

Funktionelle Genanalyse mittels RNA-Interferenz

Alle auf einen Streich

■ RNA-Interferenz ist ein potente Technik, um biologische Prozesse oder Ursachen von Erkrankungen zu verstehen: Mit kleinen RNA-Molekülen schalten Forscher in beliebigen Zellen gezielt Gene aus, um deren Funktionen aufzudecken. In den letzten Jahren entwickelten sich die RNAi-Technologien derart rasant, dass mittlerweile nicht nur einzelne Gene, sondern ganze Genome untersucht werden.

Lange Zeit galt RNA als passiver Mittler zwischen DNA und Protein. Seit einigen Jahren jedoch entpuppt sie sich als wahre Regentin der Zelle. Denn eine ganze Reihe kleiner RNAs, die nicht für Proteine codieren, regulieren mannigfach die Genaktivität.

So schalten die zu dieser Gruppe gehörenden *small interfering RNAs* (siRNAs) Gene komplett ab. 1998 entschlüsselten Andrew Fire und Craig Mello diesen Vorgang und nannten ihn RNA-Interferenz (RNAi). Dabei schneidet das Enzym Dicer 21-28 Basenpaare lange siRNAs aus vorhandener doppelsträngiger RNA (dsRNA). Diese binden wiederum im Proteinkomplex RISC an komplementäre mRNA, dessen weiterer „Mitspieler“ Argonaut sie dann spaltet. Die resultierenden mRNA-Schnipsel werden abgebaut und die Proteinproduktion unterbleibt.

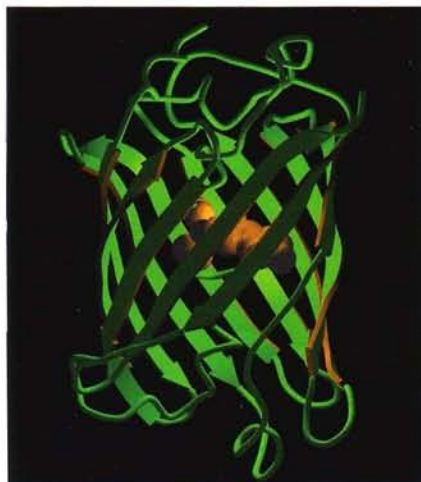
RNAi in Zellen höherer Tiere und Menschen einzusetzen gelang der Gruppe um Thomas Tuschl erst 2001 (siehe Artikel ab Seite 42). Seither werden immer raffiniertere Methoden erfunden, um kleine RNAs, die gezielt Gene stumm schalten, in Zellen zu bugsieren.

Stabile Integration

Im Labor von Achim Kramer am Berliner Universitätsklinikum Charité schleust beispielsweise Bert Maier in Lentiviren verpackte siRNA in humane Zellenlinien ein. Sein Ziel ist, mit Hilfe eines genomweiten RNAi-Screens den molekularen Aufbau der inneren Uhr in den Zellen zu entschlü-

seln. Denn obwohl die innere Uhr zentral über das Gehirn gesteuert wird, tickt in jeder Körperzelle eine eigene Uhr. „Indem wir mit RNAi einzelne Genfunktionen ausschalten, können wir erkennen, welche Gene Einfluss auf das Uhrwerk haben“, sagt Maier, der das Modellsystem etabliert hat. „Und immerhin steuert die innere Uhr viele lebensnotwendige Prozesse – etwa den Stoffwechsel, die Zellteilung und die Immunabwehr.“

Kleine RNAs über ein Retrovirus in die Zellen einzubringen ist weit aufwändiger als eine einfache Transfektion der Moleküle. „Der Vorteil der Methode ist jedoch, dass auf diese Weise die siRNA-codierende DNA stabil in das Zellgenom integriert wird, weshalb die RNA über lange Zeit gebildet wird“, erklärt Maier. „Das Vorgehen ähnelt zudem stärker dem



Green Fluorescent Protein (GFP)



Tribolium castaneum

Foto: Gregor Bucher

natürlichen RNAi-Ablauf und ist daher sehr effizient. Und es kommt auch nicht zu einer Immunantwort gegen Fremd-RNA, wie es bei Transfektionen möglich ist.“

Neben siRNA tragen die Zellen der Chronobiologen das Gen des Leuchtkäferenzym Luziferase unter einem „uhrspezifischen“ Promotor. Sie leuchten entsprechend ihres Tag/Nachtrhythmus unterschiedlich hell. „Hat eine siRNA eine Auswirkung auf die Uhr, erkennen wir das am veränderten Leuchtmuster“, so Maier.

Einen Teil der im Screen gefundenen Kandidaten untersuchen Maier und Co. in weiteren Experimenten auf ihren Effekt. Einer davon ist die Casein-Kinase 2, die eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielt. „Wird die Expression der Casein-Kinase 2 mit RNAi unterdrückt, dauert der Tag für die Zelle nicht mehr 24, sondern 26 Stunden“, berichtet Maier. Wie das Team zeigen konnte, phosphoryliert die Kinase das Uhrprotein Period2 und reguliert so dessen Stabilität und zelluläre Lokalisation (*Genes Dev* 2009, 23(6):708).

Die Forscher hoffen, dass eine genauere Kenntnis der Zelluhr dazu beiträgt, mit Schichtarbeit und Jetlag verbundene Risikoerkrankungen wie Krebs und Stoffwechselstörungen besser zu verstehen und therapieren zu können.

Medikamente gegen „Selbst“

Einige Straßen weiter, ebenfalls auf dem Gelände der Charité, spürt Thomas Meyer samt den Kollegen seiner Abteilung Molekulare Biologie am Max-Planck-

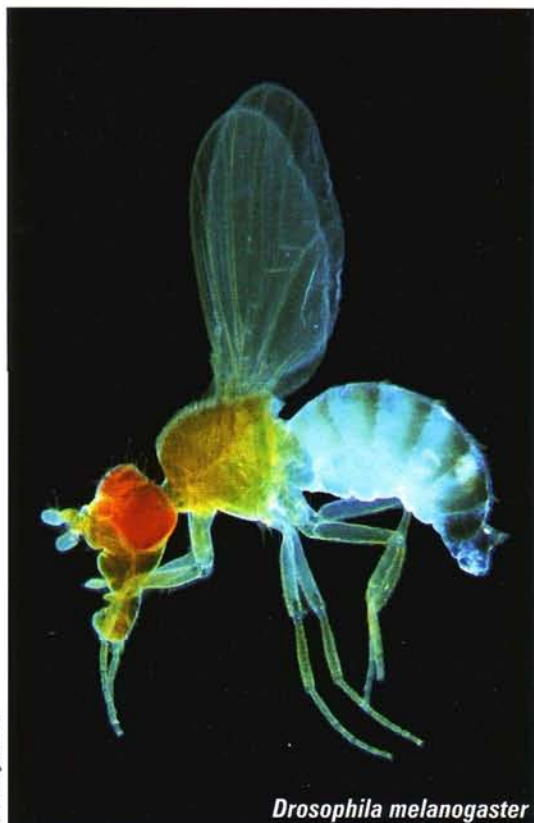


Foto: Gregor Bucher

Drosophila melanogaster

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.

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- ▶

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

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.

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



Foto: Gregor Bucher

Im Projekt „iBeetle“ wollen die Forscher um Gregor Bucher im Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* ein Gen nach dem anderen ausschalten, um deren Funktion aufzuklären.

Effekts über die Temperatur reguliert.“ Ihre Ergebnisse fassten die Zellbiologen schließlich als Netzwerk aller Wechselwirkungen mit Notch zusammen. Mit Hilfe verschiedener Methoden aus der Proteomik will Merdes dieses Bild künftig noch genauer zeichnen.

Kopf und Gehirn von Käfern

Das Modelltier *Drosophila* bietet indes nicht jedem Insektenforscher Antworten auf seine Fragen. So etwa Gregor Bucher von der Uni Göttingen, der sich für die Kopfbildung von Insekten interessiert. „*Drosophila* ist in vielen Dingen kein typisches Insekt, so dass sich manche Phänomene nicht in ihr untersuchen lassen“, sagt Bucher. „Dazu gehören die Ausbildung des Kopfes, die Segmentierung im wachsenden Embryo, die Musterbildung während der Metamorphose sowie die Anlage von Stinkdrüsen, die viele Insekten für Kommunikation und Abwehr nutzen, *Drosophila* aber fehlen.“

Bucher initiierte daher zusammen mit Kollegen der Unis Göttingen, Erlangen, Köln, Dresden und Greifswald das DFG-geförderte Projekt „iBeetle“: In einem genomweiten RNAi-Screen wollen die Teilnehmer Genfunktionen des Reismehlkäfers *Tribolium castaneum* ergründen.

Bucher und seine Mitstreiter injizieren zwischen 500 und 1000 Basenpaare lange Doppelstrang-RNA in den Hinterleib des Käfers. Von dort aus breitet sich diese über die Hämolymphe – das Insektenblut – in alle Zellen aus. In den Zellen werden die

RNA-Ketten nachfolgend zu siRNAs prozessiert. „Anders als bei *Drosophila* zeigen auch die Nachkommen der behandelten Käfer den RNAi-Effekt“, teilt Bucher mit. Um ein möglichst vollständiges Bild der Genfunktion zu erhalten, spritzen die Käferforscher ihre RNA in weibliche Puppen sowie in Larven. So können sie zum einen in den Nachkommen der Puppen Effekte während der Embryonalentwicklung beobachten, wie auch andererseits die Störung von Funktionen während der Metamorphose der Larve zum adulten Käfer.

Ihre Ergebnisse speisen Bucher und Co. in eine Online-Datenbank ein, die öffentlich zugänglich werden soll. „Wir wollen mit iBeetle eine Screening-Plattform schaffen, mit der sich Genfunktionen schnell und einfach ermitteln lassen“, sagt Bucher. „Die weitere Untersuchung der Gene würde nicht im Käfer, sondern einem anderen Tiermodell stattfinden, in dem mehr etablierte Methoden zur Verfügung stehen.“

Die Entschlüsselung der Funktionen der rund 14.000 Gene des Reismehlkäfers ist auf sechs Jahre angelegt. „Bis Ende 2011 wollen wir die Hälfte des Genoms analysiert haben“, so Bucher.

Neben einem besseren Verständnis der frühen Entwicklung vom Ei zur Larve sowie der Metamorphose erhoffen sich die am Projekt beteiligten Wissenschaftler auch neue Ansätze für die Schädlingsbekämpfung.

Auch Pflanzenforscher setzen RNAi ein, um Gene abzuschalten. Thomas Schmülling und seine Gruppe von der FU

Berlin beschäftigen sich beispielsweise mit dem Pflanzenhormon Cytokinin, das Entwicklung und Wachstum beeinflusst. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* machten die Pflanzenforscher eine erstaunliche Entdeckung: „Schalten wir Gene aus, die für Cytokinin-abbauende Proteine codieren, bilden die Pflanzen bis zu 50 Prozent mehr Samen aus. Das ist sehr viel, klassische Züchtungsmethoden erreichen nur ein bis zwei Prozent Ertragssteigerung pro Jahr.“

In Kooperation mit dem Unternehmen Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG versucht Schmüllings Team nun dieses Ergebnis in die Nutzpflanze Raps zu übertragen. Hierfür identifizierten sie die homologen Gene des Cytokinin-Stoffwechsels in Raps, deren Expression sie anschließend per RNAi unterdrückten.

Um siRNA in Pflanzen zu produzieren, nutzen die Botaniker das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*, das fremde DNA übertragen kann. „Die Übertragung von siRNA-codierender DNA führt zu einer stabilen Transformation in das Genom, die auch an die nächste Generationen weitergegeben wird“, veranschaulicht Schmülling. Ob die so veränderten Rapspflanzen mehr Samen tragen als ihre untransformierten Artgenossen, ist noch unklar – die Untersuchungen dauern noch an. „Sollten sich die Mutanten als ertragreicher erweisen, würden sie für den kommerziellen Einsatz wahrscheinlich mit anderen Verfahren als RNAi erzeugt“, meint Schmülling. Denn mit RNAi produzierte Pflanzen gelten als transgene Pflanzen, für die die entsprechenden Genehmigungsverfahren zeitaufwendig und teuer sind.

Etablierte Methode

Nur zwölf Jahre nach ihrer Entdeckung ist die RNAi-Technik heute in der Grundlagen- ebenso wie in der angewandten Forschung in Pflanzen, Tieren und Menschen fest etabliert. Und neben dem Einsatz der Methode zur Genfunktionsanalyse oder Herstellung transgener Organismen zeichnet sich bereits eine neue Perspektive auf dem RNA-Feld ab: Die Beeinflussung natürlich ablaufender RNAi-Prozesse.

„RNAi spielt beim Ablauf pathologischer Prozesse eine zentrale Rolle“, erklärt der Berliner Infektionsbiologe Meyer. „Durch die Manipulation der beteiligten kleinen RNAs ließen sich diese Krankheiten und Infektionen womöglich heilen.“ Meyer selbst ist mit seiner Gruppe auf diesem Gebiet schon aktiv.

MELANIE ESTRELLA