

## Moleküle mit Nebenwirkungen

von Georg Hoffmann

Spätestens seit dem Abschluss des Human-genom-Projekts ist klar, dass DNA nur zu einem überraschend kleinen Teil aus Genen, also Bauanweisungen für Proteine, besteht. Dazwischen liegen rund 97% nicht kodierende Abschnitte, die früher abfällig als „genetischer Schrott“ bezeichnet wurden. Man nahm an, dass sie sich im Lauf der Evolution als totes Kapital angesammelt hatten, weil sie nicht in Proteine übersetzt werden.

Erst seit wenigen Jahren ist bekannt, dass viele nicht-kodierende DNA-Sequenzen in RNA übersetzt werden. Daraus entstehen zwar keine Proteine, sie spielen aber eine wichtige Rolle bei der Genregulation. Das vermeintlich tote Kapital führt also ein bis vor wenigen Jahren unbekanntes Eigenleben. Dabei spielt die Zerlegung langer RNA-Ketten in kurze, zufällige Schnipsel eine wichtige Rolle.



Prof. Dr. Thomas Tuschl  
Rockefeller University, New York

Unsere Titelgeschichte berichtet in erster Linie von den großen Wirkungen dieser RNA-Bruchstücke auf die Entwicklung unseres Körpers und die Abwehr von Eindringlingen. Ganz am Rande klingt aber auch an, dass diese kleinen Moleküle große Nebenwirkungen für die Karriere einiger Wissenschaftler hatten, von denen zwei soeben Nobelpreisträger wurden. Ein Dritter, der den Nobelpreis womöglich nur knapp verfehlte, ist der deutsche Wahlamerikaner Thomas Tuschl. Er wurde aber auf der Analytica 2006 mit dem renommierten Preis Biochemische Analytik ausgezeichnet; mehrere Träger dieser Ehrung erhielten später ebenfalls den Nobelpreis.

Es ist uns eine große Freude, dass Thomas Tuschl sich bereit erklärt hat, im Trillium-Report als Koautor auf die richtige Darstellung der äußerst komplexen Materie zu achten. Dafür möchte ich ihm als Herausgeber ganz herzlich danken.

### RNA-Interferenz

# Kleine Moleküle – große Wirkung

**Mikro RNAs sind eine erst vor kurzem entdeckte Klasse kleiner, nicht-kodierender Ribonukleinsäuren, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen. In der Grundlagenforschung sind die strukturell und funktionell eng verwandten siRNAs praktische Werkzeuge zur reversiblen Geninaktivierung, um auf deren Funktionen schließen zu können. In der Medizin untersucht man derzeit ihren therapeutischen Einsatz z.B. bei Hepatitis C oder der Makuladegeneration. Die Bedeutung und das Interesse gipfelten dieses Jahr in der Verleihung des Nobelpreises für Physiologie und Medizin.**

Lange Zeit galten Ribonukleinsäuren nur als mobile Datenträger der Zelle. Ihre einzige bekannte Aufgabe war es, die in den Genen enthaltene Erbinformation in Eiweiße und damit in zelltypische Strukturen und Funktionen zu übersetzen. Mit der Entdeckung, dass kleine RNA-Moleküle Genaktivitäten unterdrücken und damit regulatorisch wirksam sein können, sollte sich dieses Bild aber gründlich ändern.

In der Zelle ist die Proteinbiosynthese streng reguliert. Unzählige Faktoren sorgen dafür, dass diejenigen Gene abgelesen werden, deren Produkte eine Zelle in einer bestimmten Situation benötigt. Damit sich z.B. Muskelzellen kontrahieren, Beta-Zellen Insulin produzieren oder Leberzellen Nährstoffe metabolisieren können, müssen sie völlig unterschiedliche Proteine bilden. Wann welche Gene abgelesen werden, liegt u.a. in der Hand von den Transkriptionsfaktoren. Hierbei handelt es sich um Proteine, die an Startsequenzen der Gene binden und die Proteinbiosynthese in Gang setzen. Wie überall in der

Biologie existiert auch für diesen Bereich ein Gleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau. So gibt es neben den Stoffwechselwegen zur Biosynthese auch Möglichkeiten, einzelne Zwischenprodukte auf dem Weg zum reifen Protein wieder abzubauen.

### RNA-Interferenz

Zum Repertoire der hemmenden Mechanismen gehört unter anderem die RNA-Interferenz, deren Entdeckung in diesem Jahr durch die Verleihung des Nobelpreises für Physiologie und Medizin weltweite Beachtung fand. Doch eigentlich begann die Geschichte bereits vor 20 Jahren mit Beobachtungen an Pflanzen - nur dass ihre Entdecker die Phänomene damals nicht richtig deuten konnten.

Marjori Matzke vom Gregor Mendel Institut in Wien weist darauf hin, dass bereits Mitte der achtziger Jahre „eine Handvoll botanischer Labore über seltsame Fälle von Gene-Silencing in transgenen Pflanzen gestolpert waren“. 1989 veröffentlichte ihr Forschungsteam Ergebnisse an transgenen Tabakpflanzen, wonach Transgene, die nur in einer Kopie vorlagen, aktiv waren, eigenartigerweise aber abgeschaltet schienen, wenn man eine zweite Kopie hinzufügte.

1990 folgte dann ein wegweisendes Experiment, das auf unserem Titelbild symbolhaft dargestellt ist. Eine niederländische und eine amerikanische Gruppe versuchten unabhängig voneinander, die Blütenfärbung von Zuchtpetunien zu verstärken. In ihren Experimenten brachten die Wissenschaftler zusätzliche Kopien eines wichtigen Gens für die Blütenfarbe in die Pflanze ein. Doch anstatt intensiv leuchtend, waren die Blüten der genetisch modifizierten Pflanzen nur schwach ge-



färbt, fleckig oder sogar schneeweiß. Das zusätzliche Gen war nicht nur wirkungslos, es hemmte auch die Proteinsynthese. Nach der zu jener Zeit geltenden Auffassung hätte eine Verdopplung des Gens zu einer verdoppelten Menge an mRNA und somit erhöhter Proteinproduktion führen müssen. Eine genauere Analyse zeigte, dass die mRNA für das „Violettgen“ extrem niedrige Werte aufwies. Offenbar schaltete das eingeführte Gen die eigene Kopie der Pflanze ab.

**Schlüsselexperimente**

1993 entdeckten Lee, Feinbaum und Ambros von der Harvard University, Cambridge, USA, im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* RNA-Moleküle mit wenigen Nukleotidbausteinen, die offenbar die Biosynthese bestimmter Eiweiße spezifisch inhibieren konnten. Ab da dauerte es noch weitere fünf Jahre, bis Andrew Fire von der Stanford University, USA, und Craig Mello von der Massachusetts Medical School, USA, das Rätsel der geheimnisvollen Genabschaltung löften. Das Duo injizierte in den Fadenwurm einzelsträngige mRNA, die zugehörige Antisense-RNA und auch doppelsträngige RNA eines Gens, das Muskelkontraktionen verhindert. Mit der Injektion hemmten die Forscher die Umsetzung des Muskelgens in Protein. Dabei war die Wirkung der doppelsträngigen RNA um ein vielfaches potenter als die der einzelnen Nukleinsäuren. Den Vorgang der Geninaktivierung nannten die Forscher RNA-Interferenz (RNAi). Basierend auf diesen Ergebnissen versuchte man, die RNA-Interferenz auch in Säuger- oder humanen Zellen auszulösen. Das Einbringen von langen doppelsträngigen RNA-Molekülen in die Zellen führte aber nicht zu den erwarteten Ergebnissen.

Die genaue Aufklärung und neue Anwendungsmöglichkeiten erfolgten erst 2001, als es der Arbeitsgruppe um Thomas Tuschl gelang, die RNAi-Technik in menschlichen Zellen einzusetzen.

Die Forscher fanden heraus, dass RNA-Doppelstränge mit einer Länge von meist 21 Basenpaaren, die als small interfering RNAs (siRNAs) bezeichnet werden, die eigentlichen Effektoren der RNA-Interferenz sind.

Tuschl isolierte und charakterisierte die kurzen RNA-Fragmente. Diese hatte er zuvor durch Inkubation von längeren Doppelstrang-RNA-Molekülen in Zellysaten gewonnen. Das Enzym Dicer, das die RNA in kurze Fragmente zerschneidet, wurde kurze Zeit später entdeckt. Die resultierenden Fragmente werden entwunden und in Einzelstränge getrennt. Eingebunden in Proteine bildet einer von ihnen den RNAi-induzierten Silencing-Komplex. Bindet dieser Enzymkomplex an ein Zielmolekül, wird es abgebaut.

Die Arbeitsgruppe um Tuschl stellte synthetische siRNA her, brachte sie in Säugetierzellen ein und war so im Stande, Gene spezifisch stilllegen zu können. Sie entwickelten damit eine analytische Methode, mit der sich Genfunktionen bzw. die Funktionen der entsprechenden Proteine erforschen lassen. Mithilfe der RNA-Interferenz können nicht nur Gene komplett stumm geschaltet werden, eine gezielte Herunterregulierung und damit eine Verringerung der Genaktivität sind ebenfalls möglich.

**Praktische Anwendungen**

Die wichtigste Funktion der miRNA ist die Genregulation. Bereits mehrere hundert Sequenzen wurden im humanen Erbgut entdeckt, die Gensequenz-Abschnitte enthalten und miRNA-Moleküle kodieren.

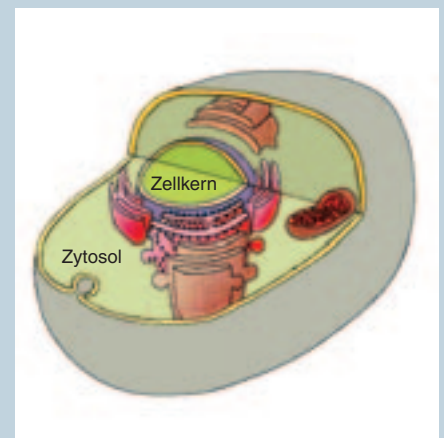
Die zweite Funktion der RNA-Interferenz ist die Regulation von mobilen virusähnlichen Elementen wie den Transposons. Die endogen exprimierten RNA-Fragmente sind u.a. in niederen Organismen Bestandteil eines Abwehrmechanismus gegen Viren. Gelangt virale RNA in die Zellen, bilden komplementäre miRNA-Moleküle mit der fremden Nukleinsäure einen Doppelstrang, der erkannt und direkt abgebaut wird.

Neben strukturbildenden Eigenschaften im Ribosom und enzymatischer Aktivität reguliert RNA somit auch zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und programmierten Zelltod (Apoptose).

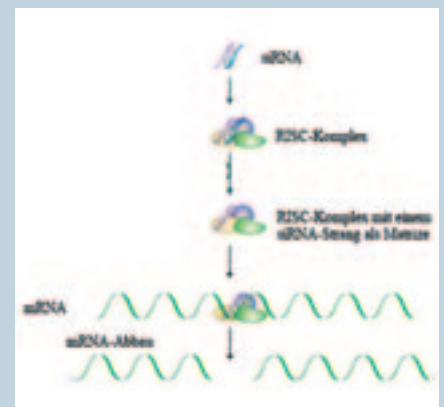
Aus diesen Eigenschaften ergeben sich diverse therapeutische Ansätze. Rein theoretisch lässt sich mit der RNAi jedes

krankmachende Gen still legen. Stoffwechselstörungen, Viruserkrankungen oder Krebs stehen hier u.a. im Fokus. Durch siRNA-Injektionen konnte z.B. der Cholesterinspiegel im Blut gesenkt werden. Wissenschaftler hatten einer Maus siRNA injiziert und so ein Protein still gelegt, das am Cholesterintransport beteiligt ist. Da es sich - im Gegensatz zu anderen therapeutischen Ansätzen wie der Gentherapie - bei dieser Methode um einen natürlich vorkommenden Mechanismus handelt, brauchte es nur wenige Jahre bis zu den ersten Versuchen am Menschen. Klinische Studien laufen bereits. ■

os, gh, tt



*Ihren Ursprung nimmt die miRNA im Zellkern. Dort zertrennt das Enzym Drosha zunächst die langen Vorläufer-RNA-Doppelstränge. Die Moleküle gelangen anschließend ins Zytosol, wo das Enzym Dicer die zwischen 21 und 23 Basenpaare langen miRNA-Moleküle herausschneidet.*



*Gelangt siRNA in die Zelle, kann sie an komplementäre mRNA-Sequenzen binden und einen RNA-Doppelstrang bilden. Der RISC-Komplex erkennt diese Strukturen und sorgt für den Abbau der jeweiligen mRNA.*

# Komplexe Mischung

Die RNA-Interferenz ist ein Werkzeug, mit dem die Zelle die Genexpression regulieren kann. So dient die endogen produzierte miRNA in erster Linie zur Feinabstimmung des Proteinbiosyntheseapparates. Si- und piRNAs ergänzen die Palette der natürlich vorkommenden kleinen RNA-Moleküle.



Alles begann mit Experimenten am *Caenorhabditis elegans*. Der Fadenwurm ist etwa einen Millimeter lang und ein typischer Modellorganismus in der Genetik und Entwicklungsbiologie. Andrew Fire und Craig Mello nutzten den Wurm für ihre wegweisenden Versuche zur RNA-Interferenz.

Bisher wurden in der Natur drei Klassen kleiner Ribonukleinsäuren (small RNA) entdeckt, die einen regulatorischen Einfluss auf die Genexpression haben. Je nach Herkunft und Funktion unterscheidet man zwischen der mikroRNA (miRNA), der small interfering RNA (siRNA) und der piwi-interacting RNA (piRNA).

## miRNA

Die miRNA ist ein Produkt aus einem doppelsträngigen Vorläufer, das die Proteinbiosynthese auf mRNA-Ebene regulieren kann. Direkt nach der Synthese der langen miRNA-Vorläufer durch die RNA-Polymerase entsteht eine Haarnadelstruktur, der Hairpin loop, bei der sich komplementäre Nukleinsäuresequenzen an den beiden Enden des Nukleinsäurestrangs aneinander lagern. Noch im Zellkern schneidet das Enzym Drosha den Strang an spezifischen Positionen

auseinander. Die resultierenden miRNA-Vorläufer (pre-miRNA) gelangen ins Zytoplasma, wo sie von dem Enzym Dicer zur reifen miRNA gespalten werden. Dicer und Drosha sind Proteine, die spezifisch doppelsträngige RNA Moleküle erkennen und aufgrund ihrer RNase III-Aktivität in der Lage sind, die Nukleinsäureketten zu trennen. Dicer heißt so viel wie „Zerwürfler“, denn dieses Enzym arbeitet - ganz im Sinne eines „molekularen Darwinismus“ - nach dem Zufallsprinzip. So entsteht eine enorme Vielfalt von scheinbar wahllosen Nukleotidsequenzen.

## RISC-Proteinkomplex

Jeweils ein Fragment aus dem zu rechtgeschnittenen miRNA-Doppelstrang wird im Zytosol der Zelle in den RISC-Proteinkomplex (RNA induced silencing complex) eingebaut und dient als Matrize für die mRNA. Lagert sich der miRNA-Proteinkomplex an komplementäre mRNA-Sequenzen, bilden sich Doppelstränge aus, die umgehend abgebaut werden. Da die miRNA-Basenabfolge in der Regel zu vielen mRNA-Sequenzen komplementär ist, kann eine bestimmte miRNA die Expression mehrerer Gene steuern. Ein bestimmtes Gen kann wiederum auch von unterschiedlichen miRNAs gestoppt werden. Daraus ergibt sich ein sehr komplexer Mechanismus für die Genregulation, der hauptsächlich der Feinabstimmung dient.

Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass miRNA auch die Proteinbiosynthese beeinflussen kann, ohne mRNA abzubauen. In diesem Fall bildet die miRNA mit der mRNA einen doppelsträngigen Komplex direkt am Ribosom und unterbricht damit wahrscheinlich den Prozess der Proteinbildung. Mittlerweile hat man hunderte evolutionär konservierte miRNAs identifiziert.

## siRNA

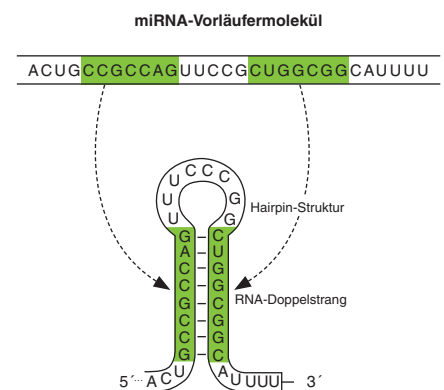
siRNAs sind - ähnlich wie miRNAs - Nukleinsäurefragmente mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden. Im Gegensatz zur miRNA werden die Sequenzen so gewählt, dass sie zu einhundert Prozent komplementär zu den entsprechenden mRNA-Zielsequenzen sind.

Künstlich hergestellte RNA-Fragmente werden in erster Linie in der Forschung eingesetzt. Als Bestandteil des RISC-

Proteinkomplexes dient die eingebaute RNA-Sequenz wieder, um fremde RNA abzubauen. siRNA und miRNA-Moleküle nutzen in der Zelle teilweise den gleichen Proteinapparat.

Die dritte Sorte der natürlich vorkommenden, regulatorischen Ribonukleinsäuren bilden die piRNAs. Diese erst kürzlich entdeckte Gruppe wird in Verbindung mit der Regulation der Transposons gebracht und scheint darüber hinaus einen Einfluss auf die Entwicklung der Keimzellbahn zu haben. Die genauere Funktion ist allerdings noch unklar.

Aus dieser Kenntnis ergeben sich zahlreiche Anwendungsgebiete für die Forschung. Die Genabschaltung mittels molekularbiologischer Methoden ist ein gängiges Verfahren, um mehr über Proteine und Gene zu erfahren. Die Generierung der klassischen Knock-out-Maus z.B., die durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen entsteht, ist allerdings methodisch anspruchsvoll und kostenintensiv. Zudem kann es passieren, dass der transgene Organismus den Knockout kompensiert und keinen erkennbaren Phänotyp zeigt.



Komplementäre doppelsträngige „Haarnadelstrukturen“ (engl. hairpin) der mRNA sind die biochemischen Vorstufen der mikroRNA. Die Abbildung ist eine schematische Darstellung. In der Realität ist der RNA-Doppelstrang über 20 Basenpaare lang.

Zellkulturexperimente sind dagegen sehr viel überschaubarer, führen schneller zum Ziel und erfordern weniger Aufwand. Die RNA-Interferenz hat somit die besten Voraussetzungen. ■

os, tt

# Ein mächtiges Werkzeug

**In der klinischen Grundlagenforschung hat sich die RNA-Interferenz in kürzester Zeit zu einer weit verbreiteten und etablierten Methode entwickelt. Künstlich hergestellte small interfering RNAs (siRNAs) werden in erster Linie in Zellkulturrexperimenten eingesetzt, um Genfunktionen zu entschlüsseln.**

Fire und Mello legten 1998 den Grundstein für eine Methode, mit der sich beliebige Gene gezielt abschalten oder herunterregulieren lassen und die praktisch in jedem molekularbiologischen Labor durchgeführt werden kann. Die Aufklärung zellulärer Signalwege, die zur Zellteilung, Differenzierung oder Apoptose führen, gehört zu den typischen Anwendungsbereichen in der biomedizinischen Forschung. Ansätze in der Medizin finden sich bei der Behandlung von Virusinfektionen, Stoffwechselerkrankungen, Hormonstörungen oder Krebs.

Um aussagekräftige Forschungsergebnisse erzielen zu können, muss die synthetisierte siRNA jedoch zunächst reproduzierbar und mit hoher Ausbeute in die Zelle eingeschleust werden. Hierfür stehen zurzeit zwei gängige Methoden zur Verfügung: die Lipofektion und die Elektroporation. Bei der Lipofektion wird die siRNA in Liposomen verpackt, die dann mit der Membran der Zielzelle fusionieren, so dass die Nukleinsäuren in die Zelle gelangen können. Dieses Verfahren wird am häufigsten angewendet, allerdings können damit nur Zellen analysiert werden, die sich auch gut transfizieren lassen. Eine Alternative ist die Elektroporation. Bei diesem Verfahren werden die Mem-

branen mithilfe eines elektrischen Felds permeabel gemacht, so dass die Nukleinsäuren durch kleine Löcher innerhalb der Membran in die Zelle diffundieren können. Praktisch alle Zelltypen lassen sich mit dieser Methode transfizieren.

## Therapieansätze

Die richtige Dosierung und das Einbringen der RNA-Moleküle in die Zelle stellen derzeit auch bei therapeutischen Ansätzen noch große Probleme dar. So muss aufgrund der kurzen Halbwertszeit siRNA regelmäßig neu zugeführt werden, um die Expression eines Gens dauerhaft unterbinden zu können. Andererseits darf eine gewisse Konzentration offenbar nicht überschritten werden. Welch fatale Folgen eine Überdosierung haben kann, zeigten Experimente, die kürzlich Mark A. Kay et al. an der Stanford School of Medicine, USA, an einem Mausmodell durchführte. Auf der Suche nach einer neuen Hepatitis C-Therapie nutzten die amerikanischen Forscher ein Vektorsystem, das -in der Maus integriert- von sich aus die RNA-Fragmente permanent produziert. Anstatt eine Verbesserung zu zeigen, starben jedoch nach kurzer Zeit viele der Versuchstiere. Wahrscheinlich führten die hohen RNA-Konzentrationen zu einer Entgleisung der Genregulation und zum Tod.

Die RNA-Interferenz liefert auch neue Ansätze für die Krebstherapie und Tumordiagnostik. So sind Gene, die miRNA-Sequenzen enthalten, häufig in genomischen Regionen lokalisiert, die in Verbindung mit Krebs gebracht werden. Verschiedene Onkogene wie das c-Myc

scheinen zudem die miRNA-Synthese zu fördern. Die Arbeitsgruppe um Todd Golub, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, hat beispielsweise die miRNA-Expressionsmuster von gesundem und Tumorgewebe untersucht und erkannte in einigen Fällen spezifische Muster zur Unterscheidung von malignem und normalem Gewebe.

## Klinische Studien

Im Rahmen klinischer Studien wird die RNA-Interferenz u.a. für den Einsatz bei Haut- und Augenerkrankungen getestet. So laufen derzeit Untersuchungen mit einer RNAi-basierten Therapie gegen die feuchte Makuladegeneration, die häufigste Ursache von Blindheit im Alter. Im Verlauf dieser Erkrankung bilden sich wuchernde Blutgefäße im Bereich der Makula. Bei dem therapeutischen Ansatz soll die Biosynthese des Vascular Endothelial Growth Factor-Proteins, das für das Blutgefäßwachstum verantwortlich ist, mithilfe der RNAi komplett unterbunden werden. Die RNA-Moleküle werden dabei direkt in das Auge gespritzt, sodass das Therapeutikum am Ort des Geschehens ist. Da das Auge relativ isoliert ist, kann die therapeutische RNA nicht einfach wegdiffundieren. Ist diese Therapie erfolgreich, könnte die Erkrankung gestoppt werden, indem ein weiteres Einwachsen neuer Blutgefäße in das Auge verhindert wird.

Dieser Einblick zeigt, welch enormes Potenzial hinter der RNAi-Technik steckt. Dennoch müssen nicht unerhebliche Hürden überwunden werden. ■

os

## Transfektionsexperimente

Für das Einbringen der siRNA in die Zelle bieten viele Hersteller kommerzielle Kits an. Diese Kits enthalten alle wichtigen Komponenten für die Durchführung von RNAi-Experimenten. Ein entscheidender Bestandteil ist das Vektorsystem, ein ringförmiger DNA-Doppelstrang mit allen notwendigen genetischen Informationen. Diese Vektoren enthalten häufig zwei Genfragmente: Die siRNA-Sequenz und ein Markergen, das die genetischen Informationen für die Synthese eines grün fluoreszierenden Proteins (Green fluorescent protein, GFP) trägt. Die Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, produzieren

dementsprechend einerseits die siRNA, andererseits synthetisieren sie fluoreszierende Proteine und unterscheiden sich damit zusätzlich von den normalen Wildtypzellen. Dadurch kann der Anteil der Zellen, die das fremde Erbgut aufgenommen haben, die also transfiziert sind, sehr schnell und einfach bestimmt werden. Darüber hinaus lassen sich transfizierte Zellen mithilfe der Fluoreszenz-aktivierten-Zell-Sortierung, FACS, zählen und sortieren.

Die Abbildung zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Zellkulturaufnahme von Krebszellen (HeLa-Zellen). Alle Zellen zeigen eine Fluoreszenz und tragen somit auch das Konstrukt zur siRNA-Synthese (Quelle: Promega).

