

Ein homogener Assay der microRNA-Reifung***Brian P. Davies und Christoph Arenz**

Die in jüngster Zeit gewonnenen Einsichten in die Mechanismen der Genregulation auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene können möglicherweise die vorhandenen therapeutischen Strategien erweitern. Vor allem die Genregulation durch Hormone, zelluläre Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren ist Gegenstand biomedizinischer Forschung. Durch eine Manipulation proteinvermittelter Prozesse, z. B. durch Enzyminhibitoren und Rezeptoragonisten oder -antagonisten, ist es vielfach möglich, pathologische Prozesse einzudämmen oder gar zu unterdrücken.^[1] Aus mehreren Gründen verspricht jedoch auch eine Intervention auf RNA-Ebene Vorteile. Von besonderem Interesse sind hier die so genannten microRNAs (miRNAs), deren Rolle für die zelluläre Regulation der Genexpression offenbar lange Zeit unterschätzt wurde. Als miRNAs bezeichnet man ca. 21 Basenpaare lange doppelsträngige, regulatorische RNA-Moleküle endogenen Ursprungs. Sie werden durch Dicer, eine doppelstrangspezifische Ribonuclease, aus ihren haarnadel-förmigen inaktiven Vorstufen, den prä-miRNAs, freigesetzt (Abbildung 1).^[2] Die reifen miRNAs können in Form von RNA-Proteinkomplexen die Boten-RNA blockieren und somit die Translation zum Protein unterbinden. Viele Details der miRNA-vermittelten Genregulation sind noch unklar, besonders die Identität und Zahl der durch die jeweiligen miRNAs regulierten mRNAs. Es gibt immer mehr Hinweise, dass verschiedene Krankheiten – besonders Krebserkrankungen – mit spezifisch veränderten zellulären miRNA-Mustern einhergehen;^[3] miRNAs bieten sich daher als potenzielle Zielmoleküle für neuartige therapeutische Ansätze an.^[4]

Wir wollen untersuchen, ob es möglich ist, durch eine Inhibition der Dicer-vermittelten Reifung von miRNAs eine Manipulation der Genregulation herbeizuführen. Dies könnte z. B. durch eine Blockierung der entsprechenden inaktiven prä-miRNAs mithilfe spezifischer Liganden erreicht werden. RNAs sind geeignete Zielstrukturen für die Bindung durch kleine Moleküle,^[5] ein rationales Design von selektiven RNA-Liganden ist allerdings äußerst schwierig.^[6] Wir stellen

[*] B. P. Davies, Prof. Dr. C. Arenz
Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Chemie
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+ 49) 30-2093-6947
E-Mail: christoph.arenz@chemie.hu-berlin.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und vom Innovationsfonds der Humboldt-Universität zu Berlin unterstützt.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

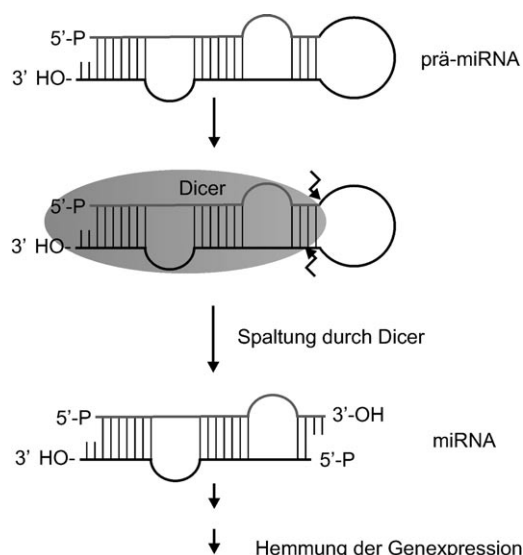


Abbildung 1. Bildung von miRNAs aus den inaktiven prä-miRNAs durch die Ribonuclease Dicer.

hier einen homogenen, fluoreszenzbasierten Dicer-Assay vor, der ein einfaches Screening von Bibliotheken potenzieller prä-miRNA-Liganden – und damit potenzieller Inhibitoren der miRNA-Reifung – ermöglicht.

In Anlehnung an bekannte Fluoreszenzassays auf DNA- und RNA-Ebene war unser Ziel zunächst die Synthese einer doppelt markierten prä-miRNA-Sonde, bei der das 5'-Ende mit einem Fluoreszenzemitter (F) und das 3'-Ende mit einem Fluoreszenzlöcher (Q) verknüpft ist.^[7] Durch die intramolekulare Basenpaarung sollten sich die beiden Reste in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft zueinander befinden, sodass eine effektive Fluoreszenzlöschung, bevorzugt durch Stoßlöschung („collisional quenching“), resultieren sollte. Die Dicer-vermittelte Hydrolyse der prä-miRNA würde dann zu einer Dissoziation von Fluoreszenzemitter und -löcher, und damit zu einem Dicer-abhängigen Fluoreszenzanstieg führen. In Analogie zu den üblichen Assaydesigns für Proteaseinhibitoren^[8] sollte in Gegenwart von Dicerinhibitoren oder von Liganden der prä-miRNA der Fluoreszenzanstieg hingegen ausbleiben (Abbildung 2).

Als Zielstruktur für die Entwicklung eines homogenen miRNA-Reifungsassays entschieden wir uns für eine doppelt markierte prä-let-7-RNA aus *Drosophila melanogaster*.^[9] Diese let-7-miRNA gilt als eine der bestuntersuchten miRNAs und war die erste miRNA, für die eine Reifung durch das Enzym Dicer aus einer längeren RNA nachgewiesen wurde.^[9] Zur Herstellung der Sonde wurde der 5'-fluoresceinmarkierte, 5'-terminale Teilstrang der prä-let-7-RNA durch T4-RNA-Ligase enzymatisch mit dem 5'-phos-

phorylierten, 3'-Dabcyl-markierten 3'-terminalen Teilstrang verknüpft.

Dicer kann haarnadelförmige RNA-Moleküle auf zwei Arten spalten: Natürliche prä-miRNAs mit den typischen 3'-Überhängen von zwei Nucleotiden werden durch die Hydrolyse zweier Phosphodiesterbindungen im bevorzugten Abstand von jeweils 21–23 Nucleotiden vom helicalem Ende her gespalten.^[10] Bei Abwesenheit des 3'-terminalen Überhangs werden die Substrate jedoch wenige Nucleotide weiter vom helicalem Ende weg gespalten, was mit einer Hydrolyse von vier statt nur zwei Phosphodiesterbindungen und der Abspaltung der jeweils ein bis drei terminalen Nucleotide einhergeht.^[11] Um die Dissoziation von Fluoreszenzemitter und -löcher nach erfolgter Hydrolyse zu erleichtern, weist unsere Sonde daher anders als die natürlichen prä-miRNAs keinen Überhang von zwei Nucleotiden am 3'-Ende auf. Das Ligationsprodukt zeigte im Vergleich zum freien fluoreszenzmarkierten 5'-Teilstrang keine nennenswerte Fluoreszenz. Bei der anschließenden Inkubation dieser Sonde mit rekombinantem Dicer konnten wir hingegen einen konzen-

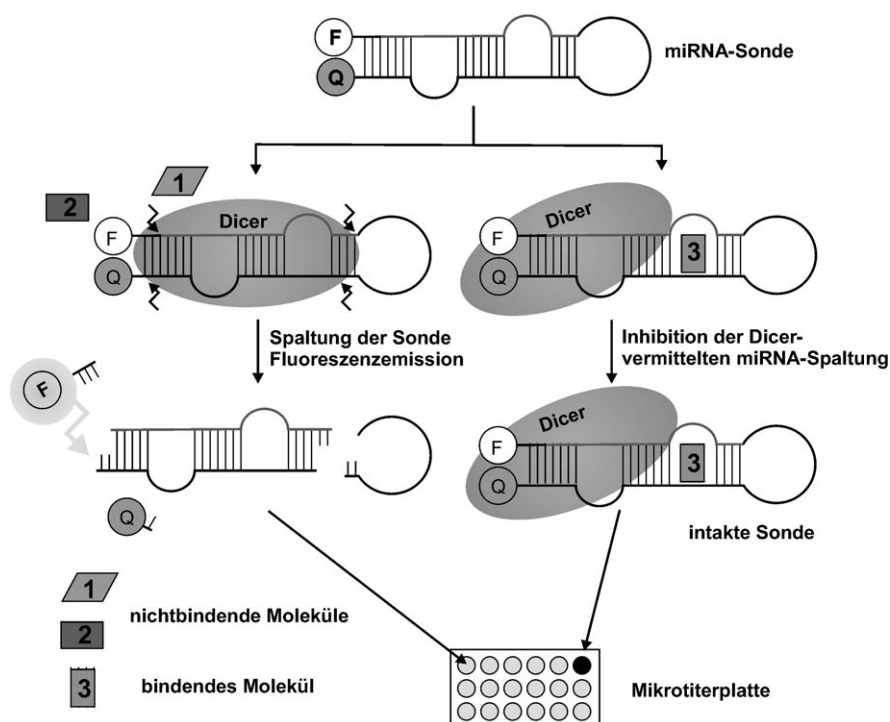


Abbildung 2. Ein homogener Assay der miRNA-Reifung. Links: Die doppelt markierte RNA-Sonde wird von Dicer hydrolysiert, und es kommt zum Fluoreszenzanstieg. Rechts: In Gegenwart von prä-miRNA-Liganden bleibt der Fluoreszenzanstieg aus.

trations- und zeitabhängigen Anstieg der Fluoreszenz je nach Reaktionsbedingungen um das 3- bis 10fache beobachten (Abbildung 3). Das Kontrollexperiment mit hitzeinaktiviertem Dicer zeigte erwartungsgemäß keinen Fluoreszenzanstieg. Nach beendeter Reaktion wurde die RNA ausgefällt und eventuell ebenfalls ausgefallenes Protein durch Phenol-extraktion entfernt. Die elektrophoretische und massenspektrometrische Analyse des Rückstands zeigte unter anderem das Vorliegen der erwarteten ca. 22meren RNAs.

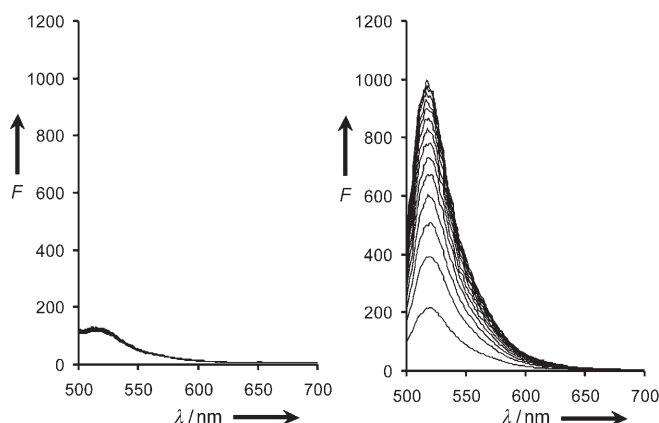


Abbildung 3. Inkubation der prä-miRNA-Sonde mit hitzeinaktiviertem Dicer (links) und mit nativem rekombinantem Dicer (rechts). Die Fluoreszenz wurde alle zehn Minuten gemessen.

Um die Eignung der Reaktion für Screenings im Hochdurchsatzverfahren zu demonstrieren, wurden alle weiteren Experimente in handelsüblichen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Als nächstes wollten wir testen, ob statt des gereinigten rekombinanten Dicer-Enzyms auch Zelllysate als Enzymquelle eingesetzt werden können. Dies hätte den Vorteil, den homogenen Assay unter realistischeren Bedingungen durchzuführen, da Dicer in zellulärer Umgebung mit weiteren Proteinen wie TRBP (transactivating response binding protein) wechselwirkt. TRBP erhöht nicht nur die Geschwindigkeit der Dicer-vermittelten RNA-Hydrolyse *in vitro*, sondern es ist auch wesentlich für die korrekte zelluläre Funktion der miRNAs.^[12] Um eine mögliche unspezifische Hydrolyse durch eine andere RNase zu verhindern, wurde der Reaktionsansatz zusätzlich mit RNase-Inhibitor versetzt. Wie erwartet führte die Zugabe von 10 % HEK-293-Zelllysate zu unserer Sonde zu einem besonders schnellen Anstieg der Fluoreszenz, der durch unterschiedliche Konzentrationen an RNase-Inhibitor nicht beeinflusst wurde. Der Zusatz von RNase-Inhibitor führte auch beim Einsatz von gereinigtem rekombinantem Dicer zu keinerlei Inhibition der hydrolytischen Aktivität. Die Selektivität des RNase-Inhibitors kann dadurch erklärt werden, dass Dicer als Ribonuclease der Klasse III nur geringe Ähnlichkeit zu z.B. RNase A hat, die zur Klasse I der RNasen gezählt wird. Vorheriges Erhitzen des Zelllysats oder die Zugabe von Erbium(III)-chlorid, einem Inhibitor von Dicer,^[13] hingegen führten dazu, dass die Fluoreszenz konstant auf dem Basiswert blieb.^[14]

Zur Beantwortung der Frage, ob die Sonde sich prinzipiell für die Identifizierung von Inhibitoren der miRNA-Reifung eignet, wurde der Reaktionsansatz jeweils mit unterschiedlichen potenziellen prä-miRNA-Liganden versetzt. Das Aminoglykosidantibiotikum Kanamycin bindet bevorzugt an bakterielle ribosomale 70S-RNA.^[15] In einer Konzentration von 100 μM zeigte Kanamycin eine etwa 40-proz. Reduktion des Fluoreszenzanstiegs verglichen mit der Referenzreaktion. Da Dicer die inhärente Eigenschaft zur Bindung von miRNAs aufweist, haben wir drei von der Dicer-Aminosäuresequenz abgeleitete Dodecapeptide als potenzielle Binder

der prä-let-7-RNA synthetisiert (siehe Hintergrundinformationen). In einer Konzentration von 100 μM zeigten die Peptide S117 und S417 nur eine moderate Inhibition von 10 bis 20 % (siehe Hintergrundinformationen). Das Peptid S186 hingegen führte bei dieser Konzentration zu einer Inhibition von ca. 85 % (Abbildung 4). Wurde das gleiche Peptid in 10

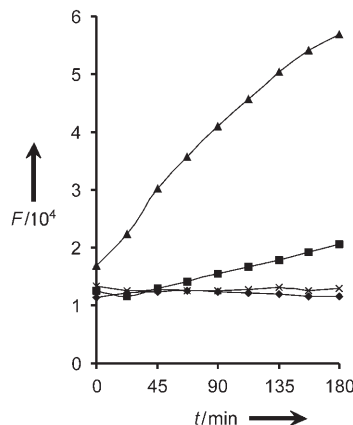


Abbildung 4. Fluoreszenzanstieg bei Zugabe des rekombinanten Dicer-Enzyms mit (■) und ohne (▲) 100 μM S186. Es wird eine Inhibition der prä-let-7-Prozessierung von ca. 85 % beobachtet. Kontrollen: 10 μM ErCl_3 (◆) und hitzeinaktiviertes Dicer mit S186 (×).

bzw. 1 μM eingesetzt, war eine Inhibition des Fluoreszenzanstiegs von 30 bzw. 10 % zu beobachten.^[16] Interessanterweise waren die Inhibitionen für alle eingesetzten Liganden etwas niedriger, wenn anstelle des rekombinanten Dicer-Enzyms Zelllysate als Enzymquelle eingesetzt wurde. Der Grund hierfür liegt vermutlich in einer Herabsetzung der aktiven Ligandenkonzentration durch unspezifische Bindung an zelluläre Nucleinsäuren.

Kleine regulatorische RNA-Moleküle sind potenzielle Zielstrukturen für zukünftige Wirkstoffe. Wir haben hier ein Konzept vorgestellt, nach dem die Funktion von regulatorischen miRNAs durch eine Blockierung der entsprechenden inaktiven Vorstufen manipuliert werden könnte. Mit unserer doppelt markierten prä-let-7-RNA-Sonde konnten wir den ersten homogenen Fluoreszenzassay für Dicer entwickeln. Diese Sonde eignet sich zur Identifizierung potenzieller Inhibitoren der prä-let-7-RNA-Reifung. Wir errechneten die Kosten für die RNA-Sonde zu unter fünf Eurocent pro Messpunkt in der Platte mit 96 Vertiefungen (100 μL Reaktionsvolumen). Diese Kosten reduzieren sich entsprechend beim Einsatz von 384er- oder 1536er-Platten, was auch das Screening größerer Substanzbibliotheken ermöglicht. Die Suche nach prä-miRNA-Liganden für eine Blockierung der microRNA-Reifung steht damit jedoch erst am Anfang. Zukünftige Forschung muss vor allem die Frage nach der Selektivität von prä-miRNA-Liganden beantworten.

Experimentelles

Assaybedingungen: 50 nM prä-miRNA-Sonde, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan), pH 7.4, 2.5 mM

MgCl₂ und 1 mM Dithiothreitol und 5–25 U mL⁻¹ rekombinantes Dicer (Stratagene/Genlantis).

Oder: Wie oben, jedoch mit 10 % HEK-293-Zelllysat (entspricht einer Proteinkonzentration im Assay von 10–25 µg).

Eingegangen am 4. April 2006

Online veröffentlicht am 21. Juli 2006

Stichwörter: Enzymkatalyse · Fluoreszenzassay · Genexpression · microRNAs · RNA-Erkennung

- [1] K. Hinterding, D. Alonso-Diaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 716–780; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 688–749.
- [2] Aktuelle Übersichten: a) E. J. Sontheimer, R. W. Carthew, *Cell* **2005**, *122*, 9–12; b) C. M. Croce, G. A. Calin, *Cell* **2005**, *122*, 6–7.
- [3] Aktuelle Beispiele: a) G. A. Calin, M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-g. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, C. M. Croce, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1793–1801; b) P. M. Voorhoeve, C. le Sage, M. Schrier, A. J. Gillis, H. Stoop, R. Nagel, Y. P. Liu, J. van Duijse, J. Drost, A. Griekspoor, E. Zlotorynski, N. Yabuta, G. De Vita, H. Nojima, L. H. Looijenga, R. Agami, *Cell* **2006**, *124*, 1169–1181; c) N. Yanaihara, N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R. M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G. A. Calin, C. G. Liu, C. M. Croce, C. C. Harris, *Cancer Cell* **2006**, *9*, 189–198.
- [4] M. P. Czech, *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 1194–1195.
- [5] Übersichten: a) T. Hermann, E. Westhof, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 66–73; b) Q. Vicens, E. Westhof, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1018–1023.
- [6] T. Hermann, E. Westhof, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2000**, *3*, 219–234.
- [7] a) W. Tan, X. Fang, J. Li, X. Liu, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1107–1111; b) A. Jenne, W. Gmelin, N. Raffler, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1383–1386; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1300–1303.
- [8] E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, *Science* **1990**, *247*, 954–958.
- [9] G. Hutvagner, J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, P. D. Zamore, *Science* **2001**, *293*, 834–838.
- [10] H. Zhang, F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, W. Filipowicz, *Cell* **2004**, *118*, 57–68.
- [11] A. Vermeulen, L. Behlen, A. Reynolds, A. Wolfson, W. S. Marshall, J. Karpilow, A. Khvorova, *RNA* **2005**, *11*, 674–682.
- [12] A. D. Haase, L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Laine, R. Sack, A. Gagnol, W. Filipowicz, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 961–967.
- [13] I. J. Macrae, K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. N. Brooks, W. Z. Cande, P. D. Adams, J. A. Doudna, *Science* **2006**, *311*, 195–198.
- [14] Die Inkubation mit Dicer-Antikörper (Ambion) führte weder im Zelllysat noch bei Verwendung des gereinigten rekombinanten Enzyms zu einer Verlangsamung des Fluoreszenzanstiegs.
- [15] a) A. Okuyama, N. Tanaka, T. Komai, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 903–905; b) H. Wang, Y. Tor, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 117–120; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 109–111.
- [16] Für die Sequenzen der Peptide siehe Hintergrundinformationen.