

Eine Genom-weite RNA-Interferenz-Bibliothek für die funktionelle Charakterisierung aller Gene in kultivierten, menschlichen Zellen

Eberhard Krauß, Anne-Kristin Heninger, Ralf Kittler, Annett Lohmann, Ina Poser, Jan Wagner,

Kristin Franke, Karol Kozak, Hannes Grabner und Frank Buchholz

HT-Technology Development Studio (TDS), Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik,

Dresden

RNA-Interferenz

► RNA-Interferenz (RNAi) ist ein vor einigen Jahren entdeckter Mechanismus^[1], der die Möglichkeit bietet, die Expression eines jeden einzelnen Gens gezielt still zu legen^[2, 3]. Durch sequenzspezifischen Abbau einer ausgewählten mRNA-Population in der Zelle wird die Synthese eines Proteins verhindert. Bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* oder Zelllinien aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist das recht einfach: Die mehrere hundert Basenpaare lange, doppelsträngige RNA, sequenzhomolog zu dem Gen, welches ausgeschaltet werden soll, wird in das Nährmedium gegeben und spontan aufgenommen. In den Zellen wird diese doppelsträngige RNA durch das Enzym *Dicer* in überlappende etwa 21 Nukleotide lange Effektormoleküle, so genannte „small interfering RNAs“ (siRNAs), zerlegt. Diese werden vom RISC Proteinkomplex aufgenommen und zu Einzelsträngen entwunden. Nun werden die sequenzmäßig passenden mRNA-Moleküle in den Zellen gesucht und spezifisch geschnitten, was sie weiterem Abbau preisgibt. Somit kann ganz gezielt, vom Experimentator im Voraus bestimmt, nur eine Sorte an mRNA in der Zelle bzw. systemisch im ganzen Wurm schnell und effizient abgebaut werden, um eine Genfunktion zu untersuchen. Der Stilllegungseffekt dauert mehrere Tage an und wird an die Tochterzellen bzw. weitere Generationen weitergegeben, erlischt aber letztendlich im Regelfall; man spricht von einem transienten Effekt, es handelt sich nicht um eine gentechnische Veränderung.

Bei kultivierten Säugerzellen ist die Methode schwieriger: Lange doppelsträngige RNA aktiviert die natürliche Virenabwehr

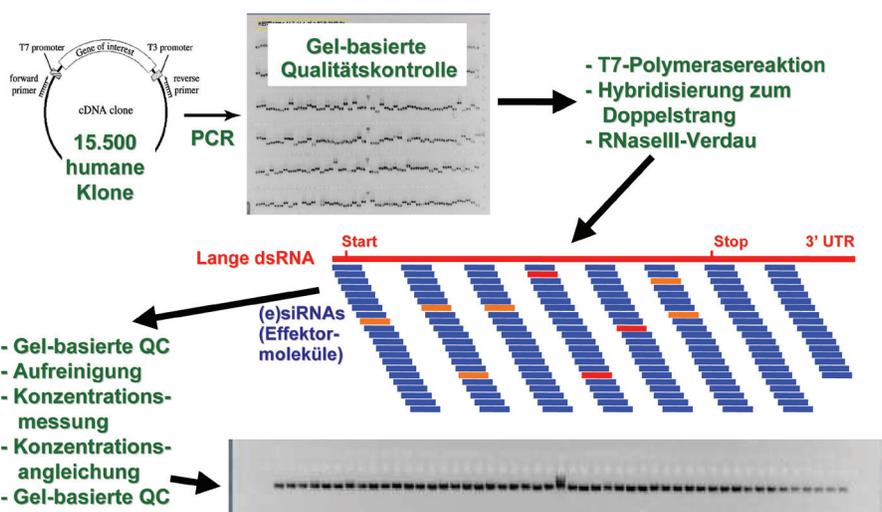


Abb. 1: Produktion der Endoribonuklease-hergestellten siRNA (esiRNA) Bibliothek.

der Zelle. Erst 2001 wurde entdeckt, dass mit direkter Einschleusung von chemisch synthetisierten kurzen siRNAs in die Zelle dieser Abwehrmechanismus unterlaufen wird^[4]. Seither wird die RNA-Interferenzmethode auch in Säugerzellen erfolgreich angewendet. Leider sind nicht alle möglichen siRNAs wirkungsvoll, und obwohl es bereits gute Algorithmen gibt, die mit einer vertretbaren Wahrscheinlichkeit (50–85 %) gut funktionierende Sequenzen voraussagen, kann nur das Experiment zeigen, ob die ausgewählte siRNA tatsächlich die mRNA in der Zelle effizient abbaut.

Die Genom-weite Anwendung in Modellorganismen

Die RNA-Interferenz ist mittlerweile auch im genomweiten Maßstab bei Modellorganismen durchgeführt worden (*C. elegans*, ganzer Wurm^[5–7], *Drosophila*-Zelllinien^[8–11]), um

den Einfluss aller Gene auf einen bestimmten biologischen Prozess zu untersuchen. Für die akademische Anwendung müssen RNAi-Bibliotheken zur Verfügung stehen, die alle derzeit annotierten Gene des Organismus abdecken und preisgünstig zu erwerben sind, oder unter standardisierbaren Bedingungen in entsprechend ausgestatteten Laboratorien herzustellen sind. Weiterhin bedarf es für die Anwendung in kultivierten Säugerzellen robuster und automatisierbarer Transfektionsmethoden, um die siRNA-Moleküle zu gleich bleibenden Bedingungen effizient in die Zelle einschleusen zu können.

Produktion einer humanen genom-weiten RNAi-Bibliothek

Um der Unwägbarkeit der richtigen Voraussage effizienter siRNAs und den immensen Kosten der chemischen Synthese solcher ►►

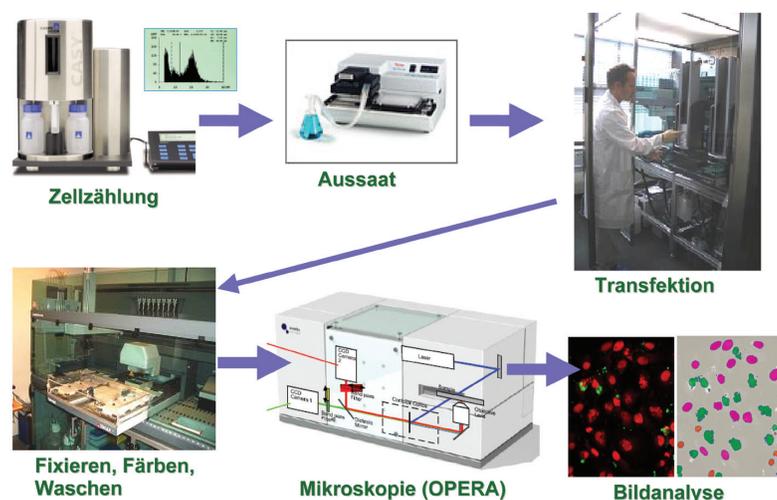


Abb. 2: Automatisierter Arbeitsablauf.



Moleküle aus dem Weg zu gehen, haben wir eine genom-weite Bibliothek Endoribonuklease-verdauter so genannter esiRNA hergestellt (Methode^[12, 13], Erster Screen^[14]). Bei dieser Methode werden lange doppelsträngige RNA-Moleküle mit *Dicer* oder bakterieller RNaseIII *in vitro* zu überlappenden siRNA-Molekülen zerlegt, die dann später unter Umgehung des viralen Abwehrmechanismus in die Säugerzelle eingebracht werden können, um spezifisch die gewünschte mRNA abzubauen. Ausgangsmaterial ist eine Sammlung von 15.500 *E. coli*-Bakterienklonen, die eine genom-weite cDNA-Bibliothek enthalten, die weitestgehend alle bekannten und vorausgesagten menschlichen Gene abdeckt (Abb. 1). Für jedes einzelne Gen werden im 96er Mikrotiterplattenmaßstab die cDNA-Insertionsfragmente aus den Plasmiden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert und mit T7-Polymerasepromotoren an beiden Seiten versehen. Von diesen Promotoren liest die T7-Polymerase im nächsten Schritt beidseitig mRNA ab, die anschließend zum RNA-Doppelstrang hybridisiert werden kann. Nach der Zugabe von RNaseIII aus *E. coli* wird die doppelsträngige RNA in kurze überlappende siRNA-Fragmente zerlegt, die neben den weniger oder gar nicht aktiven auch die hochaktiven Effektormoleküle im „pool“ enthält. Dieses Effektormolekülgemisch wird über Säulen aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde für alle Molekülgemische die esiRNA-Konzentration gemessen und in neuen Mikrotiterplatten auf gleiche Konzentrationen eingestellt (Normalisierung). Zu allen wichtigen Schritten wurden Gel-gestützte Qualitätskontrollschritte eingelegt, um die Längen der Fragmente, ihre Reinheit und Konzentration zu überprüfen. Alle gewonnenen Daten wurden in eine Datenbank eingespeist, alle Arbeitsschritte durch ein LIMS (Laboratory Information

Management System) überwacht. Letztendlich wurde eine Bibliothek mit über 14.000 Molekülgemischen gewonnen, die in gleichen Konzentrationen in 384er-Mikrotiterplatten zur Verfügung stehen, um eine entsprechende Anzahl an menschlichen Genen in kultivierten Zellen abzuschalten und den Einfluss auf biologische Prozesse zu untersuchen.

Besondere Beachtung findet hier der letzte Schritt, die Normalisierung der Bibliothek: Grundvoraussetzung für eine gut eingestellte und anwendbare Bibliothek ist die hohe Präzision bei der Aliquotierung und anschließender Hard- und Software-seitig voll integrierter Messung. Als Robotereinheit wurde eine Freedom EVO Workstation mit 8-Kanal LIHA-Nadeln verwendet (Tecan AG, Männedorf, CH). Zur schnellen Präzi-

sionsaliquotierung für die UV-Messung der esiRNA-Konzentration wurde ein integriertes 96er Te-MO-Pipettiersystem wahlweise mit Einwegpipettenspitzen oder 96er-Teflonnadelkopf verwendet. Diese mit Teflon beschichteten Stahlnadeln haben den Vorteil, dass eine verstärkte Rückhaltung von negativ geladener siRNA wie an statisch meist unterschiedlich stark aufgeladenen Kunststoffflächen herkömmlicher Wechsellspitzen, nahezu nicht vorkommt. Ebenso ist werkstoffbedingt die Oberflächenrauheit von Plastikwechsellspitzen wesentlich höher. Nicht zuletzt sind hierbei auch die Kosten für Beschaffung, Lagerung und Entsorgung der Verbrauchsmaterialien zu berücksichtigen. Entsprechende Wasch- und Sterilisierungsprotokolle wurden erarbeitet, um eine Verschleppung von Substanzen in die nächste Platte oder Kontaminationen durch Bakterien oder Pilzen zu vermeiden.

In der Einheit befindet sich ebenso ein voll integriertes Tecan GENios Plus Photometer um die Messungen bei 260 und 280 nm durchzuführen, um anschließend nicht nur die Konzentration sondern auch die Reinheit durch den Quotienten aus beiden Messungen bestimmen zu können. Für den Hochdurchsatz werden die Proben in speziell für diesen Anwendungsbereich gefertigte 384er-Mikrotiterplatten (Corning UV-Star) aliquotiert. Diese Platten haben im UV Bereich nahezu keine Absorption und sind weit weniger zerbrechlich als Quarzküvetten. Die besten Messergebnisse erzielt man, wenn eine gute Durchmischung der Proben im Verdünnungsmedium erfolgt. Dies wird sowohl durch eine so genannte ‘Sandwich’-Pipettierung (14 μ L Verdün-

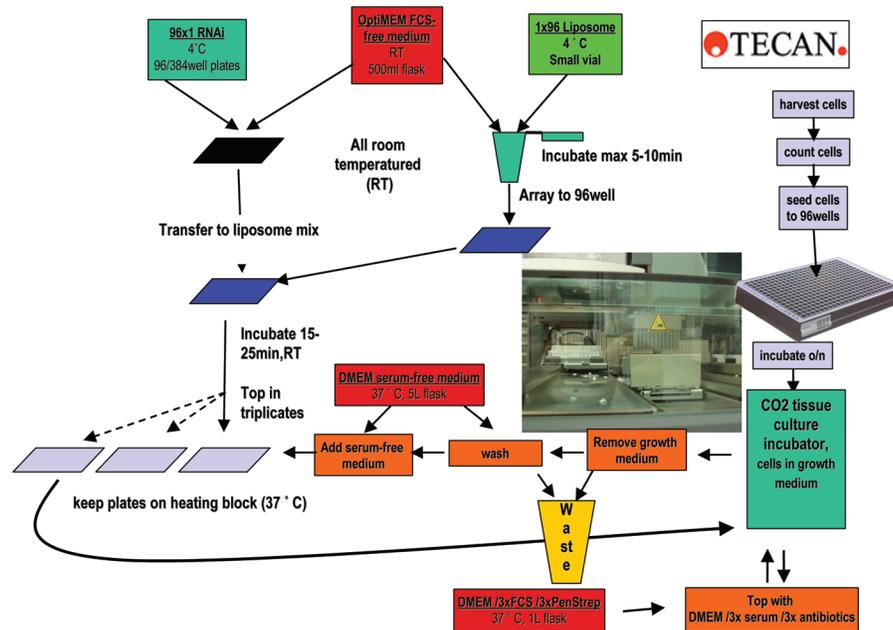


Abb. 3: Automatisierte Transfektion.



nungsmedium, 2 µL Probe, 14 µL Verdünnungsmedium) als auch durch einen separaten Mischpipettierschritt erreicht.

Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit wurden die Messwerte als Datei im XML Format (Extensible Markup Language (XML), www.w3.org/XML/) automatisiert direkt in das LIMS-System des TDS exportiert. Die einzelne XML Readerdatei ist immer einer Platte zugeordnet. Mit Hilfe dieser TDS-LIMS Software wird eine vollständige, statistische Auswertung durchgeführt. Parallel zu den Photometerdaten wurden auch Gelbilder in das TDS-LIMS importiert. Mit Hilfe des „siRNA-Normalisierungs-Algorithmus“, der im TDS-LIMS implementiert ist, wird dann eine komplette Normalisierungsliste für den Roboter zur Reformatierung und Einstellung zu gleichen Konzentrationen in einer neu zu pipettierenden Bibliothek erstellt. Dabei werden Proben mit unzureichender Qualität (keine PCR-Bande, PCR-Doppelbanden, unvollständiger RNaseIII-Verdau, etc.) oder zu geringer Konzentration aussortiert.

Für die Zusammenstellung der normalisierten Bibliothek wurde das 8-nadelige LIHA-Pipettiersystem angewendet. Alle acht Nadeln können unabhängig voneinander gemäß der LIMS-Vorgabe erst das Verdünnungsmedium vorlegen und dann als Summand entsprechende Mengen des esiRNA-Gemisches zugeben. In der Summe ergibt sich ein gleiches Endvolumen der verschiedenen esiRNA zu gleichen Konzentrationen. Von dieser neu zusammengestellten Bibliothek im 384er-Maßstab werden nun wieder Proben genommen und sowohl auf einem Gel kontrolliert als auch nochmals im UV-Spektrophotometer gemessen. Die Standardabweichungen nach erfolgter Normalisierung liegen bei effektiver Verwendung der Probenmengen (2 µL) im Bereich von weniger als 20 %.

Transfektion im Hochdurchsatz

Als nächster wichtiger Schritt für die weitere Anwendung dieser neu geschaffenen Bibliothek wurde die automatisierte Transfektion in menschliche Krebszellen aufgesetzt und optimiert. Um Nukleotide jeglicher Art in die Zellen einzubringen, wer-

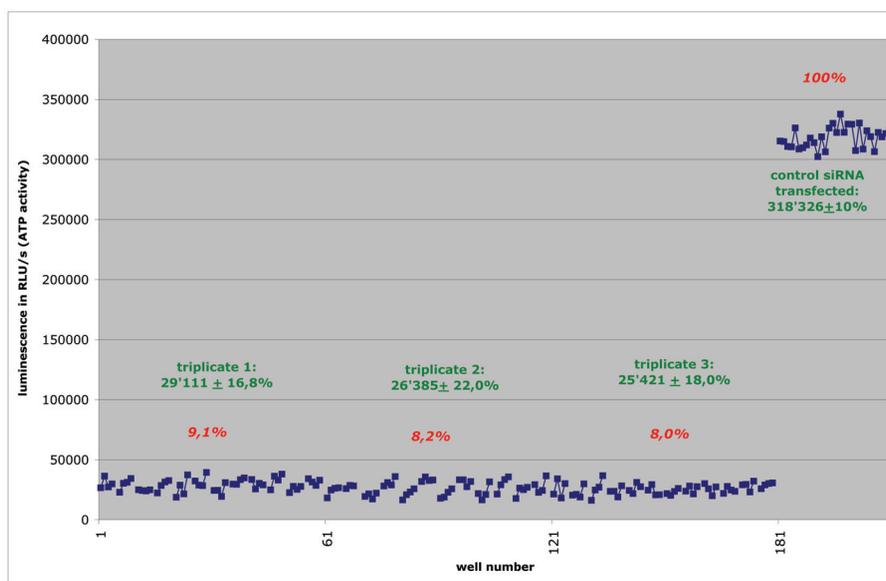


Abb. 4: Transfektionsoptimierung.

den liposomale Formulierungen verwendet. Die positiv geladenen Liposomen komprimieren und „verpacken“ die Nukleotidstränge und helfen, die Membran von Zellen zu durchdringen, sowie die endosomalen Strukturen, in denen die Zelle diese Komplexe aufgenommen hat, in Richtung Zytoplast zu verlassen. Der gesamte Transfektionsprozess ist soweit als möglich standardisiert (Abb. 2). Das Zellzählgerät CASY (Schärfe System GmbH, Reutlingen) sorgt für gleich bleibende Zählweise, variable Verteilungsmuster durch Pipettenwinkel und andere schwankende Parameter manueller Handhabung werden mit automatisierter Zellaussaat (WellMate Dispenser, MATRIX Corp., Hudson, USA) vermieden. Die Zellen werden am Tag vor der Transfektion in Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank am Transfektionsroboter (Tecan Freedom EVO System) inkubiert. Mit dem komplexen Transfektionsprogramm wird ein Durchsatz von 40 Transfektionen in Triplikaten, d. h. 120 Empfängerplatten mit den Zellen, pro Tag erzielt. Das Protokoll ist in *Abbildung 3* schematisch dargestellt. Zuerst wird das Transfektionsreagenz in Zellkulturmedium vorverdünnt und mit dem 8-Nadler LIHA in eine 96er-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wird ei-

ne Platte der esiRNA-Bibliothek in Medium verdünnt und mit dem 96er-Kopf TEMO auf das Transfektionsreagenz repliziert und gemischt. Während sich der Transfektionskomplex bildet, werden die Zellen vorbereitet. Drei Mikrotiterplatten werden aus dem Brutschrank genommen, gewaschen und serum-freies Zellkulturmedium vorgelegt. Anschließend werden die fertigen Transfektionskomplexe in Triplikaten auf die Zellen gegeben, wobei die Replikate jeweils in eine weitere Zellplatte abgegeben werden. Die drei transfizierten Mikrotiterplatten werden wieder in den Brutschrank überführt. Parallel zu den weiteren Transfektionsrunden werden nach 3 Stunden Inkubationszeit die transfizierten Zellen wieder herausgenommen, und Serum für optimales Wachstum zugegeben. Die Zellen werden anschließend bis zur Analyse zwischen zwei und vier Tagen inkubiert. Zur Transfektionsoptimierung wurde die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa mit RNAi-Molekülen gegen das Kinesin-verwandte mitotische Motorprotein Eg5^[15] transfiziert, welches eine wichtige Rolle bei der Spindelbildung spielt, und dessen Ausschaltung zuerst zu einem Arrest in der Mitose des Zellzyklus, später dann zu Apoptose führt. Die abgerundeten, mitotischen Zel-

len können nach 24–48 Stunden einfach unter dem Mikroskop gezählt werden, oder im hier dargestellten Falle (Abb. 4) nach 72 Stunden mit Hilfe eines ATP-Assays die Abnahme der Zellzahl/-masse gegenüber der kontroll-transfizierten Platte in einer Lichtreaktion gemessen werden. Die Transfektionseffizienz liegt typischerweise bei über 90 % der Zellen, was nach 72 Stunden zu einem massiven Zellverlust führt. Andererseits teilen sich die nicht-transfizierten Zellen rasant weiter, da ihnen alle Nährstoffe zufallen, und verfälschen das Bild mit zunehmender Zeit.

Ausblick

Mit dieser genomweiten RNA-Interferenzbibliothek steht der Forschung ein außergewöhnliches Werkzeug zur Verfügung, um systematisch die einzelnen Gene des menschlichen Genoms auf ihre Funktion bei allen elementaren biologischen Prozessen in der Zelle zu untersuchen. Außerdem haben wir Transfektionsmethoden entwickelt, die es unserer Screeningabteilung TDS erlaubt, solche Gencharakterisierungsprojekte im Hochdurchsatz durchzuführen. Multiparametrische, zelluläre Assays aus den Bereichen Onkologie und Infektionsbiologie werden zur Zeit am TDS für die Anwendung auf dem automatisierten Screening-Mikroskop OPERA (Evotec Technologies GmbH, Hamburg) entwickelt und für die genomweiten Screens validiert. Die Auswertung der bei einem Screen anfallenden zehn- oder hunderttausenden von Bildern wird von Bildverarbeitungsprogrammen, wie der Cellenger™-Software (Definiens AG, München), durchgeführt.

Automatisierte Fluoreszenzmikroskopie bietet außergewöhnliche Möglichkeiten um den physiologischen Status einzelner Zellen im Hochdurchsatz und mit hohem Informationsgehalt zu analysieren. Dabei werden möglichst mit mehreren fluoreszenten Markierungen Menge und Ort einzelner Biomoleküle in mehreren Farben sichtbar, und können nicht nur quantitativ und qualitativ ausgewertet werden, sondern die verschiedenen Parameter können auch noch gegeneinander in Beziehung gesetzt werden. Somit entsteht ein komplexes Geflecht an Informationen, das zum besseren Verständnis von zellulären Vorgängen, aber auch von in die Zellen eingebrachten Substanzen in erheblichem Maße beisteuert. In der Arzneistoffforschung kann zum Beispiel frühzeitig das Verhalten von chemischen Substanzen in Zellen getestet werden und mögliche unerwünschte Nebenwirkungen schon sehr frühzeitig im Pharmaentwicklungsprozess erkannt (und verbessert/eliminiert) werden.

Literatur

- [1] **Fire, A., et al.** (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811.
- [2] **Tomari, Y., und Zamore, P. D.,** (2005): Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19: 517–529.
- [3] **Dykxhoorn, D. M., Novina C. D., and Sharp, P. A.** (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 457–467.
- [4] **Elbashir, S. M., et al.** (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498.
- [5] **Sonnichsen, B., et al.** (2005): Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 434: 462–469.
- [6] **Kamath, R. S., et al.** (2003): Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421: 231–237.
- [7] **Gonczy, P., et al.** (2000): Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* 408: 331–336.
- [8] **DasGupta, R., et al.** (2005): Functional genomic analysis of the Wnt-wingless signaling pathway. *Science* 308: 826–833.
- [9] **Furlong, E. E.** (2005): A functional genomics approach to identify new regulators of Wnt signalling. *Dev Cell*, 8: 624–626.
- [10] **Armknecht, S., et al.** (2005): High-throughput RNA interference screens in *Drosophila* tissue culture cells. *Methods Enzymol* 392: 55–73.
- [11] **Boutros, M., et al.** (2004): Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 303: 832–835.
- [12] **Yang, D., Buchholz, F., et al.** (2002): Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *PNAS* 99: 9942–9947.
- [13] **Kittler, R., Buchholz, F.** (2003): RNA interference: gene silencing in the fast lane. *Semin Cancer Biol* 13: 259–265.
- [14] **Kittler, R., et al.** (2004): An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432: 1036–1040.
- [15] **Weil, D., et al.** (2002): Targeting the Kinesin Eg5 to Monitor siRNA Transfection in Mammalian Cells. *BioTechniques* 33: 1244–48.

Danksagung

Wir danken dem Deutschen Ressourcenzentrum (RZPD) und dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin für die Bereitstellung der cDNA-Bibliothek.

Korrespondenzadresse:

Dr. Eberhard Krauß
HT-Technology Development Studio (TDS)
Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik
Pfotenhauerstr. 108
D-01307 Dresden
buchholz@mpi-cbg.de