

Genomweite funktionelle Analyse des Kinoms mittels RNA-Interferenz

Eberhard Krauß¹, Lucas Pelkmans², Eugenio Fava¹, Michael Hannus³, Claudia Möbius¹, Kerstin Korn¹, Françoise Halley³, Annett Lohmann¹, Hannes Grabner¹ und Marino Zerial²

¹HT-Technology Development Studio (TDS), ^{1,2}Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden, ³Cenix BioScience GmbH, Dresden

► In den Laboratorien des „High-Throughput Technology Development Studio“ (TDS) werden in enger Zusammenarbeit mit internen und externen Forschungsgruppen phänotypische Assays (qualitative/quantitative Untersuchungen) entwickelt und mikroskopiegestützte Durchmusterungen, so genanntes „High-Content Screening“, sowohl in kultivierten Zellen als auch in Modellorganismen durchgeführt. Dabei werden automatisierte Pipettierstationen, Mikroskope und Bildverarbeitungsprogramme zu Hilfe genommen, um neue Genfunktionen oder Wirkungsweisen chemischer Substanzen zu entdecken.

RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus, der die Möglichkeit bietet, die Expression eines jeden einzelnen Gens gezielt still zu legen^[1] und findet mittlerweile breite Anwendung um Genfunktionen zu identifizieren und zu charakterisieren. Durch sequenzspezifischen Abbau einer ausgewählten mRNA-Population in der Zelle wird die Synthese eines Proteins verhindert. Mittlerweile stehen größere Sammlungen von RNAi-Molekülen, so genannte Bibliotheken, zur Verfügung, um systematisch ein Gen nach dem anderen auf seine Funktion bei biologischen Prozessen in der Zelle zu untersuchen. Wir haben automatisierte Transfektionsmethoden entwickelt, die es erlauben, siRNA-Moleküle in Liposomen zu verpacken und in die Zelle einzubringen, um genomweite Gencharakterisierungsprojekte im Hochdurchsatz durchzuführen^[2].

„High-Content Screening“

Mit der automatisierten Fluoreszenzmikroskopie steht eine überlegene Technologie gegenüber klassischen Screeningverfahren zur Verfügung, um die Wirkweise von Substanzen im physiologischen Kontext lebender Zellen sowohl mit hohem Durchsatz als auch gleichzeitig mit hohem Informationsgehalt zu untersuchen. Dabei werden mit verschiedenen, fluoreszierenden Farbstoffen Menge und Ort einzelner Biomole-

küle in der Zelle sichtbar gemacht. Neben einer solchen qualitativen als auch quantitativen Erfassung können die verschiedenen Parameter zusätzlich in Relation zueinander gesetzt werden. Damit entsteht ein komplexes Geflecht an Informationen, das zum besseren Verständnis von zellulären Vorgängen, aber auch von in die Zellen eingebrachten chemischen Substanzen, in realitätsnahem Maße beisteuert. In der Arzneimittelforschung kann zum Beispiel schon beim primären Screening das Verhalten von chemischen Substanzen direkt in lebenden Zellen getestet werden, wodurch unerwünschte Nebenwirkungen bereits frühzeitig im pharmazeutischen Entwicklungsprozess erkannt werden. Multiparametrische, zelluläre Assays aus den Bereichen Onkologie und Infektionsbiologie werden zurzeit am TDS für die Anwendung auf dem automatisierten Screeningmikroskop OPERATM (Evotec Technologies GmbH, Hamburg) entwickelt und für größere Screens validiert. Die Auswertung der bei einem Screen anfallenden außerordentlichen Menge an Bildern wird von Muster-erkennenden Bild-

verarbeitungsprogrammen, wie der Cellen-gerTM-Software (Definiens AG, München), durchgeführt.

Das Screeningmikroskop OPERATM TEHS ist ein konfokales, inverses Fluoreszenzmikroskop (Abb. 1), das automatisch Bilder von Zellen in Mikrotiterplatten nehmen kann. Die Bildpositionen innerhalb der Plattenvertiefungen werden einheitlich vorgegeben, das Gerät stellt vor jeder Aufnahme automatisch scharf. Der Vorgang dauert etwa 0,1 Sekunde. Das System ist mit drei Laserlichtquellen ausgestattet, wobei zwei Kameras die gleichzeitige Aufnahme in zwei Farben erlauben. Die Stärke des Gerätes liegt vor allem in der hervorragenden Bildqualität, die durch die generelle Optik, ein auf dem Markt einmaliger Wasserkragen, der den Einsatz von Immersionsobjektiven erlaubt, und durch eine Nipkow-Scheibe generierte Konfokalität erreicht wird. Die Konfokalität bewirkt ein Scharfstellen genau auf eine Ebene und erlaubt scheinbar die dreidimensionale Analyse der Zelle. Damit werden räumliche Anordnungen sichtbar, aber auch die Hintergrundfluoreszenz durch außerhalb der Ebene liegende zelluläre Strukturen oder schicht des flüssigen Überstandes eliminiert.

Kinasen: Regulatoren zellulärer Prozesse

Kinasen sind nicht nur wichtige Regulatoren vieler zellulärer Prozesse sondern auch eine bedeutende Klasse von Zielproteinen für pharmazeutische Wirkstoffe. Leider wissen wir über die mehr als 700 im menschlichen Genom kodierten Kinasen nur von einer Minderheit, welche Rolle sie in der Zel-

Automatisierte Hochdurchsatz-Mikroskopie: Das OPERATM TEHS System

- > Konfokales Fluoreszenzmikroskop (Nipkow-Scheibe)
- > Automatische Fokussierung (0,1 sec)
- > Hohe Auflösung bis auf sub-zellulärer Ebene (10x - 60x Vergrößerung)
- > 3 Farben (Anregung bei 488nm, 532nm, 633nm durch Laserquellen)
- > 2 CCD-Kameras
- > Geschwindigkeit: bis zu 100.000 Aufnahmen in 24 Stunden

Abb. 1: Das Hochdurchsatzmikroskop OPERATM TEHS (Schema mit freundlicher Genehmigung der Evotec Technologies GmbH übernommen).

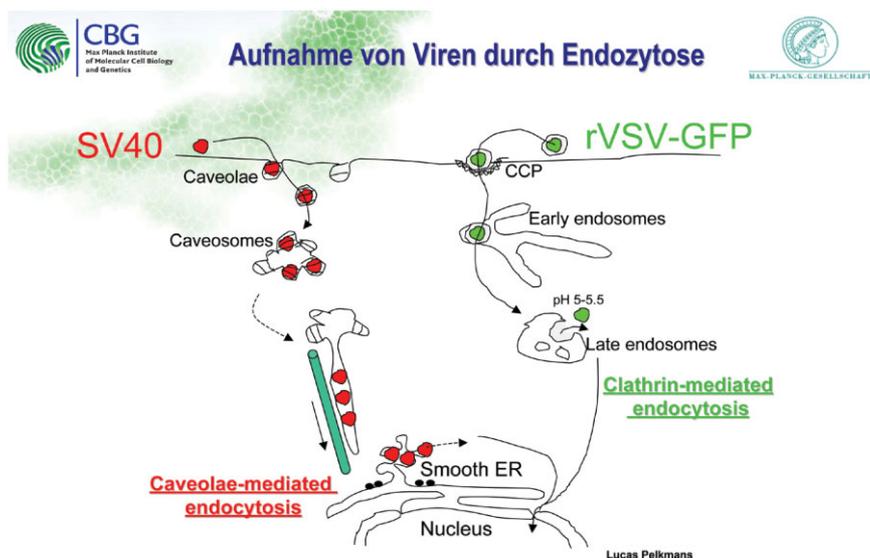


Abb. 2: Viren kapern Endozytosewege um in die Zelle zu gelangen.

le spielen. Noch kleiner ist die Zahl derer, die mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden und damit für die Arzneistoffentwicklung interessant sind. Nun bietet die RNA-Interferenz eine Methode Gene stillzulegen und funktionelle Erkenntnisse über jede Kinase zu gewinnen. Wir haben eine siRNA-Bibliothek (Ambion, USA) angewendet, die 600 humane Kinasen mit jeweils drei chemisch synthetisierten siRNA-Sequenzen pro Gen abdeckt. Erwähnenswert ist, dass für mehr als 300 Kinasen Daten zur Effizienz des mRNA-Abbaus durch die einzelnen siRNA-Moleküle in transfizierten Zellen vorliegen, die durch quantitative RT-PCR gemessen wurden. Die Effizienz liegt für die große Mehrheit (> 90 %) der untersuchten Moleküle bei mindestens 70 %. Der Datensatz wird beim Erwerb der siRNA-Bibliothek mitgeliefert.

Regulation von Endozytosewegen

Diese siRNA-Bibliothek wurde in einem Screeningprojekt zur Untersuchung der Regulation von Endozytosewegen durch Kinasen eingesetzt. Endozytose ist der Prozess bei dem Zellen Membrankomponenten zusammen mit Löslichem von der Oberfläche in das Zellinnere aufnehmen. Von den beschriebenen Endozytosewegen^[3] wurden für die Clathrin-abhängige und die Caveolae- und Raft-abhängige Endozytose eine Anzahl an primären und sekundären Assays entwickelt. Die primären Assays sollten einfach und robust sein sowie vornehmlich eine Ja-/Nein-Antwort geben. Dabei wurde in unserer Strategie ausgenutzt, dass zwei bekannte Viren jeweils einen speziellen Endozytoseweg ausnutzen um in die Zelle zu gelangen: Das Vesikuläre Stomatitisvirus (VSV) den Clathrin-abhängigen und Simian Vi-

rus 40 (SV40) den Caveolae-abhängigen (Abb. 2). Beide sorgen dafür, dass bei erfolgreicher Infektion die Zellen markiert werden. Da bei VSV in das virale Genom eine Expressionskassette für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) eingebaut wurde, lässt sich die Anreicherung des Proteins im Zytosol verfolgen. Bei SV40 agiert das viruseigene große T-Antigen („Tag“) im Kern als Transkriptionsfaktor und kann mittels eines Antikörpers angefärbt werden. Die sekundären Assays sollen zur näheren Charakterisierung der Treffer („hits“) aus den primären Screens verwendet werden. Sie sind deutlich aufwendiger und erlauben eine Zerlegung der Aufnahmewege in einzel-

ne Schritte. In den komplexen phänotypischen Analysen sollen Klassen von Mustern unterschieden werden. Dafür wurden anstelle der Viren entweder andere Träger wie Transferrin verwendet, deren Aufnahme während des gesamten Transportes beobachtet werden kann, oder morphologische Markierungsproteine ausgewählt, die charakteristisch in bestimmten Vesikeltypen vorkommen. Die Proteine wurden entweder mit GFP fusioniert oder mittels spezifischer Antikörper angefärbt.

Durchmusterung nach Regulatoren

Während der primären Screens wurden die HeLa-Zellen in 96er-Mikrotiterplatten mit Klarsichtboden ausgesät, und nach 16–24 Stunden die siRNA-Moleküle in Triplikaten transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden getrennt entweder SV40 oder VSV dazugegeben. Für VSV wurde bereits drei Stunden später nach grün fluoreszierenden Zellen geschaut, während für SV40 erst 36 Stunden nach der Infektion mit Antikörpern gegen „Tag“ angefärbt wurde. Beide Male wurde als zweite Markierung der Kern angefärbt. Um eine möglichst spezifische Virusaufnahme zu gewährleisten, wurde ein recht geringer Virustiter mit etwa einem Virus pro 10 Zellen gewählt, d. h. nur ein kleiner Teil der Zellen wurde infiziert. Somit konnte sowohl eine Minderung als auch eine Verstärkung der Infektionen erkannt werden. Als Treffer („hit“) wurde eine Minderung oder Steigerung um mehr als das Dreifache definiert. Erstaunlicherweise wurden 208 Kinasen identifiziert^[4], von de-

Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics

Sekundäre Endozytoseassays

MAX-PLANCK-GESellschaft

Morphologie von

- a) frühen Endosomen (anti-EEA1)
- b) späten Endosomen (anti-LAMP1)
- c) Caveolae & Caveosomen (Cav1-GFP)

Aufnahme fluoreszenzmarkierter Substanzen über

- d) den Endocytose-Recycling-Weg (AF488-Transferrin)
- e) den degradativen Weg (Dil-LDL)
- f) Caveolae/Raft-vermittelte Endozytose (AF488- Cholera toxin B)

d) Aufnahme von Transferrin (10min)

siRNA gg. RPS6KL1	siRNA gg. AAK1	siRNA gg. CHUK	Negativkontrolle (siRNA gegen Luciferase)
Klasse 1: Akkumulation in kleinen Punkten an der Zellperipherie	Klasse 2: Starke Akkumulation im perinukleären Bereich	Klasse 3: Akkumulation in vergrößerten zytoplasmatischen Strukturen	

Abb. 3: Die sechs sekundären Endozytoseassays und beispielhaft drei verschiedene Phänotypen (Klassen), die 10 min nach der Zugabe von grün-fluoreszentem Transferrin und 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion beobachtet wurden.

nen 92 ausschließlich mit dem VSV-Aufnahmeweg interferierten, 80 die ausschließlich mit dem SV40-Aufnahmeweg in Verbindung standen. Nur 36 waren in beide Wege involviert, wobei die Mehrheit von 23 einen inversen Phänotyp zeigt, d. h. Minderrung der SV40-Infektion bei gleichzeitiger Erhöhung der VSV-Infektion oder umgekehrt. Nur 13 behinderten oder förderten beide Wege in dieselbe Richtung. Damit sind mehr als 80 % der Treffer spezifisch für einen der Wege. Die Wiederholung der Screens mit unabhängigen siRNA-Sequenzen gegen dieselben mRNA-Moleküle und mit kleinerer Bibliotheksgröße erbrachte eine Verifizierung von 50 von 50 Treffern für VSV und 48 von 50 Treffern für SV40.

Sechs von acht aus der Literatur bekannten Kinasen wurden auch in unseren Screens in ihrer Funktion bestätigt. Weiterhin wurden siRNAs gegen 50 beliebig gewählte Gene zusammengestellt und mit einem Assay getestet: Die Entdeckung nur eines Treffers zeigt, dass der Assay durchaus nicht störanfällig ist, also eventuell massenweise falsch-positive Treffer aufzeigen würde, sondern vielmehr, dass die Kinasen selektiv angereichert sind, was bei ihrer Funktion als Regulatoren zellulärer Prozesse folgerichtig erscheint.

Sekundäre Assays

Der Screen für den Clathrin-abhängigen Endozytoseweg wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Transferrin anstelle des VSV-Virus als erstem sekundären Assay mit der vollständigen siRNA-Bibliothek wiederholt. Danach wurden 50 ausgewählte Kinasen in den fünf weiteren sekundären Assays (Abb. 3) charakterisiert, um zu ermitteln, an welcher Stelle der Endozytosewege sie interagieren. Die gewonnenen Bilder wurden auf das Auftreten von Mustern analysiert und in Klassen eingeteilt. Für den Transferrin-Screen konnte 72 % Übereinstimmung (92/128) mit dem VSV-Screen gezeigt werden. Für den Caveolae-/Raft-abhängigen Endozytoseweg wurden 87 % Übereinstimmung (34/39) nachgewiesen. Eine aufwendige Auswertung auch mit Clusteranalysen legte ein komplexes regulatorisches Netzwerk zur Kontrolle von Endozytosewegen offen^[4]. Einige interessante Kandidaten wurden herausgenommen und einer erheblich verfeinerten experimentellen Analyse in dem kooperierenden Forschungslabor unterzogen^[5].

Ausblick

Zurzeit laufen die Arbeiten für einen genomweiten Screen mit siRNA-Molekülen gegen mehr als 21.000 menschliche Gene. In

der nahen Zukunft werden wir im Rahmen des „Chemical Genomics Center“ innerhalb der Max-Planck-Gesellschaft und in enger Zusammenarbeit mit Prof. Waldmann am MPI Dortmund chemische Substanzsammlungen durchmustern. Die Idee ist, funktionelle mit chemischer Genomik zu verbinden um neue Genfunktionen zu entdecken und gleichzeitig nach chemischen Modulatoren der zugehörigen Proteinaktivitäten zu suchen. Damit soll gezeigt werden, in welchem Maße multi-parametrische, zellbasierende Analysetechnologien dazu beitragen können, Fortschritte nicht nur in der Grundlagenforschung zu erzielen, sondern auch neuartige Möglichkeiten für therapeutische Anwendungen zu schaffen.

Danksagung

Die Arbeiten werden durch Fördermittel der Max-Planck-Gesellschaft (Institutsübergreifende Forschungsinitiative „RNA-Interferenz“) sowie des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (InnoRegio/BioMeT Dresden, Förderkennzeichen 03I4035A) finanziert.

Literatur

- [1] Tomari, Y., and Zamore, P. D. (2005): Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19: 517–529.
- [2] Krauß, E., et al. (2005): Eine genomweite RNA-Interferenz-Bibliothek für die funktionelle Charakterisierung aller Gene in kultivierten, menschlichen Zellen. *BIOspektrum* 4: 436–441.
- [3] Pelkmans, L., and Helenius, A., (2003): Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 414–422.
- [4] Pelkmans, L., et al. (2005): Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436: 78–86.
- [5] Pelkmans, L., and Zerial, M. (2005): Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 436: 128–133.

Korrespondenzadresse:

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