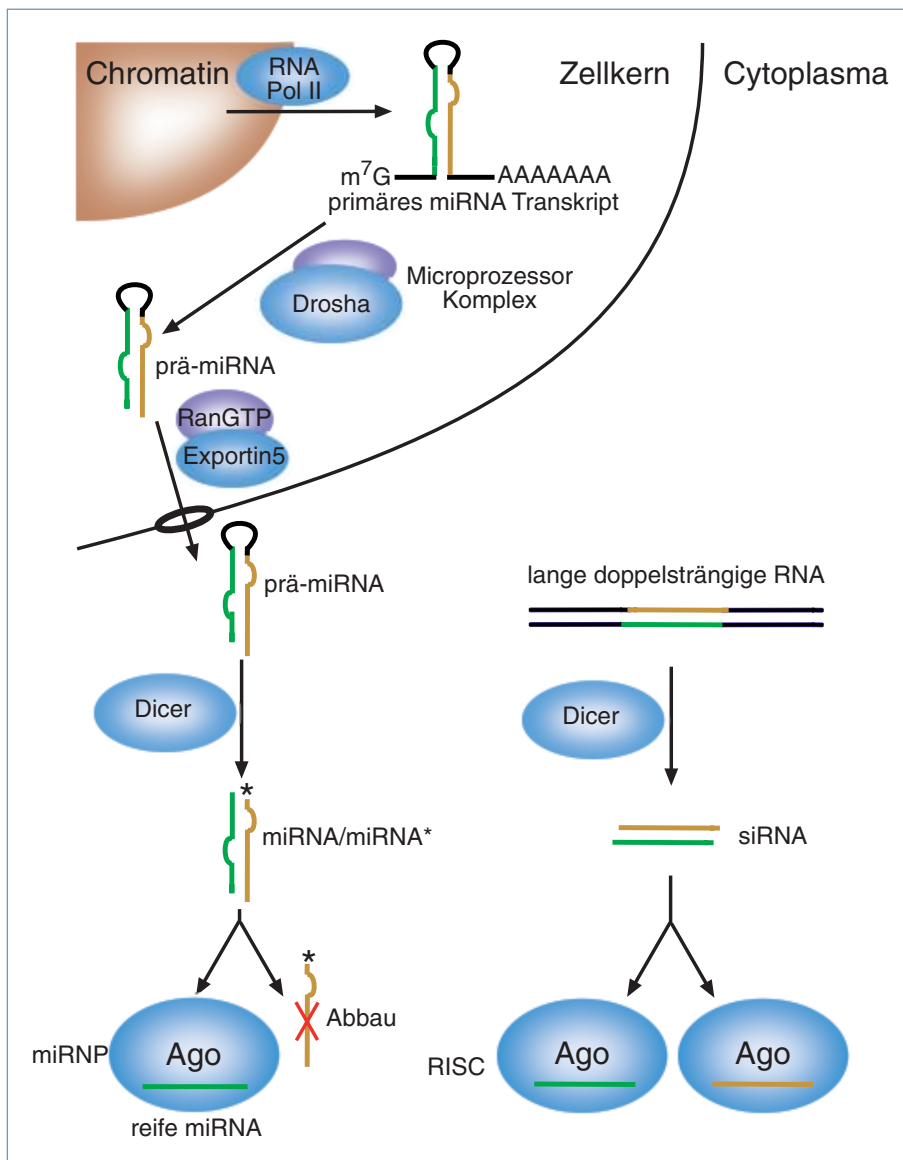


Regulatorische RNAs

Kleine nicht-kodierende RNAs als Regulatoren der Genexpression

LASSE PETERS UND GUNTER MEISTER
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, MARTINSRIED

RNA-Moleküle transportieren nicht nur die genetische Information von der DNA zu den Protein-Manufakturen der Zelle, sondern nehmen auch wichtige regulatorische Funktionen wahr.



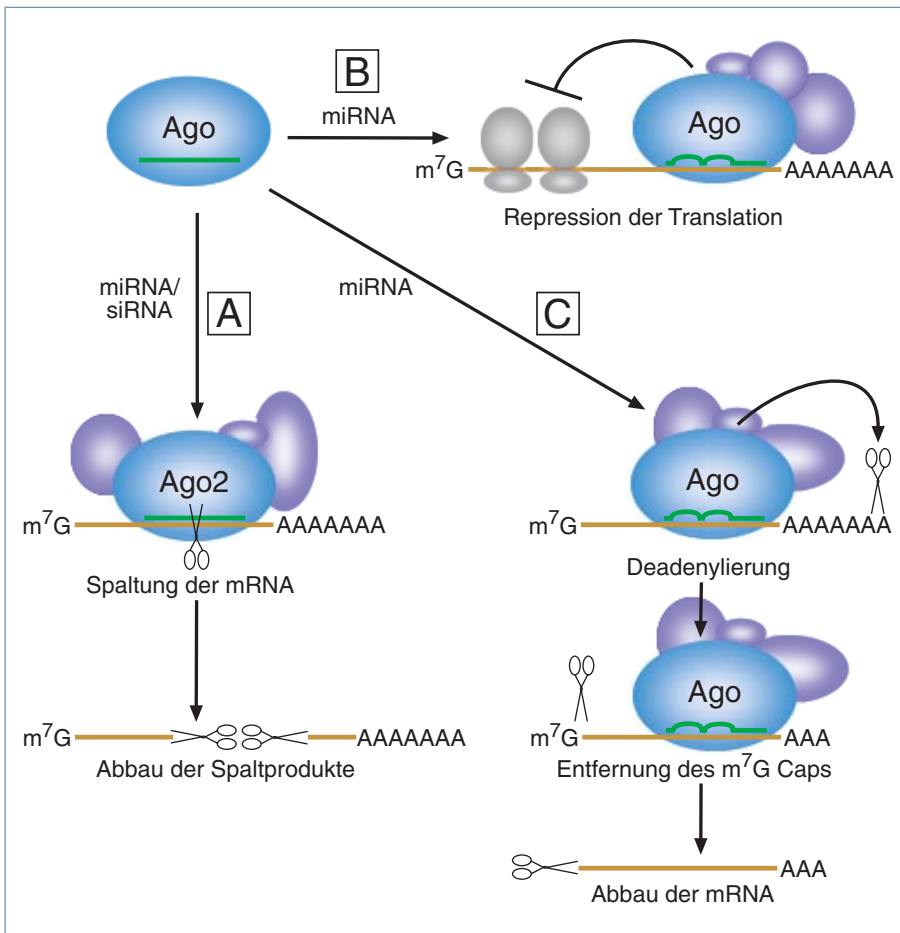
▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der Biogenese von miRNAs und siRNAs. Details siehe Text. m⁷G, 7-Methyl-Guanin; AAAAA, Poly-A-Schwanz.

■ Nicht-kodierenden RNAs sind an Prozessen wie mRNA-Prozessierung oder Protein-Synthese beteiligt. Eine neue, erst kürzlich in vollem Umfang entdeckte Klasse nicht-kodierender RNAs ist durch ihre ungewöhnliche Länge gekennzeichnet und wird daher als kleine nicht-kodierende oder kleine regulatorische RNA bezeichnet. Kleine nicht-kodierende RNAs wie *short interfering RNA* (siRNAs) oder *microRNAs* (miRNAs) beeinflussen sowohl die Stabilität von mRNAs als auch deren Translation und sind daher wichtige zelluläre Regulatoren der Genexpression. siRNAs haben sich zudem in kurzer Zeit zu wichtigen Werkzeugen der Grundlagenforschung entwickelt und könnten in Zukunft auch zur Therapie von Krankheiten eingesetzt werden.

Doppelsträngige RNA als Schlüssel-molekül

Bei allen bisher untersuchten Genregulationsprozessen, die durch kleine regulatorische RNAs gesteuert werden, fungiert doppelsträngige RNA (dsRNA) als entscheidendes Schaltermolekül. Die dsRNA kann dabei sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein. Quellen von dsRNA in der Zelle sind Replikations-Intermediate mancher Viren, artifiziell eingebrachte dsRNA aber auch Faltungsstrukturen einzelsträngiger RNAs wie zum Beispiel Haar-Nadel-Strukturen von miRNA-Vorläufern^[1]. Endogen exprimierte miRNAs werden als primäre miRNA-Transkripte durch die RNA-Polymerase II im Zellkern transkribiert und durch das RNase-III-Enzym Drosha zu miRNA-Vorläufermolekülen (prä-miRNAs) prozessiert^[2, 3]. Nach dem Transport ins Zytoplasma wird die prä-miRNA durch das RNase-III-Enzym Dicer zu einer 20–23 Nukleotide umfassenden dsRNA gespalten. Diese kurzlebige dsRNA wird schließlich entwunden und die einzelsträngige, reife miRNA in spezifische Protein-Komplexe, miRNPs, inkorporiert (**Abb. 1**)^[1].

Lange dsRNA wird ebenfalls durch das RNase-III-Enzym Dicer zu doppelsträngigen, circa 21 Nukleotide langen siRNAs prozes-



▲ **Abb. 2:** Schematische Darstellung der Funktion von miRNAs. miRNAs können sowohl die Stabilität ihrer Ziel-mRNAs (A, C) als auch deren Translation (B) beeinflussen. m⁷G, 7-Methyl-Guanin; AAAA, Poly-A-Schwanz.

siert. Wie alle RNase-III-Produkte tragen diese kurzen RNA-Moleküle 5'-Phosphatgruppen sowie jeweils zwei Nukleotide lange 3'-Überhänge. Im folgenden Schritt wird die siRNA entwunden und die einzelnen RNA-Stränge in den so genannten *RNA induced silencing complex* (RISC) eingebaut (**Abb. 1**)^[1]. Der gebundene siRNA-Strang führt RISC zu vollständig komplementären Substrat-RNAs, die dann endonukleolytisch gespalten werden – ein Prozess, der als RNA-Interferenz oder RNAi bekannt geworden ist (**Abb. 2A**)^[4].

Auch miRNAs können wie siRNAs wirken und die Spaltung von vollständig komplementären RNAs steuern. Während pflanzliche miRNAs hauptsächlich die Spaltung von Ziel-RNAs bewirken, wurden nur wenige tierische miRNAs mit vollständiger Komplementarität zu zellulären RNAs entdeckt. Tierische miRNAs interagieren hauptsächlich mit unvollständig komplementären Bereichen in den 3' untranslatierten Regionen von mRNAs und inhibieren deren Translation, ohne dabei die Stabilität der mRNA zu beein-

flussen (**Abb. 2B**)^[2, 3]. Darüber hinaus wurde kürzlich ein weiterer Mechanismus der miRNA-vermittelten Genregulation beschrieben. Hierbei rekrutieren miRNAs spezifische Deadenylassen, die den Poly-A-Schwanz der mRNA verkürzen. Dies führt schließlich zum Abbau der mRNA und folglich zur Inhibition der Genexpression (**Abb. 2C**)^[5].

Argonaut-Proteine

Proteine der Argonaut-Protein-Familie (Ago-Proteine) sind zentrale Komponenten aller durch kleine nicht-kodierende RNAs gesteuerten Genregulationsprozesse. Ago-Proteine sind durch PAZ- und PIWI-Domänen gekennzeichnet^[6]. Während die PAZ-Domäne selektiv das 3'-Ende der miRNA oder siRNA bindet, ist die PIWI-Domäne strukturell der RNase H sehr ähnlich^[7]. In der Tat besitzen Ago-Proteine endonukleolytische Aktivität. In menschlichen Zellen kann jedoch nur Ago2 komplementäre RNA-Stränge spalten. In Analogie zu Dicer wird Ago2 daher auch „Slicer“ genannt^[8, 9].

Wichtige Schritte des RNA-Metabolismus finden in der Zelle in spezifischen cytoplasmatischen Kompartimenten, den *processing bodies* (P-bodies), statt. Lokalisationsstudien von humanen Ago-Proteinen haben gezeigt, dass auch Ago-Proteine in P-bodies zu finden sind (**Abb. 3**)^[10, 11]. miRNAs und auch deren Ziel-mRNAs sind ebenfalls in solchen Strukturen anzutreffen. Tatsächlich werden mRNAs in P-bodies nicht notwendigerweise degradiert. Sie können dort gelagert und somit der Translationsmaschinerie entzogen werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass an Ago-Proteinen gebundene miRNAs spezifische Ziel-mRNAs in P-bodies halten und auf diese Weise deren Expression verhindern^[12].

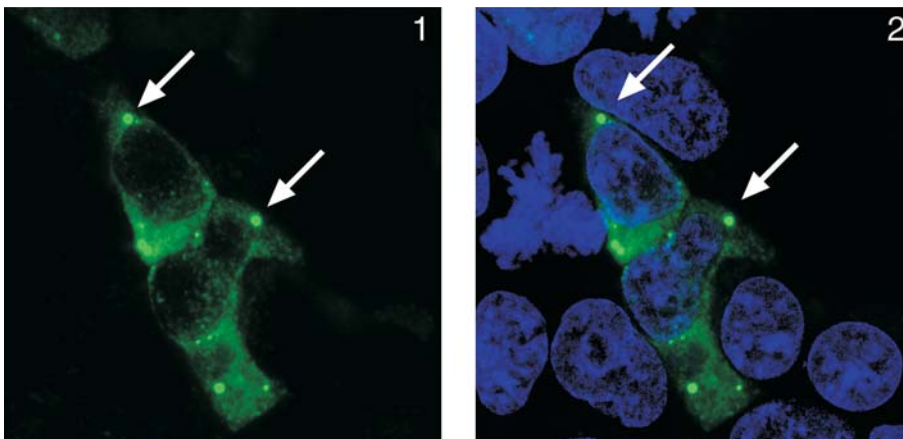
microRNAs und Krebs

Bereits kurz nach der Entdeckung humaner miRNAs wurde berichtet, dass in Lymphomen wie der chronischen, lymphozytischen B-Zell-Leukämie (B-CLL), miRNA-Gene deletiert sind oder deren Expression stark reduziert ist. Bei 68 % der untersuchten Patienten wurde eine Deletion des Genlokus 13q14 gefunden. Genau in diesem Bereich befinden sich die Gene für miR-15 und miR-16 und in der Tat war die miR-15- und miR-16-Expression in B-CLL-Patienten stark reduziert^[13]. Ausgehend von diesen initialen Studien wurde eine Vielzahl von weiteren Studien an verschiedenen Krebsarten durchgeführt. So wurde gefunden, dass in verschiedenen Lymphomarten miR-155 sowie miRNAs des miR-17-92 „clusters“ überrepräsentiert waren. Zudem scheint bei bestimmten Formen von Lungenkrebs die Expression der miRNA let-7 stark reduziert zu sein. Interessanterweise reguliert let-7 die Expression des Onkogens RAS, was bei verminderter let-7 Expression zu einer verstärkten Expression von RAS führt und somit die Krebsentstehung begünstigt^[13].

Derzeit werden miRNA-Expressionsstudien an weiteren Krebsarten durchgeführt und es ist sehr wahrscheinlich, dass miRNAs an der Entstehung von einer Vielzahl von Krebsarten maßgeblich beteiligt sind. Sequenz-spezifische Inhibitoren von überrepräsentierten miRNAs aber auch die ektopische Expression von deletierten oder unterrepräsentierten miRNAs wird daher in naher Zukunft neue Möglichkeiten zur Bekämpfung von Krebs liefern.

RNAi als neuer Weg zur Therapie von Krankheiten

Kurz nachdem Tuschl und Kollegen im Jahre 2001 die prinzipielle Durchführbarkeit von



▲ **Abb. 3:** Lokalisation von Argonaute-Proteinen in HEK 293 Zellen. Teilabbildung 1 zeigt die Färbung mit anti-Argonaute-Antikörpern. P-bodies sind durch Pfeile gekennzeichnet. In Teilabbildung 2 sind die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

RNAi in humanen Zellen demonstriert hatten, begann die Entwicklung neuartiger, auf siRNAs beruhender Medikamente. Bereits 2003 wurde eine erste Studie publiziert, in der durch Injektion von siRNAs in die Blutbahn der Maus die Expression eines Leberspezifischen Gens ausgeschaltet werden konnte^[14]. In weiteren Studien wurde versucht, Viren mit siRNAs zu inaktivieren, da siRNAs gegen virale RNAs für die menschliche Zelle harmlos sind. Später wurden modifizierte siRNAs in Mäuse injiziert, was die Aufnahme in die Zellen erleichtern sollte. Tatsächlich zeigte sich, dass solche siRNAs spezifisch die ApoB-mRNA in der Leber von Mäusen reduziert. ApoB ist an der Regulation des Cholesterolaushaltes beteiligt und es konnte beobachtet werden, dass die Cholesterolmengen im Blut durch diese siRNAs reduziert wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich an nicht-humanen Primaten erzielt. Ein sehr ermutigendes Ergebnis dieser Studien war allerdings, dass keinerlei Toxizität der verabreichten siRNAs beobachtet wurde^[14].

Obwohl beachtliche Erfolge erzielt wurden, steckt die Entwicklung von siRNA-Medikamenten noch in den Kinderschuhen. Wichti-

ge Hürden, die es zu überwinden gilt, sind die Aufnahme von siRNAs in Gewebe oder Zellen, Sequenz-spezifische „off-target“-Effekte einzelner siRNAs sowie Resistenzentwicklung vor allem bei der Applikation von antiviralen siRNAs. Obwohl es sicherlich noch Jahre dauern wird, bis all diese Probleme gelöst sein werden, stellen siRNAs dennoch einen viel versprechenden neuartigen Ansatz zur Bekämpfung von unterschiedlichsten Krankheiten dar, vor allem solcher, die bislang noch nicht effizient bekämpft werden konnten. ■

Danksagung

Unsere Arbeit wird von der Max-Planck-Gesellschaft sowie von der DFG (ME-2064/2) unterstützt. Lasse Peters ist Stipendiat des Boehringer Ingelheim Fonds.

Literatur

- [1] Meister, G., Tuschl, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343–349.
- [2] Ambros, V. (2004): The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350–355.
- [3] Bartel, D.P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
- [4] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811.

- [5] Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., Izaurralde, E. (2006): mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20: 1885–1898.
- [6] Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., Hannon, G.J. (2002): The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16: 2733–2742.
- [7] Hall, T.M. (2005): Structure and function of argonaute proteins. *Structure* 13: 1403–1408.
- [8] Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J. (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437–1441.
- [9] Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., Tuschl, T. (2004): Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15: 185–197.
- [10] Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., Parker, R. (2005): MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell. Biol.* 7: 719–723.
- [11] Sen, G.L., Blau, H.M. (2005): Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell. Biol.* 7: 633–636.
- [12] Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W. (2006): Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125: 1111–1124.
- [13] Chen, P.Y., Meister, G. (2005): microRNA-guided post-transcriptional gene regulation. *Biol. Chem.* 386: 1205–1218.
- [14] Dykxhoorn, D.M., Lieberman, J. (2006): Knocking down Disease with siRNAs. *Cell* 126: 231–235.



Korrespondenzadresse:

Dr. Gunter Meister¹
Lasse Peters²
Arbeitsgruppe RNA Biologie
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18
D-82152 Martinsried
Tel.: 089-8578-3042
Fax: 089-8578-3022
meister@biochem.mpg.de