

doppelsträngige RNA (dsRNA) bindet an „Dicer“, einen Proteinkomplex ...



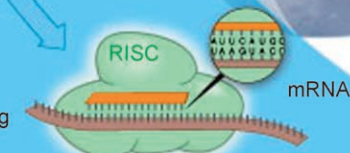
... der dsRNA in kleinere Bruchstücke spaltet



Einer der RNA-Stränge wird auf einen anderen Proteinkomplex, RISC, geladen ...



... und verknüpft den Komplex durch Basenpaarung mit der Boten-RNA (mRNA).



Die mRNA wird gespalten und zerstört.

Die Proteinsynthese ist unterbrochen.

Das Gen ist stummgeschaltet.



A. Fire



C. Mello

## RNA-Interferenz

# Gen-Stummschaltung durch doppelsträngige RNA (Nobel-Vortrag)\*\*

Andrew Z. Fire\*

**Stichwörter:**

Gen-Stummschaltung · Immunität · Nobel-Vortrag · RNA-Interferenz · Viren

*Ich danke der Nobelversammlung des Karolinska-Instituts für die Gelegenheit, einige neuere Arbeiten zur RNA-aktivierten Gen-Stummschaltung vorstellen zu können. Eines muss ich aber vorausschicken: Die gesamte Geschichte der Gen-Stummschaltung zu erzählen, wäre ein gigantisches Unternehmen, das den Rahmen dieses Vortrags weit übersteigen würde. Es wird daher nicht zu vermeiden sein, dass ich die Geschichte mehr als nur ein bisschen verkürze. Des Weiteren befinden sich unsere Kenntnisse der Gen-Stummschaltung noch in den Anfängen, weshalb Sie den Vortrag nur als Einführung in das Thema betrachten sollten – so gut es eben geht an diesem 8. Dezember 2006. Als drittes sollten Sie wissen, dass die Geschichte, die ich erzählen werde, die Arbeiten mehrerer Generationen von Biologen und Chemikern (und sämtlichen Schattierungen dazwischen) zusammenfasst. Ich bin geschmeichelt, dass Arbeiten meiner Forschungsgruppe zu diesem Feld beitragen konnten und dazu geführt haben, dass ich nun hier über diese Entwicklungen berichten darf. Gleichzeitig hoffe ich, dass man unsere bescheidenen Beiträge nicht mit den sehr viel größeren Errungenschaften der RNAi-Forschungen gleichsetzt.*

## Doppelsträngige RNA als biologisches Alarmsignal

Nachdem wir nun etliche Einschränkungen vorausgeschickt haben, können wir unsere Geschichte mit dem ersten Hauptakteur beginnen. Doppelsträngige RNA ist wahrscheinlich so alt (oder fast so alt) wie das Leben auf der Erde. Die Naturwissenschaften nahmen freilich etwas später Notiz von dieser RNA-Form, und zwar Mitte der 1950er Jahre. Hierbei wurden die gleichen Arten von Basenpaaren, die DNA-Stränge wie einen Reißverschluss zu einer Helix zusammenziehen,<sup>[1]</sup> nur ein paar Jahre später auch in der Struktur der RNA gefunden.<sup>[2–5]</sup> Wenn zwei RNA-Stränge größere Bereiche komplementärer Sequenzen aufweisen, können sie sich zu einer etwas flexiblen stäbchenförmigen Struktur zusammenlagern, die ähnliche Merkmale wie die DNA-Doppelhelix hat (sich im Detail aber von dieser unterscheidet).<sup>[5,6]</sup>

Das Vorkommen von doppelsträngigen RNAs in biologischen Systemen wurde in einer Reihe von Experimenten Anfang der 60er Jahre aufgedeckt.<sup>[7–9]</sup> Interessanterweise waren all diese biologischen Systeme, die als Quelle für doppelsträngige RNA ausgemacht wurden, am Vorgang der Virusinfektion beteiligt. Die Befunde führten zu der Hypothese, dass viele Viren mithilfe eines doppelsträngigen RNA-

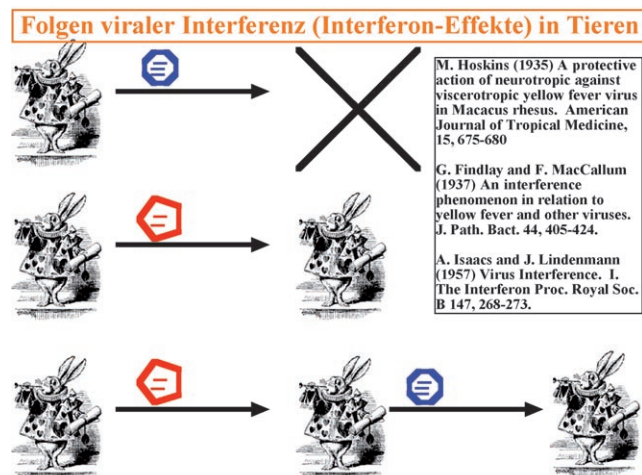
Intermediats von einer RNA zur nächsten RNA replizieren könnten. Zu dieser Zeit wurde das zentrale Dogma der Molekularbiologie experimentell begründet, welches besagt, dass Zellen in erster Linie doppelsträngige DNA für die langzeitige und einzelsträngige RNA für die kurzzeitige Informationsspeicherung nutzen. Dies ließ keinen Spielraum für eine Beteiligung doppelsträngiger RNA am normalen zellulären Informationsfluss, beließ der dsRNA aber eine Schlüsselrolle bei der Replikation von RNA-Viren (zumindest vorübergehend).

Springen wir nun weitere dreißig Jahre in die Vergangenheit, zu einer Serie von Experimenten, in denen man die Reaktionen einer Wirtszelle auf eine virale Infektion untersuchte.<sup>[10,11]</sup> Die Experimente wurden mit zwei verschiedenen (im Wesentlichen nicht verwandten) Viren ausgeführt, mit

[\*] Prof. Dr. A. Z. Fire  
Departments of Pathology and Genetics  
Stanford University School of Medicine  
300 Pasteur Drive, Room L235, Stanford, CA 94305-5324 (USA)  
E-Mail: afire@stanford.edu

[\*\*] Copyright© The Nobel Foundation 2006. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

denen man einen einzelnen Wirt infizierte (Abbildung 1). Eines der Viren war recht virulent und in der Lage, das Wirtstier zu töten, während das zweite Virus relativ gutartig war und nur geringe Symptome verursachte. Das überras-



**Abbildung 1.** Virale Interferenz („angeborene Immunität“) bei Säugern. Oben: Ein hoch virulentes Virus (dargestellt als blaues Sechseck) führt zum Tod, wenn es einem „naiven“ Wirttier eingepflegt wird. Mitte: Ein weniger virulentes (und nicht verwandtes) Virus (dargestellt als rotes Fünfeck) infiziert Zellen, verursacht aber keine oder nur geringe systemische Symptome – das Tier bleibt am Leben. Unten: Eine vorausgehende Infektion mit dem weniger virulenten Virus (rot) führt zu einer angeborenen Immunreaktion, die es dem Tier ermöglicht, eine nachfolgende Infektion mit dem hoch virulenten Virus (blau) zu überleben. Quelle: Im Einschub und im Haupttext angegebene Literaturstellen; die Zeichnung des Kaninchens ist John Tenniels Illustration im 11. Kapitel von Alice im Wunderland entlehnt (1865).

schende Ergebnis war, dass eine vorab vorgenommene Infektion mit dem gutartigen Virus das Tier widerstandsfähig gegen den zweiten, tödlichen Virus machte. Die Schlussfolgerung aus diesem Befund lautet, dass der Wirt (in diesem Fall ein Hase) in irgendeiner Form weiß, dass er durch ein virales Pathogen infiziert wurde und in irgendeiner Weise ein Signal aussendet, das es ihm ermöglicht, eine Form von Widerstandsfähigkeit gegen weitere Infektionen zu entwickeln. Obwohl schon lange bekannt war, dass Viren Immunreaktionen auslösen können, kamen diese Ergebnisse unerwartet, da die beiden im Experiment verwendeten Viren anscheinend nicht verwandt waren. Diese allgemeine Immunreaktion auf eine Infektion war eine neue Erscheinung und erbrachte wichtige Erkenntnisse über Immunmechanismen unter Beteiligung allgemeiner Alarmreaktionen. Eine entscheidende Folgeentdeckung kam ungefähr 20 Jahre später, als Isaacs und Lindeman<sup>[12]</sup> ein Protein aus einem infizierten Tier isolierten, das nach Injektion in ein naives Tier eine allgemeine Virenresistenz übertrug. Dieses Protein wurde als Interferon bezeichnet.

Noch während diese Studien liefen, begann sich der Mediziner Richard Shope für mögliche Anwendungen der angeborenen Immunantwort zu interessieren. Sein Ziel war es, eine Behandlung zu finden, die eine allgemeine Immunität

auslösen und so zu Virenresistenz führen sollte. Shope reiste gegen Ende des Zweiten Weltkrieges rund um die Welt und sammelte biologisches Material auf der Suche nach etwas, das er zermahlen und als Ausgangsmaterial verwenden konnte. Sein bemerkenswertester Fund war ein Pilz (*Penicillium funiculosum*), den er in Guam auf einem eingerahmten Bild seiner Frau Helen fand. Die Extrakte des Pilzes nannte er „Helenin“, und er fand, dass diese eine Interferonantwort in Tieren auslösen konnten.<sup>[13]</sup>

Das nächste Kapitel schlugen Maurice Hilleman und Mitarbeiter bei Merck auf, die aus Shopes Pilz die eigentliche Substanz isolierten, die für die Virenresistenz zuständig war. In einer 1967 veröffentlichten Arbeit<sup>[14]</sup> berichteten sie, dass die Pilzextrakte doppelsträngige RNA enthielten, welche die Resistenz induzierte. Mit der Annahme, dass die Sequenzen der pilzlichen RNA und der viralen Zielstruktur nur gering oder gar nicht übereinstimmten, wurden weitere nur sehr entfernt verwandte natürliche und synthetische Doppelstrang-RNAs getestet, und man fand, dass alle eine Interferonantwort auslösen können.<sup>[15-17]</sup> Natürlich warf diese Studie eine Vielzahl von Fragen auf. Von vielleicht größter Bedeutung war die Frage, warum der Pilz doppelsträngige RNA enthielt. Hilleman stellte die interessante Hypothese auf, dass sich der Pilz zufällig eine virale Infektion eingehandelt habe. Tatsächlich hatten die Autoren ein altertümliches System entdeckt, durch das Zellen ein als „Bote“ einer viralen Infektion wirkendes Molekül (dsRNA) wahrnehmen können und daraufhin mit einem Warnsignal an den Organismus reagieren, sodass dieser entsprechende Gegenmaßnahmen einleiten kann.

Frühe Studien zur systemischen Immunität beschränkten sich keineswegs auf tierische Zellen. Als man in den 30er Jahren erstmals die Interferonantwort bei Tieren beobachtete, war bereits bekannt, dass Pflanzen einige bemerkenswerte Immunreaktionen auslösen konnten. Injizierte man ein Virus in einen bestimmten Pflanzenteil, konnte sich (zumindest in einigen Fällen) in der gesamten Pflanze Virenresistenz entwickeln (z.B. Lit. [18,19]). Diese Experimente wiesen zwar darauf hin, dass Pflanzen über ein Immunsystem verfügen, andererseits fehlten ihnen die spezifischen Immunkomponenten (einschließlich Antikörpern und weißen Blutzellen), die man in Tieren seit vielen Jahren untersucht hatte.

Zweierlei Befunde mit großer Bedeutung für die Gen-Stummschaltung wurden also schon frühzeitig erkannt: eine Immunreaktion in Tieren, die allgemein wirkt und von doppelsträngiger RNA abhängt, und eine Immunreaktion in Pflanzen mit unbekanntem Auslöser, die ein spezifisches Signal über größere Entfernungen im Organismus verbreiten kann.

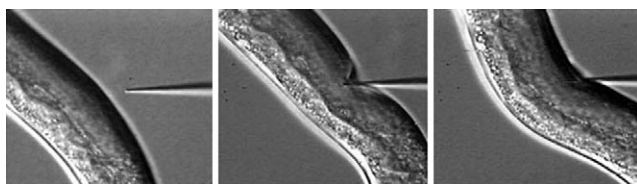
## Gen-Stummschaltung in einem gewöhnlichen Fadenwurm

Es ist nun an der Zeit, eine weitere Hauptfigur einzuführen, eine, die ein guter Freund von Craig, mir und ein paar tausend anderen Forschern weltweit ist: *Caenorhabditis elegans*, ein knapp ein Millimeter langer Spulwurm aus dem Stamm der Nematoden. *C. elegans* hat schon bei den Nobel-



Vorträgen 2002 von Sydney Brenner, John Sulston und Bob Horvitz eine Rolle gespielt, und Dr. Brenner sprach „dem Wurm“ ein beträchtliches Maß an wissenschaftlicher Reputation zu (wenngleich er doch zögerte, ihm auch einen monetären Anteil zuzuerkennen).<sup>[20]</sup> Und auch wir haben dem Getier unsere Ehre zu erweisen, denn *C. elegans* hat sich als eine glückliche Wahl für Untersuchungen zur Gen-Stummschaltung erwiesen. Dabei sorgte die vehemente Reaktion des Wurms auf „Fremdinformation“ zuerst für große Frustrationen, gestattete später aber wertvolle Einblicke in den Mechanismus der Gen-Stummschaltung.

Einer der Aspekte von *C. elegans*, den Craig und ich sehr zu schätzen wissen, ist die bestehende Möglichkeit, dem Tier Makromoleküle (DNA, RNA, Proteine) injizieren zu können.<sup>[21–25]</sup> Abbildung 2 zeigt eine von Craig aufgenommene Photoserie dieses Vorgangs: Die Nadel wird in die



**Abbildung 2.** Mikrographische Aufnahme einer Mikroinjektionsnadel, die eine Lösung von DNA in die Keimdrüse eines adulten hermaphroditen *Caenorhabditis* injiziert. Links: Die Mikroinjektionsnadel wird an die Seite des Wurms gehalten. Die Nadel ist mit einer Injektionslösung gefüllt und wird unter einem leichten Druck gehalten, bis sie in das Tier eingestochen wird (Mitte). Durch Erhöhung des Drucks wird nun ein bestimmtes Volumen des Materials injiziert. Danach wird die Nadel entfernt, und die Oberhaut des Tiers erholt sich rasch. Photographien mit Genehmigung von Dr. Craig C. Mello; Wiedergabe nach Mello und Fire, 1995.<sup>[25]</sup>

Oberhaut eingestochen, ein mechanischer Druck wird ausgeübt, und ein Teil der Flüssigkeit gelangt in die zu befüllende Zelle. In der gezeigten Photographie handelt es sich um die Keimbahn (Keimdrüse) des Wurms – eine große Zelle mit hunderten von einzelnen Zellkernen, die einen gemeinsamen Kernbereich aus Cytoplasma umgeben. Jede Keimdrüse erzeugt dann hunderte von Oocyten, sodass man mit einer einzigen Mikroinjektion auf eine große Population von Tieren einwirken kann. Die Mikroinjektionsnadel kann mit fast jeder Flüssigkeit befüllt werden, einschließlich Lösungen von DNA, RNA und Proteinen, die wir heute im Labor entwerfen und synthetisieren können. Die einfache Versuchsführung machte diese Methode zu einem exzellenten Werkzeug, um das Genom von *C. elegans* zu manipulieren und die Auswirkungen auf Entwicklungsereignisse und Physiologie zu erforschen. Die Methode wurde außerdem von vielen genutzt, um die Reaktionen des Systems auf Fremdinformation zu studieren.

Zu den ersten Zielen, die man in Mikroinjektionsstudien mit *C. elegans* verfolgte, zählten die Unterdrückung und Verstärkung der Genexpression für bestimmte Gene. Mitte der 80er Jahre arbeitete ich als Stipendiat (Helen Hay Whitney Fellow) am Medizinischen Forschungszentrum für Molekularbiologie in Cambridge (Großbritannien) und befasste mich dort mit entsprechenden Experimenten, wobei ich

unter anderem das *unc-22*-Gen verwendete, das einige der ersten charakterisierten DNA-Klone des Wurms lieferte. Aus der klassischen Genetik war bekannt, dass die verminderte Expression von *unc-22* einen Beweglichkeitsdefekt verursacht, der sich in einem Zuckverhalten äußerte.<sup>[26,27]</sup> Don Moerman, Guy Benian und Bob Waterston präparierten Fragmente von *unc-22*,<sup>[28]</sup> die ich in der Hoffnung injizierte, sie würden mit den normalen *unc-22*-Allelen rekombinieren und eine Funktionsverlustmutante produzieren, die ich dann studieren könnte. Die Ergebnisse dieses Experiments waren rätselhaft: Obwohl in Populationen, die von injizierten Tieren abstammten, zuckende Würmer auftraten, war am ursprünglichen *unc-22*-Gen keine direkte Veränderung festzustellen. Statt des erwarteten Rekombinationsereignisses zeigte sich, dass die Gegenwart einer zusätzlichen DNA aus dem *unc-22*-Genlocus eine verminderte Genexpression des endogenen *unc-22*-Gens auslöst.<sup>[29]</sup> Mehrere Erklärungen für diesen ungewöhnlichen Effekt schienen uns damals plausibel: Vielleicht paarte die DNA im endogenen *unc-22*-Genlocus irgendwie mit den Fremdkopien dieser DNA; vielleicht wirkte die Fremd-DNA als Matrize für die Synthese von Antisense-RNA, welche die Aktivität des normalen Transkripts durch Basenpaarung neutralisieren würde; vielleicht produzierten die Fragmente von *unc-22* ein anomales Protein oder banden einen essenziellen Regulationsfaktor; und vielleicht gab es einen ganz anderen Mechanismus, der erst noch erkannt werden musste.

Was immer der tatsächliche Interferenzmechanismus in diesen Experimenten war: Es schien außerordentlich lohnend, die Antisense-Strategie zur gerichteten Unterbrechung der Genexpression einem expliziten Test zu unterziehen. Solche Strategien waren damals keineswegs neu; sie waren schon einige Jahre zuvor von Zamecnik und Stephenson<sup>[30]</sup> sowie von Izant und Weintraub<sup>[31]</sup> in bahnbrechenden Studien beschrieben worden. 1987, ich war gerade an das Carnegie-Institut in Baltimore gewechselt, begann meine Mitarbeiterin Susan White-Harrison mit der Synthese von DNA-Konstrukten, die für einen solchen expliziten Test genutzt werden sollten. Susans Konstrukte stützten sich auf unsere laufenden Forschungen zur Aufklärung von Muskelpromotoren (DNA-Sequenzen, die die RNA-Polymerase anweisen, mit der RNA-Synthese im Zellkern von Muskelzellen zu beginnen). Wir erwarteten einen Promotor, der sich in Antisense-Orientierung an ein *unc-22*-Fragment anlagert und so zu einer Antisense-RNA führt und eine Gen-Stummschaltung bewirkt, während das entsprechende Sense-Konstrukt bestenfalls einen Überschuss des Sense-Strangs ergeben sollte, ohne dass eine Stummschaltung zu erwarten wäre. Wir waren kaum überrascht, als die Antisense-Konstrukte eine gerichtete Interferenzwirkung hervorriefen (Knockout des entsprechenden endogenen Gens). Dies war in Einklang mit einer beträchtlichen Zahl von Berichten über erfolgreiche Antisense-Interventionen in der Literatur. Wir waren allerdings sehr überrascht, als die zur Kontrolle eingesetzten Sense-Produkte eine ähnliche Interferenzwirkung hatten.<sup>[32,33]</sup> Die Annahme für unser „experimentelles“ Konstrukt war, dass die Antisense-RNAs ihre äquivalenten Sense-RNAs durch gewöhnliche Watson-Crick-Basenpaarung finden und aus dem Kreislauf herausnehmen. Was war los mit den Sense-Kon-

strukturen (von denen wir, falls überhaupt, erwarten konnten, dass das in den Expressionsvektor eingeschobene Fragment überexprimiert würde)? Dies war zwar ein interessantes Rätsel, das uns damals aber kaum zu fesseln vermochte. Die Neigung von DNA-Transgenen, eine unerwünschte RNA-Transkription hervorzurufen, war ein guter Ausgangspunkt für mögliche Modelle, und eine vernünftige Erklärung (die uns ein wenig davon abhielt, unmittelbare Forschungen anzustellen) wäre gewesen, dass die Transgene aus irgendeinem Grund genügend Antisense-RNA erzeugten, um eine Interferenzwirkung zu erzielen.

Ein wichtiger Meilenstein bei den Studien zur Stummschaltung von *C. elegans* war der Befund, dass die direkte Injektion von RNA eine Interferenzwirkung verursachen konnte.<sup>[34]</sup> Diese Beobachtung resultierte aus Arbeiten von Su Guo, die zu dieser Zeit Doktorandin bei Ken Kemphues in Cornell war. Sus Erkenntnis, dass die Injektion von RNA eine Stummschaltung hervorrufen könnte, erwies sich als korrekt. Darüber hinaus konnte sie nachweisen, dass sowohl Sense- als auch Antisense-Präparate von RNA eine Interferenzwirkung hatten. Aus dieser Versuchsreihe konnten zweierlei Lehren gezogen werden: Erstens lieferte sie eine bemerkenswert wirksame Methode zur Unterbrechung von Genaktivitäten (besonders in Embryos), was eine Vielzahl von Experimenten in einem Gebiet erleichterte, das wir heute als funktionelle Genomik kennen. Zweitens rückte sie das Rätsel um die interferierenden Sense-Präparate abermals in den Blickpunkt.

Etliche andere Forschungsgruppen begannen bald, die RNA-aktivierte Stummschaltung als eine leistungsfähige Technik für die Untersuchung von Genfunktionen in Embryos zu nutzen – und über den ungewöhnlichen Charakter dieser Technik zu staunen. Speziell Craig Mello, der erst als Postdoc bei Jim Priess am Fred-Hutchinson-Krebsforschungszentrum arbeitete und dann an die Universität von Massachusetts ging, begann die Technik zu nutzen,<sup>[35]</sup> um Aspekte der biologischen Regulation zu untersuchen. Wie ich später noch schildern werde, lieferte Sam Drivers und Craigs Entdeckung, dass die Stummschaltung durch ein diffusibles und spezifisches molekulares Signal hervorgerufen wird, wichtige Einblicke in die konzertierte Natur der Immunantwort. Obwohl der Begriff „Antisense“ anfangs zur Beschreibung dieses Prozesses genutzt wurde, war aus den Ergebnissen der Sense-Experimente klar, dass das Phänomen auf weitergehenden Ursachen beruhte. Deshalb schien es notwendig, einen neuen Terminus einzuführen, und nachdem einige Namen zur Auswahl gestellt waren, wählte Craig den Begriff „RNAi“ („RNA-Interferenz“) zur Beschreibung der beobachteten Stummschaltungsprozesse.<sup>[35]</sup>

### Ansätze zum strukturellen Verständnis des RNAi-Triggers

Ein aus meiner damaligen Sicht wichtiges Ereignis (das ich zu dem Zeitpunkt eher als Beobachter verfolgte) war ein 1997 in Madison abgehaltener *C. elegans*-Workshop, für den Craig die Organisation übernommen hatte. Der Workshop fand im Hörsaal des Studentenwerks statt, dessen normales Fassungsvermögen deutlich überschritten war (ich selbst saß

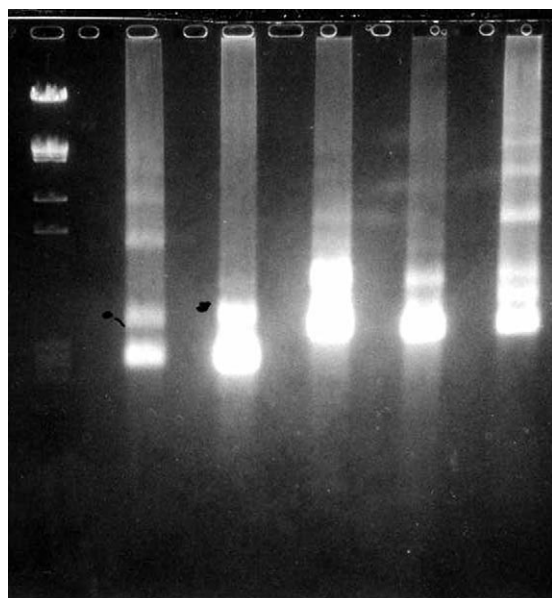
auf dem Boden). Bezüglich der Immunantwort, mit der der Wurm auf die Injektion von dsRNA reagierte, gab es damals einige klare Vorstellungen, manches war jedoch gänzlich unerklärlich. Abgesehen von den Daten zur diffusiblen Signalweitergabe (über die Driver beim *C. elegans*-Meeting im Jahr zuvor berichtet hatte) und dem Befund, dass sowohl Sense- als auch Antisense-Stränge die Interferenzwirkung hervorriefen, wurde nun auch berichtet, dass die Wirkung bemerkenswert lange anhielt. Aus Arbeiten von Craig, Ruyeling Lin, Morgan Park und Mike Krause sowie von Patty Kuwabara<sup>[36]</sup> ging eindeutig hervor, dass injizierte RNAs noch mehrere Tage nach der Injektion (und in manchen Fällen Generationen nach den ursprünglichen Injektionen) eine Wirkung hatten. Dies widersprach Beobachtungen, die Geraldine Seydoux einige Jahre zuvor gemacht hatte,<sup>[37]</sup> die ergaben, dass viele native RNAs (in den gleichen Zellen und gleichen Zeiträumen) vergleichsweise instabil sind. Die Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass das aktive interferierende Material durch eine besondere Stabilität begünstigt war. Vielleicht enthielt das injizierte Material einen Bruchteil an besonders stabilen Molekülen, die für die lang anhaltende Interferenz zuständig waren.

Es war bekannt, dass doppelsträngige RNA chemisch und enzymatisch relativ stabil ist (z. B. Lit. [38]) und außerdem in geringen Mengen als Verunreinigung in synthetischen RNA-Präparationen auftritt (z. B. Lit. [39]). Von meiner Doktorarbeit über RNA-Polymerasen war mir die bisweilen ärgerliche Eigenschaft der RNA-Polymerasen vertraut, in vitro an zufälligen Stellen des RNA-Strangs mit der Polymerisation zu beginnen. Die Schlussfolgerung, dass doppelsträngige RNA ein Bestandteil des injizierten Materials sein könnte, war damit mehr als naheliegend. Gegen eine Beteiligung von dsRNA als mögliche Wirksubstanz sprach, dass native dsRNA keine freien Basenpaare hat, um mit passenden Molekülen in der Zelle wechselwirken zu können. Eine erste Vermutung war daher, dass injizierte dsRNA nicht in der Lage ist, spezifische Wechselwirkungen mit kognaten Sequenzen einzugehen und für die Auslösung von genetischen Interferenzen eher nicht zu gebrauchen sei. Bei einer kritischen Durchsicht meiner Forschungsplanungen, die ich unter dem Eindruck des 97er Meetings aufstellte, wäre dieser Punkt sicher als bedenklich aufgefallen. Man konnte sich – sowohl rückblickend als auch heute noch – viele unterschiedliche Modelle und Erklärungen für das Phänomen vorstellen. Einige Szenarien hätten interessante experimentelle Studien hervorgebracht, andere wiederum wären nur von begrenztem Interesse gewesen; ich hatte sicher das Glück, dass unsere Forschungsmittel für zumindest einige Monate nicht zur erneuten Bewilligung anstanden.

Die Stärken des experimentellen Systems mit *C. elegans* waren, dass man praktisch jede biochemische Mischung zusammenbrauen und dem Wurm injizieren konnte und dass sehr schnelle (und in den meisten Fällen recht spezifische) Tests der genetischen Veränderung möglich waren. Dies gestattete es, auch ziemlich weit hergeholte Hypothesen (wie die Beteiligung von dsRNA) zu prüfen, ohne dass man Jahre dafür aufwenden oder eine „Spielbank sprengen“ müsste. Eine weitere Zutat, die man für die Tests der doppelsträngigen RNA brauchte, war ein Experimentator. SiQun Xu, der eine

große Erfahrung sowohl mit der Synthese und Isolierung von Nucleinsäuren als auch mit der Mikroinjektion in *C. elegans* hatte, war aus vielen Gründen die ideale Person hierfür. Für mich ergab sich ein sehr komfortables Arrangement, da SiQun die Synthesen und Injektionen vornahm und ich nur ein oder zwei Stunden am Tag bei meinem Mikroskop vorbeischauen musste, um die injizierten Tiere und ihre Nachkommen zu betrachten.

SiQun wiederholte zuerst die Synthese- und Injektionsexperimente, die andere zuvor ausgeführt hatten, wobei er in diesem Fall unser „Lieblingsgen“ verwendete, das *unc-22* aus *C. elegans*. Erwartungsgemäß funktionierten die Experimente gut, und wir erhielten einen Pulk von zuckenden Würmern als Beweis für die wirkungsvolle Stummschaltung der endogenen *unc-22*-Aktivität. Damit stand uns ein verlässliches Testsystem für weiterführende Versuche zur Verfügung, um die Beziehungen zwischen Struktur und Interferenz der injizierten RNA zu studieren. Abbildung 3 zeigt eine Serie der anfänglichen RNA-Präparate, die mithilfe eines elektrophoretischen



**Abbildung 3.** Elektrophoretische Trennung von RNA, präpariert durch Synthese *in vitro*. Linke Spur: Marker-DNAs. Die übrigen Spuren markieren RNA-Populationen mit einer starken Bande (helles Signal) an der für die jeweilige einzelsträngige Sense- oder Antisense-RNA zu erwartenden Stelle sowie einer Reihe von unerwarteten Banden (und einer verschmierten Zone), die bei Überbelichtung sichtbar werden. Die RNA wird an Agarosegelen aufgetrennt und nach Interkalieren von Ethidiumbromid anhand ihrer Fluoreszenz sichtbar gemacht. Quelle: Originalaufnahme des Gels von SiQun Xu und Andrew Fire, 1997.

Feldes an Agarosegel aufgetrennt wurden. Man erkennt eine sehr markante Bande – einen hellen Fleck – an der für die RNA zu erwartenden Stelle. Dieses Photo wurde absichtlich überbelichtet, um etwaige andere Komponenten aufzudecken, und tatsächlich erkennt man zusätzliche schwache Banden und einen verschmierten Bereich. Was die dsRNA-Hypothese betraf, war ich nach diesen ersten Versuchen mit

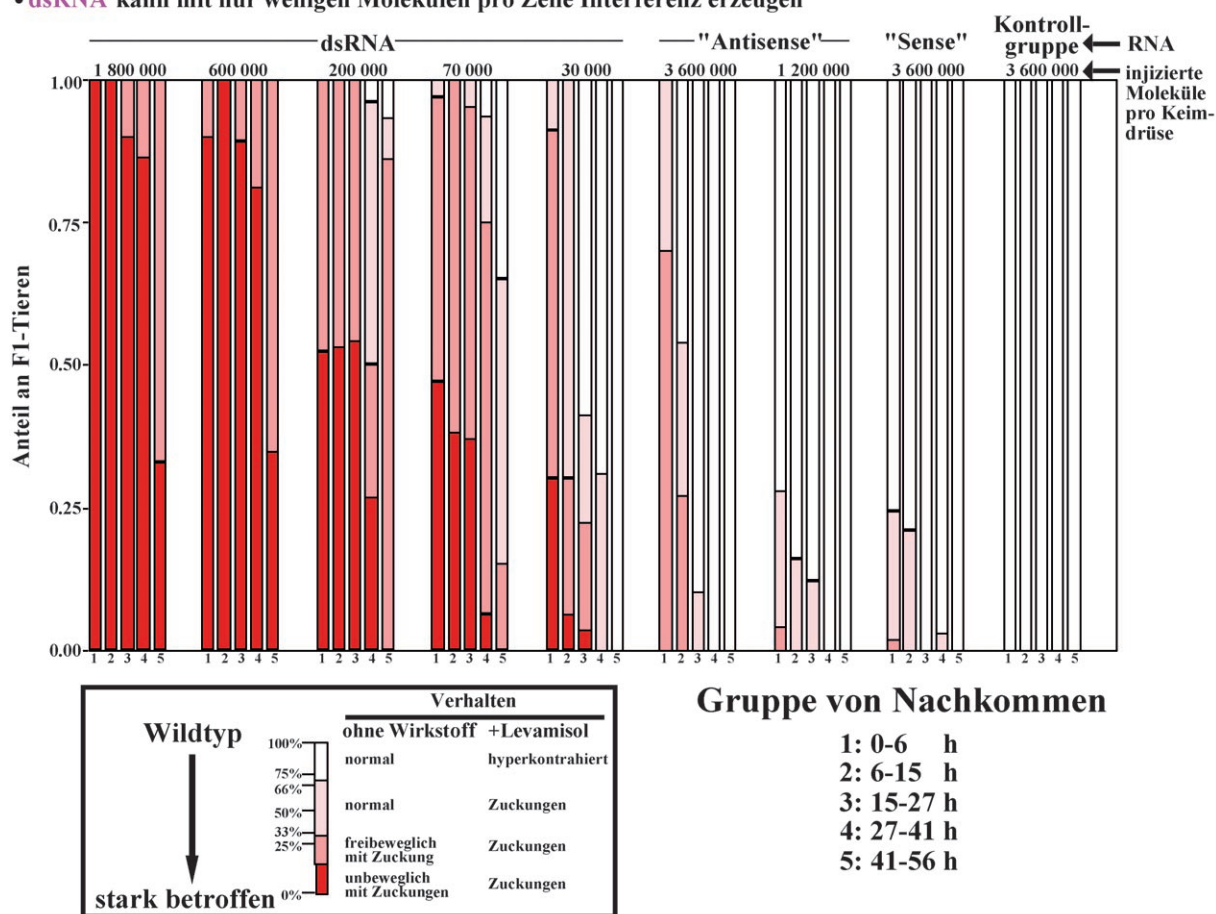
nichtaufgereinigten RNA-Präparaten durchaus ermutigt, aber längst nicht überzeugt. Es war klar, dass wir ein reineres Ausgangspräparat benötigten. Um dies zu erreichen, schnitt SiQun die Hauptbanden aus dem Gel aus, extrahierte die RNA und injizierte den Würmern die aufgereinigten Sense- oder Antisense-RNAs. Dies erbrachte ein Ergebnis – allerdings ein negatives: Fast die gesamte Aktivität ging durch die Aufreinigung der Einzelstränge verloren, was zu dem Schluss führte, dass Sense- und Antisense-RNA nicht das Material waren, das die Interferenz verursachte.

SiQuns aufgereinigte Stränge boten nun einen besseren Ausgangspunkt für die Überprüfung der dsRNA-Hypothese; zwei nahezu inaktive Stränge konnten im Reagenzglas vermischt werden, um so ein sauber definiertes Doppelstrangprodukt zu bilden. Die Injektion der auf diese Weise erzeugten doppelsträngigen *unc-22*-RNA erbrachte ein bemerkenswertes Ergebnis, insofern alle produzierten Tiere stark zuckten. Um festzustellen, wie stark die Wirkung war, injizierte SiQun immer kleiner werdende Mengen des Doppelstrangmaterials (Abbildung 4). Selbst bei beträchtlicher Verdünnung wurde noch eine Interferenzwirkung beobachtet. Als wir dann ausrechneten, wie viel Material wir eigentlich injizierten, stellten wir fest, dass wir die Auswirkungen von nur wenigen Molekülen doppelsträngiger RNA pro Zelle sahen. Dies war bemerkenswert, zumal wir aus früheren Arbeiten unserer und anderer Forschungsgruppen (unter anderem der von Don Moerman) wussten, dass die Zielstruktur, die *unc-22*-mRNA, in sehr viel größeren Mengen in der Zelle vorhanden ist.

Wie bei allen unerforschten Phänomenen versucht man als allererstes, Erklärungen auf der Grundlage bekannter Prozesse zu finden. 1997 war ein sehr geschäftiger Sommer für Telefonleitungen, Email-Anschlüsse und Paketdienste zwischen Baltimore und Worcester. Es gab zahlreiche gemeinsame Experimente mit Craig und SiQun, dazu gesellten sich nun Steve Kostas und Mary Montgomery. Ein hauptsächliches Ziel der Forschungen war, endgültigen Aufschluss darüber zu erhalten, ob doppelsträngige RNA in der interferierenden Sequenz für die beobachteten Wirkungen direkt verantwortlich sei. Eine alternative, durchaus haltbare Erklärung war, dass doppelsträngige RNA eine nichtspezifische Reaktion erzeugt (entweder lokal oder global), die die Aktivität kleiner Mengen von Antisense-RNA potenziert. Um dieser Frage nachgehen zu können, war ein wenig molekulare Artistik erforderlich. Die beste Lösung erzielten wir mit einem Testsystem, das es uns ermöglichte, eine genspezifische Interferenz von komplexen RNA-Molekülen zu beobachten. Das System beruhte auf der Verwendung einer einzelsträngigen, zu einem bestimmten Gen passenden RNA sowie einer doppelsträngigen, zu einem zweiten Gen passenden RNA. Sämtliche Experimente ließen eindeutig erkennen, dass bestimmte Abschnitte einer doppelsträngigen RNA spezifische Interferenzen induzieren, und am Ende des Sommers hatten wir das Gefühl, dass wir ein Manuskript einreichen konnten, das den endgültigen Beweis vorbringt, dass dsRNA einen genspezifischen und systemischen Stummschaltungsprozess auslösen kann.<sup>[40]</sup>

### Quantitative Untersuchung der Stummschaltung: *unc-22*

- dsRNA ist mehr als 100-mal wirksamer als Sense- oder Antisense-RNA
- dsRNA kann mit nur wenigen Molekülen pro Zelle Interferenz erzeugen



**Abbildung 4.** Quantitative Studie zur Stummschaltung des *unc-22*-Gens. Die RNA-Präparationen wurden bezüglich der entsprechenden Sense- oder Antisense-Spezies angereichert, indem die Hauptbanden des Elektropherogramms (wie in Abbildung 3) ausgeschnitten wurden und die RNA extrahiert wurde. Geringste Mengen unerwünschter dsRNA könnten in diesen Proben zurückbleiben, bei allerdings stark verringerten Konzentrationen. Die einzelnen Abschnitte des Diagramms zeigen biologische Reaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen von einzel- und doppelsträngigen RNAs, wie angegeben (dunklere Farbtöne entsprechen stärker betroffenen Tieren). Quelle: Lit. [40].

### Gen-Stummschaltung durch dsRNA und ihre Funktion: Erkenntnisse von Würmern, Pflanzen, Fliegen, Pilzen und sonstigem Gekreuch

Was wirklich vor sich geht, wussten wir natürlich immer noch nicht, insbesondere was genau mit der Expression des Ziel-Gens geschah. Mary Montgomery hatte sicher die besten Voraussetzungen, um dieser Frage nachzugehen, da sie sich schon mehrere Jahre mit dem Problem beschäftigt hatte, dass *C. elegans* anscheinend keine injizierte RNA translatieren wollte. Die Vorstellung von einem RNA-Experiment, das dramatische, wenn auch seltsame und unerwartete Folgen zeigte, war da sicher verlockend, und so widmete sie sich der Frage, was wohl mit der Genexpression geschähe, wenn man doppelsträngige RNA injiziert. Damals lag die Vorstellung nahe, dass eine Interferenz jede Stufe der Genexpression oder zellulären Homöostase beeinflusst. Mary hatte beobachtet, dass Ziel-Gene ihre Fähigkeit zur Anreicherung von mRNA im Cytoplasma verlieren.<sup>[40]</sup> In weitergehenden Analysen konnte sie nachweisen, dass die RNA-Interferenz mit der

Destabilisierung der Ziel-mRNA in den Zellkernen und im Cytoplasma von infizierten Zellen einherging.<sup>[41]</sup> Wir hatten durchaus Glück, dass wir an einem der einfacheren Antwortssysteme auf dsRNA arbeiteten; neuere Erkenntnisse zur RNA-modulierten Genexpression zeigen, dass praktisch jede Art von Genaktivität durch modulatorische RNAs beeinflusst werden kann (Replikation, DNA-Struktur und -Sequenz, Chromatinstruktur, Transkription, Prozessierung, Lokalisierung, Translation usw.; z.B. Lit. [42–48]). Marys Experimente lieferten auch einen bemerkenswerten bildlichen Eindruck von der Wirksamkeit der RNA-Interferenz in *C. elegans*. Abbildung 5 zeigt ein Beispiel hierfür; in diesem Fall wurde ein Test-Gen mit und ohne Interferenz anhand der Häufigkeit der zugehörigen mRNA untersucht. In der Kontrollprobe liegt die mRNA des Gens in hohen Konzentrationen vor und wird durch eine Farbreaktion infolge einer In-situ-Hybridisierung detektiert.<sup>[49]</sup> Nach Injektion der entsprechenden dsRNA und Interferenz des Test-Gens war praktisch keinerlei mRNA mehr detektierbar.





**Abbildung 5.** Die Injektion einer dsRNA führt zu einem Verschwinden der zugehörigen mRNA. Das Experiment (von Mary Montgomery)<sup>[40]</sup> zeigt Embryos von *C. elegans* mit und ohne Injektion der das *mex-3*-Gen ansteuernden dsRNA.<sup>[142]</sup> In Kontrollproben wird nach In-situ-Hybridisierung [AA] ein starkes Signal beobachtet (intensive blaue Färbung, links), das eine hohe Konzentration des *mex-3*-Transkripts im gesamten vierzelligen Embryo anzeigt. Nach Injektion der dsRNA wird kein *mex-3*-Transkript detektiert (Mitte).

Aus Marys Experimenten folgte die Hypothese, dass die doppelsträngige RNA einen Zustand erzeugt, in dem das Transkript zwar produziert wird, aber sehr instabil ist. Anders ausgedrückt wird ein System zum sequenzspezifischen RNA-Abbau postuliert, das durch die Wirkung einer dsRNA ausgelöst wird. Eine alte TV-Serie namens „Twilight Zone“ ging von der Vorstellung aus, dass es im Universum viele Erscheinungen gibt, die unser Begriffsvermögen übersteigen. Im Jahr 1998 waren die Daten, die wir gesammelt hatten, im Einklang mit der Hypothese, dass wir uns zumindest vorübergehend in diesem „Zwielichtbereich“ befanden.

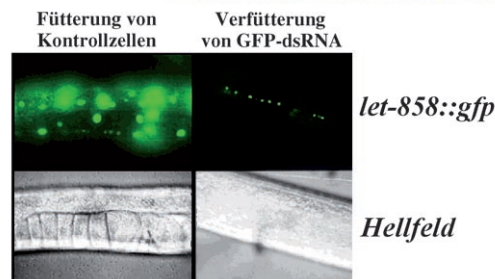
Noch mehr Unerklärliches brachte eine Versuchsreihe hervor, bei der die dsRNA in unterschiedliche Gewebeteile injiziert wurde. In den ursprünglichen Versuchen zur RNA-Injektion, die Su Guo in Cornell ausführte, sollte die biologische Wirkung des injizierten Materials auf die Keimdrüse untersucht werden, und tatsächlich wurde eine solche Wirkung beobachtet.<sup>[34]</sup> Die Lektion, die wir daraus lernen lautet: „Wenn du ein Experiment auf die Weise machen kannst, die am wirksamsten erscheint, dann tu es einfach auf diese Weise.“ Eine nachfolgende Beobachtung von Sam Driver und Craig Mello führt zu einer weiteren Lektion: „Wenn du das Experiment *nicht* auf die Weise machen kannst, die am wirksamsten erscheint, dann tu es trotzdem.“ 1996 hatte Sam gerade mit seiner Promotion in Craigs Arbeitsgruppe an der Universität von Massachusetts begonnen. Er führte seine ersten Injektionsversuche aus und hatte einige Probleme, das richtige Gewebe zu treffen. Sam und Craig stellten fest, dass die Injektionen trotz falsch gesetzter Nadeln eine extrem effiziente Interferenz erzeugten. Auch als sie dann absichtlich in eine falsche Stelle (die Körperhöhle) injizierten, beobachteten sie eine starke biologische Wirkung. Später erstellten dann Craig und SiQun Xu eine ausführliche Liste von Geweben, bei denen eine dsRNA-Injektion zu einer systemischen Wirkung führt.

Eine dritte Lektion schließlich folgt aus Experimenten von Lisa Timmons, die damals Postdoktorandin in meiner Arbeitsgruppe in Carnegie war und heute an der Universität von Kansas lehrt. Sie lautet, dass du als Postdoktorand oder Doktorand Experimente machen solltest, die dein Betreuer nie geduldet oder vorgeschlagen hätte. Lisa nahm eine gentechnische Veränderung an *E. coli* – einem als Nahrungsquelle für *C. elegans* dienenden Bakterium – in der Weise vor, dass es doppelsträngige RNA produzierte. Nach Verfüttern

dieser gentechnisch veränderten Nahrung an den Wurm beobachtete sie eine genspezifische Interferenzwirkung. Abbildung 6 zeigt einen Fall, in dem das Bakterium so modifiziert wurde, dass es doppelsträngige RNA produziert, die zum

## Form und Wirkung der RNA-Verabreichung

S. Guo (Cornell): **RNA in Keimdrüse --> gonadale Wirkung**  
S. Driver (UMass): **RNA in Körperhöhle --> gonadale Wirkung**  
L. Timmons (Carnegie): **Fütterung von Würmern mit dsRNA-exprimierenden Bakterien**



**Abbildung 6.** RNA, die außerhalb einer Zelle verabreicht wurde, kann eine starke Interferenzwirkung erzeugen. Oben: Überblick über die Experimente zur RNA-Injektion von Su Guo und Ken Kemphues,<sup>[34]</sup> Sam Driver und Craig Mello<sup>[40]</sup> sowie Lisa Timmons.<sup>[53]</sup> Unten: Beispiele für verfütterungsbasierte RNA-Interferenz. Beide Tiere gehören zu einem *C. elegans*-Stamm, bei dem eine allgemeine somatische Expression eines grün fluoreszierenden Reporters beobachtet wird. Das rechts abgebildete Tier wurde mit Bakterien gefüttert, die die als Gegenstück zur GFP-codierenden Region fungierende dsRNA exprimieren. Das links abgebildete Tier wurde mit Bakterien gefüttert, die dieses Konstrukt nicht exprimieren. In allen sichtbaren Zellen, außer den Nervenzellen, tritt ein dsRNA-abhängiger Verlust der GFP-Aktivität auf.

Fluoreszenzreporter GFP komplementär ist (GFP (grün fluoreszierendes Protein) ist eine wunderbare Substanz, um die Genexpression und die Entwicklung von Zellmustern zu verfolgen).<sup>[50–52]</sup> Beginnend mit einem Wurmsstamm, der GFP in praktisch allen Körperzellen produziert, fand Lisa heraus, dass die aufgenommene RNA die Genexpression im gesamten Tier stummschalten konnte.<sup>[53]</sup> (Das Bild erzählt noch eine andere interessante Geschichte, nämlich dass es in den Nervenzellen eine beträchtliche Resistenz gegen RNA-Interferenz gibt. Obwohl wir die Ursache hierfür noch nicht verstanden haben, ist dieses unterschiedliche Verhalten in verschiedenen Geweben ein Hinweis darauf, dass es sich um einen reiflich durchdachten biologischen Prozess handelt.) Hiroaki Tabara, ein damaliger Postdoktorand bei Craig, ging noch einen Schritt weiter, indem er den Nachweis erbrachte, dass die Würmer auch dann eine Interferenzwirkung zeigten, wenn man sie einfach in eine Lösung doppelsträngiger RNA eintauchte.<sup>[54]</sup> Diese Experimente waren besonders überraschend, da wir erwartet hatten, dass die Zellmembranen die Wanderung größerer, nichtdiffusibler Moleküle zwischen den Zellen blockieren sollten. Wir wussten, dass DNA nur geringfügig oder überhaupt nicht diffundiert. Eine wichtige Erkenntnis zum makromolekularen Transport von großen geladenen Molekülen ist, dass Zellen nur Dinge transportieren, die nützlich sein könnten, wobei die betreffenden Transportmechanismen sehr spezifisch und stark reguliert



sind. Ich hatte nicht die geringste Idee, warum der Wurm dsRNA-abgeleitete Signale transportieren sollte.

Wir hatten also allen Grund zur Annahme, dass wir uns im „Zwielichtbereich“ befanden. Davon abgesehen waren wir aber sehr zufrieden über unsere Errungenschaften, die wir bei der Entwicklung von Methoden für die Veränderung der Genexpression in *C. elegans* erzielt hatten.

Wir gehen nun einen Schritt weiter von unserem Lieblingswurm hin zu einer weitaus vielfältigeren Welt mit ihren unzähligen Spezies. Dieser Übergang geht mit der Erkenntnis einher, dass unsere Entdeckungen, die wir ursprünglich als bloße technische „Errungenschaften“ gesehen haben, all die Prozesse widerspiegeln, die zum Fortbestand eines lebenden Organismus beitragen.

Bald nach der anfänglichen Beschreibung der dsRNA-aktivierten Stummschaltung in *C. elegans* erschienen mehrere Berichte über ähnliche Vorgänge in anderen Organismen. Zu den ersten untersuchten Organismen gehörten *Drosophila* (eine Fruchtfliege), Trypanosomen (einzellige Parasiten) und Pflanzensysteme;<sup>[55–58]</sup> viele andere sollten rasch folgen. Was verdächtigerweise fehlte, waren Säugetiere. Dies war andererseits keine große Überraschung: Die nichtspezifischen Reaktionen auf dsRNA, wie sie ursprünglich Hilleman und Mitarbeiter entdeckt hatten,<sup>[14]</sup> waren mehr als genügend, um jedwede Analyse einer spezifischen genetischen Interferenz zu vereiteln. Dennoch wiesen frühe Studien auf die mögliche Existenz sowohl von spezifischen dsRNA-Antworten in bestimmten spezialisierten Säugetierzellsystemen hin (z.B. Oozyten und Eierstockzellen)<sup>[59–61]</sup> wie auch auf die Dominanz von nichtspezifischen Antworten bei den meisten anderen Zellen (z.B. Lit. [62]).

Der Nachweis der dsRNA-aktivierten Gen-Stummschaltung in Pflanzen und Pilzen ergab wichtige Einblicke in den Mechanismus des Prozesses, die unsere bruchstückhaften Erkenntnisse aus den *C. elegans*-Studien ergänzten und außerdem bewiesen, dass das Phänomen in der Natur weit verbreitet ist. Tatsächlich waren schon zehn Jahre früher Arbeiten zu Pilz- und Pflanzensystemen erschienen, in denen über sequenzspezifische Wirkungen von fremden DNA-Transgenen auf die zugehörigen endogenen Gene berichtet wurde;<sup>[63–67]</sup> siehe auch Lit. [68]. In ausführlichen Studien wurden die sequenzspezifischen Reaktionen auf Fremd-DNA in Pflanzen und Pilzen als ein komplexer Satz von Einzelantworten entschlüsselt, die unabhängig auf das Chromatin oder die RNA des Ziel-Gens abzielen (z.B. Lit. [46, 69–71]). Die charakteristischen räumlichen Muster der Stummschaltung, die bei endogenen Genen in Pflanzen auftreten,<sup>[65, 66]</sup> waren eines der vielen Merkmale, die zum Gegenstand intensiver Forschungen wurden. Besonders bemerkenswert war der Nachweis eines systemischen Signals bei der Stummschaltung,<sup>[71, 72]</sup> der zu der eindeutigen Erkenntnis führte, dass in *C. elegans* und in Pflanzen sehr ähnliche Vorgänge ablaufen.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass es beträchtliche Vorteile mit sich bringt, die Gen-Stummschaltung (oder irgendein anderes wichtiges Phänomen) in mehr als einem Modellsystem zu untersuchen. Der große Vorteil der Studien mit *C. elegans* bestand darin, dass die RNA-Strukturen auf sehr flexible Weise „im Reagenzglas“ ent-

worfen und hergestellt werden konnten und sich sehr einfach (durch Mikroinjektion) einem sich rasch fortpflanzenden Testsystem (dem Nematoden) verabreichen ließen. Auf diese Weise konnten viele der Probleme, die bei Arbeiten mit Pflanzen auftraten, umgangen werden; hier sorgten komplizierte Fragen zur Struktur und Transkription der transgenen Pflanzen dafür, dass anfängliche Versuche, bestimmte Antworten einer spezifischen RNA-Struktur zuzuschreiben, scheiterten. Auf der anderen Seite boten Pflanzensysteme eine bemerkenswerte Plattform, um die biologische Rolle der Interferenzantwort zu untersuchen. Anhand erster Beobachtungen einer transgenen Virenresistenz<sup>[73]</sup> und der Tatsache, dass virale RNAs sowohl als Auslöser wie auch als Zielstrukturen für die Stummschaltung agieren konnten,<sup>[46, 74, 75]</sup> war schnell klar, dass das Stummschaltungssystem als natürlicher Schutzmechanismus der Pflanzen gegen „unerwünschte Informationen“ in Form viraler Pathogene diente. Den eindeutigen Beweis hierfür erbrachte eine Reihe von Analysen der Virus-Wirt-Wechselwirkung.

Von einem erfolgreichen antiviralen System sollte man erwarten, dass es die Pathogenese von zumindest einer Untergruppe von Viren blockieren kann. Wie wir aber sehr wohl wissen, gibt es auf der Welt noch immer Viren (sehr zu unserem Leidwesen), sodass es Wege geben muss, durch die das Virus die zellulären Verteidigungsmechanismen überwindet. Ein entscheidender Hinweis auf die Rolle der RNA-aktivierten Stummschaltung war der Befund, dass viele erfolgreiche RNA-Pflanzenviren Proteinbestandteile produzieren, die auf die Inaktivierung des Stummschaltungsmechanismus zielen (z.B. Lit. [76–79]). Eine Unterdrückung der RNA-aktivierten Stummschaltung ermöglicht jedem gegebenen Virus die virale Infektion zumindest einer Untergruppe von Pflanzen. Der Stummschaltungsmechanismus auf der einen Seite und die Versuche des Virus, diesen zu unterwandern, entsprechen einem ertümlichen Wettrüsten zwischen Pflanzen und Viren. Weiteren Beleg für diese Art von Wettrüsten erbrachten Studien, in denen die Erzeugung von abgeschwächten Viren (durch Entfernen der Antistummschaltungsfunktion) und überempfindlichen Pflanzen (durch Expression eines relevanten viralen Antistummschaltungsproteins oder Interferenz mit dem endogenen RNAi-System) gelang.

Die heranreifende Erkenntnis, dass die transgenen Antwortmechanismen in Pflanzen zumindest in Teilen eine antivirale Reaktion waren, warf die Frage auf, wie ein Stummschaltungsapparat in der Lage wäre, eine virale Aktivität spezifisch zu erkennen. Einen recht bemerkenswerten Vorschlag, um dies zu erklären, stellten Ratcliff, Harrison und Baulcombe Mitte 1997 in einer Veröffentlichung vor,<sup>[80]</sup> auf die wir in Carnegie aufmerksam wurden, als wir gerade unsere ersten Tests auf die Fähigkeit der dsRNA zum Auslösen der Gen-Stummschaltung in *C. elegans* ausgeführt hatten. Baulcombe und Mitarbeiter kamen zu dem Schluss, dass spezielle Merkmale der bei der viralen Replikation auftretenden Intermediate zu verbesserten transgenen Triggern für die Gen-Stummschaltung führen könnten: „It may be possible to increase the incidence of gene silencing by ensuring that transgene transcripts have features, such as double-strandedness, that resemble replicative forms of viral

RNA“.<sup>[80]</sup> Zusammen mit Experimenten, die auf einen Zusammenhang zwischen der Stummschaltungswirkung und bestimmten Sekundärstrukturen im Transgen und im Transkript hinwiesen,<sup>[68,82]</sup> legten diese Vorschläge eine Versuchsreihe nahe, die der unseren sehr ähnlich gewesen wäre. Die Kombination der beiden Ansätze – die chemische Aufklärung des Triggers in *C. elegans* und eine biologische Erklärung seiner Wirkung in Pflanzen – erwies sich als treibende Kraft für die weiteren Arbeiten und ließ die Forschungsanstrengungen auf diesem Gebiet explodieren.

### Der Antwortmechanismus: ein Blick in die „Black Box“

Trotz der großen Begeisterung, mit der an Pflanzen, Würmern und Insekten als Modellsystemen geforscht wurde, blieb der Mechanismus, durch den dsRNA die Stummschaltung der Genexpression bewirkt, unbekannt. Vortragsfolien aus dieser Zeit zeigten, wie die dsRNA und die betroffene mRNA irgendwie in einen großen geheimnisvollen „schwarzen Kasten“ eintraten, gefolgt von einem Abbau der Ziel-RNA und einem unbekannten Schicksal der dsRNA. Unser Verständnis der zugrundeliegenden Biologie war also sehr eingeschränkt, und es war kaum möglich, die erhaltenen Befunde zur RNA-Interferenz auf andere Organismen (z. B. den Menschen), deren Antwortverhalten komplizierter war als das „einfacher“ Wirbelloser, zu übertragen. Die Schlüsselfragen (sowohl was den molekularen Mechanismus als auch die mögliche Rolle der RNA-aktivierten Gen-Stummschaltung als Immunprozess anbelangte) drehten sich um die Struktur des molekularen Konstrukts, das für die Erkennung der Ziel-RNA durch die dsRNA zuständig war. Ähnlich den Antikörper-Antigen-Komplexen aus der klassischen Immunologie schien die Identifizierung einer „fundamentalen Erkennungseinheit“ der entscheidende Schritt für die Aufklärung der RNA-basierten Immunität in Zellen zu sein.

Einige der hierfür erforderlichen Studien konnten mit *C. elegans* ausgeführt werden, und ich möchte hier ein wenig näher darauf eingehen. Im Hinterkopf behalten wir, dass eine große Zahl von Forschungsgruppen, alle mit ihren eigenen Modellsystemen und Interferenztests, an den Arbeiten beteiligt war. Die RNA-Interferenz ist ein Dreistrangprozess (Abbildung 7), an dem ein Sense-Strang und ein Antisense-Strang des Triggers und ein Ziel-Transkript der Zelle beteiligt sind. Wir nahmen umfangreiche Modifikationen der Trigger-Stränge vor, um so exakt bestimmen zu können, welche Parameter für die Induktion einer spezifischen Interferenz erforderlich waren. Diese Analyse lieferte mehrere charakteristische Ergebnisse.<sup>[83]</sup> Zunächst fanden wir für den Sense- und den Antisense-Strang einen unterschiedlichen Satz von „chemischen Vorgaben“, die erfüllt sein mussten, um eine Interferenz auszulösen. Zweitens gab es eine recht strikte Anforderung bezüglich einer Sequenzhomologie zwischen den beiden Triggersträngen und dem Zielstrang. Drittens konnten wir noch mit Triggern, die rund 25 Nucleotide lang waren, ein Antwortverhalten in *C. elegans* erzielen, wenngleich die Wirksamkeit bei kürzer werdenden Triggern sank. Zusammen mit komplementären Struktur-Funktions-Expe-

### Rückschlüsse aus der Trigger-Analyse

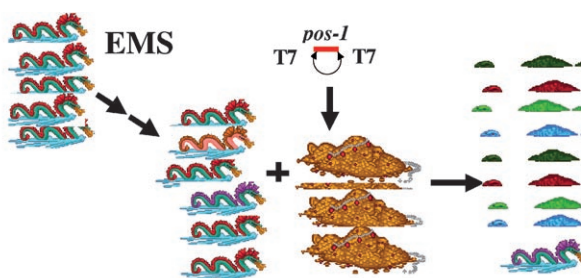
- sehr genau paarender Doppelstrang in einem sequenzhomologen Bereich zur Ziel-RNA erforderlich
- dsRNAs mit ca. 25 Nucleotiden können spezifische RNAi-Antworten auslösen
- Plus- und Minusstränge tragen unterschiedlich zum RNAi bei



**Abbildung 7.** Rückschlüsse aus Experimenten zur RNA-Interferenz nach strukturellen und chemischen Modifikationen der injizierten RNAs. Einzelheiten werden im Haupttext sowie bei Parrish et al.<sup>[83]</sup> erläutert.

perimenten, die mit anderen Systemen ausgeführt wurden (z. B. Lit. [84]), waren diese Daten ein Beleg für eine hochgradig konzentrierte chemische Erkennung und Wirkungsweise der dsDNA in der (zum damaligen Zeitpunkt noch sehr unerforschten) „Black Box“.

Ein zweites Projekt, bei dem *C. elegans* zum Verständnis der RNA-aktivierten Stummschaltung beitrug, war ein genetischer Reihentest, den ursprünglich Hiroaki Tabara und Craig Mello ausführten<sup>[85]</sup> und der eine wichtige Modifikation gegenüber Lisa Timmons' Fütterungsexperiment aufwies. Hiroaki präparierte einen gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamm, der eine spezifische dsRNA produzierte, die diesmal aber ein essenzielles Gen in *C. elegans* ansteuerte (ein als *pos-1* bezeichnetes Gen, das Hiroaki während seiner Doktorarbeit bei Yuji Kohara charakterisiert hatte).<sup>[86]</sup> Ohne die Aktivität dieses Gens konnte eine Wurmpopulation nicht überleben, sodass die gentechnisch veränderten Bakterien eine denkbar schlechte Nahrungsquelle für *C. elegans* waren. Durch Verwendung von Populationen, die man einige Generationen zuvor durch chemische Behandlung mutationsanfällig gemacht hatte, gelang es jedoch, extrem seltene Tiere zu selektieren, die mit dieser Nahrungsquelle heranwachsen konnten (Abbildung 8). Unter diesen Tieren befand sich eine Untergruppe, denen jederlei Reaktion auf alle Arten von injizierter Fremd-dsRNA fehlte. Bei zumindest zwei Genen fand Hiroaki, dass ein vollständiger Funktionsverlust in einem Wurm resultierte, der normal aussah (oder fast normal), dem aber die Eigenschaft fehlte, auf unsere dsRNA-Injektion zu reagieren. Die Existenz dieser Mutationen lieferte weitere (und überzeugende) Hinweise darauf, dass die RNA-Interferenz ein konzentrierter Prozess war. Wäre die Fähigkeit der dsRNA zur Stummschaltung von Genen eine einfache Erscheinung z. B. der physikalischen Chemie der dsRNA gewesen, so wäre es unwahrscheinlich gewesen, dass wir Mutationen gefunden hätten, die diese Aktivität außer Kraft setzen konnten. Dass *C. elegans* ohne den Interferenzprozess überleben und normal heranwachsen konnte (zumindest unter den künstlichen, reinen Bedingungen einer



#### Mutations-Screen von trans-agierenden Faktoren in der RNAi

siehe: Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. (1999) "The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*." *Cell* 99:123-132

**Abbildung 8.** Identifizierung von Mutationen, die Interferenzantworten auf Fremd-RNA unterbinden, aber mit einem Überleben des Wurms kompatibel sind. Nach Mutagenese mit dem chemischen Mutagen Ethylmethansulfonat<sup>[26]</sup> wurden Tiere über mehrere Generationen gezüchtet und dann mit *E. coli*-Bakterien gefüttert, die eine als Gegenstück zum *pos-1*-Gen von *C. elegans* fungierende dsRNA exprimieren. Die Embryogenese kommt bei der großen Mehrheit der resultierenden Population zum Erliegen; nur diejenigen Mutanten, bei denen die RNA-Interferenz unterbunden ist, können sich entwickeln. Einzelheiten werden im Haupttext sowie bei Tabara et al.<sup>[85]</sup> erläutert.

isolierten Petri-Schale), war ein Beleg dafür, dass der Mechanismus der dsRNA-aktivierten Stummschaltung zweckbestimmt war. Durch beträchtliche Anstrengungen gelang es Hiroaki und Craig, in relativ kurzer Zeit diejenigen Gene zu identifizieren, die in den resistenten Stämmen mutiert waren. Die Identität der entsprechenden Gene war sowohl erhellend als auch frustrierend.

*rde-4* codierte für ein Protein, dessen Struktur eindeutig auf eine Fähigkeit zur Bindung an dsRNA schließen ließ,<sup>[87]</sup> die Struktur an sich war zwar überzeugend (sowie auch die erwartete Fähigkeit des Proteins, nichtspezifisch an dsRNA zu binden),<sup>[88]</sup> reichte aber nicht aus, den zugrundeliegenden Mechanismus zu erklären.

*rde-1* codierte für ein Protein aus einer großen Familie (heute als „Argonaut-Proteine“ bezeichnet), für die damals nur wenige biochemische Daten verfügbar waren. Von Proteinen aus verwandten Familien wusste man, dass sie Schlüsselrollen bei der Zellentwicklung spielen.<sup>[89–91]</sup> Es gab gewisse Hinweise auf mögliche Wechselwirkungen mit RNA,<sup>[92]</sup> sehr viel mehr wusste man aber nicht. Als sich die Hinweise häuften, dass andere Modellorganismen den gleichen Mechanismus der dsRNA-Antwort zeigen, wurde im Gegenzug klar (aus genetischen Untersuchungen in Pflanzen, Pilzen, Fliegen usw.; z.B. Lit. [93–95]), dass zumindest eine Untergruppe, wie bei *C. elegans*, ohne diesen Mechanismus überleben konnte. Die Fähigkeit verschiedener Organismen, für ähnliche Proteine zu codieren, wie sie an der Gen-Stummschaltung in *C. elegans* beteiligt sind, und die letztendliche Identifizierung von homologen Genen, die für ein Funktionieren der RNA-Interferenz in bestimmten Modellsystemen essenziell sind (z.B. Lit. [95–97]), stützten die Hypothese, dass wir alle einen sehr ähnlichen und konservierten biologischen Prozess betrachteten. Jenseits der standardmäßig genutzten Modellorganismen sprach die Existenz von homologen codierenden Bereichen in Säugetieren für die

Hypothese, dass diese in der Tat ähnliche Antwortmechanismen verwenden, die allerdings von nichtspezifischen Antworten verdeckt sind.

Trotz der hoffnungsvollen Hinweise aus den Struktur-Funktions- und genetischen Analysen waren wir nicht in der Lage, einen vereinheitlichenden Mechanismus für die RNA-Interferenz zu postulieren, noch Experimente zu entwerfen, um die Wirksamkeit des Systems in Säugetieren zu untersuchen. Die kürzesten RNAs, die wir anfänglich auf eine Interferenzwirkung in *C. elegans* getestet hatten,<sup>[83]</sup> waren noch zu lang, um in den RISC-Komplex (RISC: RNA-induzierter Stummschaltungskomplex) zu passen (siehe unten), und sie hatten nicht die richtige Struktur, um eine nebeneffektfreie Gen-Stummschaltung in Säugetierzellen zu bewirken.

Um letztlich doch Einblick in die „Black Box“ zu erhalten, war eine ganze Serie von einschneidenden biochemischen Beobachtungen nötig. Ich will nicht zu detailliert darauf eingehen, zumal die kleinen RNAs, die eine exogene und endogene genetische Kontrolle in diversen biologischen Systemen vermitteln, einen eigenen Vortrag verdienen würden. Dennoch ist ein kurzer Überblick über kleine interferierende RNAs (siRNAs) nützlich, um unser heutiges Wissen um die RNA-Interferenz in den historischen Kontext zu stellen.

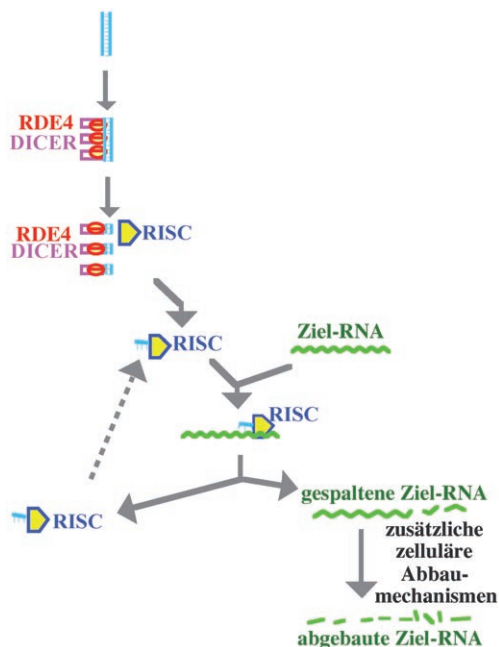
Der erste Hinweis, dass kleine RNAs entscheidend für den RNAi-Prozess sind, stammte aus Experimenten in Pflanzensystemen.<sup>[98]</sup> Andrew Hamilton und David Baulcombe fanden eine RNA-Population mit einem schmalen Größenbereich von 21 bis 25 Nucleotiden, deren Gegenwart eng mit der Gen-Stummschaltung assoziiert ist. Entscheidend für die gewonnenen Erkenntnisse war der Entschluss, nach RNAs in einem schmalen Größenbereich zu suchen, sowie der recht eindrucksvolle chemische Kunstgriff, mit dem die Detektion dieser RNAs gelang.

Die Tatsache, dass kleine RNAs als mögliche Effektoren identifiziert wurden, verlieh den biochemischen Forschungen einen beträchtlichen Impuls. Um zu verstehen, was in der „Black Box“ vor sich ging, musste man die Reaktion in einem isolierten System untersuchen, anstatt in der komplexen Umgebung einer lebenden Zelle. Zwei Forschungsgruppen nahmen sich anfänglich dieser Herausforderung an: eine am MIT (Phil Zamore, Tom Tuschl, Ruth Lehman, David Bartel und Phil Sharp) und eine in Cold Spring Harbor (Scott Hammond, Emily Bernstein, David Beach und Greg Hannon). Beiden gelang es unabhängig voneinander (mit unterschiedlichen Ansätzen), die RNAi-Antwort in löslichen Extrakten von *Drosophila*-Zellen zu erhalten.<sup>[99,100]</sup> Aus diesen und den Ergebnissen weiterer Arbeitsgruppen war klar zu ersehen, dass die kleinen RNAs, die Hamilton und Baulcombe in Pflanzen beobachtet hatten, eine zentrale Rolle für die Interferenzantwort spielten. Die Interferenzantwort teilte sich, zumindest vom Konzept her, in drei Phasen auf: 1) die Spaltung eines langen dsRNA-Triggers in kürzere dsRNA-Segmente, 2) die Assoziation von einzelsträngigen Spaltungsprodukten an einen festen Ribonucleoproteinkomplex und 3) das Durchmusterung möglicher Ziel-RNAs in der Zelle durch diesen Komplex.<sup>[99–102]</sup> Für die beiden zentral beteiligten Enzymkomplexe prägten Hannon und Mitarbeiter griffige Namen, die heute standardmäßig in Verwendung sind: „Dicer“ (der die dsRNA in kurze Seg-



mente schneidet) und „Slicer“ (der sich um einen Einzelstrang der prozessierten RNA wickelt und die Spaltung der Ziel-mRNA einleitet).

Der Mechanismus, der aus den biochemischen und genetischen Analysen folgt, ist in Abbildung 9 dargestellt. Er beginnt mit der Spaltung des langen dsRNA-Strangs in kleine



**Abbildung 9.** Ein Grundmodell für den konservierten molekularen Mechanismus der RNA-Interferenz. Doppelsträngige RNA tritt in die Zelle ein und bindet an einen Komplex aus einem dsRNA-bindenden Protein (RDE4 für *C. elegans*) und einer dsRNA-spezifischen Nuclease (Dicer). Die dsRNA wird in kurze doppelsträngige Segmente geschnitten, die an einen zweiten Proteinkomplex binden, der unter anderem ein Argonaut-Protein enthält (RISC: RNA-induzierter Stummschaltungskomplex). Die gebildeten RISC-Komplexe können die in der Zelle vorhandene RNA-Population nach passenden Zielstrukturen austesten, die dann abgebaut werden.

doppelsträngige Bruchstücke. Ausgewählte Segmente einzelsträngiger RNA werden in den Slicer-Komplex aufgenommen, der auf eine bisher nicht verstandene Weise in der Zelle nach Ziel-RNAs sucht. Gefundene Ziel-RNAs werden durch eine intrinsische Enzymaktivität des RISC gespalten. Dieser Mechanismus konnte sicher nicht alle Erscheinungsformen des Prozesses erklären, erwies sich aber als gutes Arbeitsmodell für weitere Studien zur RNAi.

Unter anderem war es mit diesem Modell möglich, einige Vorhersagen darüber zu treffen, wie man in menschlichen Zellen zu einer spezifischen RNA-Interferenz gelangen könnte. Ein entscheidender Schritt war die detaillierte chemische Beschreibung des ersten kleinen RNA-Intermediats durch Elbashir, Lendeckel und Tuschl.<sup>[103]</sup> Diese weitgehend doppelsträngige RNA-Population, die durch das Dicer-Protein erzeugt wird, wies einen charakteristischen Satz von Endgruppen mit zwei leicht überhängenden Basen an jedem Strang und der negativ geladenen Phosphatgruppe am nicht überhängenden Ende auf. Wir erinnern uns, dass lange dop-

pelsträngige RNA eine nichtspezifische Wirkung induzierte, die uns daran hinderte, irgendwelche spezifischen Wirkungen zu erkennen. Die Bestimmung der Intermediatstruktur ließ die Vermutung zu, dass RNAs mit dieser Struktur – die früheren Studien zufolge zu kurz waren, um eine starke nicht-spezifische Antwort auszulösen (z.B. Lit. [104]) – eine sehr viel spezifischere Antwort erzeugen könnten. Dies war in der Tat der Fall, und erste Berichte hierzu erschienen von Elbashir, Tuschl und Mitarbeitern,<sup>[105]</sup> an die sich in rascher Folge Arbeiten anderer Forscher, darunter Natasha Caplen und Richard Morgan an den NIH, mit denen wir eine Zusammenarbeit hatten, anschlossen.<sup>[106]</sup> Die relativ unkomplizierte Ausführung dieser Tests führte rasch dazu, dass die siRNA-vermittelte Interferenz als eine bevorzugte Methode für bestimmte Analysen von Genfunktionen in Säugetieren übernommen wurde.

### RNA-Interferenz als Immunmechanismus: einige Analogien und Fragen

Die genetische und biochemische Aufklärung der RNA-Interferenz warf einige interessante Fragen auf bezüglich der Analogie zur klassischen Immunantwort (mit Antikörpern und Lymphozyten) (Abbildung 10). Die erste Frage betrifft

#### Vergleich zwischen RNAi und "klassischer" Immunität Spezifität: Wie findet man eine "Nadel im Heuhaufen"?

Wie reagiert man auf Pathogene ohne sich selbst anzugreifen?  
vorhandenes "angeborenes" Repertoire  
infektionsspezifisches "erworbenes" Repertoire

Wie erkennt man kleine Teilstücke des Pathogens?

Wie erreicht man eine systemweite Antwort?

Wie schont man Ressourcen für nutzbringende Immunantworten?  
durch Stabilisierung "nutzbringender Antworten"  
durch Verstärkung "nutzbringender Antworten"  
durch Regenerierung "nutzbringender Antworten"  
durch gegenseitige Abhängigkeit unterschiedlicher Immunantworten

Wie kann man sich erinnern?

**Abbildung 10.** Vergleiche, Analogien und Gegensätze zwischen der klassischen Immunität (durch T-Zellen und Antikörper vermittelte Immunantwort) und vermuteten RNAi-basierten Abwehrmechanismen.

die Spezifität. Im Fall des klassischen Immunsystems wird Spezifität durch eine Serie von Wechselwirkungen zwischen Erkennungsproteinen (Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren) und ihren möglichen Partnern (einschließlich Fremdproteinen und anderen Molekülen) erzwungen. Die Flexibilität dieses Repertoires an spezifischen Erkennungsproteinen dient somit als Grundlage für die klassische Immunantwort. Im Fall der intrazellulären Immunantwort auf Fremd-RNA scheint es, dass die Komplementarität von Nucleinsäuren eine ähnliche Rolle spielt. Die Hybridisierung der kurzen Effektor-RNA mit einer Ziel-RNA führt zu einer raschen und spezifischen Erkennung, auf die sich eine Immunantwort

stützen kann. Die kritische Länge des Doppelstrangs – im Bereich von 15 bis 25 Nucleotiden – erweist sich als optimal für eine spezifische Erkennung, da auf diese Weise das System nicht mit unspezifischen Hybridisierungen belastet wird, wie sie bei längeren Effektormolekülen gewöhnlich auftreten (ein Sachverhalt, auf den Tom Cech vor vielen Jahren in einem Vortrag vor einer Gruppe von Wissenschaftlern, die auf eine therapeutische Nutzung der Antisense-Technik hofften, hingewiesen hat).

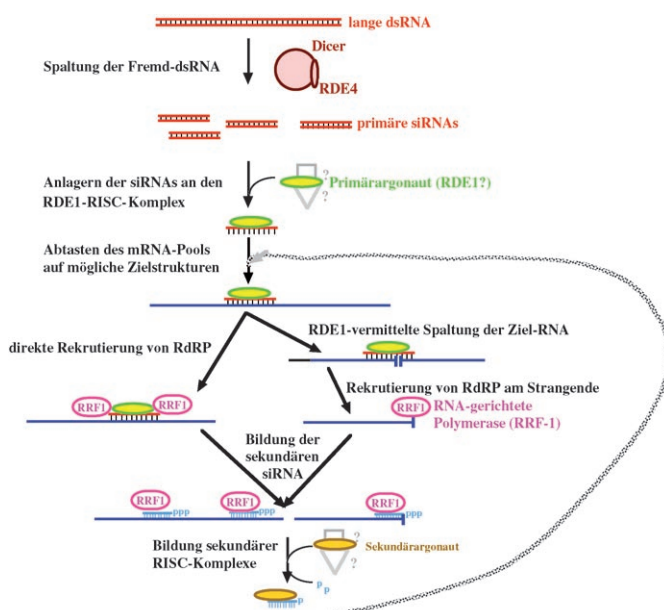
Ein zweiter Punkt gilt der Frage, wie der RNAi-Mechanismus sicherstellt, dass kein Selbstangriff stattfindet, der die Wirtszelle schädigen könnte; es muss im Wesentlichen gewährleistet sein, dass keines der essenziellen Gene der Zelle durch den RNAi-Mechanismus angegriffen wird. Der Mechanismus, durch den dies gelingt, beruht zum Teil darauf, dass eine dsRNA als Trigger genutzt wird. Unsere Zellen verwenden normalerweise keine doppelsträngige, sondern einzelsträngige RNA zur Genexpression. Natürlich kann es Fälle geben, in denen auch doppelsträngige RNA an der Regulierung der Genexpression teilnimmt, meistens jedoch können Zellen dies vermeiden. Der interessante Aspekt dabei ist, dass diese Vermeidung doppelsträngiger RNA evolutionärer Natur ist. Unsere Annahme ist, dass, sobald der RNAi-Mechanismus erst einmal in Gang ist, Zellen sehr sorgfältig in der Weise evolvieren, dass sie dsRNA nicht in Mengen erzeugen, die wichtige endogene Gene abschalten würden. Jedes Abweichen hiervon könnte die „Fitness“ des Organismus senken, sodass wir erwarten, dass es in evolutionären Zeiträumen zu einer sehr wirksamen Vermeidung von selbstschädigender RNAi kam. Diese Langzeitmechanismen unterscheiden sich von den klassischen Immunreaktionen in der Weise, dass letztere selbstschädigende Wirkungen durch einen Kontrollmechanismus vermeiden, der (wenn alles richtig funktioniert) eigengerichtete Erkennungselemente während der Lebensspanne eines Organismus kontinuierlich entfernt. Das bedeutet, dass es bei der RNA-basierten Immunität einfacher ist, das System in Echtzeit dazu zu bringen, eine endogene Zielkomponente anzusteuern, was eine vielversprechende Perspektive für die Entwicklung therapeutischer Strategien auf RNAi-Basis aufzeigt.

Ein dritter Aspekt ist die Aufspaltung des ursprünglichen dsRNA-Triggers in kleine Bruchstücke. Durch das Spalten des Triggers erhöht sich zunächst einmal die Zahl der unabhängigen Moleküle (und Spezifitäten), die an der Immunreaktion beteiligt sind. Hierdurch wird ein günstigeres Trigger-Zielstruktur-Verhältnis und damit ein wirksamerer Kontrollmechanismus erreicht. Darüber hinaus ermöglicht diese hauptsächlich Beteiligung kurzer Segmente dem System, auf Viren zu reagieren, deren Genom mutiert ist, die aber eine oder mehr essenzielle Sequenzen von mehr als 20 Basen behalten haben. Schließlich ist es von Vorteil, die Infektivität der Effektormoleküle auszuschalten, bevor diese im Organismus verteilt werden. Ich beschreibe dies gewöhnlich als analog zur Funktionsweise von Antiviren-Software: Ein Antivirenpaket enthält 1) eine Datenbank mit Informationen über Viren (in diesem Fall Computerviren), 2) eine Reihe von Routinen, um zu erkennen, welche Dateien infiziert sind, und 3) eine Reihe von Programmen, die die infizierten Dateien entweder reparieren oder löschen. Die Virendatenbank, die

Teil dieses Programmpakets ist, muss nicht die vollständigen Sequenzen jedes Virus haben, und tatsächlich wäre es ein Fehler, wenn die Hersteller von Antivirensoftware solch eine Datenbank vertreiben würden, da einige der Komponenten der Datenbank am Ende selbst infektiös sein könnten. Wenn man von jedem Virus nur einen Satz von relativ kurzen Sequenzen angibt, wird die zur Identifizierung benötigte Information bereitgestellt, ohne dass die Gefahr einer Infektion besteht. Das Aufbrechen der doppelsträngigen RNA in einzelne Segmente von 21 bis 25 Nucleotiden Länge könnte den gleichen Effekt in der zellulären Immunreaktion auf unerwünschte Fremd-RNA haben.

Ein weiterer Aspekt sowohl der klassischen als auch der RNA-basierten Immunmechanismen ist die Verbreitung der Immuneffektorinformation. Beim klassischen Immunsystem ist dies mit dem Transport durch den Blutkreislauf verbunden und hängt außerdem von einigen sehr exakt gesteuerten Migrationsprozessen der Lymphozyten ab. Beim RNA-basierten Immunsystem sind die Mechanismen der Informationsverbreitung noch nicht vollständig geklärt. Bisherige Ergebnisse weisen auf eine proteinbasierte Maschinerie hin, die die Verbreitung der RNAi-Antwort in *C. elegans* vermittelt (z. B. Lit. [107]). Ein Verständnis dieser Maschinerie wäre von größtem Interesse für die gezielte Entwicklung von Anwendungen der RNA-Interferenz.

Wie jeder zelluläre Mechanismus benötigt die RNA-Interferenz Energie und Stoffwechselquellen. Entscheidend ist die Fähigkeit des Organismus, diese Ressourcen je nach Bedarf zu handhaben und für die jeweils bedrohlichste Gefahr bereitzustellen. Das klassische Immunsystem besitzt Mechanismen, die die an der Überwachung beteiligte Population von Effektormolekülen (das Repertoire an T- und B-Zellen) regulieren. Die Mechanismen umfassen sowohl das Verwerfen von ungerichteten Spezifitäten als auch das Verstärken von zielgerichteten Spezifitäten. Vielleicht könnte man erwarten, dass die Spezifitäten, die die RNAi-Maschinerie steuern, einem insgesamt ähnlichen Mechanismus unterliegen. Ein interessantes Beispiel ist die Beteiligung einer RNA-gerichteten RNA-Polymerase (RdRP) am Stumm-schaltungsprozess bei Pflanzen, Würmern und einigen Einzellern (siehe Abbildung 11). In den 70er Jahren wurden zelluläre Enzyme, die RNA zu RNA vervielfältigen, erstmals in Pflanzensystemen charakterisiert (z. B. Lit. [108]), fanden aber wenig Platz innerhalb des zentralen Dogmas der Molekularbiologie („DNA erzeugt RNA erzeugt Protein“). Nachdem es zunächst beträchtliche Zweifel über die Quelle solcher Enzyme gab, gelang dann später ihre Aufreinigung sowie der Nachweis, dass sie vom Zellgenom codiert werden.<sup>[109–110]</sup> Des Weiteren konnte man zeigen, dass sie eine entscheidende Rolle bei der RNA-Interferenz in *Neurospora*, Würmern und Pflanzen spielen.<sup>[111–115]</sup> Einer der bemerkenswertesten Aspekte der RdRP-basierten Triggervverstärkung ist, dass die Verstärkung nur dann auftritt, wenn eine Zielstruktur angesteuert wird. Die Folge dieses Regulationsmechanismus ist,<sup>[116–122]</sup> dass 1) die Verstärkung des Effektorsignals auf Fälle beschränkt ist, in denen eine echte Zielstruktur gefunden wird, und 2) dass sich das Spektrum an Triggern in der Weise ausdehnen kann, dass zunehmend breitere Segmente der als fremd/unerwünscht erkannten Zielstruktur

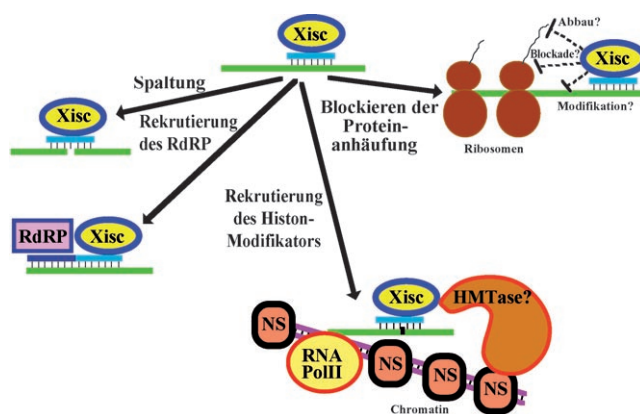


**Abbildung 11.** Ein Modell für die verstärkte RNA-Interferenz im Körpergewebe von *C. elegans*. Ein langer dsRNA-Strang, der in die Zelle eintritt, wird durch einen Komplex bestehend aus einer Nuclease (Dicer) und einem Erkennungselement (RDE4) angegriffen, der die dsRNA in kurze Bruchstücke schneidet. Durch Anlagern der Bruchstücke an ein zweites Protein entsteht ein Stummschaltungskomplex, der die mRNA-Population der Zelle nach passenden Sequenzen abtasten kann. Diese unterliegen einer Spaltung (die die mRNA inaktivieren sollte), und/oder sie dienen zur Synthese kurzer komplementärer RNAs.<sup>[116–122]</sup> Letztere können an ihre eigenen Effektor-Komplexe anlagern (möglicherweise mit einem nun anderen Argonaut-Protein),<sup>[143]</sup> was in einer zielstrukturabhängigen Verstärkung der Immunantwort auf die Fremd-dsRNA resultiert.

erfasst werden. Der RdRP-basierte Verstärkungsmechanismus ist somit ein Beispiel dafür, wie das RNAi-System der Immunaktivität einen „Feinschliff“ gegen vorliegende Gefahren verleiht.

Die Analogie zwischen dem klassischen und dem RNA-basierten Kontrollmechanismus wirft eine letzte Frage auf, nämlich wie sich das System frühere Infektionen „merkt“, um so eine optimierbare Immunität zu entwickeln. Bei den meisten RNAi-Experimenten mit *C. elegans* verschwand die sichtbare Wirkung nach etwa einer Generation (z. B. Lit. [40]). Dies ist jedoch nicht immer der Fall, und es gibt Beispiele, bei denen die genspezifischen Wirkungen der RNA-Interferenz über zahlreiche Generationen anhalten können (z. B. Lit. [123, 124]). Ähnliche Langzeitwirkungen wurden in Pflanzensystemen untersucht (z. B. Lit. [125]).

Auf der Grundlage des einfachen Modells in Abbildung 9 würde man solche Wirkungen nicht erwarten. Ein aktuelleres Modell (Abbildung 12) besagt, dass sich die anfängliche Wechselwirkung der Effektor- mit den Zielsequenzen aus mehreren Arten zeitlich verschiedener Wirkungen zusammensetzt: Kurzzeitwirkungen (z. B. Hemmung der Translation und des Abbaus der Ziel-mRNA), mittelfristige Wirkungen (die Produktion von zusätzlichen kurzkettigen RNA-Effektoren mit Komplementarität zur Zielstruktur) und Langzeitwirkungen (einschließlich Änderungen der physikalischen



**Abbildung 12.** Ein Modell für die multimodale Gen-Stummschaltung nach Erkennung des RNA-Transkripts durch die siRNA. Ein generischer ternärer Komplex aus dem Argonaut-Protein, der siRNA und der Zielstruktur (oben gezeigt) kann im Prinzip zu verschiedenen Komplexen mit rekrutierten Stummschaltungsfaktoren führen. Links oben: Spaltung des Zieltranskripts durch eine Argonaut-ähnliche Komponente oder einen rekrutierten Bindungspartner. Mitte links: Rekrutierung einer RNA-gerichteten RNA-Polymerase, die, entweder ausgelöst durch die anfängliche siRNA oder (wie offenbar bei *C. elegans*) durch eigenständige Initiierung, komplementäre RNA synthetisieren kann. Unten: Diagramm der angefügten Komponenten für die Chromatin-Modifizierung, die an nahegelegenen Nucleosomen und/oder anderen DNA-assoziierten Faktoren angreifen (hier als stummschaltende HMTase („Histon-Methyltransferase“) dargestellt;<sup>[145]</sup> zahlreiche andere epigenetische Modifikatoren könnten auf äquivalente Weise agieren). Man beachte, dass dieser Prozess wahrscheinlich an einem naszierenden RNA-Transkript ablaufen würde, das noch immer physikalisch mit der DNA-Matrize verbunden ist.<sup>[144]</sup> Rechts: Rekrutierung von Faktoren, die die Translation der mRNA blockieren könnten (z. B. Lit. [48]).

Konformation der für das Zieltranskript codierenden zellulären DNA).<sup>[46, 47]</sup> Diese unterschiedlichen Arten von Immunantworten auf ähnliche anfängliche Wechselwirkungsergebnisse sind in vielerlei Hinsicht analog zum klassischen Immunsystem, wo die anfängliche Erkennung einer Zielstruktur unzählige Folgen nach sich zieht. In beiden Fällen scheinen die anfänglichen Interaktionskomplexe (RISC-vermittelte Nucleinsäurehybridisierung im Fall von RNAi, Antikörper-Antigen-Komplex oder (T-Zell-Rezeptor)-Antigen-Komplex im Fall des klassischen Immunsystems) die Fähigkeit zu haben, je nach Situation eine Vielzahl von Unterdrückungsmechanismen heranzuziehen. Die Dauer einer jeweiligen Immunantwort (und des nachfolgenden Gedächtniseffekts) ist das Ergebnis einer Balance aus lang- und kurzzeitigen Wirkungen.

### Ein Ausblick: Rätsel und Herausforderungen

Die Forschungen zur RNA-Interferenz sind ein extrem aktives Feld und werden es in absehbarer Zeit auch bleiben. Viele der zentralen Fragen betreffen die grundlegenden Mechanismen; viele andere gelten möglichen Anwendungen. Mit an erster Stelle rangiert das Verständnis der RNA-Interferenz als möglicher „immunsystemartiger“ Kontrollmechanismus (ich habe einige der ungelösten Fragen in Abbildung 13 zusammengefasst). Eine Frage betrifft die mögliche



## Einige offene Fragen zur RNAi und zur Immunität

Hat die RNAi in Tieren die Rolle einer antipathogenen Immunreaktion?

Welche physiologischen Faktoren modulieren die RNAi, um maximale Immunantwort gegen pathogene RNAs zu erzielen?

Wirken kleine endogene RNAs als ein Ableger angeborener Immunität?

Kann RNAi so manipuliert werden, dass eine schützende Immunisierung erzielt wird?

Sind RNAi-bezogene Mechanismen für eine Reihe von Genstumschaltungsereignissen verantwortlich, die bei der Tumorentwicklung auftreten?

**Abbildung 13.** Offene Fragen zur RNA-Interferenz und zur Immunität.

Rolle der RNAi als antivirale Immunantwort außerhalb des Pflanzenreichs. Jüngste Studien an wirbellosen Tieren (Würmern und Fliegen) zeigen recht eindeutig, dass die RNAi in einfachen Tieren als Überwachungsmechanismus gegen Viren (und andere eigennützige Informationsträger wie Transposonen) fungieren kann (z.B. Lit. [85,126–128]). Dass dieser Sachverhalt für höhere Tiere (Säugetiere) bisher nicht geklärt werden konnte, liegt vor allem an der Schwierigkeit, bei Säugetieren spezifische und nichtspezifische Immunreaktionen auf dsRNA auseinanderzuhalten. Es ist sicher auch vorstellbar, dass die virenabwehrende Rolle der RNAi in Säugetieren verloren gegangen ist.

Eine aufregende Entwicklung der letzten Jahre war die Strukturaufklärung einzelner Bestandteile der RNAi-Maschinerie (z.B. Lit. [129,130]). Diese Strukturen haben – sowohl einzeln als auch im Verbund – zu einem tiefen Verständnis des Mechanismus geführt, von dem man zu Beginn der Forschungen nur träumen konnte. Mit den immer genaueren Einblicken in die Strukturen traten eine Reihe von Fragen zur Thermodynamik und Kinetik auf, die den statischen Diagrammen wie in Abbildung 9 und 11 noch die Dimension der Zeit hinzufügen. Man weiß bereits, dass auf jeder Stufe des RNAi-Mechanismus ein kinetischer „Wettkampf“ zwischen verschiedenen Effektoren stattfindet und dass dies ein entscheidender Aspekt für die Funktion des RNA-basierten Überwachungssystems ist (z.B. Lit. [131,132]). Auf ähnliche Weise dürfte eine kinetische Konkurrenz zwischen der RNAi-Maschinerie und anderen Protein-RNA-Wechselwirkungen (RNA-Synthese und -Verarbeitung, RNA-Speicherung und -Umschlag, Translationsmaschinerie) das Spektrum der RNAi-Ereignisse bestimmen, die während des Lebenszyklus einer Zelle tatsächlich auftreten können (z.B. Lit. [133]).

Während biochemische und strukturelle Studien bereits tiefe Einblicke in den RNAi-Mechanismus gewähren, gibt es im Bereich der genetischen Analyse noch reichlich Spielraum für die RNAi-Forschung. Tabara et al.<sup>[85]</sup> fanden in ihren ursprünglichen Screenings gerade zwei *C.elegans*-Gene mit der idealisierten Eigenschaft, fast die gesamte RNA-Interferenz auszuschalten ohne nennenswerte Auswirkungen auf den Organismus zu haben. Ähnliche Gene wurden in den frühen

genetischen Screenings von Pflanzen- und Pilzsystemen identifiziert (z.B. Lit. [93,94]). Wirbeltierzellen, denen die am dsRNA-basierten Überwachungsmechanismus beteiligte Argonaut-Komponente fehlt, sind interessanterweise lebendig (und können in einer Petri-Schale heranwachsen), sind aber nicht in der Lage, einen lebensfähigen Organismus zu bilden.<sup>[134]</sup> Entsprechend hat man in anderen Systemen Mutanten beobachtet, die vordergründig infolge einer spezifischen Immunantwort auf eine dsRNA entstanden sind und die selbst in Abwesenheit bekannter pathogener Einflüsse faszinierende Veränderungen in ihrem Wachstumsverhalten und/oder ihrer Physiologie zeigen (z.B. Lit. [135,136]). Etliche biologische Einflüsse, die die ersten genetischen Screenings beeinträchtigt haben, sind mittlerweile verstanden. Dass in manchen Fällen bestimmte Mutationen nicht aufgefunden werden konnten, spiegelt einen gewissen Grad an genomischer Redundanz wider, was bedeutet, dass gleich mehrere Genprodukte die Fähigkeit haben, eine einzelne Reaktionsstufe zu vermitteln.<sup>[85]</sup> Umgekehrt wurden manche RNAi-Komponenten zunächst nicht identifiziert, weil sie noch an weiteren RNAi-abhängigen Prozessen beteiligt sind, die ähnliche molekulare Maschinerien nutzen und für das Überleben des Organismus essenziell sind. Neben dem regulatorischen Mikro-RNA-System, das bereits gut charakterisiert ist,<sup>[128,137]</sup> dürfte das Spektrum an RNAi-bezogenen Prozessen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auch Überwachungs- und regulatorische Funktionen innerhalb der Zelle umfassen. Diese gilt es nun mithilfe der inzwischen breit verfügbaren Methoden der genetischen Analyse aufzuklären (z.B. Lit. [128]).

## Die RNA-Interferenz als ein Werkzeug in der Medizin?

Eine Frage, die für beträchtliche Aufregung gesorgt hat, betrifft die mögliche direkte Intervention mit dsRNA zur Behandlung menschlicher Krankheiten. Bei indirekten Anwendungen der RNA-Interferenz in der Medizin ist man sicherlich einen großen Schritt vorwärts gekommen. Neben vielen anderen Methoden hat auch die RNAi eine mittlerweile etablierte Rolle bei der Untersuchung der Genregulation, in der funktionellen Genomik und zur Identifizierung von therapeutischen Zielstrukturen.

Wird die direkte Verabreichung von interferierender RNA einmal zu einer Behandlungsmethode werden? Was spräche dagegen, einem an einer Virusinfektion erkrankten Patienten einen Wirkstoff in Form einer doppelsträngigen RNA zu geben, die zu der betreffenden Virensequenz passt? Oder bei einem Tumorpatienten: Warum nicht ein für den Tumor essenzielles Gen finden und eine passende dsRNA verabreichen, um so das Tumorstadium zu stoppen? Warum nicht eine Krankheit, die von einem veränderten Gen verursacht wird, mit einer doppelsträngigen RNA bekämpfen? Es gibt zahlreiche potenzielle Anwendungen, in allen Fällen aber muss zunächst das Dickicht aus Zuführungsform, Sicherheit und Wirksamkeit des Wirkstoffs in der komplexen Umgebung einer genetisch diversen Zielpopulation gelichtet werden, und es ist notwendig, die Reaktion des Wirtorganismus

mus (und in manchen Fällen des Pathogens) auf die spezifische dsRNA in allen Einzelheiten zu verstehen. Der Zeitrahmen für solche Tests kann Jahre, Jahrzehnte oder länger sein. Bei aller Vorsicht, die in ein solches Unterfangen einfließt, sehe ich den zukünftigen Forschungen auf diesem Gebiet, sei es im akademischen oder pharmazeutisch-industriellen Sektor, mit Spannung entgegen.

Ich erwarte, dass sich zusätzliche Bereiche auftun werden (jenseits der oben diskutierten Anwendungen in der Genomik und Therapie), in denen ein Verständnis der RNA-aktivierten Gen-Stummschaltung therapeutische Möglichkeiten eröffnet. Jeder wirksame und spezifische biologische Prozess (selbst wenn er eine generell heilsame Wirkung hat) hat Folgen für den Organismus, sobald Abweichungen in der Spezifität oder der Regulation auftreten. Anomalien der Gen-Stummschaltung (sowohl positive als auch negative) sind Bestandteil vieler menschlicher Krankheiten einschließlich Krebs. Intensive Forschungen zur Dysregulation von Krebs und anderen Krankheiten haben für praktisch jeden bekannten zellulären Regulationsmechanismus Fälle von Defekten zum Vorschein gebracht. Regulationsmechanismen unter Beteiligung kleiner RNAs bilden hier keine Ausnahme (z. B. Lit. [139,140]), wobei die derzeit verfügbaren

Daten wahrscheinlich nur einen Bruchteil solcher Effekte aufzeigen. Mit zunehmendem Maße, in dem die Beteiligung von RNA-aktivierten Gen-Stummschaltungsprozessen an Krankheiten und der Reaktion des menschlichen Organismus auf diese Krankheiten charakterisiert wird, wird es immer mehr vorstellbar, dass ein direkter Eingriff in die RNAi-Maschinerie – entweder auf umfassende Weise oder bei einer kleinen Untergruppe von Zellen oder Effektorfunktionen – sich zu einer attraktiven therapeutischen Strategie entwickeln kann. Die Verfügbarkeit von therapeutischen Maßnahmen zur Manipulation der RNAi-Maschinerie – wie niedermolekulare Wirkstoffe (z. B. Lit. [141]) und modulatorische Strategien (z. B. virale Komponenten mit Antistummschaltungsfunktion) – wird hier sicherlich ein Fundament für die Entwicklung von potenziellen Behandlungsmöglichkeiten bieten.

### Wissenschaft wächst nicht auf Bäumen, auch nicht in Santa Clara ...

Schließen möchte ich mit einigen Worten des Dankes. Ich hatte stets das Glück, einer Familie, einem Kreis von Freunden, einer Gruppe von Mitarbeitern und einer Anzahl von

In randomized order: Lilly Lerner, Maria Esquela, Lynne Corboy, Yixian Zheng, Jenny Pang, Jim Manley, Robert Weinberg, Guy Rudin, Steven Siegel, Claire Craddock, John Hennessey, Andrew Godbey, Josh Glassman, Kevin O'Connell, Mark Lorell, Jim Kiessling, Benjamin Glass-Siegel, Ziva Reuveny, Gesine Dingkuhn, Vivian Hou, MarketBiology Students, Joe Robertson, Patrick Masson, Massachusetts Institute of Technology, Gabriel Chae, Harold Smith, Caroline Marrah, Dina Goren, Sharon Long, Grace Fagade, Rose Sherak, Mike Leong, Arend Sidow, Joan Miller, Metav Arusha, Peter Okkema, Elliott Meyrowitz, Aviva Richman, Robert Schleif, David Postman, Ursula Vogel, Ann Thompson, Barry Levine, Nathan Krantz-Fire, Michael Jantsch, David Remondini, Ed Hedgecock, Fred Tan, Mehrangiz Kamyab, Shira Lander, Sondra Lazarowitz, Gilbert Chu, John Gage, Karen Rosenfeld, Allie Liu, Min Kim, Ann Crowden, Richard Meserve, Mike Cleary, Sonya Palmer, Art Barnes, Mike Krause, Ashley Chi, Ann Corsi, Nipam Patel, Parmjit Jat, Mark Eaton, Michael Shen, Ben Hwang, Lucy Sherill, Linda Breeden, David Finkel, Gregory Fisher, Irv Weissman, Judith Greenberg, Kerstin Arusha, Lisa Steiner, Peter Sarnow, David Baillie, Lisa Weymouth, Toshi Oyama, Ann Halvorsen, Richard Durbin, Naomi Richman, Helen Sherak, Helen Reichel, Claudia Lipschultz, Terence Murphy, Jade Li, Won Kyu Pak, Ruth Rose, Poornima Parameswaran, Susan Michaelis, Chip Ferguson, Ed Ziff, Donald Moerman, Miriam Goodman, Bill Tiefenwerth, Kathy Meyrowitz, Chris Halvorsen, Mary Montgomery, Paul Chernoff, Josianne Eid, David Housman, Ben Hole, Cliff Tabin, Sarina Schwartz, The Fremont Chess Club, Betty Dyer, Garfield Moore, Julia Kay, Robin Kulakow, Kevin VanDoren, William Hurlbut, Charles Long, Daniel Blanchard, Sudha Mitra, Brittany Little, Peter Waterhouse, Casey Inman, Sara Eisenberg, Bill Fixen, Rachel Krantz, Mark Samuels, Maria Jasin, Geraldine Seydoux, Victor Ambros, Inder Verma, Chang Zhang Chen, Titia Sijen, Barbara Elspas, Jorge Mancillas, Elana Lubit, Steve Johnson, David Schwartz, Barbara Levine, Joyce Rosenfeld, Blake Hill, Hollenbeck Elementary School, Ruth Shinn, Phillip Sharp, Paul Englund, John Burke, Scott Oliver, Yvonne Pon, Peter Hahn, Amy Locks, Ben Stern, Marvin Sherak, Paul Kokulis, Clifford Locks, Robert Tjian, Siva Ophir, Zuck, John Johnston, John Gearhart, Hee Young Kim, Denise Montell, Tory Prestera, Susan White-Harrison, Adi Ophir, Phil Beachy, Sam Halvorsen, Julia Pak, Alan Klotz, Hugh Riehlf, Robert Waterston, Stuart Kim, Barbara Postman, Mary Dasso, Gina Fisher, Maurice Fox, Sarah Katz, Anita Finkel, Morgan Park, Maxine Singer, Gerry Crabtree, Mitch Kostich, Rick Myers, Carol Alberts, Peter Jackson, Ira Dyer, Levana Rutschild, Daniel Nathans, Cynthia Kenyon, The National Institute of Child Health and Development, Joy Heilig, Sylvia O'Neill, The Balzano Family, Gary Otto, Ellen Zucker, The Medical Research Council, Yvette Goren, Simon Xu, Nancy Paiva, Andy Golden, Nancy Craig, Philip Anderson, Ellie Krantz, Mary Beth Shinn, Donna Rae Machado, Nina Federoff, Ann Sharp, Genevieve Fire-Halvorsen, Eleanor Maine, John Etchemendy, Richard Henderson, Gary Ruvkun, Ichi Maruyama, Kamiko Cangelosi, Shou Wei Ding, Mel Goudy, Jack Greely, Randall Kaufman, Geeta Narlikar, Haifan Lin, Victor Corces, Matt Kowitz, Alyssa Zucker, Alan Wolffe, Arielle Goren, Lynne Spencer, Joey Finkel, Christine Norman, Joe Adler, Sam Fire, Nichol Thompson, Kathy Sherak-Chen, Kam Ophir, Richard Calendar, Judith Geller, Ken Kempfles, Mark Benvenuto, Judith Kimble, Nancy Hopkins, Susan Strome, Michael McCaffery, Kathy Berkner, Rich Breyer, Ann Brunet, Kirsten Crossgrove, Richard Jorgensen, Greg Wiederrecht, Ellen Cammon, Allan Shearn, 7\_03 Students, Wendy Locks, Jim Darnell, Rebecca Raitzig, Kwok Han Lian, William Pavao, Baltimore-Washington Worm Club, Karla Kirkegaard, Ihor Lemischka, Miriam Fire, Ron Millar, Laura Loveland, Linda Henry, Lewis Chodosh, Mr. Steffen, Harold Weintraub, Path, 218 Students, Joe Yokroy, Lois Edgar, Bill Reichel, Natasha Caplen, Ms. Escobar, the Fremont Math Club, Ms. Wilson, Nancy Blachman, Andy Hopkins, Jim McGhee, Hung Hsi Wu, Charles Yanofsky, Felix Khuner, De Anza College, Craig Mello, Steven Leong, Ken Lorell, Tim Schedl, Marcus Thompson, Robert Herman, Hil Carmi, Heather McCullough, Gideon Eisenberg, Frederica Postman, Anne Villeneuve, Don Doering, Dan Donoghue, Margalit Krantz-Fire, Sarah Shaeffer, The Shapiro Family, Elias Speliotis, Peter Sklar, Ms. Beaufenkamp, Jim Kent, Nelson Blachman, Allan Spradling, Scott Hammond, Gail Shokat, David Baulcombe, Helen Hart, Jerry Fox, Menachem Ophir, Karen Lamarco, Michel Goedert, Ken Fisher, Zeke Gluzband, Molly Marcus, Don Riddle, Matt vanderRijn, The Helen Hay Whitney Foundation, Sim Esquela, The National Science Foundation, Chasen Chae, Tamir Ophir, Elizabeth Lincoln, Gavi Swerling, Jay Maniar, Lisa Sklar, Cori Bargmann, Sarah Barker, Mark Edgley, David Botstein, Jonathan Khuner, James Duc, Jim Lewis, Al Rosenfeld, Rachel Grossman, Doris Lorell, Richard Sutch, Jeff Shamma, Hannes Vogel, Bernie Elspas, Bruce Hoover, Jeff Yuan, Ky Sha, Suzy Halvorsen, Gloria Brienza, Chris Walsh, Forrest Foor, Sydney Brenner, Mike Finney, Georgia Rosenblatt, Marvin Rosenfeld, Shrage Ophir, Micah Glass-Siegel, Rainer Sachs, Mark Kay, Greg Robinson, Connie Clay, Andrea Swerling, Greg Hannon, Tom Leong, Femke Simmer, Shin Lin, Dan Riordan, Tom Lee, Samantha Glassman, Mark Bretscher, Doug Vollrath, Steve Gagli, Louise Pape, Nadia Rosenfeld, Megan Jacoby, Florence Locks, Mary Lou Pardue, Jeff Levinsky, The National Institute of General Medical Sciences, Ms. Benevides, Dan Stinchcomb, Steve Carr, David Baltimore, Aaron Mitchell, Frank Solomon, Aurora Kerscher, Saul Roseman, Arash Aryana, Timothy Bach, Roger Kornberg, Theresa Fritchle, Jamie Fleenor, Gladys Sherak, Sherrie Rakvin, Julie Baker, Joel Postman, Arlene Oyama, Fremont High School, Jim Priess, Tom McDonough, Beth Hare, Don Katz, Karen Beemon, Nelson Tandoc, Antoinette Glumac, Diane Leong, Nancy Maizels, Virginia Walbot, Phil Zamore, Mike Cherry, David Rosenfeld, Marc Shinn-Krantz, Hugh Tyson, Doug Fambrough, Michael Wassenecker, David Shore, Robert Horvitz, Matthew Grossman, Jack Lorell, Izzy Goren, Gary Struhl, Roy Halvorsen, Colin Hampton, David Lipman, Lester Dubins, Carl Baker, Jimo Borjigin, Erika Matunis, David Krantz, Bob Kingston, Ciel Berman, Tamara Doering, Martha Elspas, Teymour Boutsos Ghallil, Jim Barsom, Paul Miller, SuSun Slatky, Norma Fire, The University of California Santa Cruz, Shimming Chen, Gunther Stent, Steve Ellege, David Hirsch, Miriam Adler, Doug Koshland, Sherman Elspas, Ms. Fucile, Marcia Glass-Siegel, Alan Zahler, William Kelly, Connie Jewell, The University of California Berkeley, Jocelyn Shaw, Dennis Dixon, William Rossi, Peter Lawrence, Steve Kostas, Al Scott, The Rita Allen Foundation, Rick Irvin, Silas Xu, David Nelson, Kathy Wilson, Peter Kulakow, Tom Tullius, Jenny Hsieh, Uttam Rajbhandary, Susan Dymeck, Chelsea Glassman, Iva Greenwald, Judith Yanowitz, William Wood, Steve Wasserman, Ann Rose, Clarissa Cangelosi, Ann-Marie Macdonald, Weng Onn Lui, Tim Hunt, Michael Sklar, Genetics 235 Students, Mark Palm, Spice Kleinman, Mia Horowitz, Ellen Henderson, Michael Shokat, Eric Kostlan, Ann Marie Murphy, Jeff Axelrod, John Pringle, Alejandro Sanchez, Ulla Hansen, Deborah Robbins, Lisa Timmons, William Sherak, Lincoln Stein, Casanya Johnson, Nancy Locks, Bill Courchesne, Greg Barsh, Ronald Plasterk, David Meyrowitz, Orit Ophir, Trelligans Inc, Chris Phillips, Becky Hohman, Stan Finkel, Steven Tschantz, Scott Rosenfeld, Robert Brown, Phil Cormier, Hilla Keren, Rachel Meyrowitz, Laurie Kovens, Nina Sherak, Brian Horblit, Howard Sklar, Ben Sher, Susan Parrish, Peter Sorger, Philip Fire, Miles Greiner, Boris Magasanik, Frank Laski, John White, Jake Raitzig, Chen Ming Fan, Carrie Athans, Paul Shimmel, Daniel Shinn-Krantz, Tom Changnan, Sam Dadas, Susan Kern, Kyung Lee, Kiyoshi Nagai, Verena Jantsch, Jonathan Adler, Nigel Crawford, Sam Ward, HsuTze Lee, Bruce Vogel, Robert Ely, David Miller, Joe Gall, Jonathan Gent, Jonathan Hodgkin, Susan Blachman, Miriam Fox, Margarita Siafaca, Michael Senturia, Steve L'Hernault, Marian Barber, Michael Adler, Diane Shakes, Naudia Lauder, Saul Glass-Siegel, Donald Brown, Stanford University, Marnie Halpern, Pat Englar, Judith Swan, Malcolm Geffer, Ari Krantz, Maitreya Levanchild, Barbara Messenger, The National Institutes of Health, Michael Brent, Lihsia Chen, Elizabeth Glassman, John Sulston, Paul Sternberg, Susanna Lewis, Bingwei Lu, Man Wah Tan, Gary Tanegawa, Ann Blachman, Hiroaki Kagawa, Tina Trapani, Cecilia Mello, Nathan Landau, Eric Fyrborg, Tom Loveland, Dan Richman, Barbara Solner-Webb, Dennis Balingier, David Friedheim, Bill Kupiec, Zhou Wang, Earl Potts, Narry Kim, Mike Fuller, Stella Kerscher, Carol Berkower, Carolyn Norris, Mary Waye, Russell Rarity, Pnina Ophir, Guy Benian, Lucy Sherak, Chalermporn Ongvarasopone, Janet Fire, Rich Mulligan, Robert Rosenfeld, Michael Klass, Richard Morgan, Iris Martinez, The Carnegie Institution of Washington, Rachel Hertzman, Witold Filipowicz, Andy Hoyt, Janet Williams, Doug Melton, Kaja Arusha, Joel Schildbach, Johns Hopkins University, Calvin Moore, Mortimer Locks, Yossi Gruenbaum, Connie Cepko, 020\_731 Students, Irving Zucker, RuChih Huang, Sam Driver, Ian Purse, JooHong Ahn, Maurice Bessman, Gene Brown, Leiny Brand, The Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Karen Perry, Oliver Kerscher, Brian Harfe, Glensene Johnson, Rose Stern, Rose Kass, Sam Katz, Chaya Krishna, SiQun Xu, Ruth Starczyk, Elisabeta Ullu, Donna Albertson, Math, 51C Students, Harvey Lodish, Stan Balazar, Tom Fulton, Phil Pizzo, 020\_348 Students, Rosa Alcazar, Sarah Hammontrout, Karen Chapman, Adam Rosenfeld, Louisa Ho, Richard Pagano, Marianne Bienz, Nicholas Hammontrout, The American Cancer Society, Tom Blumenthal, Anna Esquela, Constance Sherak, Hugh Pelham, Monty Lerner, Karin Kopicak, Corwin Shokat, Paula Grabowski, Michael Wilcox, Mohammed Islam, Allen Strause, Nathan Sato, Rebecca Krantz, Magda Konarska, Sally Robinson-Seaver, Marty Chalfie, Bino Palmer, David Landsman, Steve Hardy, Michael Raitzig, Seth Alberts, Ilana Sherak, Jonathan Zucker, Mary Esteve, Richard Craddock, Eric Haag, Lori Steffy, Mango Junior High School, Crystal Myers, Donald Sherak, Mei Hsu, Elizabeth Lee, Tabitha Doniach, William Whitson, Steven Locks, Micro 233 Students, Stan Cohen, Richard Padgett, Larry Lasky, Anthony Hyman, Robert Sherak, Tom Tuschl, Charles Vinson, Bruce Reynolds, Doug Harrison, Lisa Gracey, Patty Winningham, Mike Sepanski, Pat Cammon, Mike Cangelosi, Richard Swerling, Marina Ratner, Kelly Liu, Amy Alper, David Eisenmann, Joe Lipsick, Monroe Postman, Phil Newmark, Steve McKnight, Richard Field, Ms. Mayfield, Allan Kensky, Bernard Sherak, William Matlack, Trina Shroer, Kyle Cunningham, Steve Winans, Eric Barklis, more...

**Abbildung 14.** Einige der Menschen und Arbeitsgruppen, denen ich für ihre Hilfe, Unterstützung und Ermutigung danke. Die Aufzählung ist per Computer in eine zufällige Reihenfolge gebracht; für Auslassungen und falsche Schreibungen bitte ich um Entschuldigung.

Institutionen verbunden zu sein, in der wissenschaftliche Forschung und Menschlichkeit eine gleichmaßen hohe Wertschätzung erfahren. Dies machte es zu einer Freude, Wissenschaft zu betreiben.

Da sich dieser Beitrag auf Studien aus den 90er Jahren über die strukturellen Grundlagen der RNA-Interferenz konzentriert, möchte ich zuerst den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und einigen unserer Forschungspartner danken, die an diesen Arbeiten unmittelbar beteiligt waren. Das Team meiner Arbeitsgruppe, das am unmittelbarsten beteiligt war, bestand aus SiQun Xu, Mary Montgomery, Steve Kostas, Lisa Timmons, Susan White-Harrison, Jamie Fleenor und Susan Parrish. Als sehr fruchtbar erwies sich die Zusammenarbeit mit Craig Mello und seiner Gruppe, insbesondere mit Sam Driver und Hiroaki Tabara, ebenso wie mit Natasha Caplen und Rick Morgan an den NIH, Farhad Imani am Johns Hopkins sowie Titia Sijen, Femke Simmer, Karen Thijsen und Ronald Plasterk in Utrecht. Ich hoffe, Sie erkennen, dass dieses recht beträchtliche Gemeinschaftsprojekt nur ein Teil eines sehr großen Puzzles war, an dem sich viele weitere Wissenschaftler und Forschungsgruppen auf der ganzen Welt beteiligten.

Zwei Institutionen gebührt besonderer Dank: dem Carnegie-Institut der Abteilung für Embryologie in Washington, wo wir unsere Arbeiten zur strukturellen Charakterisierung des Triggers ausgeführt haben, und den National Institutes of Health, die unsere gesamten Arbeiten in diesem Bereich finanzierten.

Wer in dieser Welt sein Glück machen will, braucht die Mitwirkung anderer. Als ich mich hingesetzt habe, um ein paar Namen von Leuten aufzuschreiben, die an dem einen oder anderen Punkt Einfluss auf meine Forschungen hatten, kam Abbildung 14 heraus. Ich entschuldige mich vorab für versehentliche Auslassungen (und zahlreiche Schreibfehler) ... Sie wissen, wer Sie sind!

Eingegangen am 7. Juni 2007

Online veröffentlicht am 23. August 2007

- [1] „Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid“: J. Watson, F. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [2] „A new two-stranded helical structure: polyadenylic acid and polyuridylic acid“: A. Rich, D. Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 3548.
- [3] „Phosphorus incorporation in Escherichia coli ribo-nucleic acid after infection with bacteriophage T2“: E. Volkin, L. Astrachan, *Virology* **1956**, 2, 149–161.
- [4] „Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA“: B. Hall, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, 47, 137–163.
- [5] „Determination of the helical configuration of ribonucleic acid molecules by X-ray diffraction study of crystalline amino-acid-transfer ribonucleic acid“: M. Spencer, W. Fuller, M. Wilkins, G. Brown, *Nature* **1962**, 194, 1014–1020.
- [6] „Double helix at atomic resolution“: J. Rosenberg, N. Seeman, J. Kim, F. Suddath, H. Nicholas, A. Rich, *Nature* **1973**, 243, 150–154.
- [7] „Replicative form of encephalomyocarditis virus Ribonucleic Acid“: L. Montagnier, F. Sanders, *Nature* **1963**, 199, 664–667.
- [8] „Replication of viral RNA, III. Double-stranded replicative form of MSW phage RNA“: C. Weissmann, P. Borst, R. Burdon, M. Billeter, S. Ochoa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, 51, 682–690.
- [9] „Virus-specific double-stranded RNA in poliovirus-infected cells“: D. Baltimore, Y. Becker, J. Darnell, *Science* **1964**, 143, 1034–1036.
- [10] „A protective action of neurotropic against viscerotropic yellow fever virus in Macacus rhesus“: M. Hoskins, *Am. J. Trop. Med.* **1935**, 15, 675–680.
- [11] „An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses“: G. Findlay, F. MacCallum, *J. Pathol. Bacteriol.* **1937**, 44, 405–424.
- [12] „Virus Interference. I. The Interferon“: F. Isaacs, J. Lindenmann, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1957**, 147, 268–273.
- [13] „An antiviral substance from Penicillium funiculosum“: R. Shope, *J. Exp. Med.* **1953**, 97, 601–650.
- [14] „Inducers of interferon and host resistance. I. Double-stranded RNA from extracts of Penicillium funiculosum“: G. Lampson, A. Tytell, A. Field, M. Nemes, M. Hilleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 782–789.
- [15] „Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes“: A. Field, A. Tytell, G. Lampson, M. Hilleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 1004–1010.
- [16] „Inducers of interferon and host resistance. 3. Double-stranded RNA from reovirus type 3 virions [reo 3-RNA]“: A. Tytell, G. Lampson, A. Field, M. Hilleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 1719–1722.
- [17] „Inducers of interferon and host resistance, IV. Double-stranded replicative form RNA [MS2-Ff-RNA] from E. coli infected with MS2 coliphage“: A. Field, G. Lampson, A. Tytell, M. Nemes, M. Hilleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 2102–2108.
- [18] „Hosts and symptoms of ringspot, a virus disease of plants“: S. Wingard, *J. Agric. Res.* **1928**, 37, 127–153.
- [19] „Virus concentration in relation to acquired immunity from tobacco ringspot“: W. Price, *Phytopathology* **1936**, 26, 503–529.
- [20] „Nature's gift to science [Nobel lecture]“: S. Brenner, *Chem-BioChem* **2003**, 4, 683–687.
- [21] „Suppression of an amber mutation by microinjection of suppressor tRNA in C. elegans“: J. Kimble, J. Hodgkin, T. Smith, J. Smith, *Nature* **1982**, 299, 456–458.
- [22] „Extrachromosomal DNA transformation of Caenorhabditis elegans“: D. Stinchcomb, J. Shaw, S. Carr, D. Hirsh, *Mol. Cell. Biol.* **1985**, 5, 3484–3496.
- [23] „Integrative transformation of Caenorhabditis elegans“: A. Fire, *EMBO J.* **1986**, 5, 2673–2680.
- [24] „Efficient gene transfer in C.elegans: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences“: C. Mello, J. Kramer, D. Stinchcomb, V. Ambros, *EMBO J.* **1991**, 10, 3959–3970.
- [25] „DNA transformation“: C. Mello, A. Fire, *Methods Cell Biol.* **1995**, 48, 451–482.
- [26] „The genetics of Caenorhabditis elegans“: S. Brenner, *Genetics* **1974**, 77, 71–94.
- [27] „Genetic Organization in Caenorhabditis elegans: Fine-Structure Analysis of the unc-22 Gene“: D. Moerman, D. Baillie, *Genetics* **1979**, 91, 95–103.
- [28] „Molecular cloning of the muscle gene unc-22 in Caenorhabditis elegans by Tc1 transposon tagging“: D. Moerman, G. Benian, R. Waterston, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 2579–2583.
- [29] „Transgenic Twitchers“: A. Fire, D. Moerman, *Worm Breeder's Gazette* **1986**, 9(8), 13–15.



- [30] „Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide“: M. Stephenson, P. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 285–288.
- [31] „Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis“: J. Izant, H. Weintraub, *Cell* **1984**, 36, 1007–1015.
- [32] „Sense and Antisense Disruption of Muscle Genes“: A. Fire, S. Harrison, *Worm Breeder's Gazette* **1988**, 10(2), 89–90.
- [33] „Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle“: A. Fire, D. Albertson, S. Harrison, D. Moerman, *Development* **1991**, 113, 503–514.
- [34] „par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed“: S. Guo, K. Kemphues, *Cell* **1995**, 81, 611–620.
- [35] „Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos“: C. Rocheleau, W. Downs, R. Lin, C. Wittmann, Y. Bei, Y. Cha, M. Ali, J. Priess, C. Mello, *Cell* **1997**, 90, 707–716.
- [36] „Interspecies comparison reveals evolution of control regions in the nematode sex-determining gene tra-2“: P. Kuwabara, *Genetics* **1996**, 144, 597–607.
- [37] „Soma-germline asymmetry in the distributions of embryonic RNAs in *Caenorhabditis elegans*“: G. Seydoux, A. Fire, *Development* **1994**, 120, 2823–2834.
- [38] „Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA“: G. Soukup, R. Breaker, *RNA* **1999**, 5, 1308–1325.
- [39] „Removal of double-stranded contaminants from RNA transcripts: synthesis of adenovirus VA RNAI from a T7 vector“: K. Mellits, T. Pe'ery, L. Manche, H. Robertson, M. Mathews, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 5401–5406.
- [40] „Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*“: A. Fire, S. Xu, M. Montgomery, S. Kostas, S. Driver, C. Mello, *Nature* **1998**, 391, 806–811.
- [41] „RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*“: M. Montgomery, S. Xu, A. Fire, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 15502–15507.
- [42] „Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA“: J. Tomizawa, T. Itoh, G. Selzer, T. Som, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 1421–1425.
- [43] „Nongenic, bidirectional transcription precedes and may promote developmental DNA deletion in *Tetrahymena thermophila*“: D. Chalker, M. Yao, *Genes Dev.* **2001**, 15, 1287–1298.
- [44] „Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena“: K. Mochizuki, N. Fine, T. Fujisawa, M. Gorovsky, *Cell* **2002**, 110, 689–699.
- [45] „A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences“: V. Yang, M. Lerner, J. Steitz, S. Flint, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 1371–1375.
- [46] „RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants“: M. Wassenegger, S. Heimes, L. Riedel, H. Sanger, *Cell* **1994**, 76, 567–576.
- [47] „Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation“: I. Ingelbrecht, Van H. Houdt, M. Van Montagu, A. Depicker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 10502–10506.
- [48] „The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation“: P. Olsen, V. Ambros, *Dev. Biol.* **1999**, 216, 671–680.
- [49] „Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations“: J. Gall, M. Pardue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, 63, 378–383.
- [50] „Green fluorescent protein as a marker for gene expression“: M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, D. Prasher, *Science* **1994**, 263, 802–805.
- [51] „Improved green fluorescence“: R. Heim, A. Cubitt, R. Tsien, *Nature* **1995**, 373, 663–664.
- [52] „Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene“: W. Kelly, S. Xu, M. Montgomery, A. Fire, *Genetics* **1997**, 146, 227–238.
- [53] „Specific interference by ingested dsRNA“: L. Timmons, A. Fire, *Nature* **1998**, 395, 854.
- [54] „RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence“: H. Tabara, A. Grishok, C. Mello, *Science* **1998**, 282, 430–431.
- [55] „Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway“: J. Kennerdell, R. Carthew, *Cell* **1998**, 95, 1017–1026.
- [56] „Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference [RNA-i]: a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation“: L. Misquitta, B. Paterson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1451–1456.
- [57] „Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*“: H. Ngo, C. Tschudi, K. Gull, E. Ullu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 14687–14692.
- [58] „Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA“: P. Waterhouse, M. Graham, M. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 13959–13964.
- [59] „Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target“: K. Ui-Tei, S. Zenno, Y. Miyata, K. Saigo, *FEBS Lett.* **2000**, 479, 79–82.
- [60] „Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development“: F. Wianny, M. Zernicka-Goetz, *Nat. Cell Biol.* **2000**, 2, 70–75.
- [61] „Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference“: P. Svoboda, P. Stein, H. Hayashi, R. Schultz, *Development* **2000**, 127, 4147–4156.
- [62] „dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference“: N. Caplen, J. Fleenor, A. Fire, R. Morgan, *Gene* **2000**, 252, 95–105.
- [63] „Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*“: E. Selker, E. Cambareri, B. Jensen, K. Haack, *Cell* **1987**, 51, 741–752.
- [64] „Targeted transformation of *Ascomobolus immersus* and de novo methylation of the resulting duplicated DNA sequences“: C. Goyon, G. Faugeron, *Mol. Cell. Biol.* **1989**, 9, 2818–2827.
- [65] „Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans“: C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell* **1990**, 2, 279–289.
- [66] „Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression“: A. van der Krol, L. Mur, M. Beld, J. Mol, A. Stuitje, *Plant Cell* **1990**, 2, 291–299.
- [67] „Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences“: N. Romano, G. Macino, *Mol. Microbiol.* **1992**, 6, 3343–3353.
- [68] „Inhibition of gene expression by a short sense fragment“: F. Cameron, P. Jennings, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 469–475.
- [69] „Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*“: E. Cambareri, B. Jensen, E. Schabtach, E. Selker, *Science* **1989**, 244, 1571–1575.
- [70] „Suppression of  $\beta$ -1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants“: F. deCarvalho, G. Gheysen, S. Kushir, M. Montagu, D. Inzé, C. Castensana, *EMBO J.* **1992**, 11, 2595–2602.

- [71] „Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation“: C. Cogoni, J. Irelan, M. Schumacher, T. Schmidhauser, E. Selker, G. Macino, *EMBO J.* **1996**, *15*, 3153–3163.
- [72] „Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions“: J. Palauqui, T. Elmayan, J. Pollien, H. Vaucheret, *EMBO J.* **1997**, *16*, 4738–4745.
- [73] „Systemic signalling in gene silencing“: O. Voinnet, D. Baulcombe, *Nature* **1997**, *389*, 553.
- [74] „Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene“: P. Abel, R. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. Rogers, R. Fraley, R. Beachy, *Science* **1986**, *232*, 738–743.
- [75] „Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance“: J. Lindbo, L. Silva-Rosales, W. Proebsting, W. Dougherty, *Plant Cell* **1993**, *5*, 1749–1759.
- [76] „Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA“: M. Kumagai, J. Donson, G. della-Cioppa, D. Harvey, K. Hanley, L. Grill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1679–1683.
- [77] „A viral suppressor of gene silencing in plants“: R. Anandakshmi, G. Pruss, X. Ge, R. Marathe, A. Mallory, T. Smith, V. Vance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13079–13084.
- [78] „A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing“: K. Kasschau, J. Carrington, *Cell* **1998**, *95*, 461–470.
- [79] „Infection of tobacco or *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral [trans]genes“: C. Beclin, R. Berthome, J. Palauqui, M. Tepfer, H. Vaucheret, *Virology* **1998**, *252*, 313–317.
- [80] „Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*“: G. Brigneti, O. Voinnet, W. Li, L. Ji, S. Ding, D. Baulcombe, *EMBO J.* **1998**, *17*, 6739–6746.
- [81] „A similarity between viral defense and gene silencing in plants“: F. Ratcliff, B. Harrison, D. Baulcombe, *Science* **1997**, *276*, 1558–1560.
- [82] „RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia“: M. Metzloff, M. O'Dell, P. Cluster, R. Flavell, *Cell* **1997**, *88*, 845–854.
- [83] „Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference“: S. Parrish, J. Fleenor, S. Xu, C. Mello, A. Fire, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1077–1087.
- [84] „Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos“: D. Yang, H. Lu, J. Erickson, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 1191–1200.
- [85] „The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*“: H. Tabara, M. Sarkissian, W. Kelly, J. Fleenor, A. Grishok, L. Timmons, A. Fire, C. Mello, *Cell* **1999**, *99*, 123–132.
- [86] „*pos-1* encodes a cytoplasmic zinc-finger protein essential for germline specification in *C. elegans*“: H. Tabara, R. Hill, C. Mello, J. Priess, Y. Kohara, *Development* **1999**, *126*, 1–11.
- [87] „The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*“: H. Tabara, E. Yigit, H. Siomi, C. Mello, *Cell* **2002**, *109*, 861–871.
- [88] „Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein kinase, DAI“: S. Green, M. Mathews, *Genes Dev.* **1992**, *6*, 2478–2490.
- [89] „A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal“: D. Cox, A. Chao, J. Baker, L. Chang, D. Qiao, H. Lin, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 3715–3727.
- [90] „AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development“: K. Bohmert, I. Camus, C. Bellini, D. Bouchez, M. Caboche, C. Benning, *EMBO J.* **1998**, *17*, 170–180.
- [91] „The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene“: K. Lynn, A. Fernandez, M. Aida, J. Sedbrook, M. Tasaka, P. Masson, M. Barton, *Development* **1999**, *126*, 469–481.
- [92] „Molecular cloning and characterization of a rabbit eIF2C protein“: C. Zou, Z. Zhang, S. Wu, J. Osterman, *Gene* **1998**, *211*, 187–194.
- [93] „*Arabidopsis* mutants impaired in cosuppression“: T. Elmayan, S. Balzergue, F. Beon, V. Bourdon, J. Daubremet, Y. Guenet, P. Mourrain, J. Palauqui, S. Vernhettes, T. Vialle, K. Wostrikoff, H. Vaucheret, *Plant Cell* **1998**, *10*, 1747–1758.
- [94] „Isolation of quelling-defective [*qde*] mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*“: C. Cogoni, G. Macino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10233–10238.
- [95] „R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway“: Q. Liu, T. Rand, S. Kalidas, F. Du, H. Kim, D. Smith, X. Wang, *Science* **2003**, *301*, 1921–1925.
- [96] „Involvement of small RNAs and role of the *qde* genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*“: C. Catalanotto, G. Azzalin, G. Macino, C. Cogoni, *Genes Dev.* **2002**, *16*, 790–795.
- [97] „Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways“: K. Okamura, A. Ishizuka, H. Siomi, M. Siomi, *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1655–1666.
- [98] „A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants“: A. Hamilton, D. Baulcombe, *Science* **1999**, *286*, 950–952.
- [99] „Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro“: T. Tuschl, P. Zamore, R. Lehmann, D. Bartel, P. Sharp, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 3191–3197.
- [100] „An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells“: S. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. Hannon, *Nature* **2000**, *404*, 293–296.
- [101] „RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals“: P. Zamore, T. Tuschl, P. Sharp, D. Bartel, *Cell* **2000**, *101*, 25–33.
- [102] „Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference“: E. Bernstein, A. Caudy, S. Hammond, G. Hannon, *Nature* **2001**, *409*, 363–366.
- [103] „RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs“: S. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188–200.
- [104] „Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI“: L. Manche, S. Green, C. Schmedt, M. Mathews, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 5238–5248.
- [105] „Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells“: S. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [106] „Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems“: N. Caplen, S. Parrish, F. Imani, A. Fire, R. Morgan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9742–9747.
- [107] „Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1“: W. Winston, C. Molodowitch, C. Hunter, *Science* **2002**, *295*, 2456–2459.
- [108] „RNA-dependent RNA polymerase in Chinese cabbage“: S. Astier-Manifacier, P. Cornuet, *Biochim. Biophys. Acta Nucleic Acids Protein Synth.* **1971**, *232*, 484–493.
- [109] „RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. I. Purification and physical properties; II. Catalytic in vitro proper-

- ties": W. Schiebel, B. Haas, S. Marinkovic, A. Klanner, H. Sanger, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 11851–11867.
- [110] „Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato": W. Schiebel, T. Pelissier, L. Riedel, S. Thalmeir, R. Schiebel, D. Kempe, F. Lottspeich, H. Sanger, M. Wassenegger, *Plant Cell* **1998**, 10, 2087–2101.
- [111] „Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase": C. Cogoni, G. Macino, *Nature* **1999**, 399, 166–169.
- [112] „EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*": A. Smardon, J. Spoerke, S. Stacey, M. Klein, N. Mackin, E. Maine, *Curr. Biol.* **2000**, 10, 169–178.
- [113] „*Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance": P. Mourrain, C. Beclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J. Morel, D. Jouette, A. Lacombe, S. Nikic, N. Picault, K. Remoue, M. Sanial, T. Vo, H. Vaucheret, *Cell* **2000**, 101, 533–542.
- [114] „An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus": T. Dalmay, A. Hamilton, S. Rudd, S. Angell, D. Baulcombe, *Cell* **2000**, 101, 543–553.
- [115] „On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing": T. Sijen, J. Fleenor, F. Simmer, K. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R. Plasterk, A. Fire, *Cell* **2001**, 107, 465–476.
- [116] „Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase": F. Vaistij, L. Jones, D. Baulcombe, *Plant Cell* **2002**, 14, 857–867.
- [117] „Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in post-transcriptional gene silencing has two distinct activity modes": E. Makeyev, D. Bamford, *Mol. Cell* **2002**, 10, 1417–1427.
- [118] „Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference": M. Alder, S. Dames, J. Gaudet, S. Mango, *RNA* **2003**, 9, 25–32.
- [119] „Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes": F. Nicolas, S. Torres-Martinez, R. Ruiz-Vazquez, *EMBO J.* **2003**, 22, 3983–3991.
- [120] „Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*": J. Pak, A. Fire, *Science* **2007**, 315, 241–244.
- [121] „Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class": T. Sijen, F. Steiner, K. Thijssen, R. Plasterk, *Science* **2007**, 315, 244–247.
- [122] „Transgenes and gene suppression: telling us something new?": W. Dougherty, T. Parks, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, 7, 399–405.
- [123] „Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*": A. Grishok, H. Tabara, C. Mello, *Science* **2000**, 287, 2494–2497.
- [124] „Gene expression: long-term gene silencing by RNAi": N. Vastenhouw, K. Brunschwig, K. Okihara, F. Muller, M. Tijsterman, R. Plasterk, *Nature* **2006**, 442, 882.
- [125] „Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity": Y. Park, I. Papp, E. Moscone, V. Iglesias, H. Vaucheret, A. Matzke, M. Matzke, *Plant J.* **1996**, 9, 183–194.
- [126] „Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*": R. Lu, M. Maduro, F. Li, H. Li, G. Broitman-Maduro, W. Li, S. Ding, *Nature* **2005**, 436, 1040–1043.
- [127] „RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*": C. Wilkins, R. Dishongh, S. Moore, M. Whitt, M. Chow, K. Machaca, *Nature* **2005**, 436, 1044–1047.
- [128] „Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD": R. Ketting, T. Haverkamp, H. van Luenen, R. Plasterk, *Cell* **1999**, 99, 133–141.
- [129] „Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity": J. Song, S. Smith, G. Hannon, L. Joshua-Tor, *Science* **2004**, 305, 1434–1437.
- [130] „Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer": I. Macrae, K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. Brooks, W. Cande, P. Adams, J. Doudna, *Science* **2006**, 311, 195–198.
- [131] „Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex": D. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. Zamore, *Cell* **2003**, 115, 199–208.
- [132] „Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias": A. Khvorova, A. Reynolds, S. Jayasena, *Cell* **2003**, 115, 209–216.
- [133] „Mutations in RNAi rescue aberrant chemotaxis of ADAR mutants": L. Tonkin, B. Bass, *Science* **2003**, 302, 1725.
- [134] „Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi": J. Liu, M. Carmell, F. Rivas, C. Marsden, J. Thomson, J. Song, S. Hammond, L. Joshua-Tor, G. Hannon, *Science* **2004**, 305, 1437–1441.
- [135] „*Drosophila* argonaute-2 is required early in embryogenesis for the assembly of centric/centromeric heterochromatin, nuclear division, nuclear migration, and germ-cell formation": G. Deshpande, G. Calhoun, P. Schedl, *Genes Dev.* **2005**, 19, 1680–1685.
- [136] „Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline": A. Kalmykova, M. Klenov, V. Gvozdev, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 2052–2059.
- [137] „The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14": R. Lee, R. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, 75, 843–854.
- [138] „Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing": A. Grishok, A. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun, C. Mello, *Cell* **2001**, 106, 23–34.
- [139] „A microRNA polycistron as a potential human oncogene": L. He, J. Thomson, M. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. Lowe, G. Hannon, S. Hammond, *Nature* **2005**, 435, 828–833.
- [140] „MicroRNA expression profiles classify human cancers": J. Lu, G. Getz, E. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. Ebert, R. Mak, A. Ferrando, J. Downing, T. Jacks, H. Horvitz, T. Golub, *Nature* **2005**, 435, 834–838.
- [141] „Dissecting RNA-interference pathway with small molecules": Y. Chiu, C. Dinesh, C. Chu, A. Ali, K. Brown, H. Cao, T. Rana, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 643–648.
- [142] „MEX-3 is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early *C. elegans* embryos": B. Draper, C. Mello, B. Bowerman, J. Hardin, J. Priess, *Cell* **1996**, 87, 205–216.
- [143] „Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi": E. Yigit, P. Batista, Y. Bei, K. Pang, C. Chen, N. Tolia, L. Joshua-Tor, S. Mitani, M. Simard, C. Mello, *Cell* **2006**, 127, 747–757.
- [144] „MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome": N. Bao, K. Lye, M. Barton, *Dev. Cell* **2004**, 7, 653–662.
- [145] „Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi": T. Volpe, C. Kidner, I. Hall, G. Teng, S. Grewal, R. Martienssen, *Science* **2002**, 297, 1833–1837.