Tang, G. Churakov, J. G. Slagter-Jager, A. Huttenhofer, E. G. Wagner, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 6435–6443.
- 44) G. Elliott, P. Ohare, *Cell* 1997, 88, 223–233.



Ute Schepers, Jahrgang 1966, studierte von 1986 bis 1992 Chemie und Biochemie in Bonn und promovierte dort bei Konrad Sandhoff. Von 1998 bis 2000 arbeitete sie als Postdoctoral Fellow und Research Associate an der Harvard Medical School in Boston. Seit ihrer Rückkehr nach Bonn im Jahr 2000 arbeitet sie an ihrer Habilitation über die Kombination von chemischen und genetischen Methoden zur Weiterentwicklung der RNA-Interferenz in Säugtieren.



Beruf- und Karriere-Service

der GDCh



Information
Arbeitsvermittlung
Fördermaßnahmen

Gesellschaft Deutscher Chemiker
Karriereservice
Postfach 90 04 40
60444 Frankfurt am Main
Telefon: (069) 7917-665
Telefax: (069) 7917-322
E-Mail: karriere@gdch.de