

- [1] J. Akimitsu, *Symposium on Transition Metal Oxides* (Sendai, Japan, 10. Januar 2001).
- [2] J. Nagamatsu, N. Nakagawa, T. Muranaka, Y. Zenitani, J. Akimitsu, *Nature* **2001**, *410*, 63.
- [3] D. P. Young, D. Hall, M. E. Torelli, Z. Fisk, J. L. Sarrao, J. D. Thompson, H.-R. Ott, S. B. Oseroff, R. G. Goodrich, R. Zysler, *Nature* **1999**, *397*, 412.
- [4] J. Russel, R. Hirst, F. A. Kanda, A. J. King, *Acta Crystallogr.* **1953**, *6*, 870.
- [5] M. Jones, R. Marsh, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1434.
- [6] E. G. Killian, R. B. Kaner, *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 333.
- [7] B. T. Matthias, *Superconductivity of d- and f-Band Metals*, American Institute of Physics, New York, **1972**, S. 367.
- [8] J. R. Gavaler, *Appl. Phys. Lett.* **1973**, *23*, 480.
- [9] J. G. Bednorz, K. A. Müller, *Z. Phys. B* **1986**, *64*, 189.
- [10] H. Takagi, *Physica C* **2000**, *341*–348, 3.
- [11] K. Tanigaki, T. W. Ebbesen, S. Saito, J. Mizuki, J. S. Tsai, Y. Kubo, S. Kuroshima, *Nature* **1991**, *352*, 222.
- [12] L. F. Schneemeyer, J. K. Thomas, T. Siegrist, B. Batlogg, L. W. Rupp, R. L. Opila, R. V. Cava, *Nature* **1988**, *332*, 814.
- [13] J. H. Schön, C. Kloc, B. Batlogg, *Nature* **2000**, *408*, 549.
- [14] J. M. An, W. E. Picket, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4366.
- [15] J. S. Slusky, N. Rogado, K. A. Regan, M. A. Hayward, P. Khalifah, T. He, K. Inumaru, S. Loureiro, M. K. Haas, H. W. Zandbergen, R. J. Cava, *Nature* **2001**, *410*, 343.
- [16] J. Bardeen, L. N. Cooper, J. R. Schrieffer, *Phys. Rev.* **1957**, *108*, 1175.
- [17] S. L. Bud'ko, G. Lapertot, C. Petrovic, C. E. Cunningham, N. Anderson, P. C. Canfield, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 1877.
- [18] R. K. Kremer, B. J. Gibson, K. Ahn, cond-mat/0102432. Die hier und nachfolgend gegebenen Zitate für elektronische Preprints können unter der Internet-Adresse <http://xxx.lanl.gov/archive/cond-mat> unter Angabe der jeweiligen Nummer abgerufen werden.
- [19] A. Sharoni, I. Fellner, O. Millo, cond-mat/0102325.
- [20] J. Kortus, I. I. Mazin, K. D. Belashchenko, V. P. Antropov, L. L. Boyer, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4656.
- [21] Y. Kong, O. V. Dolgov, O. Jepsen, O. K. Andersen, *Phys. Rev. B* **2001**, im Druck; cond-mat/0102499.
- [22] I. Loa, K. Syassen, *Solid State Commun.* **2001**, *118*, 279.
- [23] B. Lorenz, R. L. Meng, C. W. Chu, *Phys. Rev. B* **2001**, im Druck; cond-mat/0102264.
- [24] M. Monteverde, M. Núñez-Regueiro, N. Rogado, K. A. Regan, M. A. Hayward, T. He, S. M. Loureiro, R. J. Cava, *Science* **2001**, *292*, 75.
- [25] K.-H. Müller, G. Fuchs, A. Handstein, K. Nenkov, V. N. Narozhnyi, D. Eckert, *Solid State Commun.* **2001**, *118*, 1.
- [26] D. K. Finnemore, J. E. Ostenson, S. L. Bud'ko, G. Lapertot, P. C. Canfield, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 2420.
- [27] P. C. Canfield, D. K. Finnemore, S. L. Bud'ko, J. E. Ostenson, G. Lapertot, C. E. Cunningham, C. Petrovic, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 2423.
- [28] W. N. Kang, H.-J. Kim, E.-M. Choi, C. U. Jung, S.-I. Lee, cond-mat/0103179.

RNA-Interferenz: ein neuer Weg zur Analyse von Proteinfunktionen

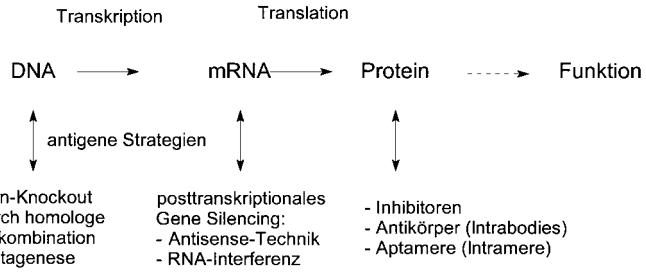
Ute Schepers und Thomas Kolter*

Einleitung

In den letzten Jahren sind enorme Anstrengungen zur Analyse des Erbguts einer Reihe von Spezies unternommen worden. Auch das Genom des Menschen wurde sequenziert. Diese Daten bedürfen jedoch zusätzlicher Informationen, um für das Verständnis biochemischer, biologischer und pharmakologischer Zusammenhänge nützlich zu werden. Diese zusätzlichen Informationen betreffen vor allem die Funktion der Genprodukte, weitgehend also der Proteine, die von dem Genom einer Spezies codiert werden (*functional Genomics*). Eine neuartige Technik ermöglicht eine schnellere und einfachere Analyse von Proteinfunktionen, als es bisher in vielen Fällen möglich war. Dabei wird durch doppelsträngige RNA sequenzspezifisch die Genexpression in Zellkulturen und ganzen Organismen auf der Ebene der Messenger-RNA (mRNA) unterbrochen (Schema 1).^[1]

Funktion von Proteinen

Seit langem suchen Wissenschaftler nach Methoden, die Funktion von Proteinen zu untersuchen. Die verfügbaren experimentellen Methoden sind meist äußerst zeitaufwändig.



Schema 1. Beispiele für Verfahren zum Ausschalten von Proteinen.

Klassische Verfahren zur Aufklärung der Funktion von Proteinen, aber auch anderen Biomolekülen, sind Ausschaltexperimente. Dazu wird der Phänotyp von Zellkulturen oder ganzen Organismen analysiert, die ein Protein z.B. aufgrund von Mutationen nicht bilden können. Beim Menschen lieferten in vielen Fällen Erbkrankheiten solche Modellsysteme. Als eine der vielversprechendsten neueren Techniken zeichnet sich die RNA-Interferenz ab. Sie beruht auf dem Ausschalten ausgewählter mRNA durch doppelsträngige RNA. Gegenüber anderen antigenen Strategien^[2] wie dem Gen-Knockout durch homologe Rekombination, Antisense-Oligonucleotiden oder auch Ribozymen^[3] bietet sie erhebliche Vorteile.

Geschichte

Entdeckt wurde die RNA-Interferenz 1995 bei Experimenten am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), der in

[*] Dr. T. Kolter, Dr. U. Schepers

Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-73-77-78
E-mail: tkolter@uni-bonn.de

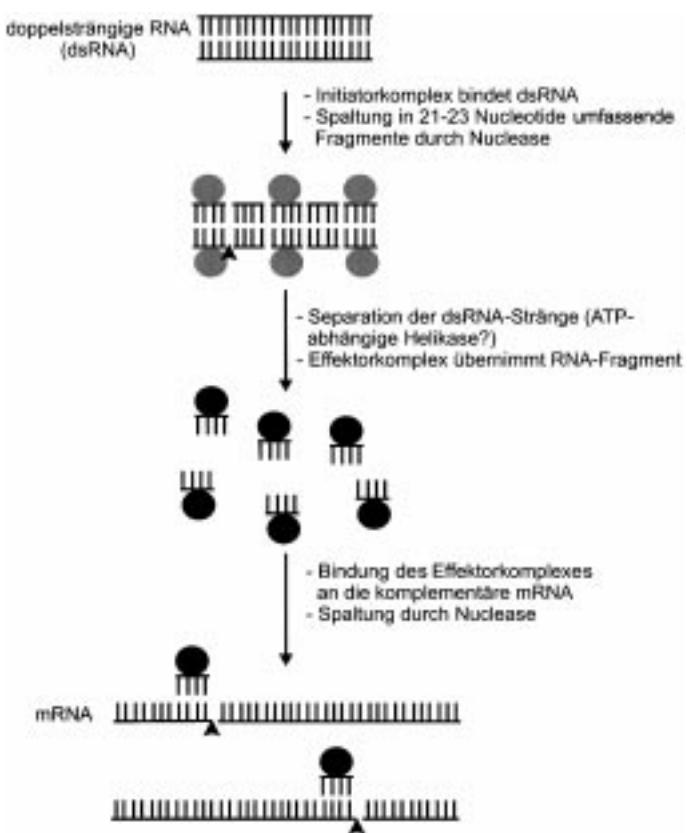
vielen biologischen Untersuchungen als Modellorganismus dient.^[4] Durch Verabreichen von Antisense-RNA sollte die Expression eines einzelnen Gen ausgeschaltet werden. Bei solchen Versuchen wird eine zur Ziel-mRNA komplementäre RNA (Antisense-RNA) in den Organismus eingeführt, um die mRNA spezifisch zu binden und deren Umschreibung in Protein zu verhindern. Überraschenderweise führte die gleichzeitige Injektion von Sense- und Antisense-RNA zu einer weit effizienteren Ausschaltung der Proteinproduktion als das reine Antisense-Experiment.^[1] Dieser Befund lieferte die Grundlagen für eine einfache Methode, die Bildung ausgewählter Proteine durch die Einführung von exogenen dsRNAs zu unterbinden.

Die RNA-Interferenz (RNAi) fällt unter den Oberbegriff des posttranskriptionalen Gene Silencing (PTGS). Dieses Phänomen wurde Anfang der neunziger Jahre in mehreren Organismen beobachtet und mit verschiedenen Namen versehen: „Cosuppression“ bei Pflanzen, „Quelling“ bei Pilzen und „RNA-Interferenz“ bei Fadenwürmern und Insekten.^[5, 6] PTGS ist vermutlich einer der ältesten Mechanismen von Zellen, Infektionen durch RNA-Viren oder Transposone (mobile parasitäre DNA-Einheiten, die in das Genom der Wirtzelle inserieren) zu bekämpfen. Bei deren Vervielfältigung entsteht vorübergehend doppelsträngige RNA (dsRNA), die von der Wirtzelle erkannt und abgebaut wird. Dieser Abwehrmechanismus konnte seither auch in einer Reihe weiterer Organismen wie Trypanosomen,^[7] Insekten,^[8, 9] Pflanzen^[10] und kürzlich auch – für die Anwendung besonders interessant – in embryonalen Stammzellen und Oozyten der Maus^[11] nachgewiesen werden. Die RNAi bedient sich dieses Abwehrmechanismus durch Gabe exogener dsRNA. Wenn diese zu einer zelleigenen (einzelsträngigen) mRNA homolog ist, kommt es nicht nur zum Abbau der exogenen RNA, sondern auch zu dem der homologen mRNA des Wirtes.

Das Phänomen RNAi wurde lange Zeit nicht in Säugetieren untersucht, da bekannt war, dass Säugerzellen einen anderen Mechanismus zur Abwehr von Viren nutzen. Schon extrem geringe Mengen dsRNA können eine Signalkaskade auslösen, die zur Aktivierung einer dsRNA-Responsive-Kinase (PKR) führt. Diese phosphoryliert und inaktiviert den Translationsfaktor EIF2α und führt durch eine globale Hemmung der Proteinbiosynthese zum programmierten Zelltod (Apoptose). Neuere RNAi-Experimente waren jedoch auch in embryonalen Maus-Stammzellen^[11] erfolgreich. Möglicherweise ist der Interferon-Abwehrmechanismus in diesen Zellen noch nicht ausgebildet, und die Anwendung der RNAi bei ausdifferenzierten Säugerzellen könnte durch dessen Aktivierung in einem späteren Entwicklungsstadium erschwert werden. Dennoch wird an einer Weiterentwicklung dieser Technik für Proteinuntersuchungen bei Säugern gearbeitet.

Mechanismus

Der Mechanismus der RNAi ist noch nicht geklärt. Die gegenwärtigen Vorstellungen, wie er auf molekularer Ebene in *C. elegans* und anderen Spezies abläuft, stellen sich wie folgt dar (Schema 2). Als Antwort auf substöchiometrische



Schema 2. Hypothetischer Mechanismus von PTGS durch RNAi (modifiziert nach Lit. [12] unter Berücksichtigung von Lit. [13]).

Mengen dsRNA werden die Spiegel von mRNA homologer Sequenz innerhalb von 2–3 h stark erniedrigt.^[12] Dieser Abbau erfolgt in zwei Stufen: Zunächst wird die dsRNA in Fragmente von 21–23 Nucleotiden Länge gespalten. In einem zweiten Schritt steuern diese den Abbau homologer zellulärer mRNA. Mithilfe von *C. elegans*-Mutanten, die nicht in der Lage sind, den RNAi-Phänotyp auszubilden, konnten einige Genfamilien identifiziert werden, deren Produkte am PTGS beteiligt sind. Diese bilden Komplexe, die aus 3'-Exonucleaseen, Helikasen, RNA-Polymerasen und RNA-bindenden Proteinen bestehen. Dass die die Spaltung der dsRNA^[12] bewirkende Nuclease der RNase-III-Familie angehört, wurde kürzlich in *Drosophila* nachgewiesen.^[13] Nach der Spaltung kommt es in *Neurospora*^[14] und möglicherweise auch in *C. elegans*^[13] zur Vervielfältigung der dsRNA durch RNA-abhängige RNA-Polymerasen und somit zur Verstärkung des Alarmsignals in der Zelle. Die entstandenen Fragmente werden durch eine ATP-abhängige Helikase^[12] getrennt und durch ein RNA-bindendes Protein an die komplementäre mRNA angelagert. Weitere Nucleasen werden aktiviert, um die neu entstandene dsRNA aus Fragment und mRNA zu zerschneiden.

Durch die Gabe exogener dsRNA gelingt es, diesen Vorgang zum gezielten Ausschalten eines Proteins zu nutzen. Da die RNAi posttranskriptional abläuft, muss die exogene RNA homolog zu Exonsequenzen des auszuschaltenden Gens sein. Doppelsträngige RNAs mit Sequenzen von nichttranskribierten Bereichen wie Introns und Promotoren sind ohne Effekt.^[1] Eine einzelne dsRNA geeigneter Sequenz genügt,

um mehrere Proteine gleichzeitig auszuschalten, sofern die sie codierenden Gene hochkonservierte Bereiche aufweisen.^[1, 8]

Anwendungen und Ausblick

Wie intrazelluläre Antikörper (Intrabodies) oder Aptamere (Intramere)^[15] ermöglicht auch die RNAi Ausschaltexperimente ohne Veränderung des genetischen Materials. Die Methode ist verglichen mit der Erzeugung gentechnisch veränderter Tiere durch homologe Rekombination einfach und schnell.

Kommt es bei der Antisense-Technik, bei der eine 1:1-Hybridisierung von mRNA mit der Antisense-RNA erfolgen muss, nur in wenigen Fällen zum vollständigen Ausschalten des Proteins, so führt die Gabe katalytischer Mengen dsRNA zum kompletten Abbau der zelleigenen mRNA dieser Sequenz. Bei der Verwendung von Antisense-DNA anstelle von -RNA kommt es zum Abbau von Hybriden aus RNA und DNA durch RNase H.^[3]

Mit der RNAi können einzelne Proteine nicht nur in Zellkulturen oder ganzen Lebewesen, sondern auch in verschiedenen Entwicklungsstadien eines Organismus ausgeschaltet werden. Dies könnte sich als wesentlicher Vorteil gegenüber der zurzeit bei Mäusen üblichen Knockout-Technik erweisen, bei der ein Gendefekt zum Absterben eines Embryos führen kann. Gene entwicklungs- und gewebespezifisch zu inaktivieren ist auch heute schon durch die cre-loxP-Technik möglich,^[16] allerdings nur mit hohem Zeitaufwand. Zurzeit wird versucht, die RNAi-Technik auch auf Säugetiere zu übertragen und somit zeitaufwändige Schritte wie homologe Rekombination und zielgerichtete Mutagenese zu umgehen.

Die Grundvoraussetzung für die RNAi ist die Kenntnis der Nucleinsäuresequenz von etwa 200–1000 Basen. Mithilfe moderner Transfektionstechniken wie Lipidtransfer, Mikroinjektion, „Gene Gun“ oder auch Fütterung von dsRNA, wie bei *C. elegans* beschrieben,^[1] können transiente Phänotypen erzeugt werden. Die Vorteile liegen dabei in der simultanen und parallelen Ausschaltung einer Vielzahl von Proteinen und somit der Möglichkeit eines Hochdurchsatz-Screenings (*C. elegans*).^[17, 18] Zur Erzeugung von Zelllinien oder Tieren mit einer dauerhaften oder induzierbaren Ausschaltung muss man diese Spezies jedoch gentechnisch verändern. Die transgenen Zelllinien bzw. Organismen tragen dann Plasmide, die endogen dsRNA produzieren. Diese enthalten etwa 1000 Desoxyribonukleotide passend zur Sequenz einer Ziel-mRNA in einer hintereinander geschalteten Sense- und Antisense-Orientierung (*inverted Repeat*). Bei der Transkription dieser DNA-Sequenz in RNA entsteht durch intramolekulare Hybridisierung eine Haarnadelstruktur, die sich wie doppelsträngige RNA verhält. Induziert man die Expression dieser Haarnadel-dsRNA mit einem gewebespezifischen oder einem induzierbaren Promotor, so können RNAi-Phänotypen in verschiedenen Geweben oder in verschiedenen Entwicklungsstadien gebildet werden. Ein weiterer Vorteil dieser

Technik ist, dass auch virale und parasitäre Proteine zur Abwehr von Pathogenen ausgeschaltet werden können. So gelang es bereits, Tabakpflanzen durch Transformation mit einem Haarnadelkonstrukt gegen eine Protease des Potato-virus Y vollständig gegen das Virus zu immunisieren.^[19]

Mithilfe der bestehenden Methoden konnten in großem Umfang Einsichten in die Funktion von Proteinen gewonnen werden. Trotz des weitreichenden Erfolgs von Ausschaltexperimenten muss auf die Schwierigkeiten hingewiesen werden, die mit diesem Ansatz verbunden sind. So ist die Extrapolation von Zellkulturergebnissen auf den gesamten Organismus nicht immer zulässig: Das Fehlen vielzelliger Verbände oder die artifiziellen Bedingungen von Zellkulturen waren bereits Ursache von Fehlschlüssen.^[20] Selbst die Analyse von Knockout-Tieren kann irreführen; so sind die Tiermodelle schwerer menschlicher Erkrankungen wie der Tay-Sachs-Erkrankung^[21] und des Lesch-Nyhan-Syndroms ohne Symptome.^[20] Insofern ist die Analyse der Proteinfunktion selbst mithilfe der RNAi ein schwieriges Unterfangen.

Es gibt bei dieser Technik noch viele Unklarheiten, sowohl was den Mechanismus als auch was die Anwendungsmöglichkeiten betrifft. Die Zahl der Wissenschaftler, die sich der Methode zuwenden, wächst jedoch stetig und lässt auf eine rasante Entwicklung auf diesem Gebiet hoffen.^[22]

- [1] A. Fire, S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [2] K.-Y. Jen, A. M. Gewirtz, *Stem Cells* **2000**, *18*, 307–319.
- [3] U. Galderisi, A. Cascino, A. Giordano, *J. Cell. Physiol.* **1999**, *181*, 251–257.
- [4] S. Guo, K. J. Kemphues, *Cell* **1995**, *81*, 611–620.
- [5] Übersicht: R. H. A. Plasterk, R. F. Ketting, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, *10*, 562–567.
- [6] Übersicht: B. L. Bass, *Cell* **2000**, *101*, 235–238.
- [7] H. Ngo, C. Tschudi, K. Gull, E. Ullu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14687–14692.
- [8] J. R. Kenedell, R. W. Carthew, *Cell* **1998**, *95*, 1017–1026.
- [9] L. Misquitta, B. M. Paterson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1451–1456.
- [10] A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe, *Science* **1999**, *286*, 950–952.
- [11] F. Wianny, M. Zernicka-Goetz, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 70–75.
- [12] P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, D. P. Bartel, *Cell* **2000**, *101*, 25–33.
- [13] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hammond, *Nature* **2001**, *409*, 363–366.
- [14] C. Cognoni, G. Macino, *Nature* **1999**, *399*, 166–169.
- [15] M. Famulok, G. Mayer, M. Blind, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 591–599.
- [16] A. Nagy, *Genesis* **2000**, *26*, 99–109.
- [17] P. Gonczy, G. Echeverri, K. Oegema, A. Coulson, S. J. Jones, R. R. Copley, J. Duperon, J. Oegema, M. Brehm, E. Cassin, E. Hannak, M. Kirkham, S. Pichler, K. Flohrs, A. Goessen, S. Leidel, A. M. Alleaume, C. Martin, N. Ozlu, P. Bork, A. A. Hyman, *Nature* **2000**, *408*, 331–336.
- [18] A. G. Fraser, R. S. Kamath, P. Zipperlen, M. Martinez-Campos, M. Sohrmann, J. Ahringer, *Nature* **2000**, *408*, 325–330.
- [19] N. A. Smith, S. P. Singh, M.-B. Wang, P. A. Stoujesdijk, A. G. Green, P. M. Waterhouse, *Nature* **2000**, *407*, 319–320.
- [20] T. Kolter, T. Magin, K. Sandhoff, *Traffic* **2000**, *1*, 803–804.
- [21] T. Kolter, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2044–2048; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1955–1959.
- [22] Für eine neue Übersicht siehe: T. Tuschl, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 239–245.