

Darmlose marine Würmer

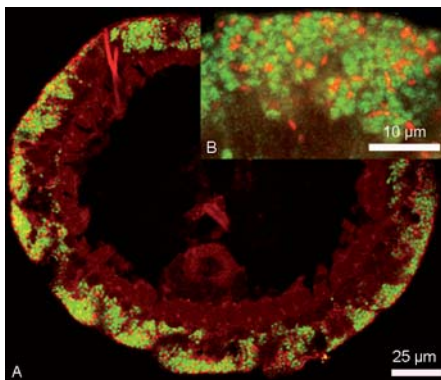
Symbiosen mit mikrobiellen Konsortien

CAROLINE RÜHLAND, CLAUDIA BERGIN, CHRISTIAN LOTT UND NICOLE DUBILIER
 MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MARINE MIKROBIOLOGIE, BREMEN

Darmlose Oligochaeten sind kleine Meereswürmer von 1–2 cm Länge und 0,2 mm Durchmesser, die weder Mund noch Darm noch Nephridien besitzen. Stattdessen beherbergen sie bakterielle Endosymbionten, die die Funktion des Verdauungs- und Exkretionssystems übernommen haben. Erste physiologische und morphologische Studien deuteten darauf hin, dass diese Symbiose auf Chemoautotrophie beruht^[1].

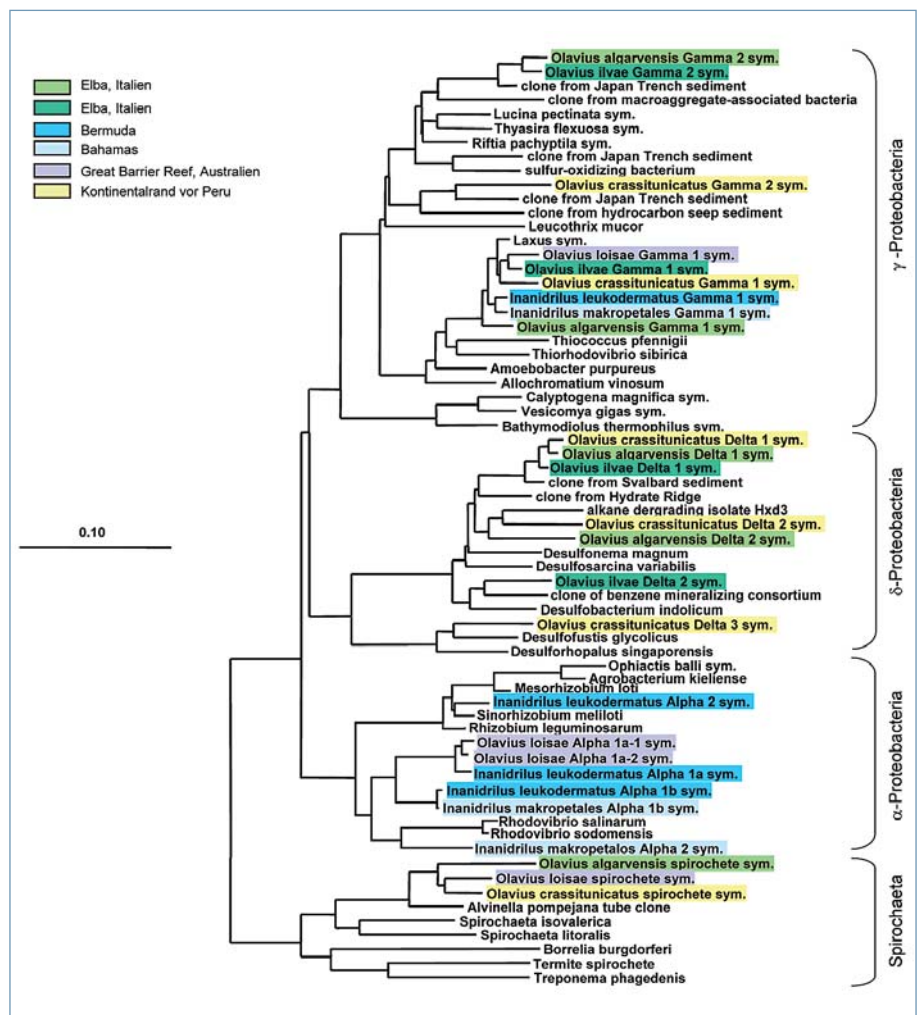
■ Die Symbionten versorgen dabei den Wurm mit Nahrung, indem sie reduzierte anorganische Schwefelverbindungen als Energiequelle nutzen, um Kohlendioxid in organische Stoffe zu fixieren. Inzwischen wissen wir, dass nur ein Teil der symbiontischen Population Schwefeloxidierer sind und dass eine Vielzahl weiterer Bakterienarten mit zum Teil sehr unterschiedlichen Stoffwechselwegen als Symbionten in den Würmern lebt. Dies ist ungewöhnlich, da in den meisten bisher beschriebenen chemoautotrophen Symbiosen zwischen Wirbellosen und Bakterien nur ein bis zwei Symbiontenarten vorkommen.

Mehr als 100 darmlose Oligochaetenarten sind weltweit in marinen Sedimenten



▲ **Abb. 1:** Querschnitt durch den darmlosen Oligochaeten *Olavius algarvensis* mit fluoreszenzmarkierten sulfidoxidierenden (Grün) und sulfatreduzierenden (Rot) Symbionten. A, Übersicht; B, Ausschnitt^[8].

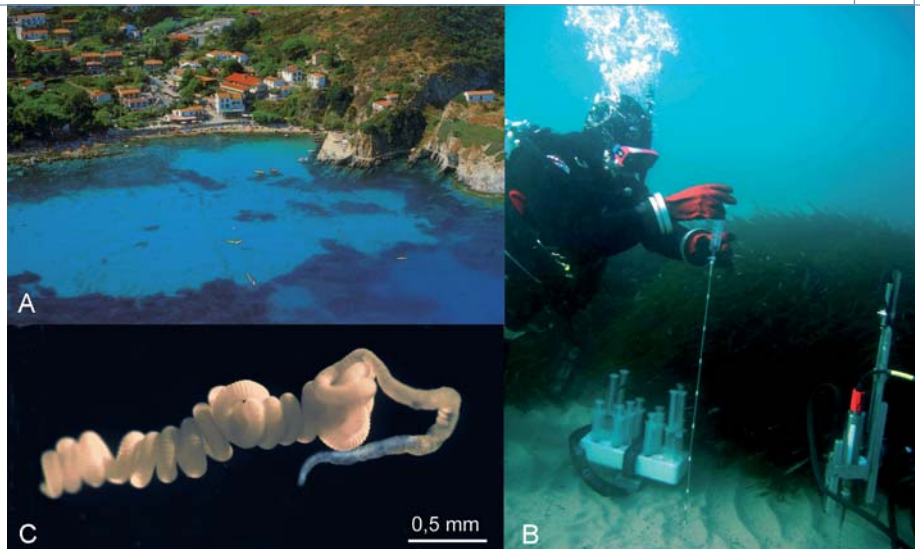
bekannt. Die bakteriellen Symbionten dieser Würmer liegen extrazellulär in einer Schicht unter der Wurmkuikula zwischen Ausläufern der epidermalen Zellen (**Abb. 1**). Durch molekularbiologische Verwandtschaftsanalysen und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung konnten wir nachweisen, dass diese Wirte bis zu sechs bakterielle Symbiontenarten beherbergen können (**Abb. 2**)^[2–4]. Trotz dieser hohen Diversität ist die Symbiose obligat und spezifisch, sodass alle Individuen einer Wirtspopulation mit denselben dominanten Bakterienarten assoziiert sind.



▲ **Abb. 2:** Phylogenie der Symbionten darmloser mariner Oligochaeten basierend auf 16S rRNA-Sequenzen^[1].

Alle bisher untersuchten darmlosen Oligochaeten leben in Symbiose mit einem γ -Proteobakterium, das mit freilebenden schwefeloxidierenden Bakterien wie dem phototrophen *Allochromatium vinosum* verwandt ist (Abb. 2). Diese γ -1-Symbionten aus verschiedenen Wirtsarten sind phylogenetisch eng verwandt. Durch ultrastrukturelle, immunhistochemische^[5] und molekularbiologische Untersuchungen^[3, 4, 6] wurde der thioautotrophe Charakter (schwefeloxidierender, CO_2 -fixierender Stoffwechsel) der γ -1-Symbionten bestätigt.

Neben den γ -1-Symbionten beherbergen manche Wirtsarten ein zweites γ -Proteobakterium und bis zu drei verschiedene δ -Proteobakterien, während andere mit α -Proteobakterien assoziiert sind (Abb. 2)^[3, 7]. Auch Spirochaeten kommen in manchen Wirtsarten vor^[2, 4, 7]. Diese phylogenetische Diversität der Symbionten weist auf eine hohe physiologische Diversität dieser Bakterien hin, mit ungewöhnlichen oder bislang noch nicht bekannten symbiotischen Interaktionen. So wurde zum Beispiel in der Wirtsart *Olavius*



▲ **Abb. 3:** A, Die Bucht von Sant'Andrea auf Elba, Italien. Die darmlosen Oligochaeten kommen in den höchsten Konzentrationen neben den Seegrasswiesen (dunkle Felder im Wasser) vor. B, Porenwasserextraktion für biogeochemische Untersuchungen des Wurmhabitates. C, Die darmlosen Oligochaeten erscheinen durch die Reflektion von Speicherstoffen in ihren endosymbiontischen Bakterien wie Polyhydroxybuttersäure und Schwefel weiß. (Foto: HYDRA/MPIMM/C. Lott, M. Weber)

algarvensis eine neuartige Form von Syntrophie entdeckt^[8].

In diesem Wurm von der Küste Elbas (Abb. 3) sind die δ -proteobakteriellen Sym-

bionten Sulfatreduzierer, die oxidierte Schwefelverbindungen wie Sulfat zu Sulfid veratmen. Dieses intern produzierte Sulfid kann von den sulfidoxidierenden Symbionten zur



Ihre Arbeit steht im Mittelpunkt!

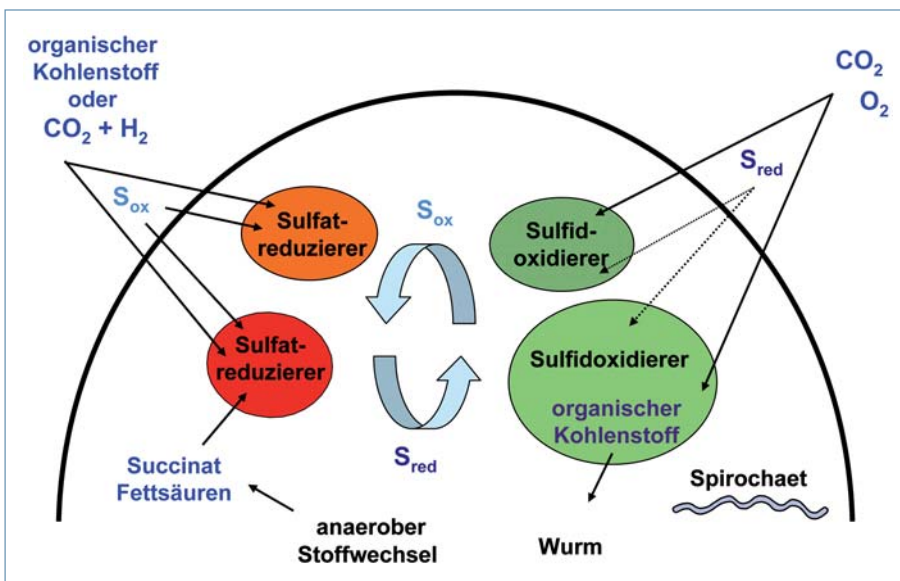
Anwendungsspezifische Systeme für alle fluoreszenztechnischen Aufgaben in der Stereomikroskopie

Vom Sortieren und Screening bis zur automatisierten Dokumentation und Analyse. Nutzen Sie die manuellen oder motorisierten Stereomikroskope Leica MZ 16F/FA. Nutzen Sie zusätzlich einschwenkbare Mikrooptik, z.B. Objektiv 5x Planapo High-Resolution, durch Verwendung des Ansatzes FluoCombi III TM.

Zur Dokumentation ihrer Arbeit stehen Ihnen hervorragende Möglichkeiten mit den hochsensitiven Leica DFC FX-Kameras und der neuen Fluoreszenzsoftware Leica AF 6000 zur Verfügung.

www.leica-microsystems.com/MZ16A

Leica
MICROSYSTEMS



▲ **Abb. 4:** Schematische Übersicht möglicher Symbioseinteraktionen in *O. algarvensis*: Die beiden Sulfidoxidierer (grün) nutzen die Energie aus der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen zur Fixierung von CO_2 in organische Stoffe. Die Sulfatreduzierer (rot) oxidieren organische Stoffe oder Wasserstoff aus dem anaeroben Metabolismus des Wurmes oder der Umgebung mit Sulfatreduktion und produzieren Sulfid. Die Funktion des Spirochaeten ist noch unbekannt.

autotrophen Fixierung von CO_2 genutzt werden. Auf den ersten Blick erscheint dieser syntrophe Schwefelkreislauf als „perpetuum mobile“. Zum Wachstum des Wurms und seiner Symbionten müssen jedoch Energiequellen, wie im Porenwasser gelöste organische Stoffe, aus der Umgebung aufgenommen werden (**Abb. 4**).

Darmlose Oligochaeten sind ein gutes Beispiel für eine erfolgreiche Evolution mutualistischer Assoziationen mit mehreren Symbionten: 1) Wirte, die sulfatreduzierende Bakterien als zusätzliche Symbionten aufnehmen, können sich an Veränderungen in der Umgebung – wie die Verfügbarkeit von Sulfid, die stark schwanken kann, aber für den γ -1-Symbionten essenziell ist – anpassen. 2) Die sulfidoxidierenden und sulfatreduzierenden Symbionten scheinen nicht um Ressourcen zu konkurrieren, sondern profitieren stattdessen bei deren Umsetzung voneinander. Auch für die weiteren Symbionten vermuten wir eine Aufteilung der Ressourcen, bei der jeder Symbiont durch seine Substratspezifität und -affinität eine Mikronische einnimmt und so der mobilen Multisymbiose Nutzen bringt. Denn bei seiner Wanderung durch das Sediment passiert der Wurm Zonen mit unterschiedlichen Substratangeboten sowie Elektronendonatoren und -akzeptoren, auf die sich die einzelnen Symbionten spezialisiert haben könnten. Inzwischen haben wir auch in anderen Tierarten, die in chemoautotropher Symbiose leben, wie Muscheln der

Gattung *Bathymodiolus*, Multisymbiosen mit bis zu vier Phylotypen festgestellt^[9].

Olavius algarvensis dient uns als Modellorganismus zur Erforschung multipler Symbiosen. Dessen gerade fertig gestellte metagenomische Analyse lieferte die erste schlüssige Rekonstruktion mehrerer bakterieller Genome in einem eukaryotischen Wirt^[6]. Die hierbei ermittelten potenziellen Stoffwechselwege sollen nun mittels Proteomik und Transkriptomik überprüft werden. Weiterhin sollen ökologische Studien Aufschluss zu entscheidenden Faktoren im Habitat und zur Transmission (Übertragung) der Symbionten liefern und so zu einem grundlegenden Verständnis dieser komplexen Assoziation beitragen. ■

Literatur

- [1] Dubilier, N., Blazejak, A., Ruehland, C. (2006): Symbioses between bacteria and gutless marine oligochaetes. In: Overmann, J. (Hrsg.) *Molecular Basis of Symbiosis*. Springer Verlag, New York, 251–275.
- [2] Blazejak, A., Erséus, C., Amann, R., Dubilier, N. (2005): Coexistence of bacterial sulfide oxidizers, sulfate reducers, and spirochetes in a gutless worm (Oligochaeta) from the Peru Margin. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1553–1561.
- [3] Blazejak, A., Kuever, J., Erséus, C., Amann, R., Dubilier, N. (2006): Phylogeny of 16S rRNA, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless Marine Worms (Oligochaeta) from Bermuda and the Bahamas. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5527–5536.
- [4] Ruehland, C., Blazejak, A., Loy, A., Wagner, M., Erséus, C., Amann, R., Dubilier, N. (in Vorbereitung): Multiple symbioses with sulfur-oxidizers, sulfate-reducers and spirochetes in two gutless marine worms (Oligochaeta) from Mediterranean sediments low in sulphide.
- [5] Krieger, J., Giere, O., Dubilier, N. (2000): Localization of RubisCO and sulfur in endosymbiotic bacteria of the gutless marine oligochaete *Inanidrilus leukoderma* (Annelida). *Mar. Biol.* 137: 239–244.
- [6] Woyke, T., Teeling, H., Ivanova, N.N., Huntman, M., Richter, M., Gloeckner, F.O., Boffelli, D., Anderson, I.J., Barry, K.W., Shapiro, H.J., Szeto, E., Kyrpides, N.C., Mussmann, M., Bergin, C., Amann, R., Ruehland, C., Rubin, E.M., Dubilier, N. (2006): Metagenome of microbial symbionts in a gutless worm. *Nature* (im Druck, online Vorab-Veröffentlichung seit 17.09.06).
- [7] Dubilier, N., Amann, R., Erséus, C., Muyzer, G., Park, S., Giere, O., Cavanaugh, C.M. (1999): Phylogenetic diversity of bacterial endosymbionts in the gutless marine oligochaete *Olavius loiseae* (Annelida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 178: 271–280.
- [8] Dubilier, N., Mülders, C., Ferdelman, T., de Beer, D., Hentschke, A., Klein, M., Wagner, M., Erséus, C., Thiermann, F., Krieger, J., Giere, O., Amann, R. (2001): Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature* 411: 298–302.
- [9] Duperron, S., Sibuet, M., MacGregor, B.J., Kuypers, M.M.M., Fisher, C.R., Dubilier, N. (2006): Diversity, relative abundance, and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico. *Environ. Microbiol.* (submitted).

Korrespondenzadresse:

Dr. Nicole Dubilier
MPI für Marine Mikrobiologie
Celsiusstr. 1
D-28359 Bremen
Tel.: 0421-2028-932
Fax: 0421-2028-580
ndubilie@mpi-bremen.de

AUTORINNEN



Nicole Dubilier

Studium der Biologie an der Universität Hamburg, 1992 Promotion, 1993–1994 Postdoc an der Harvard University (MA, USA), seit 2000 Leiterin des Symbioselabors in der Abteilung Molekulare Ökologie des Max-Planck-Instituts für marine Mikrobiologie in Bremen. Seit 2002 Koordinatorin der International Max-Planck-Research School for Marine Microbiology, 2005 Gastprofessur an der Universität Pierre et Marie Curie (Paris), Steering Committee InterRidge und Census of Marine Life ChEss und EuroCoML.



Caroline Rühland

Studium der Biologie an den Universitäten Würzburg, Bochum und Hamburg, Auslandsstudien in den USA, Italien und Mexiko. Promoviert derzeit über die molekularbiologische Charakterisierung von Symbiosen verschiedener mariner Oligochaeten.

Gentherapie

Erhellende Langzeiteffekte am Mausmodell der juvenilen Retinoschisis

ANDREAS JANSSEN¹, THOMAS LOENHARDT¹, MATHIAS W. SEELIGER² UND BERNHARD H.F. WEBER¹

¹INSTITUT FÜR HUMANGENETIK, UNIVERSITÄT REGENSBURG, ²UNIVERSITÄTS-AUGENKLINIK, TÜBINGEN

Neurodegenerative Krankheitsprozesse in der menschlichen Netzhaut führen in der Regel zu Visusminderungen, die häufig progredient zu irreversibler und vollständiger Erblindung fortschreiten. Intensive internationale Forschungsanstrengungen haben in den letzten Jahren weit reichende Erfolge bei der Aufklärung der genetischen Ursachen erblicher Netzhautdystrophien erzielt.

■ Bis heute konnten Mutationen in 116 definierten Genen ursächlich mit den unterschiedlichen Krankheitsbildern dieser klinisch und genetisch heterogenen Gruppe von Augenerkrankungen in Verbindung gebracht werden. Die nächste große Herausforderung besteht darin, diese Erkenntnisse in kausale Therapieoptionen umzusetzen und dem Patienten zeitnah zugänglich zu machen.

Am Beispiel einer gezielt generierten Mausmutante der juvenilen Retinoschisis (RS), einer X-gebundenen rezessiven Retinopathie des Kindesalters, kann unsere Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass eine einmalige Anwendung einer Gensatztherapie, die das intakte menschliche Retinoschisin-Gen in die erkrankte murine Netzhaut einbringt, einen anhaltenden Effekt für das Überleben der Photorezeptoren und die Integrität der Netzhautstrukturen über die gesamte Lebensspanne der behandelten Tiere erzielt^[1, 2]. RS manifestiert typischerweise eine kongenitale zystische Pathologie, die primär den zentralen Bereich der Netzhaut, die Makula, in Mitleidenschaft zieht. Die Prognose für einen Visusverlust ist individuell sehr variabel, wird jedoch stark von sekundären Komplikationen beeinflusst, wie dem Auftreten von vitrealen Blutungen, regionalen Netzhautablösungen oder dem Entstehen eines neovaskulären Glaukoms^[3].

Der zugrunde liegende Gendefekt bei RS konnte bereits 1983 auf den kurzen Arm des

X-Chromosoms kartiert werden^[4]. Dies führte über einen positionellen Klonierungsansatz 1997 schließlich zur Isolierung des Krankheitsgenes^[5]. Dieses kodiert für ein Netzhaut-spezifisches Protein, das Retinoschisin, welches von Photorezeptoren und Bipolarzellen exprimiert und als homo-oktamerischer Proteinkomplex sezerniert wird^[6, 7]. Signifikante Homologien bestehen zwischen dem überwiegenden Teil des Proteins und der so genannten Discoidin-Domäne, die ursprünglich im Discoidin I Protein des Schleimpilzes *Dictyostelium discoidium* beschrieben wurde. Dieses Motiv ist bei einer Reihe von sezernierten und membranständigen Proteinen konserviert und an Prozessen wie neuronale Entwicklung und zelluläre Adhäsion beteiligt.

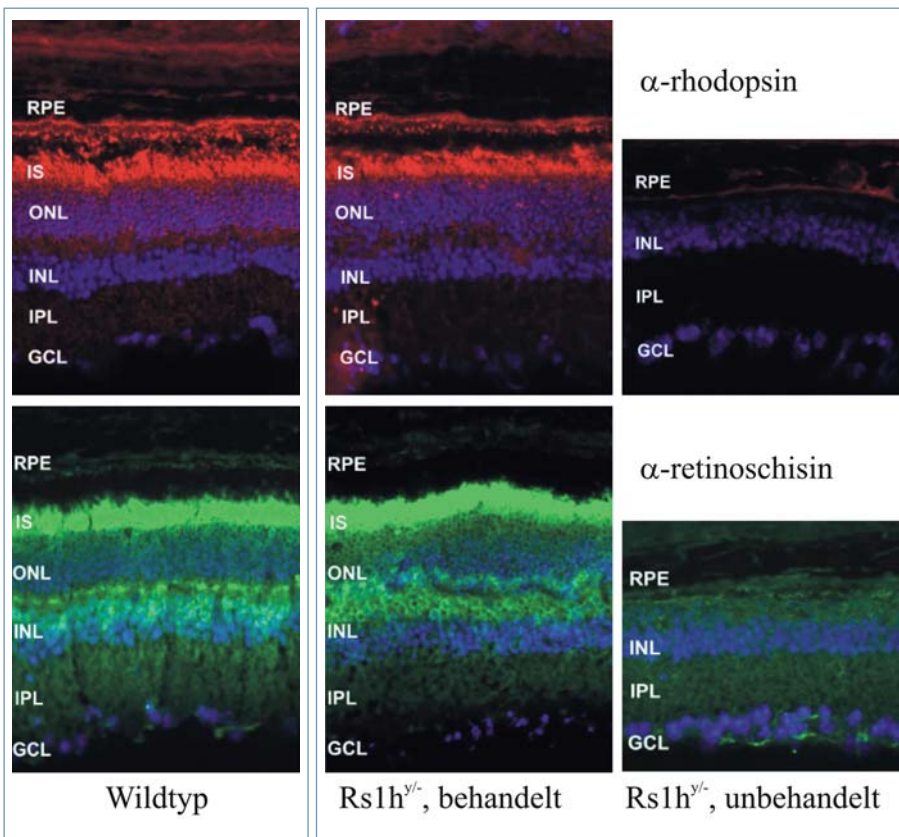
Über 120 individuelle krankheitsbezogene Mutationen im Retinoschisin-Gen sind bis heute beschrieben^[5, 8]. Die Mehrheit dieser Mutationen führt zu einem nicht-funktionellen Protein, das typischerweise im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und abgebaut wird^[7]. Zur weiteren Aufklärung der basalen Pathomechanismen bei RS haben wir eine Mauslinie generiert, bei der das Retinoschisin-orthologe Gen der Maus, *Rs1h*, gezielt mithilfe eines Knock-out-Konstruktes inaktiviert wurde. Die *Rs1h*-defiziente Maus zeigt deutliche pathologische Gemeinsamkeiten zum menschlichen Krankheitsbild, wie beispielsweise eine typische

negative Antwort im Elektroretinogramm (ERG), oder der Entwicklung zystischer Strukturen in der inneren Retina, die von einer massiven Apoptose der Photorezeptoren begleitet werden^[9]. Somit stellt die *Rs1h*-defiziente Maus ein ideales Modellsystem für die Erprobung innovativer Therapieanwendungen für dieses Krankheitsbild dar.

AAV-vermittelte Erhaltung von Struktur und Funktion der Retinoschisin-defizienten murinen Netzhaut

Ziel unserer Untersuchung ist es, die Wirksamkeit einer somatischen Gensatztherapie in der Retinoschisin-defizienten murinen Netzhaut zu erproben. Hierzu wurde das menschliche Retinoschisin-Gen in Replikations-defiziente Adeno-assoziierte Viren vom Serotyp 5 (AAV5) unter der Kontrolle eines murinen Opsinpromoters kloniert und in ein Auge von 14 Tage alten *Rs1h*-defizienten Tieren subretinal injiziert. Das zweite Auge wurde nicht injiziert und diente als interne Referenz. Von den ursprünglich behandelten Tieren (n = 17) konnte der individuelle Verlauf der Erkrankung bei 5 Tieren bis zum 19. Lebensmonat mittels nicht-invasiver Techniken (z. B. ERG Messung) verfolgt werden. Die gealterten Tiere wurden phänotypisch im Detail charakterisiert.

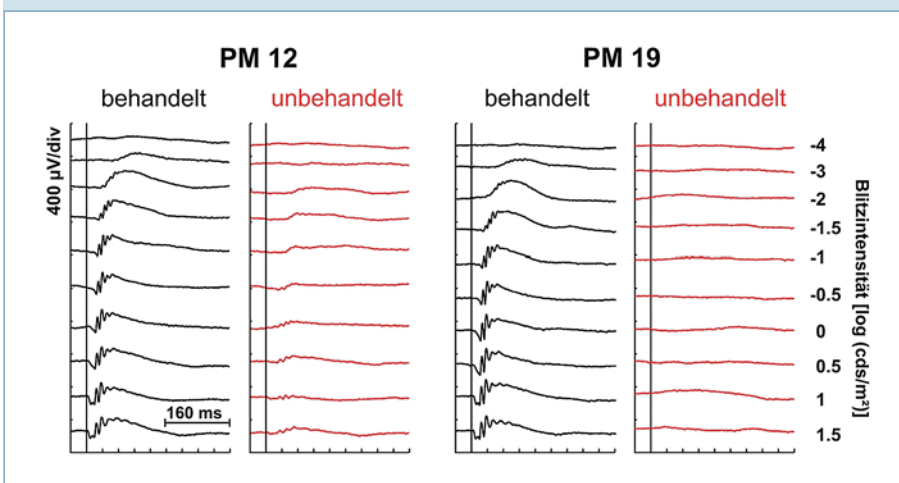
Zu allen untersuchten Zeitpunkten, insbesondere jedoch bei den 19 Monate alten Tieren zeigen sich sehr eindrucksvoll die Effekte der AAV-RS1 Behandlung. Während in histologischen/immunohistochemischen Analysen der Fundus des jeweils nicht-behandelten Auges das typische Bild einer schwerwiegenden retinalen Degeneration im Endstadium aufweist, ist das therapierte Partnerauge morphologisch unauffällig und entspricht in wesentlichen Charakteristika dem Erscheinungsbild einer altersangepassten Wildtyp-Maus (**Abb. 1**). So ist im unbehandelten Auge ein fast vollständiger Verlust der Photorezeptoren zu erkennen, mit der Konsequenz, dass die Zellen des retinalen Pigmentepithels mit der inneren Netzhaut in anomalen Kontakt kommen. Im



Gegensatz hierzu findet sich in histologischen Schnitten behandelter Augen eine intakte Struktur der retinalen Schichten. Die äußeren Segmente der Photorezeptoren, die entscheidend für die initialen Schritte im visuellen Prozess sind, sind normal entwickelt, nicht unterscheidbar von einer altersangepassten Wildtyp-Morphologie. Immunohistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Rhodopsin bestätigen die histologischen Befunde und zeigen eine intakte Prozessierung und Lokalisierung dieses Chromophors in den Stäbchen-Photorezeptoren. Dies lässt vermuten, dass somit auch der Sehprozess in den behandelten Augen regelrecht abläuft. Im Gegensatz hierzu findet sich keinerlei Rhodopsin-Färbung im unbehandelten Partnerauge der 19 Monate alten Tiere (Abb. 1).

Wir haben weiterhin untersucht, inwieweit die Visusfunktion von der Genersatztherapie profitiert haben könnte. Als Methode der Wahl wurde hier eine ERG-Messung bei 12 und 19 Monate alten Tieren durchgeführt (Abb. 2). Diese Methode erfasst die elektrische Reizweiterleitung der eintreffenden Lichtreize durch die unterschiedlichen Schichten der Netzhaut und kann zwischen Beiträgen des Stäbchen- und Zapfensystems differenzieren^[10]. Ein Vergleich von behandelten und unbehandelten Augen offenbart einen immer deutlicher werdenden Unterschied der Reizantworten im zeitlichen Verlauf. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass das behandelte Auge im Beobachtungszeitraum stabil bleibt, während die ERG-Werte im unbehandelten Auge graduell, bis hin zu nicht mehr messbaren Werten, abnehmen (Abb. 2). Diese Befunde gelten gleichermaßen für dunkel- (skotopisch) und helladaptierte (photopisch, hier nicht gezeigt) Messungen und deuten darauf hin, dass sich der Therapieerfolg sowohl im Stäbchen- wie auch im Zapfensystem der Netzhaut auswirkt. Um neben einem relativen Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Augen auch ein absolutes Maß für die Einschätzung der Therapieeffizienz zu haben, wurden die ERG-Antworten der behandelten Augen von Retinoschisin-defizienten Tieren auch mit solchen von altersangepassten Wildtyp-Tieren verglichen. Bei diesem Vergleich waren die Werte der behandelten Augen nur knapp geringer als die der Wildtypen, wobei der Überlappungsbereich der Messungen darauf hindeutet, dass etwa 50 % der injizierten Augen im 90 % Normbereich der Kontrollaugen zu liegen kommen.

▲ **Abb. 1:** Kryo-Schnitte von Wildtyp, behandelten und unbehandelten Retinoschisin-defizienten Tieren ($Rs1h^{Y/-}$) wurden mit Antikörpern gegen Rhodopsin (Rot) und Retinoschisin (Grün) gefärbt. Die positive Rhodopsin-Färbung weist auf intakte Photorezeptoren und eine normale Prozessierung des Chromophors in der behandelten Netzhaut hin. Die AAV-RS1 Behandlung führt zu einer regulären Expression und Verteilung des Proteins in der gesamten Netzhaut. Die unbehandelte Netzhaut des Partnerauges zeigt eine fortgeschrittene Degeneration der Photorezeptorzellen mit vollständigem Verlust der äußeren nukleären Schicht (ONL). Distamycin-DAPI-Färbung markiert Zellkerne blau.



▲ **Abb. 2:** Skotopische (dunkeladaptierte) elektroretinographische Netzhautantworten von behandeltem (schwarze Linien) und unbehandeltem (rote Linien) Auge des gleichen Tieres in Abhängigkeit von der Blitzintensität. Messwerte wurden bei 12 (links, PM12) und 19 Monate alten Tieren (rechts, PM19) ermittelt. Die Antworten des therapierten Auges bleiben in etwa konstant, während die des nicht behandelten Auges bei 19 Monaten postnatal praktisch verschwunden sind.

Von der Retinoschisin-defizienten Maus zum Patienten?

Seit Jahrhunderten strebt die Medizin nach Heilung von pathologischen Zuständen, wobei dieser uralte Traum oft genug der Realität einer rein palliativen Symptombehandlung weichen muss. Heute halten wir jedoch innovative Werkzeuge in Händen, die in Verbindung mit einem stetig wachsenden Wissen um die molekularen Ursachen von Erkrankungen Hoffnungen wecken, dass sich dieser Traum doch noch in nicht allzu ferner Zukunft erfüllen könnte. In der vorliegenden Studie konnten wir am Mausmodell der X-gebundenen juvenilen Retinoschisis zeigen, dass ein einziger Behandlungszyklus eines AAV-vermittelten Gensatzes ausreichend ist, um effektiv eine progrediente Zerstörung der Netzhaut – ansonsten eine unvermeidliche Konsequenz dieser Erkrankung – für die gesamte Lebensspanne der behandelten Tiere zu verhindern. Dies kommt einer kurativen Option zur Heilung der RS Erkrankung ein Stück näher, wenn auch vorerst nur im Mausmodell. Viele Fragen bedürfen hierbei ohne Zweifel noch unserer Aufmerksamkeit, dies ist jedoch ein erster sehr viel versprechender Schritt, um diesen Behandlungsansatz auch als Option für menschliche Patienten mit dieser Erkrankung in Erwägung zu ziehen.

Literatur

- [1] Min, S.H., Molday, L.L., Seeliger, M.W., Dinculescu, A., Timmers, A.M., Janssen, A., Tonagel, F., Tanimoto, N., Weber, B.H., Molday, R.S., Hauswirth, W.W. (2005): Prolonged recovery of retinal structure/function after gene therapy in an Rs1h-deficient mouse model of X-linked juvenile retinoschisis. *Mol. Ther.* 12: 644–651.
- [2] Seeliger, M.W., Haverkamp, S., Janssen, A., Tanimoto, N., Beck, S.C., Fahl, E., Molday, L.L., Min, S.H., Molday, R.S., Hauswirth, W.W., Weber, B.H.F. (2006): Lifelong restoration of vision by a single gene therapeutic treatment in a mouse model of X-linked juvenile retinoschisis. (submitted).

- [3] George, N.D., Yates, J.R., Moore, A.T. (1995): X linked retinoschisis. *Br. J. Ophthalmol.* 79: 697–702.
- [4] Wieacker, P., Wienker, T.F., Dallapiccola, B., Bender, K., Davies, K., Ropers, H.H. (1983): Linkage relationships between Retinoschisis, Xg, and a cloned DNA sequence from the distal short arm of the X chromosome. *Hum. Genet.* 64: 143–145.
- [5] Sauer, C.G., Gehrig, A., Warneke-Wittstock, R., Marquardt, A., Ewing, C.C., Gibson, A., Lorenz, B., Jurklics, B., Weber, B.H.F. (1997): Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat. Genet.* 17: 164–170.
- [6] Molday, L.L., Hicks, D., Sauer, C.G., Weber, B.H., Molday, R.S. (2001): Expression of X-linked retinoschisis protein RS1 in photoreceptor and bipolar cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 42: 816–825.
- [7] Wu, W.W., Wong, J.P., Kast, J., Molday, R.S. (2005): RS1, a discoidin domain-containing retinal cell adhesion protein associated with X-linked retinoschisis, exists as a novel disulfide-linked octamer. *J. Biol. Chem.* 280: 10721–10730.
- [8] The Retinoschisis Consortium (1998): Functional implications of the spectrum of mutations found in 234 cases with X-linked juvenile retinoschisis (XLRS). *Hum. Mol. Genet.* 7: 1185–1192.
- [9] Weber, B.H., Schrewe, H., Molday, L.L., Gehrig, A., White, K.L., Seeliger, M.W., Jaissle, G.B., Friedburg, C., Tamm, E., Molday, R.S. (2002): Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, Rs1h, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 6222–6227.
- [10] Seeliger, M.W., Grimm, C., Stählberg, F., Friedburg, C., Jaissle, G., Zrenner, E., Guo, H., Remé, C.E., Humphries, P., Hofmann, F., Biel, M., Fariss, R.N., Redmond, T.M., Wenzel, A. (2001): New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 29: 70–74.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Bernhard H.F. Weber
Institut für Humangenetik
Universität Regensburg
Franz-Josef-Strauss-Allee 11
D-93053 Regensburg
Tel.: 0941-944-5400
Fax: 0941-944-5402
bweb@klinik.uni-regensburg.de

AUTOR



Bernhard H.F. Weber

geboren 1956, Studium der Chemie und Biologie für das Lehramt an Gymnasien in Freiburg, 1988 Promotion bei Prof. Ulrich Wolf am Institut für Humangenetik in Freiburg. 1988–1993 Department of Medical Genetics, University of British Columbia, Vancouver, Canada. 1995 Habilitation für das Fach Humangenetik bei Prof. Holger Höhn am Institut für Humangenetik in Würzburg, seit 1995 Universitätsprofessor (C3) für Humangenetik an der Universität Würzburg und Leiter der Arbeitsgruppe „Molekulare Ophthalmologie und Onkologie“.

...es funktioniert
100 %!!!
MAXBONDAX



- regeneriert Silica-basierte Anionenaustauscher DNA-Bindungssäulen
- komplette Entfernung aller Nukleinsäuren
- stellt volle Bindungskapazität wieder her
- nicht giftig, biologisch abbaubar
- Regeneration schont Ihren Etat massiv

AppliChem
BioChemica Chemica Synthesis Service



Darmstadt hat eine weitere Topadresse:
AppliChem GmbH Ottoweg 4 64291 Darmstadt
Fon 06151/93 57-0 Fax 06151/93 57-11
service@appliChem.de www.appliChem.com

Small Molecules

Chemische Biologie

STEFAN FLORIAN, STEFAN HÜMMER UND THOMAS U. MAYER
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, MARTINSRIED

Es gibt viele mögliche Ansätze, um die Funktion eines Proteins *in vivo* selektiv zu hemmen und so seine Funktion zu erforschen. Diese reichen von der Einführung einer inaktivierenden Mutation über die Depletion des Proteins innerhalb der Zelle durch RNAi bis zur Inaktivierung durch Antikörper. In den letzten Jahren hat ein neuer Ansatz immer größere Verbreitung gefunden, die chemische Biologie.

■ Dabei handelt es sich um die Erforschung der Funktion von Proteinen sowohl *in vitro* als auch im zellulären Kontext mithilfe von niedermolekularen organischen Verbindungen. Weitere Bezeichnungen, die im Grunde das Gleiche bedeuten, sind „chemical genomics“, „biological chemistry“ oder „chemical genetics“.

Diese Methode bietet viele Vorteile:

- Durch die Verwendung niedermolekularer Verbindungen kann die Aktivität eines bestimmten Proteins zeitlich sehr genau kontrolliert werden. Innerhalb weniger Minuten nach Zugabe der Substanz ist das Zielprotein inaktiv, ebenso schnell nach Auswaschen der Substanz ist es wieder aktiv. Dies ermöglicht kinetische Untersuchungen, die mit klassischen Methoden nicht möglich wären.
- Die Methode ist sehr schonend. Im Falle einer hochspezifischen Substanz treten die für andere Methoden typischen „off-target“ Effekte (z. B. durch die sonst notwendige Transfektion) nicht auf. Zudem bietet dieser Ansatz die Möglichkeit, mit einer Substanz die Funktion homologer Proteine in unterschiedlichen Spezies zu untersuchen.

Die chemische Biologie hat sich innerhalb der akademischen Forschung erst in den letzten Jahren etabliert, nachdem der technologische Fortschritt die Synthese von Bibliotheken chemischer Verbindungen beschleunigt^[1] und die automatisierte Analyse von systematischen Screens zur Identifizierung der wirksamen Substanzen möglich gemacht hat.

Das Konzept ist jedoch nicht neu. Biologen verwenden schon lange „small molecules“,

um die Zellfunktion zu untersuchen. Beispiele wären die Verwendung von Nocodazol, Taxol oder Colcemid zur Beeinflussung der Mikrotubulopolymerisation^[2].

Ein chemisch-biologisches Projekt besteht aus vier Phasen:

- Auswahl oder Generierung einer Bibliothek niedermolekularer Verbindungen
- Screening dieser Bibliothek im gewählten System nach dem gewünschten Effekt
- Weitere Tests zum Nachweis der Spezifität oder zur Identifizierung des Zielmoleküls
- Untersuchung der Funktion des Zielmoleküls mithilfe der gefundenen Substanzen

Die Vorgehensweise der chemischen Biologie ist stark an die klassischer genetischer Screens angelehnt, mit dem Unterschied, dass Mutationen durch die Wirkung niedermolekularer Verbindungen ersetzt werden. Somit gibt es, ebenso wie in der klassischen Genetik, eine „forward“ und eine „reverse“-Screeningstrategie (**Abb. 1**).

„Reverse chemical genetics“

Hier geht man von einem bestimmten Protein (oder, allgemeiner gesagt, „target“, daher auch „target oriented approach“) aus, dessen Funktion man mit einem organischen Molekül beeinflussen möchte. Dazu isoliert man das Protein und konzipiert einen Assay, mithilfe dessen man die Proteinaktivität bestimmen kann. Dieser sollte für hohen Durchsatz geeignet und die Messung daher technologisch nicht sehr aufwändig sein. Oft verwendet man auf Farbreaktionen basierende enzymatische Assays. Mithilfe dieses Assays wird getestet, ob die zur Verfügung stehenden Ver-

bindungen die Aktivität eines bestimmten Proteins oder dessen Interaktion mit einem anderen beeinflussen kann. Meist werden Zehn- bis Hunderttausende Verbindungen aus einer Bibliothek getestet. Findet man ein Molekül, das die gewünschte Aktivität aufweist, ist es unabdingbar zu überprüfen, ob die Wirkung dieses Moleküls spezifisch für das untersuchte Protein ist. Schließlich verwendet man die gefundenen Substanzen dazu, die Funktion des betreffenden Proteins in Zellen oder in einem Organismus zu untersuchen.

„Forward chemical genetics“

In diesem Fall geht man den umgekehrten Weg. Man entwickelt einen Assay, bei dem man nach einem bestimmten Defekt in Zellen oder einem ganzen Organismus sucht („phenotype based screen“). Nachdem geeignete bioaktive Substanzen identifiziert worden sind, kann mit der Suche nach dem zellulären Zielprotein begonnen werden.

Beide Ansätze haben Vor- und Nachteile. Beim „reverse“-Ansatz sucht man gezielt nach Verbindungen, welche die Funktion eines bestimmten Proteins modulieren. Beim „forward“-Ansatz ist die Anzahl der potenziellen Zielmoleküle deutlich größer, da nach Inhibitoren gesucht wird, die auf einen bestimmten zellulären Prozess mit einer Vielzahl an beteiligten Proteinen abzielen. Im Vergleich zum „reverse“-Ansatz erhöht daher die Suche nach zellulären Phänotypen die Trefferquote und selektiert *per se* nach membrangängigen, bioaktiven Verbindungen. Oft stellt die nachträgliche Identifizierung des zellulären Zielmoleküls aber eine große technische Hürde dar.

Variationen

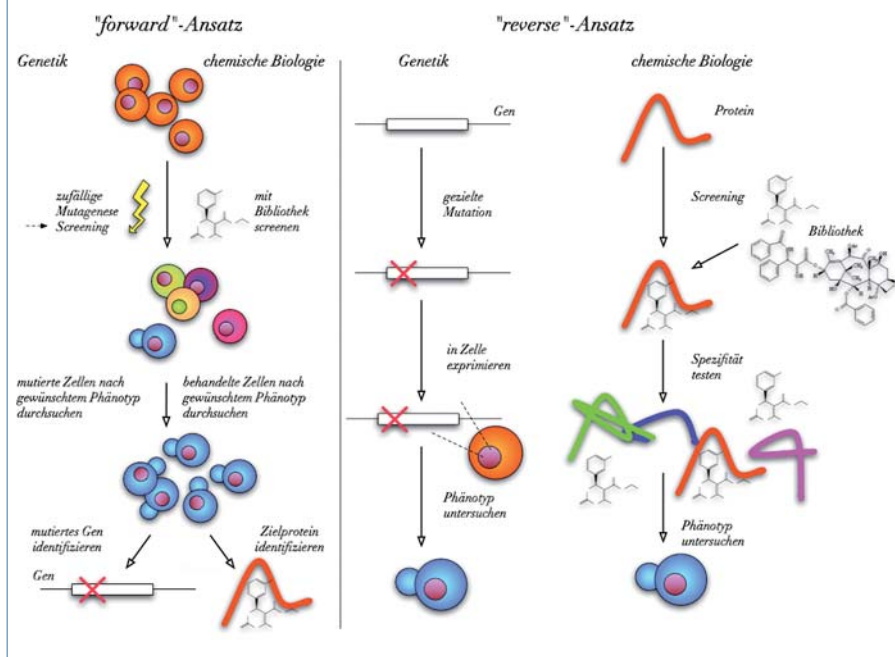
Abgesehen von den oben erwähnten zwei Grundkonzepten gibt es viele Varianten. Ein Beispiel für eine Abwandlung der „reverse“-Strategie wäre die „bump and hole“-Strategie^[3], die v. a. im Labor von Kevan Shokat entwickelt wurde, um Kinasen spezifisch zu inhibieren. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der ATP-Bindungstaschen innerhalb der Proteinkinasefamilie weisen zahlreiche Inhibitoren, welche kompetitiv zu ATP wirken, eine ein-

geschränkte Spezifität bezüglich einer Kinase auf. Um dieses Problem zu umgehen, vergrößert man durch genetische Manipulationen die ATP-Bindungstasche („hole“) der zu untersuchenden Kinase so, dass diese aber nicht andere unveränderte Kinasen durch ein vergrößertes Derivat („bump“) des ursprünglichen Kinaseinhibitors inhibiert werden können. Es ist also ein klassischer „reverse“-Ansatz, bei dem man aber die initiale Screeningphase durch eine neue Strategie überspringt. Diese Methode wurde so weit verfeinert, dass sie prinzipiell für jede Kinase anwendbar ist^[4]. Mithilfe dieser Methode war es möglich, sogar im genetisch bereits sehr gut untersuchten Modellorganismus Hefe neue Erkenntnisse über den Zellzyklus zu gewinnen^[4].

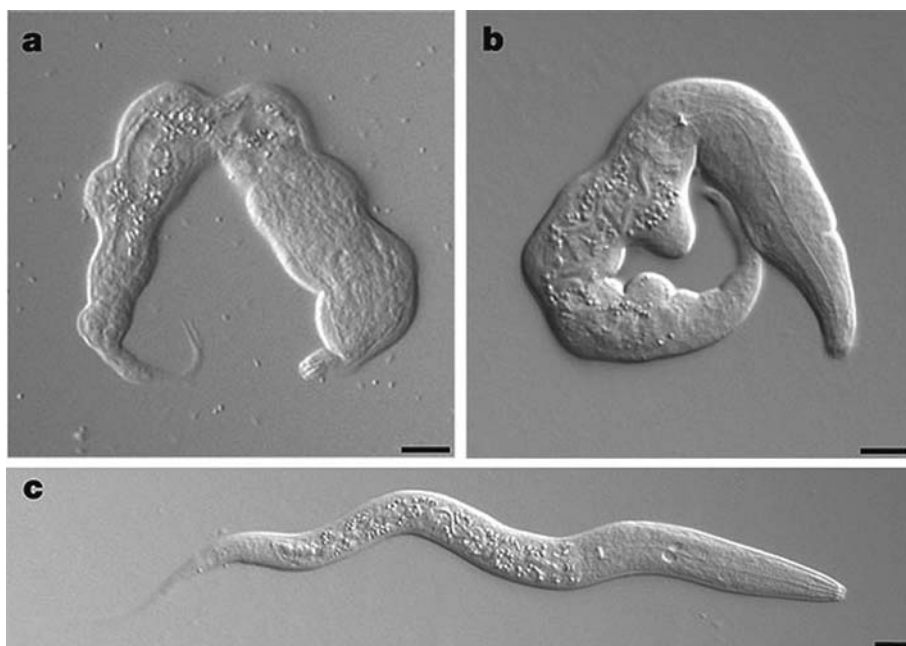
Anwendungsgebiete und Beispiele

Die chemische Biologie wird mittlerweile für die funktionelle Untersuchung vieler unterschiedlicher Proteinklassen verwendet, wobei die schnelle und meist reversible Wirkungsweise niedermolekularer Verbindungen für den Erfolg der chemischen Biologie verantwortlich ist. Ein Beispiel hierfür ist die Verwendung des „bump and hole“-Ansatzes für die Untersuchung der Geschmacksempfindung bei Mäusen^[5]. So haben Zhao *et al.* einen veränderten κ -Opioidrezeptor in Mäusen exprimiert, der nur durch einen synthetischen Liganden, Spiradolin, stimulierbar ist und der nicht auf endogene Opioide reagiert. Dieser Rezeptor wurde unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors in jenen Zellen exprimiert, welche auch die physiologischen Geschmacksrezeptoren exprimieren. Sie beobachteten, dass die Mäuse mit dem modifizierten Opioidrezeptor, welcher die gleichen Signalwege aktiviert wie die endogenen Geschmacksrezeptoren, durch Spiradolin in ähnlicher Weise wie z. B. von süßen Substanzen angezogen wurden. Daraus schlossen sie, dass die Verhaltenskomponente, die mit gustatorischer Empfindung verknüpft ist, durch die Zellen vermittelt wird und rezeptorunabhängig ist.

Ein beeindruckendes Beispiel für den „forward“-Ansatz ist die Identifizierung von Nemadipine-A als spezifischen Inhibitor eines spannungsabhängigen Kalziumkanals^[6]. In einem Screen mit 14.300 Substanzen konnten Kwok *et al.* das Molekül Nemadipine-A identifizieren, das in *C. elegans* einen Phänotyp mit Wachstumsdefekten (Vab) und Defekten beim Legen von Eiern (Egl) verursachte. Mithilfe eines zweiten, diesmal genetischen



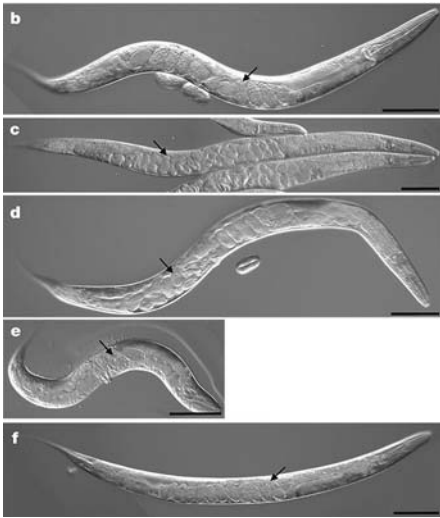
▲ **Abb. 1:** Gegenüberstellung von genetischen und chemisch-biologischen Ansätzen. Ein rein genetischer „forward“-Screen verwendet die zufällige Mutagenese anstatt der Compounds, um die Genaktivität zu modulieren. Vom induzierten Phänotyp ausgehend folgt die Identifizierung jener Gene, deren Mutation den gewünschten Phänotyp verursacht. Bei der genetischen „reverse“-Strategie mutiert man ein zu untersuchendes Protein und exprimiert es im gewünschten zellulären System. Es folgt die Untersuchung des Phänotyps. Für Erklärungen zu den chemisch-biologischen Strategien siehe Text.



▲ **Abb. 2:** Nemadipine-A verursacht Wachstumsstörungen. *C. elegans*-Larven, welche mit Nemadipine-A behandelt wurden (A) oder eine verminderte *egl-19*-Genexpression aufweisen (B), leiden beide an Wachstumsstörungen (so genannter Vab-Phänotyp). C, eine Larve mit physiologischem Phänotyp (DMSO-Kontrolle)^[6].

Screens nach Mutationen, die den Nemadipine-A-induzierten Phänotyp aufheben können, identifizierten sie schließlich das *egl-19* Gen, welches für den Kalziumkanal kodiert (**Abb. 2, 3**). Mithilfe von Nemadipine-A konnten sie zeigen, dass die Funktion von EGL-19

und die Funktion der zwei übrigen α_1 -Untereinheiten von spannungsabhängigen Kalziumkanälen, die im *C. elegans*-Genom zu finden sind, für das Legen von Eiern redundant sind. Die Untersuchung dieser Fragestellung mit klassischen genetischen Methoden allein



▲ **Abb. 3:** *Egl-19* beeinflusst das Eierlegeverhalten von *C. elegans*. Nemadipine-A behandelte Würmer (C) tragen eine gegenüber der Kontrolle (B) erhöhte Anzahl an Embryonen (Pfeile). Derselbe Defekt (*Egl*-Phänotyp) kommt auch bei Würmern (E) mit verminderter *egl-19* Genexpression (D) vor. Würmer mit erhöhter *egl-19* Genexpression legen konstitutiv Eier und weisen deshalb nur wenige Embryonen auf. Sie sind außerdem myoton und daher verkürzt. Durch Behandlung dieser Würmer mit Nemadipine-A (F) werden die Defekte rückgängig gemacht^[6].

wäre nicht möglich gewesen, da *egl-19* hypomorphe Würmer überhaupt keine Eier legen können. Mithilfe von Nemadipine-A lässt sich die Aktivität von EGL-19 zu einem exakt definierten Zeitpunkt abschalten.

Es wird auch versucht, chemisch-biologische Strategien für die Inhibition von Protein-

Protein-Interaktionen zu verwenden. So wandten Berg *et al.* eine klassische reverse-Screening-Strategie an und fanden in einem auf Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) basierenden Screen Inhibitoren der Interaktion des Onkogens Myc mit Max^[7]. Diese zwei Proteine müssen als Dimer vorliegen, damit Myc seine onkogene Aktivität entfalten kann. Die Autoren konnten schließlich zeigen, dass zwei der gefundenen Inhibitoren mit der onkogenen Transformation von Hühnerzellen durch Myc interferieren.

Aufgrund der immer ausgereifteren (und billigeren) Technologie zur Generierung von Substanzbibliotheken und zur Durchführung automatisierter Screens wird sich die chemische Biologie in der Zukunft als eigenständige Disziplin innerhalb der akademischen Forschung etablieren können. Für den breiten Erfolg dieses Forschungszweiges wird es jedoch notwendig sein, die Strategien zur Targetidentifizierung und Sicherung der Spezifität bioaktiver Substanzen noch zu verbessern. Dass dies noch relativ schwierig ist, merkt man daran, dass die Arbeiten, die auf elegante Weise die chemische Biologie mit klassischen biologischen Ansätzen kombinieren und wirklich neue Erkenntnisse liefern, noch relativ selten sind und die „proof of principle“-Arbeiten in der Literatur bei weitem überwiegen. Die chemische Biologie ermöglicht es aber, ähnlich wie RNAi basierte Screens, als Ergänzung zu den klassischen Werkzeugen des Biologen, Probleme zu lösen, die bis jetzt nicht zugänglich waren. ■

Literatur

- [1] Schreiber, S.L. (1998): Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* 6: 1127–1152.
- [2] Peterson, J.R., Mitchison, T.J. (2002): Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem. Biol.* 9: 1275–1285.
- [3] Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., Wood, J.L., Morgan, D.O., Shokat, K.M. (2000): A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* 407: 395–401.
- [4] Bishop, A.C., Buzko, O., Shokat, K.M. (2001): Magic bullets for protein kinases. *Trends Cell. Biol.* 11: 167–172.
- [5] Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J.P., Zuker, C.S. (2003): The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115: 255–266.
- [6] Kwok, T.C., Ricker, N., Fraser, R., Chan, A.W., Burns, A., Stanley, E.F., McCourt, P., Cutler, S.R., Roy, P.J. (2006): A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist. *Nature* 441: 91–95.
- [7] Berg, T., Cohen, S.B., Desharnais, J., Sonderegger, C., Maslyar, D.J., Goldberg, J., Boger, D.L., Vogt, P.K. (2002): Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 3830–3835.

Korrespondenzadresse:

Dr. Thomas U. Mayer
Dr. med. Stefan Florian
Dipl. Biol. Stefan Hümmer
Max-Planck-Institut für Biochemie
Arbeitsgruppe „Chemische Genetik“
Am Klopferspitz 18
D-82152 Martinsried
Tel.: 089-8578-3145
Fax: 089-8578-3138
mayer@biochem.mpg.de

AUTOREN



Thomas Mayer

(Jahrgang 1968) studierte Biologie an der Universität Heidelberg und promovierte 1998 bei Stefan Jentsch am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg. Während seines Postdoc-Aufenthaltes an der Harvard University bei Stuart Schreiber und Timothy Mitchison identifizierte er Monastrol, den ersten membrangängigen Inhibitor für ein mitotisches Motorprotein. Seit 2002 leitet er eine Emmy-Noether-Forschungsgruppe am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried und befasst sich weiterhin mit der Inhibition mitotischer Proteine mit niedermolekularen Verbindungen.



Stefan Florian

(geboren 1979) studierte Humanmedizin in Innsbruck und Wien. Von 2002 bis 2006 arbeitete er im Bereich der Leukämie- und Mastrozytoseforschung im Labor von Peter Valent am AKH Wien. Seit 2006 ist er Doktorand in der Arbeitsgruppe von Thomas Mayer am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried.

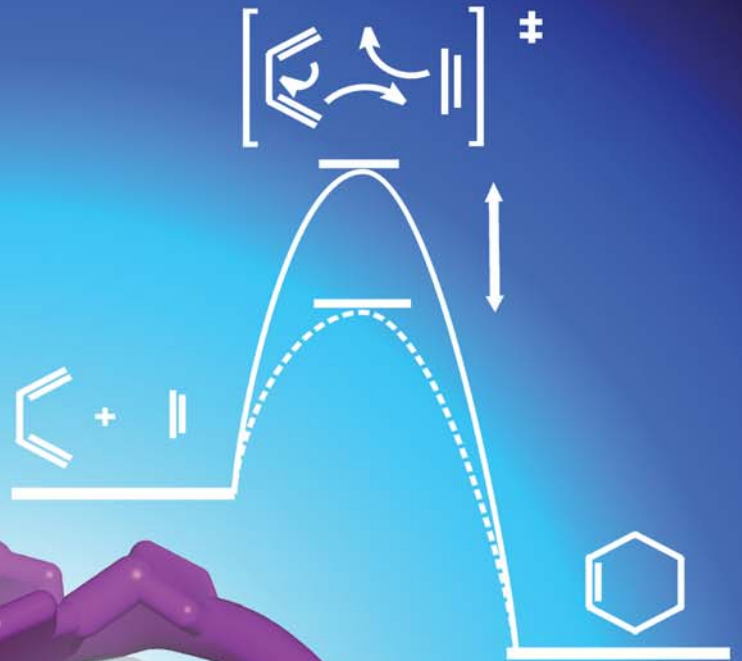


Stefan Hümmer

(geboren 1979), studierte Biologie an der Universität Regensburg und Würzburg. Seine Diplomarbeit fertigte er 2004 in der Arbeitsgruppe von Thomas Mayer an. Die 2004 begonnene Promotion als Stipendiat des „Fonds der Chemischen Industrie“ beschäftigt sich mit der Identifizierung niedermolekularer Verbindungen zur funktionellen Untersuchung mitotischer Proteine

Special:

RNA-Technologien



Neben der Vielzahl zellulärer Proteine rücken immer wieder RNA-Moleküle ins Rampenlicht aktueller Forschung und vervollständigen das mechanistische Bild zellulärer Prozesse. Natürlich sind RNA-Moleküle wichtige Informationsträger in Transkription und Translation, neuerdings machen sie jedoch als Katalysatoren, Strukturelemente in Enzymen und als Regulatoren in Signalwegen besonders von sich reden. Das Special dieser Ausgabe bietet ihnen auf den folgenden Seiten einen Überblick über die neuesten Entwicklungen in den viel versprechenden „RNA-Technologien“.

Grafik: Richard Wombacher, Universität Heidelberg

Funktionelle Genomik

Genomweite RNAi-Screens

FLORIAN FUCHS, DIERK INGELFINGER, SANDRA STEINBRINK UND
MICHAEL BOUTROS
SIGNALWEGE UND FUNKTIONELLE GENOMIK, DKFZ, HEIDELBERG

Nach der Sequenzierung der menschlichen Erbsubstanz stehen die biomedizinischen Wissenschaften nun vor der Aufgabe, die Funktion der im Erbgut kodierten Faktoren zu entschlüsseln. Trotz erheblicher Anstrengungen sind die molekularen Funktionen von einem Großteil der menschlichen Genprodukte unbekannt. Die systematische Identifizierung einzelner Faktoren, sowie ihre Interaktion in zellulären Netzwerken, sind sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Wirkstoffentwicklung von herausragender Bedeutung.

■ Aus diesem Grund werden Methoden entwickelt, welche eine funktionelle Charakterisierung auf schnelle Weise erlauben. Genetische Studien mittels RNA-Interferenz ermöglichen eine genspezifische Analyse, die auch automatisiert im Hochdurchsatzverfahren anwendbar ist.

RNA-Interferenz

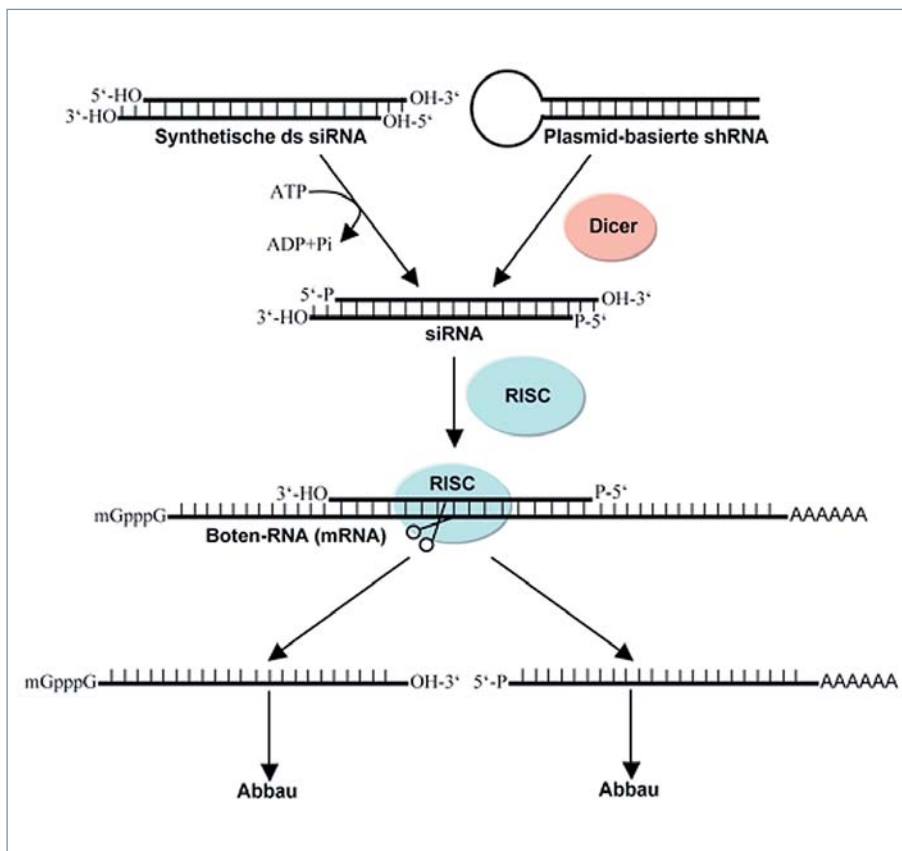
RNA-Interferenz (RNAi) wird durch das Einbringen von doppelsträngigen RNA-Molekülen induziert, welche den sequenzspezifischen Abbau von komplementärer „messenger RNA“ (mRNA) bewirken (**Abb. 1**). Entdeckt wurde RNAi im Jahr 1998 durch Fire und Mello^[1]. Sie zeigten, dass lange doppelsträngige RNA (dsRNA), die künstlich in den Fadenwurm *C. elegans* eingebracht wurde, zum Abbau der endogenen mRNA und somit zum Verlust des korrespondierenden Proteins führte.

Der Einsatz von RNAi zur Unterdrückung von mRNA-Transkripten in höheren Organismen mittels langer dsRNA war lange Zeit durch die Induktion einer unspezifischen Interferonantwort limitiert. Dieses Problem lässt sich durch den Einsatz kleiner 19–22 Basenpaar (bp) langer dsRNA-Moleküle, den „small interfering RNAs“ (siRNAs)^[2] oder den „short hairpin RNAs“ (shRNAs)^[3], umgehen.

In den letzten Jahren wurden sowohl von akademischen Forschungsgruppen als auch von kommerziellen Anbietern Bibliotheken von RNAi-Reagenzien generiert, welche aus chemisch synthetisierten siRNAs, oder aus shRNAs exprimierenden viralen Vektoren bestehen und die gegen nahezu jedes Gen im menschlichen Genom gerichtet sind^[4]. Da die Effizienz von siRNAs sehr stark variiert, ist eine mehrfache Abdeckung jedes Gens notwendig.

RNAi und Zell-basierte Assaysysteme

Während in Hochdurchsatz-Screenings für neue Wirkstoffe häufig biochemische Assays zum Einsatz kommen, werden für RNAi-Screenings zelluläre Assays verwendet, die hochsensitiv und selektiv zelluläre Funktionen messen können. Eine typische Anwendung ist die Untersuchung von Signalwegen, die zum Beispiel für Differenzierungspro-

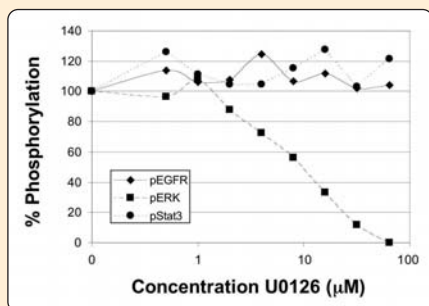


▲ **Abb. 1:** Mechanismus der RNA-Interferenz. Von Plasmiden transkribierte „small hairpin“ RNAs (shRNAs) werden durch das Enzym Dicer zu „small interfering“ RNAs (siRNAs) prozessiert. Dabei handelt es sich um 19–21 Nukleotid RNA Doppelstränge mit symmetrischen 2–3 Nukleotid 3' Überhängen und 5' Phosphatgruppen. Die siRNAs bilden zusammen mit zellulären Proteinen den RISC (RNA Induced Silencing Complex)-Komplex. Der RISC-Komplex mit dem perfekt komplementären siRNA Gegenstrang bindet an die Boten-RNA (mRNA). Die gesplattene mRNA wird dann durch Nucleasen abgebaut und kann nicht translatiert werden.

WHY AN IN-CELL WESTERN?

FASTER RESULTS.

In-Cell Westerns use the unique advantages of infrared detection to provide sensitive and quantitative analysis of signaling pathways in a high throughput manner. Target-specific primary antibodies and infrared-labeled secondary antibodies detect proteins in fixed cells in a microplate format without the need for lysates. Unlike biochemical assays, this cell-based format provides more relevant answers and lets you assay multiple targets in your pathway, so you see the whole picture.



Effect of the MEK inhibitor U0126 on EGF receptor signaling. A431 cells were treated with drug, stimulated with EGF, and fixed. Phosphorylation of EGFR, Stat3, and ERK was assessed with phospho-specific antibodies. U0126 blocked activation of ERK by MEK, but EGFR and Stat3 were unaffected.

To learn more about In-Cell Westerns and the new Aerius System, click on www.licor.com/a_aerius.

LI-COR®

Biosciences

LI-COR Biosciences • 4308 Progressive Avenue • Lincoln, NE 68504
800-645-4267 • 402-467-0700 • FAX 402-467-0819 • e-mail: odyssey@licor.com
LI-COR GmbH (Germany, Austria, Switzerland): +49 (0) 6172 17 17 771
LI-COR UK Ltd.: +44 (0) 1223 422104

LI-COR, Aerius and Odyssey are trademarks or registered trademarks of LI-COR, Inc.
Data-Chen, H., et. al. Anal. Biochem., 338:136-142 (2005)

NEW!

For Automated In-Cell
Western Analysis

Introducing

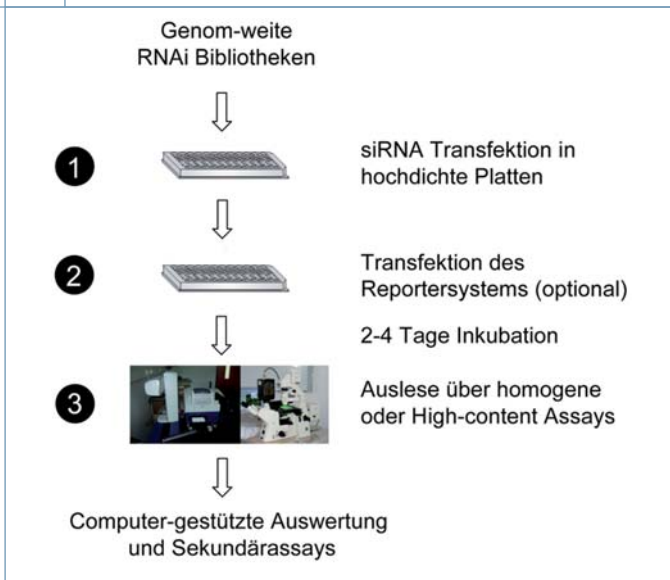
AERIUS™



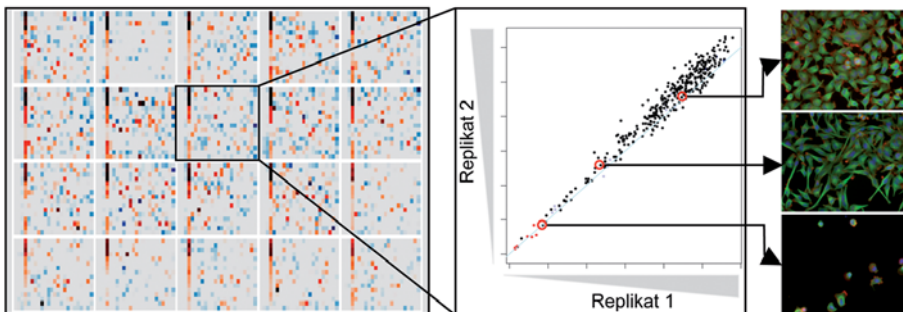
The Aerius Automated Infrared Imaging System combines the advantages of infrared detection developed for the LI-COR Odyssey® System with a fast, efficient microplate reader. The Aerius provides fully automated data analysis of In-Cell Westerns for true, one-touch, walk-away automation.



LI-COR offers the Aerius with a Bio-Tek® Bio-Stack™ Automated Microplate Stacking System to handle up to 30 microplates per run. Aerius features an internal bar code reader and optional COM software for integration with other robotic systems.



◀ **Abb. 2:** Grundlegende Arbeitsschritte eines genomweiten RNAi-Experiments (siehe Text für Details).



▲ **Abb. 3:** Analyseebenen eines RNA-Interferenzexperiments. Die Verwendung spezieller Software (cellHTS, Spotfire Decisionseite) ermöglicht die Auswertung aller untersuchten Multititerplatten sowie die farbliche Darstellung von positiven und negativen Regulatoren, die das jeweilige Reportersystem beeinflussen (linke Teilabbildung). Die Reproduzierbarkeit des Screening-Ergebnisses einer Multititerplatte lässt sich durch die Verwendung von Replikaten und Darstellung der Werte in einem Scatterplot (Mitte) beurteilen. In diesem werden die Werte einer Screeningplatte gegen das korrespondierende Wertepaar des Duplikats aufgetragen. Eine weiterführende Analyse auf Einzelzellebene ermöglichen High-Content Systeme (rechte Darstellung) unter Verwendung von Immunfluoreszenz und automatisierter Mikroskopie.

zesse, für die Teilung von Zellen oder den programmierten Zelltod notwendig sind. Mittels genomweiter RNAi-Screenings können neue, noch unbekannte Komponenten identifiziert und in Folgeexperimenten charakterisiert werden. Ein Reportersystem für Signalwege verwendet hierzu Fluoreszenz- oder Lumineszenz-basierende Reporter und Ausleseverfahren. Signalwegs-spezifische Reportersysteme bestehen häufig aus Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, zum Beispiel NFκB, die einem Gen für Luciferase vorgeschaltet werden. Wird der Signalweg in Zellen aktiviert, die dieses Reportersystem stabil oder transient führen, bindet der NFκB-Transkriptionsfaktor und führt zu einer Expression der Luciferase, die sich unter Verwendung von Plattenlesegeräten messen lässt. Mittels RNAi-Screens lassen sich nun genomweit Gene „ausschalten“ und bestimmen, welche zellulären Faktoren für die Signalvermittlung im NFκB-Signalweg verantwortlich

sind. Solche und ähnliche Screening-Verfahren wurden erfolgreich in Drosophila-Zellen angewendet, um eine Reihe von konservierten Signalwegen zu untersuchen^[5, 6, 7].

Komplexere Reportersysteme ermöglichen das gleichzeitige Erfassen einer Vielzahl von zellulären Parametern, zum Beispiel durch den Einsatz automatisierter Mikroskopie^[8, 9]. Diese „High-Content-Systeme“ können auch zur Untersuchung der Interaktion von Pathogenen mit ihren Wirtszellen eingesetzt werden.

Durchführung von Hochdurchsatz RNAi-Experimenten in human Zellen

Der Fokus zu Beginn eines genomweiten RNAi-Experiments liegt auf dem Transfer des Assays in ein Format, das zum Screening im Hochdurchsatzformat geeignet ist. Hierzu gehört eine Miniaturisierung auf hochdichte Platten (üblicherweise 384-well Platten), eine Automatisierung durch Pipettierroboter, und

eine Überprüfung des experimentellen Ansatzes mittels positiver und negativer Kontrollen. Eine Automatisierung ist nicht nur aufgrund der Anzahl der zu untersuchenden Gene notwendig, sondern sie ermöglicht außerdem ein hohes Maß an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit, ein für die Qualität der Screens entscheidender Faktor. In einem der ersten Schritte wird das Reportersystem zumeist unter Verwendung einer begrenzten Anzahl von Proben einer funktionellen Klasse, z. B. einem gegen Kinasen gerichteten Set an siRNAs, getestet. Solche Pilot-screens dienen außerdem der Entwicklung und Optimierung eines automatisierten Ablaufes.

Ein Beispiel eines genomweiten RNAi-Screens ist in **Abbildungen 2** und **3** gezeigt. Hier wurden 86.000 siRNAs (siGenome, Dharmacon, USA), die gegen ca. 21.500 menschliche Gene gerichtet sind, für Zellproliferationsphänotypen durchmustert. Hierfür wurden in unserem Labor HeLa-Zellen in 384-Lochplatten mit Pools von jeweils vier siRNAs transfiziert und für 72 Stunden inkubiert. Unter Verwendung von liposomalen Transfektionsmitteln erfolgt eine „Reverse Transfektion“ der Zellen mit der jeweiligen siRNA. Die Dauer der Genexpressionshemmung mittels siRNA und der Zeitpunkt der Analyse sind sowohl vom experimentellen Ansatz, d. h. vom verwendeten Zelltyp, als auch vom Reporterassay abhängig. In der Regel erfolgt die Expressionshemmung über einen Zeitraum von 48–96 Stunden. Abschließend erfolgt die Auswertung des Experimentes durch Auslesen des Reportersignals und einer Computer-unterstützten Analyse des Datensatzes. In dem hier gezeigten Experiment, wurden genomweit Faktoren identifiziert, die für die Zellproliferation in HeLa-Zellen notwendig sind.

Analyse von HTS-Daten

Um die Daten, die Hochdurchsatzscreens produzieren, verarbeiten zu können, ist es nötig, Methoden der Bioinformatik einzusetzen. Diese ermöglichen die Identifizierung von potenziellen Kandidaten und dienen auch der Qualitätskontrolle. Eine wichtige Größe, die die Qualität eines Screens beschreibt, ist der Z'-Faktor, in dessen Berechnung sowohl der dynamische Bereich des Screens, als auch die Variabilität der Daten bezogen auf die verwendeten Positiv- und Negativkontrollen eingehen. Des Weiteren lassen sich versuchstechnische Effekte aufzeigen und korrigieren. Meistens handelt es sich dabei um erhöhte

PALM MicroBeam

**Berührungslose
Mikrodissektion
mit LMPC für
hochreine RNA**

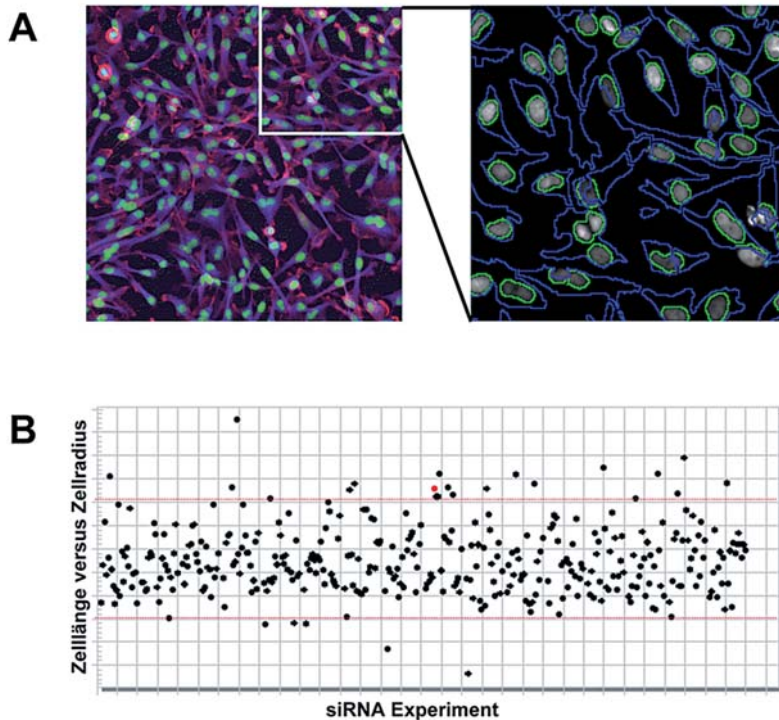


P.A.L.M.

Microlaser Technologies GmbH
Am Neuland 9+12, 82347 Bernried
Telefon: 08158 9971-0
info@palm-microlaser.com
www.palm-microlaser.com



We make it visible.



▲ **Abb. 4:** Auswertung von High-Content Experimenten. Die Abbildung zeigt den Ausschnitt eines High-Content-Screens. Die Zellen sind mit Zellkompartiment-spezifischen Farbstoffen gefärbt (Hoechst-Färbung von Zellkernen, TRITC-konjugiertes Phalloidin zur Färbung des Aktinzytoskeletts sowie Tubulinzytoskelett-Färbung unter Verwendung eines primären Anti-Tubulin und eines Alexa 488-konjugierten Zweitantikörpers) **A**, Die anschließende Auswertung erfolgte mit automatisierter Bildanalyse-Software (Cellomics, Morphology Explorer). Der Ausschnitt in **A** zeigt die Detektion von Zellultrissen (Blau) sowie Zellkernen (Grün). Diese Analyse ermöglicht die Berechnung verschiedener zellulärer Parameter wie das Verhältnis von Zelllänge zu Zellradius (**B**).

oder erniedrigte Intensitäten an den Rändern der Platten (Platteneffekte). Zur Analyse von Hochdurchsatzscreens steht das speziell für diese Applikation entwickelte Softwarepaket „cellHTS“^[10] (www.dkfz.de/signaling/cellHTS) zur Verfügung (**Abb. 3**). Dieses Paket läuft auf „Bioconductor/R“, einer freien Softwareplattform zur statistischen und grafischen Datenanalyse (www.bioconductor.org). Die vergleichende Analyse über mehrere Screens mittels Datenbanken erlaubt eine Vorhersage von spezifischen funktionellen Eigenschaften^[11] (<http://rna.dkfz.de>).

Komplexere Screens wie genomweite mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen stellen die zusätzliche Herausforderung, dass sie sehr große Datensätze erzeugen. Des Weiteren erfordert die Vielfalt der zellulären Parameter, welche simultan aufgenommen werden, den Einsatz von automatisierter Bildanalyse-Software. Bildanalyseprogramme ermöglichen relativ genaue Berechnungen und Darstellungen einfacher zellulärer Parameter, wie die Anzahl von Kernen und Zellen in einem Bildausschnitt oder den Durchmesser und die Form von Zellkern und Zelle (**Abb. 4**).

Validierung von Datensätzen

Eine Problematik des Einsatzes von siRNAs sind „off-target“-Effekte, die sequenzabhängig und -unabhängig entstehen können und sich mit bioinformatischen Methoden häufig nicht vorhersagen lassen. Ein durch mehrere unabhängige siRNAs reproduzierbarer Phänotyp gilt als Bestätigung für die Spezifität der gewählten siRNA-Sequenzen für das jeweilige Zielgen. Ein weiterer Hinweis für die Effizienz des Knock-downs sollte durch den Einsatz von Sekundärassays wie quantitativer PCR (qPCR) und Western Blot erbracht werden. Die stringenteste Kontrolle für die Validität eines RNAi-Phänotyps ist ein „rescue“-Experiment. Dabei wird der RNAi-Phänotyp revertiert, indem man ein Zielgen exprimiert, das zum Beispiel durch Mutationen resistent gegen die eingesetzte siRNA ist.

Zusammenfassung

Der Einsatz von genomweiten RNAi-Ansätzen und Hochdurchsatz-Screening Technologien verspricht, einen entscheidenden Beitrag zur systematischen Analyse des menschlichen Genoms zu leisten. Die Erfahrungen von genomweiten Screens in Modellorganismen

zeigen, dass auch im humanen System eine entscheidende Herausforderung darin liegen wird, Datensätze verschiedener Screens zu vergleichen. Standards, welche bereits im Mikroarray-Feld bestehen (MIAME), sind erforderlich, um die komplexen Informationen der RNAi-Datensätze für vergleichende Studien zu nutzen und mit anderen Daten der funktionellen Genomik zu vergleichen. ■

Danksagung

Die Forschung in der Arbeitsgruppe wurde durch das Emmy-Noether Programm der DFG, das EMBO Young Investigator Programm, einen Marie-Curie Excellence Grant der Europäischen Kommission und die Landesstiftung Baden-Württemberg unterstützt.

Literatur

- [1] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S., Mello, C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811.
- [2] Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498.
- [3] Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., Concklin, D.S. (2002): Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16: 948–958.
- [4] Fuchs, F., Boutros, M. (2006): Cellular phenotyping by RNAi. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5: 52–56.
- [5] Boutros, M., Kiger, A.A., Armknecht, S., Herr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S.A., Paro, R., Perrimon, N. (2004): Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 303: 832–835.
- [6] Muller, P., Kutenkeuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M.P., Boutros, M. (2005): Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* 436: 871–875.
- [7] Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D., Boutros, M. (2006): Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125: p. 523–533.
- [8] Kiger, A.A., Baum, B., Jones, S., Jones, M.R., Coulson, R., Echeverri, C., Perrimon, N. (2003): A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J. Biol.* 2: 27.
- [9] Kittler, R., Putz, G., Pelletier, L., Poser, I., Heninger, A.K., Drechsler, D., Fischer, S., Konstantinova, I., Habermann, B., Grabner, H., Yaspo, M.L., Himmelbauer, H., Korn, B., Neugebauer, K., Pisabarro, M.T., Buchholz, F. (2004): An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432: 1036–40.
- [10] Boutros, M., Bras, L., Huber, W. (2006): Analysis of cell-based RNAi screens. *Genome Biol.* 7: R66.
- [11] Horn, T., Arziman, Z., Berger, J., and Boutros, M. (2006): GenomeRNAi: A Database for cell-based RNAi Phenotypes. *submitted* (see also rna.dkfz.de).



Korrespondenzadresse:

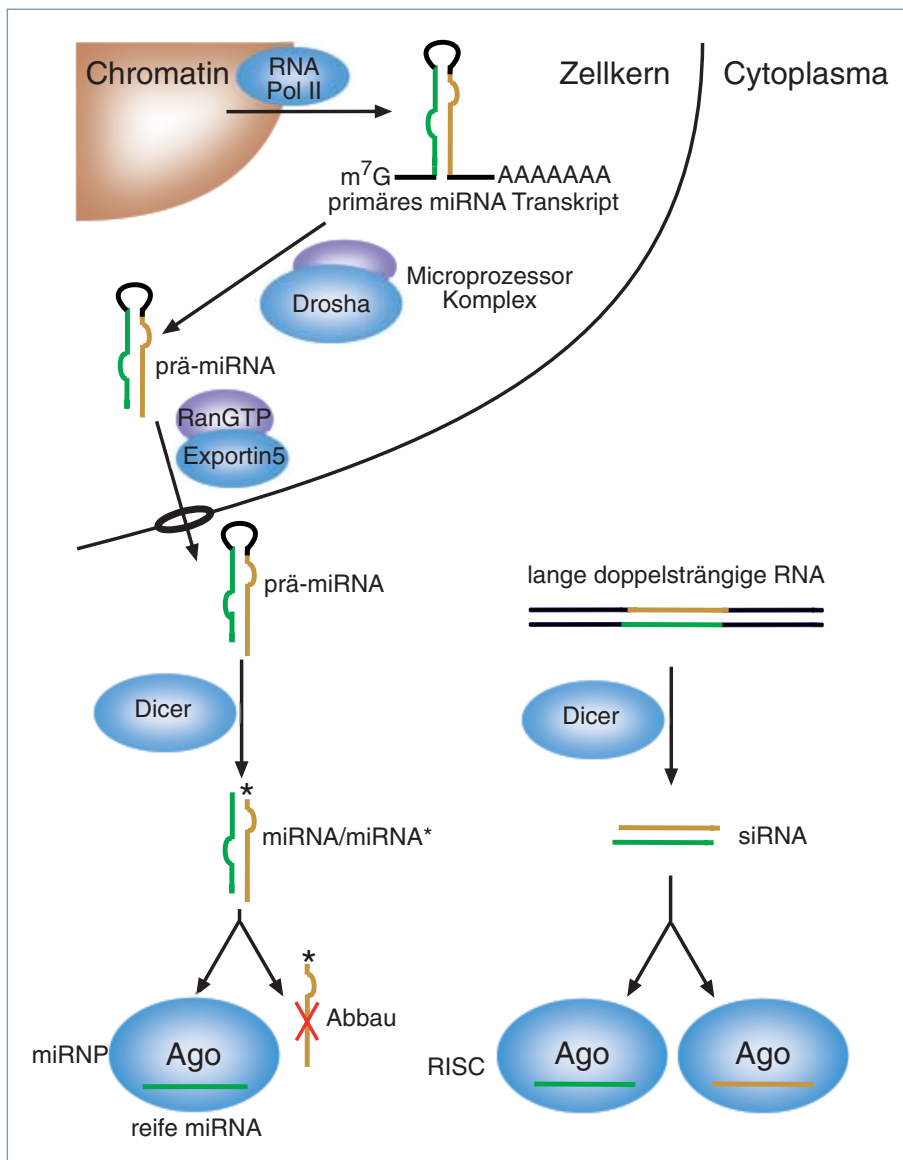
Dr. Michael Boutros
Deutsches Krebsforschungszentrum
Signalwege und Funktionelle Genomik
Im Neuenheimer Feld 580
D-69120 Heidelberg
Tel.: 06221-421950
Fax: 06221-421959
m.boutros@dkfz.de
www.dkfz.de/signaling/

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.



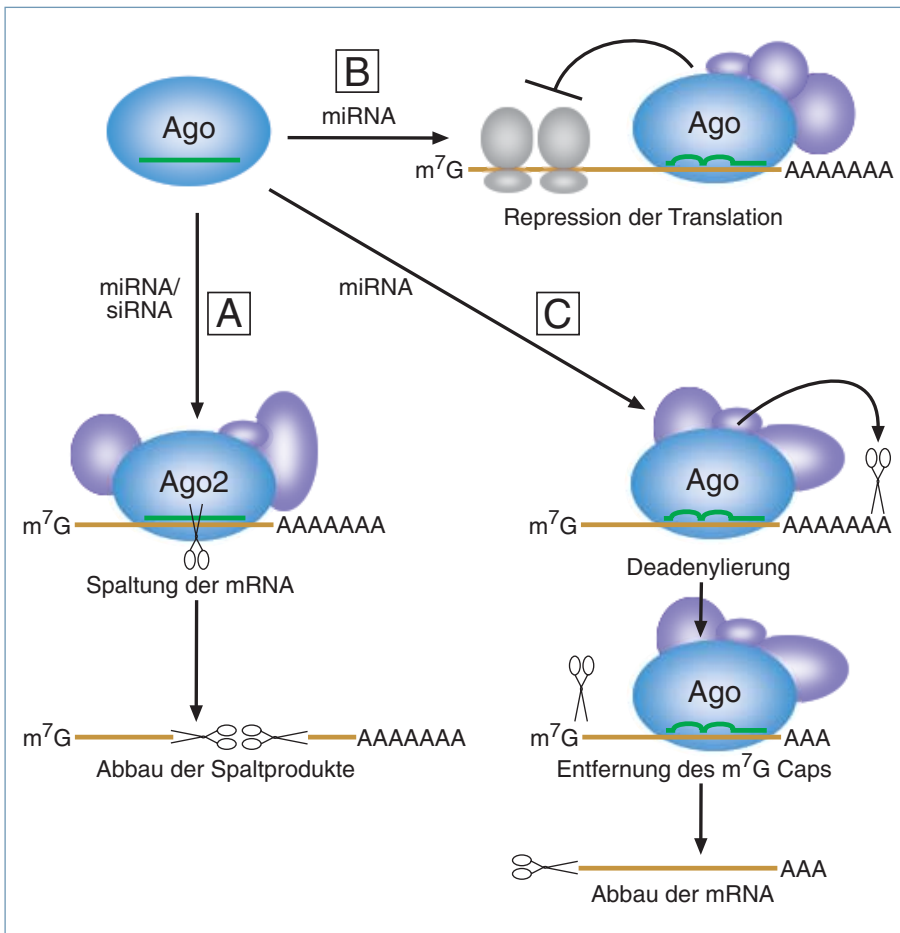
▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der Biogenese von miRNAs und siRNAs. Details siehe Text. m⁷G, 7-Methyl-Guanin; AAAAA, Poly-A-Schwanz.

■ 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 Deadenylasen, 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

In bio-research, success requires the right team.



di MultiMode V
Atomic Force
Microscope



di BioScope SZ
Atomic Force
Microscope



di MultiMode
PicoForce System



di Bioscope II
Atomic Force
Microscope

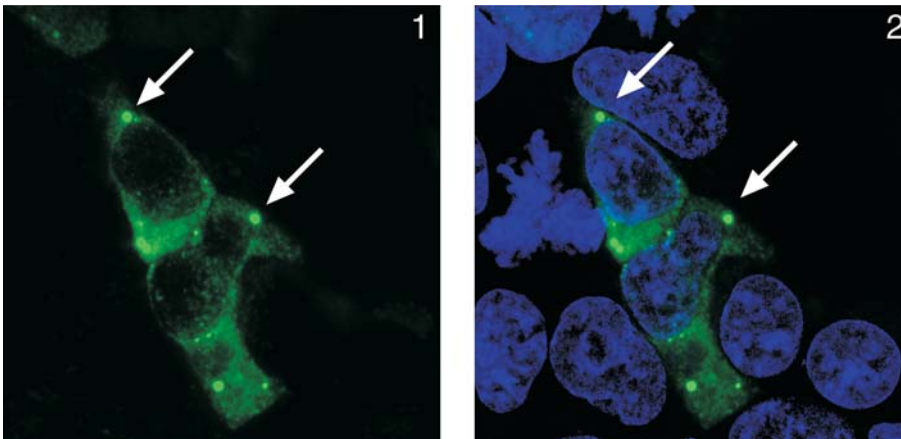
VEECO PERFORMANCE BIO-SCIENCE AFMS: THE ONLY COMPLETE TEAM

Veeco's complete team of bio-science AFMs is unmatched: Choose Multimode V for ultra-high-resolution AFM imaging—up to 5120 x 5120 pixel resolution. Perform precise single-molecule pulling experiments with the PicoForce option. Use BioScope SZ as a versatile solution to incorporate optical microscopy. Or choose new BioScope II for ultimate integration of AFM/optical microscopy for the most advanced optical techniques. Discover our AFM team at www.veeco-europe.com.

Cambridge, UK Int + 44 (0)1954 233900
Dourdan, F Int + 33 (0)1645 93520
Mannheim, D Int + 49 (0)6218 42100
Breda, NL Int + 31 (0)7652 44850



Solutions for a nanoscale world.™



▲ **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.

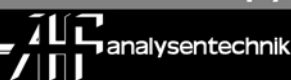
- [5] Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., Izaurralde, E. (2006): mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20: 1885–1898.
- [6] Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., Hannon, G.J. (2002): The Argonaute 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

high precision optical filters
for fluorescence microscopy



www.ahf.de

Diels-Alderasen

Katalytische Ribonukleinsäuren

RICHARD WOMBACHER UND ANDRES JÄSCHKE
INSTITUT FÜR PHARMAZIE UND MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE,
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT, HEIDELBERG

Die Katalyse von chemischen Reaktionen ist eine der anspruchsvollsten Aufgaben, die Biopolymere zu erfüllen haben. Ribozyme können ein Spektrum an Reaktionen beschleunigen, das weit über die Spaltung von RNA-Strängen hinausreicht. Aktuelle Struktur-Funktions-Untersuchungen decken bemerkenswerte Parallelen zu Proteinenzymen auf.

Natürliche Ribozyme

Die Existenz katalytischer RNA wurde erstmals 1982 von Cech und Mitarbeitern nachgewiesen^[1]. Sie konnten zeigen, dass dem posttranskriptionalen Spleißen des Gruppe I-Introns aus *Tetrahymena thermophila* ein Selbstspaltungsmechanismus der RNA zugrunde liegt. Zeitgleich entdeckten Altman und Mitarbeiter, dass die Aktivität der bakteriellen Ribonuklease P, bestehend aus RNA- und Proteinuntereinheiten, ausschließlich auf deren RNA-Untereinheit zurückzuführen ist^[2]. Seitdem ist eine große Anzahl weiterer natürlicher Ribozyme entdeckt worden, darunter mehr als 100 weitere Gruppe I-Introns aus verschiedenen Mikroorganismen sowie eine ebenso beachtliche Menge an Gruppe II-Introns (aus mitochondrialen Genen von Pflanzen, Pilzen und Hefen), denen ein anderer Mechanismus der RNA-Spaltung zugrunde liegt. Außerdem gibt es Virus- oder Viroid-Ribozyme wie das Hammerhead Ribozym (aus Pflanzenviroiden), das Hepatitis Delta Virus-Ribozym (HDV), das Hairpin Ribozym (aus Tabak-Virus-Ringspot Satellit) und das *Neurospora Varkud* Satellit Ribozym. Das wohl eindrucksvollste Beispiel der Ribozymkatalyse ist das zu 1/3 aus Protein- und zu 2/3 aus rRNA-Anteilen bestehende Ribosom, für das kristallographische und mechanistische Untersuchungen eine maßgebliche Rolle der RNA für die Peptidyltransferaseaktivität nahe legen^[3].

Artifizielle Ribozyme

Die relativ bescheidene Reaktionsvielfalt der natürlichen Ribozyme warf Fragen auf, die sowohl für Erforschung noch unbekannter RNA-Funktionen als auch im Kontext der

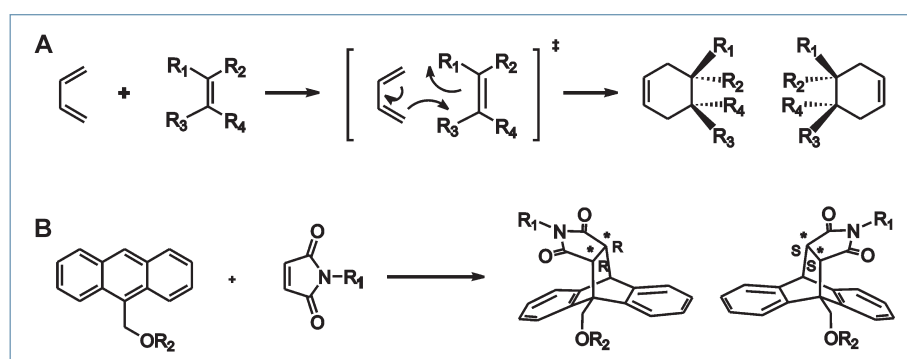
„RNA-Welt“-Hypothese zum Ursprung des Lebens von großer Bedeutung sind: Ist RNA auch in der Lage, weitere, potentiell metabolisch relevante Reaktionen zu katalysieren? Kann Sie – wie Proteinenzyme – Reaktionen zwischen kleinen organischen Substratmolekülen selektiv beschleunigen? Welche strukturellen Voraussetzungen müssen hierfür gegeben sein? Zur Beantwortung dieser Fragen erwiesen sich Techniken der *in vitro* Selektion und Evolution als hilfreich. Hierbei handelt es sich um kombinatorische Strategien, die aus großen synthetischen Nukleinsäurebibliotheken iterativ bestimmten Selektionskriterien (z.B. Beschleunigung einer Reaktion) genügende Subbibliotheken anreichern und dann vervielfältigen. In den letzten 15 Jahren konnte auf diese Weise eine große Anzahl solcher künstlichen Ribozyme selektiert werden, darunter Katalysatoren für

C-C-, C-O-, C-N- und C-S-Bindungsknüpfungen oder -Spaltungen sowie für Redoxreaktionen. Allerdings ist unser Verständnis der Funktionsweise dieser (Bio)Katalysatoren und der zugrunde liegenden strukturellen Prinzipien bisher noch außerordentlich gering.

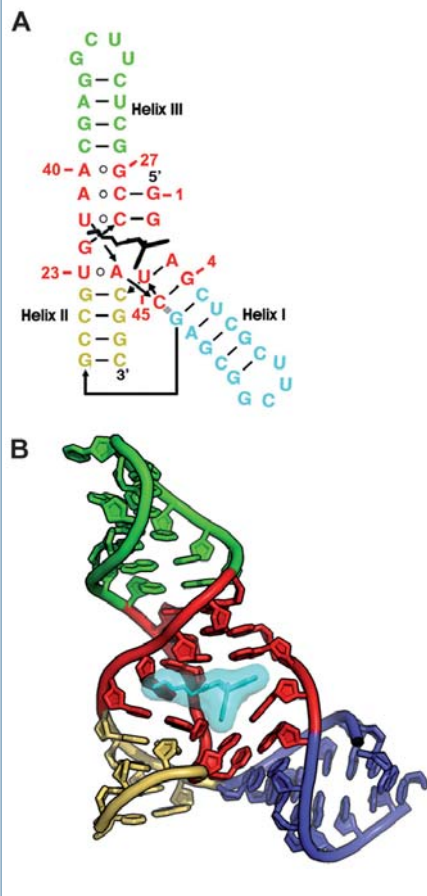
Diels-Alderasen

Die Diels-Alder-Reaktion ist eine der leistungsfähigsten Reaktionen in der organischen Chemie zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen. Dieser Reaktionstyp einer [4+2]-Cycloaddition zwischen einem (elektronenreichen) Dien und einem (elektronenarmen) Olefin, dem Dienophil, ermöglicht den Aufbau von bis zu vier Stereozentren in einem Reaktionsschritt (**Abb. 1A**). Trotz ihrer Vielseitigkeit spielt diese Reaktion jedoch im Reaktionsrepertoire der Natur kaum eine Rolle. Zwar gibt es Anzeichen für die Wirkung von Diels-Alderase-Enzymen in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten, doch ist trotz intensiver Suche bis heute kein Enzym bekannt, welches bewiesenermaßen als Diels-Alderase-Enzym bezeichnet werden kann. Auch für das Enzym Makrophomatsynthese^[4], das als Diels-Alderase-Kandidat gilt, legen moleküldynamische Simulationen einen sequentiellen Michael-Aldol-Reaktionsmechanismus nahe^[5].

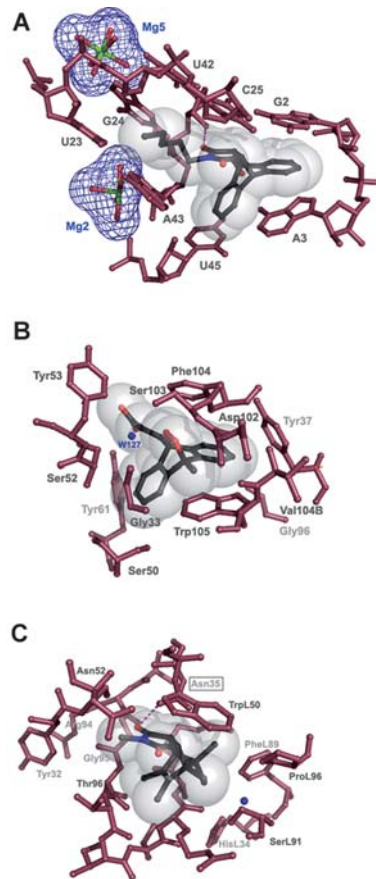
Dass Biopolymere prinzipiell in der Lage sind die Diels-Alder-Reaktion zu katalysie-



▲ **Abb. 1:** A, Die Diels-Alder-Reaktion ist eine [4+2]-Cycloaddition zwischen einem Dien und einem Dienophil, bei der aus drei C-C- π -Bindungen eine C-C- π -Bindung und zwei C-C- σ -Bindungen neu formiert werden. B, In der Reaktion zwischen Anthracen- und Maleimidderivaten wird in der unkatalysierten Reaktion ein racemisches Gemisch aus R, R- und S, S-Stereoisomeren gebildet (R₁; R₂ = verschiedene Substituenten); in der ribozymkatalysierten Reaktion wird enantioselektiv eines der beiden möglichen Stereoisomere gebildet^[9].



▲ **Abb. 2:** A, Tertiärstruktur des Diels-Alderase-Ribozyms in schematischer Darstellung. B, Dreidimensionale Topologie in der Kristallstruktur des Diels-Alderase-Ribozym-Produkt-Komplexes. Helix I (blau), Helix II (gelb), Helix III (grün), in Sekundärstruktur formal ungepaarte Bereiche (rot), Reaktionsprodukt (schwarz)^[10].



▲ **Abb. 3:** Vergleich der katalytischen Zentren von RNA und Proteinen. A, Katalytisches Zentrum des Diels-Alderase-Ribozyms, B, des Retro-Diels-Alderase katalytischen Antikörpers 10F11^[11] und C, des Diels-Alderase Antikörpers 1E9^[12].

ren, konnte erstmals mit katalytischen Antikörpern demonstriert werden, die durch Verwendung von Übergangszustandsanaloga der Diels-Alder-Reaktion als Haptene hergestellt wurden^[6]. Später konnten durch die oben erwähnten *in vitro*-Selektionstechniken auch Ribozyme isoliert werden, die Diels-Alder-Reaktionen katalysieren^[7, 8]. Für das in unserer Arbeitsgruppe isolierte Ribozym konnte demonstriert werden, dass RNA als echter Katalysator eine bimolekulare Reaktion zwischen kleinen organischen Molekülen mit mehrfachem Turnover beschleunigen kann. Das Ribozym setzt Antracen-Diene mit Maleimid-Dienophilen um (**Abb. 1B**), zeigt Michaelis-Menten-Kinetik, katalysiert hochgradig stereoselektiv und besitzt damit wesentliche enzymcharakteristische Eigenschaften^[9]. Kürzlich konnte die Kristallstruktur dieses 49-mer Diels-Alderase-Ribozyms sowohl allein als auch im Komplex mit dem Reaktionsprodukt gelöst werden^[10]. Damit ist erstmals ein detaillierter Einblick in die Wir-

kungsweise eines künstlichen Ribozyms möglich.

Diels-Alderase-Ribozym: Struktur und Mechanismus

Die räumliche Struktur des Ribozyms ähnelt dem griechischen Buchstaben Lambda λ (**Abb. 2**). Drei Helices (blau, gelb und grün dargestellt) sind in einem verschränkten Pseudoknoten miteinander verknüpft, wobei drei separate Sequenzbereiche (rot dargestellt) in komplexer Weise miteinander interagieren, nämlich die Nukleotide 1–4 unmittelbar am 5'-Ende sowie die internen Bereiche 23–27 und 40–45. Das 5'-terminale Tetranukleotid paart mit beiden internen Bereichen und zieht damit die interne Blase reißverschlussartig zusammen. Unter Ausbildung von Basentripeln, nichtkanonischen Basenpaaren und ausgeprägtem Stacking wird eine äußerst kompakte Gesamtstruktur erzeugt, in der sich klar das aktive Zentrum erkennen lässt (**Abb. 2B**). Es ist durch eine

hydrophobe Bindungstasche gekennzeichnet, in der das co-kristallisierte Diels-Alder-Produkt passgenau gebunden ist. Diese präformierte Tasche wird durch das Watson-Crick-Basenpaar A3-U45, das Reverse-Hoogsteen-Paar U23•A43 und das Basentripel U42•(C25-G2) umrahmt. Dabei bilden die Pyrimidinbase U45 und die Purinbasen A3 und G2 ideale Plattformen, um über Stackingwechselwirkungen das Anthracensubstrat zu binden. Die Base C25 ist so im aktiven Zentrum positioniert, dass die Bindung des 5-Ringes des Maleimids ausschließlich die Bildung eines der beiden Produktsomere ermöglicht (**Abb. 3A**). Diese Strukturinformationen sowie biochemische Daten deuten darauf hin, dass für die Katalyse der Reaktion zwei Effekte von wesentlicher Bedeutung sind: die Erhöhung der lokalen Konzentration und präzise Positionierung der Substrate im aktiven Zentrum einerseits und die Stabilisierung des Übergangszustandes gegenüber den Edukten durch eine exakt formkomplementäre Tasche.

Besonders interessant ist nun der Vergleich mit bekannten Strukturen der katalytischen Antikörper für die Diels-Alder-Reaktion (**Abb. 3B, C**)^[11, 12]. Auch hier zeigen die Strukturen präformierte hydrophobe Bindungstaschen mit hoher Formkomplementarität zu den Übergangszuständen. Erstaunlicherweise weist der katalytische Antikörper 10F11 einer Retro-Diels-Alder-Reaktion, der ebenso ein Anthracenderivat als Substrat hat, auch im Detail eine große Ähnlichkeit zum Diels-Alderase-Ribozym auf (**Abb. 3B**)^[11]. Hier liegt ein Tryptophanrest in identischer Position wie das A3 des Ribozyms und ist ebenso entscheidend für die Bindung des Anthracens (Vergleich **Abb. 3A, B**). Für das Maleimidsubstrat lässt sich aus der Kristallstruktur des Ribozyms eine Wasserstoffbrückenbindung im aktiven Zentrum ableiten, die einen elektronenziehenden und damit reaktionsbeschleunigenden Einfluss auf die Reaktion ausüben könnte. Einen solchen Mechanismus zur Beschleunigung der Reaktion beobachtet man für den Diels-Alderase Antikörper 1E9 in einer ähnlichen Position (**Abb. 3A, C**)^[12]. Diese starken strukturellen Analogien zwischen katalytischen Antikörpern und Ribozym lassen vermuten, dass der Katalyse auch sehr ähnliche Reaktionsmechanismen zugrunde liegen. Obwohl RNA verglichen mit Proteinen ein geringeres Arsenal an funktionellen Gruppen besitzt, kann sie offenbar Strukturen aufbauen, die die Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen mit vergleichbarer Effi-