Functional Genomics

Genfunktionsanalyse im Genom-weiten Maßstab mit ‚small interfering' RNAs

Effi Rees, Bernhard Korn, RZPD Heidelberg
Frank Buchholz, MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden

Die RNA-Interferenz (RNAi)[3] ist eine wirkungsvolle Methode zur Untersuchung von Genfunktionen und ermöglicht den „knock-down" von Genen in einer Vielzahl von Organismen (z.B. *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Mus musculus*) sowie in menschlichen Zellinien. Ein initialer Schritt bei der RNAi ist das Prozessieren der doppelsträngigen RNA (dsRNA) in kurze Stücke, die sogenannten "small interfering" RNAs (siRNA)[2]. Die siRNA bildet mit einem intrazellulären Proteinkomplex den sogenannten RNA-induced Silencing Complex (RISC); dieser bindet an den antisense-Strang des siRNA 21-23mers und schneidet die mRNA in der Mitte des Hybrides[4]. Da die gespaltene mRNA sehr instabil ist, wird sie rasch abgebaut und führt zu einem „gene silencing" auf posttranskriptioneller Ebene.

Bei Menschen-, Maus- und Rattenzellen wird durch den Einsatz von langen dsRNA-Molekülen die sogenannte Interferonantwort ausgelöst, auch als dsRNA-abhängiger Protein-Kinase (PKR)-Stoffwechselweg bekannt[7]. Durch eine Bindung von dsRNA, welche nicht sequenzabhängig ist, kommt es zur Autophosphorylierung der PKR, die ihrerseits den Translationsfaktor eIF2a durch Phosphorylierung aktiviert. Über weitere enzymatische Zwischenschritte erfolgt eine Inhibition der Translation, welche wiederum zur Induktion der Apoptose führt. In den Säugerzellen können also keine langen dsRNAs direkt zum „knock-down" eingesetzt werden, wie dies für *Drosophila* und *Caenorhabditis* beschrieben wurde, da dies in letzter Konsequenz zum Zelltod führt.

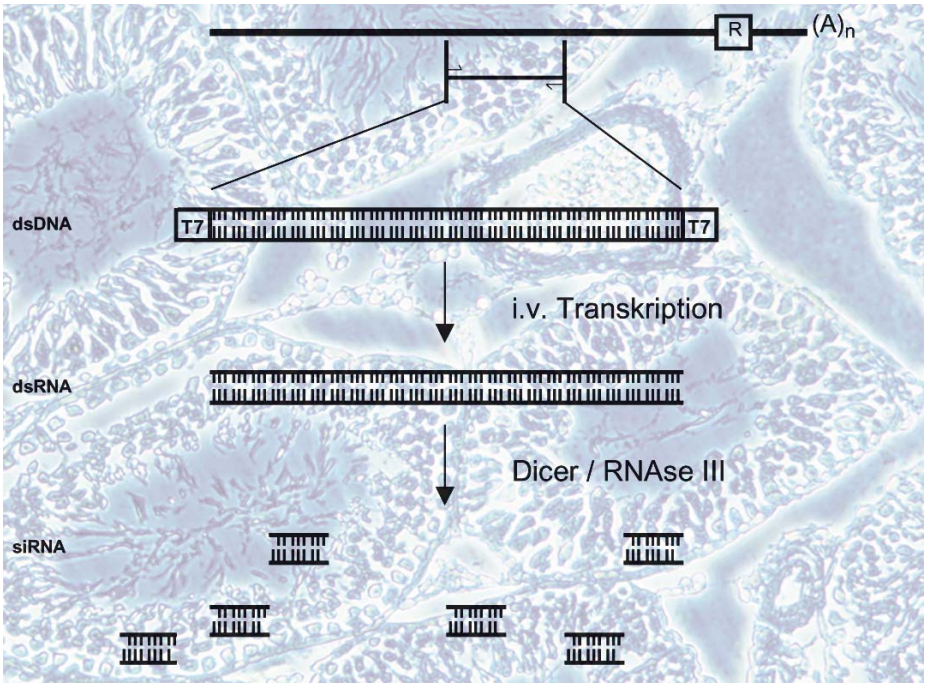

Abb. 1: Von der mRNA Sequenz zum siRNA-Ressource-Produkt. Eine Teilsequenz, die frei von „repeats" (R) und konservierten Anteilen ist, wird über genspezifische PCR amplifiziert. Die Produkte werden verifiziert und mit T7-Promotoren versehen. Über *in vitro*-Transkription werden die PCR-Produkte in „lange" dsRNAs überführt. Diese werden anschließend über spezifische RNA-abbauende Enzyme (Dicer/RNaseIII) in funktionelle siRNAs umgewandelt.

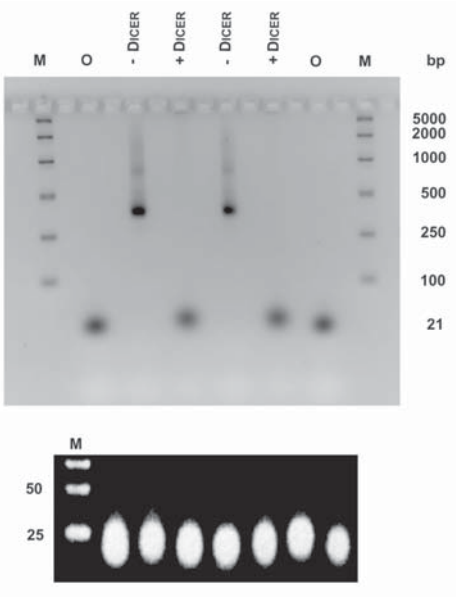

Abb. 2: Dicer/RNaseIII-Reaktion *in vitro*
A zeigt den Verdau von dsRNA durch rekombinantes Dicer-Enzym. Die Längen der Größenmarker sind angegeben, O 21mer-dsDNA
B zeigt dsRNA-Pools nach RNaseIII-Behandlung.

Einsatz von siRNAs in Säugern

Aus diesem Grund wurde der Einsatz von 21 bp-dsRNAs für den"knock-down"in menschlichen, murinen und Rattenzellen von der Arbeitsgruppe von Tom Tuschl beschrieben[2]. Inzwischen wurden diverse andere Methoden erfolgreich getestet um einen knock-down von Genen in Mensch und Maus zu erzielen[1]. Dies umfaßt den Einsatz von „small interfering" RNAs mit einer Größe von 21–23bp, „short hairpin"-RNAs (shRNA) oder vektorbasierte Systeme, mit deren Hilfe eine siRNA-Produktion *in vivo* ermöglicht wird.

Der Einsatz von 21 bp-siRNA-Produkten hat jedoch drei wesentliche Nachteile:

- eine ungewisse Erfolgsrate (im allgemeinen werden zwei bis drei verschiedene siRNA-Oligonukleotide gebraucht, um einen"knock-down"zu erzielen, da die Algorithmen zur Berechnung der Oligonukleotide bislang keine hohe Erfolgsrate ermöglichen
- die Effizienz ist meist gering, das heißt, viele der eingesetzten siRNA-Oligonukleotide führen lediglich zu einer Reduktion der Proteinkonzentration von weniger als 50%;
- die Kosten für siRNAs sind sehr hoch und belaufen sich für die chemische Synthese der siRNA-Oligonukleotide auf rund 900 (3 dsRNAs): Bei vektorbasierten Systemen belaufen sich die Kosten auf mehr als 200 pro Gen. Dies erschwert ein Genom-weites Screening.

Als Alternative bietet sich jetzt ein Verfahren an, das am RZPD weiterentwickelt wurde. Um die beschriebenen Probleme zu umgehen, werden zunächst lange dsRNAs erzeugt,

Tab. 1: Auswahl von Unternehmen, die siRNAs nutzen oder vermarkten

Firma	Firmensitz	Produkte
Alnylam	Cambridge Massachusetts/USA	Entwicklung RNAi-basierter Medikamente mit dem Schwerpunkt virale, onkologische und Autoimmun-Erkrankungen
Ambion	Austin Texas/USA	RNAi Oligos Enzym-Kits Reagenzien
Atugen	Berlin Deutschland	Entwicklung RNAi-basierter Medikamente mit onkologischem Schwerpunkt
Benitec	Brisbane Australien	Entwicklung RNAi-basierter Medikamente gegen HIV, Krebs, Hepatitis, Diabetes und Autoimmunerkrankungen
BD Biosciences Clontech	Palo Alto Kalifornien/USA	Instrumente, Reagenzien, Enzym-Kits
Cenix BioScience	Dresden Deutschland	siRNA in Kooperation mit Ambion und Medikamentenentwicklung
CytRx	Los Angeles Kalifornien/USA	Entwicklung RNAi-basierter Medikamente gegen Diabetes Typ II und ALS
Dharmacon	Lafayette Colorado/USA	Enzym-Kits, RNAi Oligos, Reagenzien
Genta	Berkeley Heights New Jersey/USA	Entwicklung RNAi-basierter Medikamente gegen Krebserkrankungen
Intradigm	Rockville Maryland/USA	Entwicklung RNAi-basierter Medikamente gegen Krebserkrankungen
Invitrogen	Carlsbad Kalifornien/USA	RNAi Oligos, Reagenzien, Enzym-Kits
Nucleonics	Malvern Pennsylvania/USA	Entwicklung RNAi-basierter Medikamente gegen Hepatitis B und C
Peqlab	Erlangen Deutschland	Reagenzien, Enzym-Kits in Kollaboration mit Gene Therapy Systems
Proligo	Boulder Colorado/USA	Enzym-Kits, RNAi Oligos, Reagenzien
Promega	Madison Wisconsin/USA	RNAi Oligos, Reagenzien, Enzym-Kits
Qiagen	Venlo Holland	Enzym-Kits, RNAi Oligos, Reagenzien
RZPD GmbH	Berlin Deutschland	Produktion von siRNA-Ressourcen im genomweiten Ansatz für Mensch, Ratte und Maus
Sequitur	Natick Massachusetts/USA	Entwicklung RNAi-basierter Medikamente gegen Asthma, Brustkrebs und RSV – Reagenzien
Sirna	Boulder Colorado/USA	Entwicklung RNAi-basierter Medikamente gegen Hepatitis C und altersabhängiger Makuladegeneration

die in verdauter Form als siRNA-Pools eingesetzt werden können. Wir beziehen uns hierbei auf eine in der Literatur beschriebene Methode: Den Einsatz von *in vitro*-Transkription und rekombinanten, RNA-verdauenden Enzymen zur Herstellung funktioneller siRNAs[6,8] (Abb. 1).

Es wurden PCR-Produkte mit einer durchschnittliche Länge von 300bp unter Verwendung von zwei genspezifischen Primern amplifiziert. Diese Zwischenprodukte enthalten keine repetitiven oder konservierten Sequenzen und werden an jedem Ende mit je einem T7-Promoter versehen, so daß durch Transkription dsRNA generiert werden kann. Diese „langen" dsRNA-Moleküle können mittels Dicer- oder RNaseIII-Reaktion in funktionelle „kleine" siRNAs überführt werden (Abb. 2). Diese Endprodukte haben sich bereits als potente „Tools" für den spezifischen knockdown erwiesen, die oft den siRNA-Oligos überlegen sind[5].

Bisher stehen am RZPD für mehr als 2.100 Gene, die an der Onkogenese und der Apoptose beteiligt sind, siRNA-Ressourcen zur Verfügung (*www.rzpd.de/products/siRNA/*). Die siRNA-Ressourcen des RZPD werden derzeit von externen Gruppen unabhängig evaluiert (F. Buchholz, MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik/B. Buchberger, Roche Diagnostics). Diese Untersuchungen bestätigen die Effektivität und die Spezifität der RZPD Ressourcen in "knock-down" Experimenten.

Bis Ende dieses Jahres werden siRNA-Ressourcen für das gesamte humane Genom vorliegen, bis Mitte 2004 können wir die Hälfte aller Transkripte von Maus und Ratte adressieren.

Literatur

[1] Bushman F. (2003) RNA interference: applications in vertebrates. Mol. Therapy 7, 9–10

[2] Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001) Duplexes of 21–nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultered mammalian cells. Nature 411,494–498

[3] Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello (1998) Potent and specific genetic interference by double–stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806–811

[4] Hammond, S.M., E. Bernstein, D. Beach, and G.J. Hannon (2000) An RNA–directed nuclease mediates post–transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature 404, 293–296

[5] Kawasaki, H., E. Suyama, M. Iyo und K. Taira (2003) siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site–independent gene silencing in human cells. NAR 31, 981–987

[6] Myer J. W., J. T. Jones, T. Meyer, and J. E. Ferell (2003) Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. Nature Biotech. 21, 324–328

[7] Stark G. R., I. M. Kerr, B. R. G. Williams, R. H. Sil verman, and R.D. Schreiber (1998) How cells respond to interferons. Annu. Rev. Biochem. 67, 227–264

[8] Yang, D., F. Buchholz, Z. Huang, A. Goga, C.Y. Chen, F.M. Brodsky und J.M. Bishop (2002) Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. PNAS 99, 9942–9947

Korrespondenzadresse

Effi Rees, Bernhard Korn
RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
Im Neuenheimer Feld 580, D-69120 Heidelberg
Fax: +49-(0)6221-424704
eMail: sirna@rzpd.de, www.rzpd.de