

# RNA Interferenz – Hintergrund und Perspektiven

Dr. Michael Meinhard, Fabrikstr. 6, 85354 Freising, michaelmeinhard@aol.com

Ob Graig Mello and Andrew Fire vom Carnegie Institut in Baltimore den Sekt schon kalt gestellt haben, ist nicht bekannt. Doch dass sie zusammen mit anderen Wissenschaftlern in den nächsten Jahren zu den hohen Favoriten auf einen Nobelpreis gehören, ist mehr als wahrscheinlich. Die Begriffe, die man rund um den Mechanismus findet, zu dessen Aufklärung Fire und Mello wesentlich beigetragen haben, nähren diesen Anspruch: „Revolution“, „Durchbruch des Jahres“, „aufregendste Entdeckung der Biologie der letzten 10 oder 20 Jahre“. Doch worum geht es bei RNA-Interferenz?

## Prinzipien der Genregulation

Gene und Proteine: das waren bisher die Hauptdarsteller auf der Bühne des Lebens. Gene, verpackt in Chromosomen, liefern das Programm für Entwicklung und Bestand eines Organismus, werden vererbt von Generation zu Generation.

Doch ein Gen allein besteht zuerst lediglich aus zwei komplementären Strängen DNA, jeder Strang zusammengesetzt aus einer Abfolge der 4 Nucleotide Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Erst mit der Synthese komplexer Proteine, resultierend aus der „Aktivität“ der Gene (auch „Genexpression“), wird das Programm zur Handlung.

Aber wie wird aus DNA Protein? Wie wird aus dem relativ simplen genetischen Code eine molekulare Maschine, die chemische Reaktionen beschleunigt, Energie umwandelt oder – im Großen betrachtet – Krankheiten auslöst oder verhindert?

Die Antwort auf diese Fragen ist eine Doppelte (Abb. 1):

1. Transkription: die Umschreibung der DNA in mRNA
2. Translation: die Übersetzung der mRNA in eine Polypeptidkette (Protein)

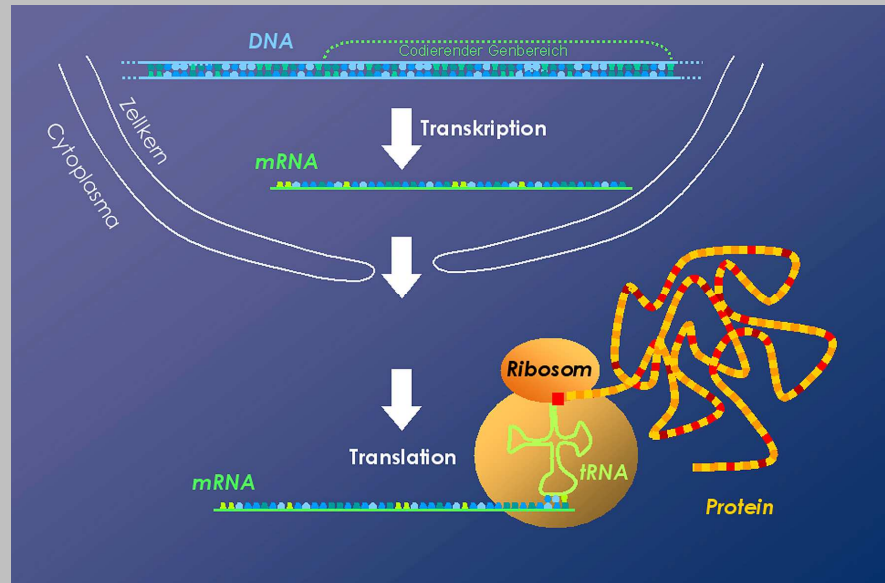
Hinter diesen Begriffen steht ein Dogma der Biologie, das bereits in den 60er Jahren formuliert wurde: die genetische Information wird von der DNA nicht direkt in Proteine umgewandelt. Vielmehr erfolgt zuerst die Umschreibung (Transkription) der DNA in die chemisch verwandte RNA. Dies ist eine mobile Form der Information und wird daher auch mRNA (*messenger RNA = Boten-RNA*) genannt. Die im Gegensatz zur DNA einsträngige mRNA durchwandert die Zelle, bis schließlich in hochspezialisierten Protein-Maschinen - den Ribosomen - die Information in eine Bauanleitung für einzelne Proteine übersetzt wird. Stellen die etwa 25000 Gene des menschlichen Genoms die festen Programminformationen dar, kann man in der mRNA den dynamischen Arbeitsspeicher der Zelle sehen, der die Umsetzung des Programms vermittelt. Erst das Zusammenspiel der Proteine die daraus hervorgehen, bestimmen Funktion, Form und Zustand der Zelle.

Ob, wann und wie stark ein einzelnes Gen über Translation und Transkription in ein Protein umgewandelt wird, kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden.

Die am besten untersuchte Kontrollinstanz ist die Regulation der Transkription, doch zunehmend steigt auch das Interesse an der Regulation auf Ebene der mRNA. An diesem Punkt kommen wieder Fire und Mello ins Spiel. Schon in zu Beginn der 90er Jahre stießen verschiedene Wissenschaftler auf ein Phänomen, für das sie zunächst keine Erklärung fanden. In transgenen Pflanzen, in denen die Synthese spezifischer Proteine durch Einbringung einer zusätzlichen Kopie des vorhandenen Gens gesteigert werden sollte, geschah zuweilen das Gegenteil: die Genexpression wurde abgeschaltet oder folgte unerwarteten Mustern (Napoli et al., 1990). Der Durchbruch zum Verständnis dieser überraschenden Ergebnisse erfolgte dann im Jahr 1998 mit einer Studie aus der Arbeitsgruppe von Fire und Mello: brachten sie doppelsträngige RNA in Zellen des

**Abb.1 Der Weg der genetischen Information**

1. Transkription: die doppelsträngige chromosomale DNA dient als Muster für die Synthese einzelsträngiger mRNA
2. Translation: die mRNA verlässt den Kern. Mit Hilfe der tRNA wird die Information ausgelesen und in den Ribosomen zur Verkettung einzelner Aminosäuren zu Polypeptidketten genutzt. Nach Faltung der Ketten entstehen die funktionsfähigen Proteine



Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* ein (d.h. RNA, die wie die DNA aus zwei komplementären Strängen besteht), wurde das entsprechende Gen mit hoher Effizienz und Selektivität abgeschaltet. Bereits das Füttern der Würmer mit dsRNA führte zum gezielten k.o. der angepeilten Gene (Timmons und Fire, 1998).

Es musste also einen Mechanismus geben, der doppelsträngige RNA erkennen konnte und im folgenden Gene mit entsprechender DNA-Sequenz auf unbekannte Weise abschaltete. Dieser Mechanismus wurde als RNA-Interferenz bezeichnet, kurz: RNAi.

Die Fragen die sich daraus ergaben, haben viele Wissenschaftler in den letzten 6 Jahren zu aufschlussreichen Studien angeregt:

- 1) Wie sieht der RNAi-Mechanismus aus?
- 2) Welche biologische Funktion kann ein solcher Mechanismus haben?
- 3) Welche Perspektiven für die Medizin ergeben sich durch RNAi?

### Wie sieht der RNAi-Mechanismus aus?

Ein sowohl faszinierender als auch hilfreicher Aspekt ist die Tatsache, dass sich RNAi sowohl in Tieren als auch in Pflanzen und Pilzen in sehr ähnlicher Ausprägung finden

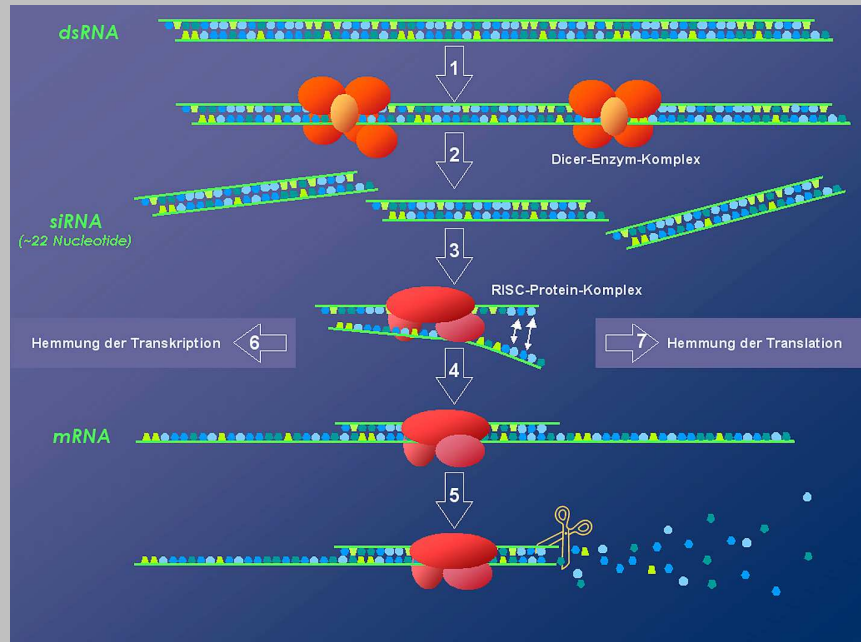
lässt. Dies war ein entscheidender Vorteil bei der Erforschung des RNAi-Mechanismus.

Ausgangspunkt ist grundsätzlich die Präsenz doppelsträngiger RNA (dsRNA, Abb.2; Hannon, 2002). dsRNA wird von einem Multiprotein-Komplex gebunden (1) und in kleinere Fragmente mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden zerstückelt (2), die sogenannte siRNA (*short interfering RNA*). Im Experiment gibt es zwei Möglichkeiten, Zellen mit dsRNA zu beladen: entweder man bringt spezifische Gene in die Zellen ein, die die Transkription doppelsträngiger RNA ermöglichen oder man bietet synthetisch produzierte siRNA an (Elbashir et al., 2001) und umgeht damit die Aktivität des Dicer-Komplexes. Die siRNA-Fragmente werden nun durch eine zweite Enzymmaschine erkannt, dem RISC-Komplex (3). Dieser trennt die beiden Stränge der siRNA und ermöglicht somit das Andocken komplementärer mRNA-Stränge (4). Es folgt der Abbau der mRNA durch spezialisierte Enzyme, die Nukleasen (5).

Die hohe Effektivität des RNAi-Mechanismus beruht auf weiteren Vervielfältigungsschritten, bei denen die siRNA Bruchstücke als Vorlage zur Bildung zusätzlicher dsRNA dienen. Je nach Organismus und Eigenschaften der dsRNA kann der RNAi-Mechanismus zusätzliche Effekte auf Ebene der Transkription (DNA > mRNA) oder auf die Translation (mRNA > Protein) haben. So

**Abb.2 Ein Modell für den RNAi Mechanismus**

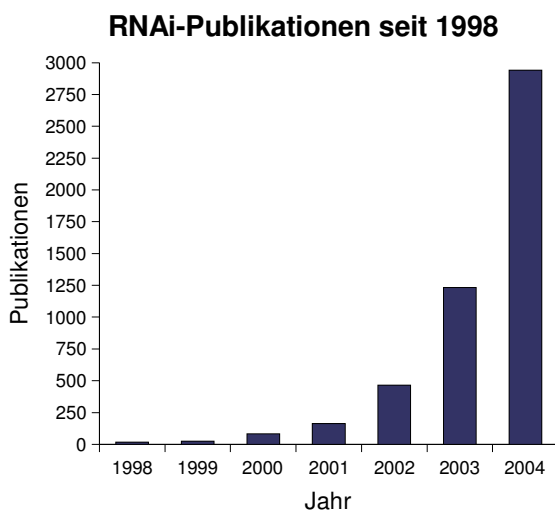
Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird von dem Enzymkomplex „Dicer“ gebunden (1) und zu kleinen Fragmenten von ca. 22 Nucleotiden Länge prozessiert. (2). Die Einzelstränge dieser siRNA werden nach Bindung an den RISC-Komplex getrennt (3). Der im RISC verbleibende Einzelstrang ermöglicht nun die Kopplung komplementärer mRNA (4), was schließlich den Abbau der mRNA auslöst (5). Je nach Form und Herkunft der siRNA kann die Bindung an den RISC-Komplex auch Auswirkungen auf die Transkription (6) oder die Translation (7) haben.



führt in Pflanzen dsRNA mit Homologie zu regulatorischen Bereichen von Genen (Promotor-Regionen) zu Veränderungen der Chromosomen-Struktur in diesem Bereich (Hannon, 2002).

**Welche biologische Funktion kann ein solcher Mechanismus haben?**

Natürlich ist eine solch komplexe und in der Evolution konservierte Einrichtung keine Laune der Natur. Was bewegt die Zelle also dazu, diesen Apparat aufrecht zu erhalten? Ein wesentlicher Aspekt wird sofort deutlich, wenn man sich in Erinnerung ruft, dass die genetische Information vieler Virenarten in Form von RNA vorliegt. Bei der Vervielfältigung der genetischen Information sind viele dieser RNA-Viren (wie z.B. Polio, Tollwut) auf dsRNA angewiesen. So scheint die Erkennung und Zerstörung von dsRNA eine sinnvolle Strategie gegen virale Invasoren darzustellen. In einem anderen Zusammenhang gehört die Beobachtung, dass Zellen unabhängig von Viren siRNA-ähnliche Moleküle produzieren. Diese als miRNA (microRNAs) bezeichnete Klasse kleiner dsRNA-Fragmente besitzt offensichtlich Funktionen in der Regulation der Genaktivität.



**Abb.3 Entwicklung der Forschung an RNAi**

Die Grafik repräsentiert die Anzahl der Publikationen, die mit dem Schlagwort „RNA interference“ und der jeweiligen Jahreszahl in der Datenbank der „National Library of Medicine“ gefunden wurden. Stand: Dezember 2004 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>)

Die komplexe Welt der RNAi ist vielleicht das aufregendste Thema der Biologie des letzten Jahrzehnts, man mag gar von einem „RNAi-Hype“ sprechen (Abb. 3). Dies weckt zwangsläufig große Hoffnungen auf neue Entwicklungen und Chancen für die Medizin.

## Welche Perspektiven für die Medizin ergeben sich durch RNAi?

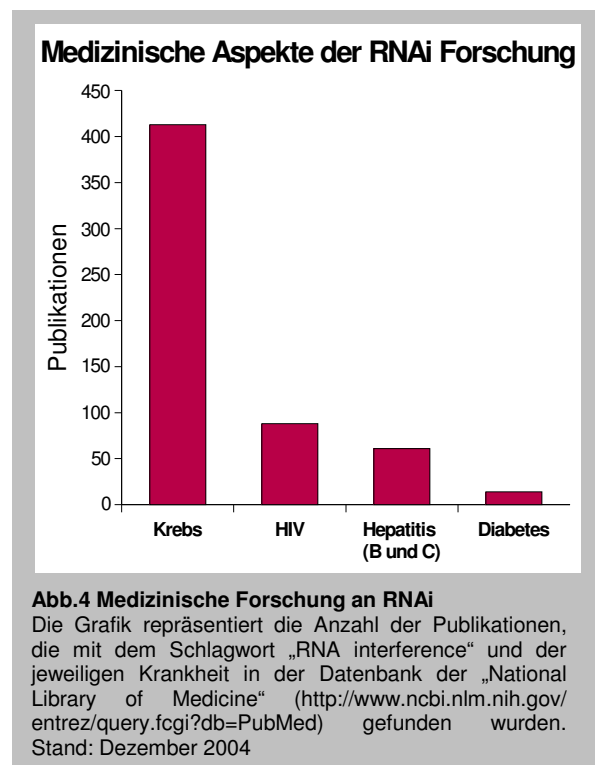
Die Vorteile für die Nutzung von RNAi in der Medizin liegen auf der Hand: Effektivität und Spezifität. Im Prinzip sollte sich fast jedes Gen durch die gezielte Einbringung von dsRNA oder siRNA ausschalten lassen. So einfach dies klingt, stehen der medizinischen Verwertbarkeit jedoch noch große Hürden entgegen. Denn was in Fadenwurm, Fruchtfliege und isolierten Zellkulturen hervorragend funktioniert, stößt in der medizinischen Anwendung auf unvorhergesehene Schwierigkeiten. Ein Hauptproblem ist die Beobachtung, dass in humanen Zellen längere dsRNA eine unspezifische Reaktion, die sogenannte Interferon-Antwort, auslösen. Diese Reaktion zeichnet sich im Wesentlichen durch eine Reduktion der Transkription auf breiter Basis aus, die schließlich zum Zelltod führt. Als gangbare Alternative gilt derzeit die Verwendung von siRNA. Auf dem Weg zum Zielort ist jedoch der Abbau der siRNA durch Nukleasen ein Hindernis. Verschiedene experimentelle Ansätze versuchen, dieses Problem zu umgehen. Zum einen bietet sich die direkte Applikation von synthetisch hergestellter siRNA an den Wirkungsort an, beispielsweise durch Einspritzung in den Blutkreislauf. Vielseitiger wird die Anwendung jedoch durch Haltbarmachung der siRNA-Moleküle mit Hilfe chemischer Modifikationen (Layzer et al., 2004). Ein weiterer Ansatz ist die aus der Gentherapie bekannte Nutzung nicht-pathogener Viren (z.B. Adenoviren) als Genfähren. In Tierversuchen wird aktuell die Anwendbarkeit dieser unterschiedlichen Verfahren erprobt (Soutschek et al., 2004).

Führt man eine Recherche zu RNAi-Literatur hinsichtlich medizinisch relevanter Begriffe durch (Abb. 4), fällt die hohe Zahl von Publikationen mit Bezug zu Krebserkrankungen auf. Ein großer Teil der Untersuchungen befasst sich mit der Suche nach Onkogenen, d.h. den Ursachen von Krebserkrankungen. Ein wichtiges Werkzeug ist dabei die Nutzung umfangreicher RNAi-Bibliotheken, die das Genom verschiedener Modellorganismen weitgehend abdecken

sollen (*Gene Therapy* 12, 2005). Durch RNAi-abhängige Ausschaltung der Gene und den Vergleich mit dem humanen Genom erhofft man sich neue Erkenntnisse zu Ursachen und Behandlungsmöglichkeiten menschlicher Krebserkrankungen (Lucentini, 2004). Ein weiteres Ziel ist die Umgehung der während Chemotherapien häufig auftretenden Arzneimittel-Resistenzen. Modellversuche zeigen, dass durch gezielten Knockout der Expression des für die Resistenz verantwortlichen P-Glycoproteins die Effizienz der Krebsbehandlung erheblich gesteigert werden könnte (Yague et al., 2004).

Mäusen intravenös verabreichte siRNA sammelt sich vor allem in der Leber an. Erkrankungen der Leber wie Hepatitis B und C sind daher ideale Testsysteme für die anwendungsorientierte RNAi-Forschung. Auch hier gibt es im Maus-Modell bereits erste ermutigende Fortschritte (Ryther et al., 2005).

Darüber hinaus sind viele weitere Krankheitsbilder sowie genetische Defekte im Visier der RNAi-Forscher. Mitte November verkündete das amerikanische Biotech-Unternehmen Sirna Therapeutics Inc. den Start



der ersten klinischen Studie mit einem RNAi-basierten Therapeutikum. Die Phase 1 Studie umfasst 30 Patienten, die unter altersbedingter Makuladegeneration leiden. Andere Unternehmen haben ähnliche Studien angekündigt. Damit ist der Startschuss für ein neues Rennen auf dem Pharmamarkt gegeben, bei dem es nicht nur um den Lorbeer für das erste marktfähige Produkt geht, sondern auch um einen gewaltigen Markt. Bereits mehr als 75 Unternehmen beteiligen sich im RNAi-Markt und Prognosen gehen für das Jahr 2010 von Einnahmen in Höhe von etwa 250 Millionen € aus (Pallarito, 2004).

Innerhalb kürzester Zeit ist somit aus den Beobachtungen an Fadenwürmern ein Markt mit gewaltigem Wachstumspotential geworden. Ob sich die hochfliegenden Hoffnungen erfüllen oder – wie bei den bisherigen gentherapeutischen Anläufen – relativ schnell Ernüchterung eintritt, werden die nächsten Jahre zeigen. Was auf jeden Fall bleiben wird, ist der immense Einfluss der Entdeckung des Prinzips RNAi auf die Grundlagenforschung in Biologie und Medizin. Daher sollten die Wissenschaftler um Mello und Fire auf jeden Fall Platz für einige Flaschen im Laborkühlschrank freihalten. Ω

## Literatur

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001 411:494-498.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 391: 806-811.

*Gene Therapy* 12, 2005 (Sonderausgabe mit verschiedenen Artikeln zur Entwicklung von RNAi Therapeutika).

Hannon, G.J. (2002) RNA interference. (Review) *Nature* 418: 244-251.

Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. (2004) *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 10:766-771.

Lucentini, J (2004) Silencing cancer. *The Scientist* 18:14-15.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthetase gene in *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* 2:279-289.

Pallarito, K (2004) Fueling the fires of RNA interference. *The Scientist* 18:18-19.

Ryther RCC, Flynt AS, Phillips III JA, Patton JG (2005) siRNA therapeutics: big potential from small RNAs (Review). *Gene Therapy* 12:5-11

Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432:173-178.

Timmons L, Fire A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854.

Yague E, Higgins CF, Raguz S.(2004) Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Therapy* 11:1170-1174.