

# Zurück zur RNAi-Welt: Gedanken zur Genexpression und Evolution (Nobel-Vortrag)\*\*

Craig C. Mello\*

## Stichwörter:

Evolution · Gen-Stummschaltung · Nobel-Vortrag · RNA-Interferenz

*Es ist wunderbar, heute hier zu sein. Beginnen möchte ich mit dem wichtigsten Part, nämlich Danke zu sagen. Zu allererst danke ich Andy Fire, der mir über all die Jahre ein großartiger Kollege und Freund war. Ohne Andy stünde ich heute nicht vor Ihnen. Dank schulde ich der University of Massachusetts, nicht nur für Ausrüstung, Laborräume und Geld, sondern vor allem auch für die großartigen Kollegen, mit denen zusammen ich meinen Forschungen nachgehe. Ohne die UMass und das tolle Umfeld dort, wäre ich wahrscheinlich heute nicht hier. Und nicht zu vergessen natürlich meine Familie; ich will jetzt keine Zeit aufbringen, jedem einzelnen zu danken, aber ihr wisst, wie wichtig ihr für mich seid.*

Ich werde heute über *C. elegans* sprechen und über die Rolle der RNA-Interferenz (RNAi) bei der Heranbildung von *C. elegans*. Dieses Tier hat seinen Namen von seiner eleganten Einfachheit (Abbildung 1). Nur ein Millimeter lang



Abbildung 1.

ist es, und doch in der Lage, 300 Nachkommen in drei Tagen durch Selbstbefruchtung zu produzieren. Eine der schönsten Erscheinungen von *C. elegans* – beim Blick durch das Mikroskop sofort erkennbar – ist seine Transparenz. Schon Sydney Brenner erkannte die Wichtigkeit dieses Merkmals bei der Auswahl seines Forschungsobjekts. *C. elegans* ist ein relativ einfaches Tier: Der adulte Organismus besteht aus nur etwa eintausend Zellen. Tatsächlich sind Herkunft und

Schicksal jeder Zelle sowohl im embryonalen als auch im adulten Zustand bestimmt worden – eine erstaunliche Ererungenschaft. In jedem Stadium der Entwicklung kann man eine bestimmte Zelle betrachten, und man kann angeben, wo diese Zelle herkommt; ihr Ursprung kann bis zur ersten embryonalen Zellteilung zurückverfolgt werden.

Es ist ein schönes System. Im Grunde haben alle Forscher, die mit *C. elegans* arbeiten, ihre eigene Abstammungslinie. Fast alle von uns gehen auf Sydney Brenner zurück, der als Wegbereiter der modernen genetischen Analyse dieses Organismus gilt. Mein eigener wissenschaftlicher Stammbaum ist in Abbildung 2 gezeigt. Ein riesiger Dank geht an Dan Stinchcomb, dafür, dass er mich in Molekularbiologie unterrichtet hat und in den ersten Hochschuljahren ein fantastischer Mentor war, an Victor Ambros, der mich zusammen mit Dan während meiner Promotion an der Harvard-Universität begleitet hat, und schließlich an Jim Priess, der mir Genetik beigebracht hat, und der mir bei meinem Postdoc-Aufenthalt am Fred Hutchinson-Krebsforschungszentrum in Seattle als großartiger Mentor und Freund zur Seite stand. Ich bin diesen

[\*] Prof. Dr. C. C. Mello  
Howard Hughes Medical Institute  
und  
Program in Molecular Medicine  
University of Massachusetts Medical School  
373 Plantation Street, Worcester, MA 01605 (USA)  
Fax: (+1) 508-856-2950  
E-Mail: craig.mello@umassmed.edu

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

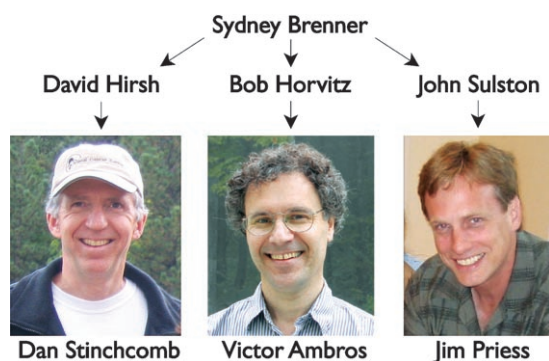


Abbildung 2.

Menschen zu unendlichem Dank verpflichtet. Im Verlauf meines Vortrags werde ich Ihnen mehr Bilder von Leuten zeigen, denen ich Dank schulde.

Ich möchte nun auf das Thema meines heutigen Vortrags zu sprechen kommen, bei dem es zum Teil darum geht, dass wir die Komplexität des Lebens andauernd unterschätzen. Sehr häufig sind es die Korrekturen, die an diesen Unterschätzungen vorgenommen werden, für die dieser Preis verliehen wird. Mit den Fortschritten in der Wissenschaft erweitern sich unsere Kenntnisse; wir glauben, wir verstünden etwas, und zu oft werden wir überheblich. Die Sache ist aber die, dass wir die Komplexität des Lebens und der Natur meiner Meinung nach fast immer unterschätzen. Heute haben wir ein wahres Fest dieser Schönheit und Komplexität erlebt. Ich habe die Physik- und Chemie-Vorträge gehört, und es war

eindrucksvoll, einfach nur nachzusinnen. Ein embryonales Universum, 13,7 Milliarden Jahre alt, anfänglich von der Größe einiger Zentimeter, das sich in Sekunden durch einen geheimnisvollen Prozess ausbreitet und die fast endlosen Ausdehnungen des Raumes einnimmt; die Wirkungsweise einer Polymerase auf atomarer Ebene zu entdecken, deren Ursprung auf einen gemeinsamen Urahn allen Lebens auf der Erde vor rund 3,5 Milliarden Jahren zurückgeht.

Diese Geschichten sind in ihrer Komplexität so schön und atemberaubend. Für jede Antwort, die sie geben, werfen sie tausend neue Fragen auf. Und eines, was ich so mit meinem Vortrag erreichen möchte, ist Fragen aufzuwerfen, die ich nicht beantworten kann; ein wenig über das Unbekannte zu sprechen. Andy hat Sie so wundervoll in die Thematik eingeführt, dass ich mir den Luxus erlauben kann, mehr über mögliche Folgerungen und Auswirkungen zu sprechen und über einige der Dinge, über die wir nichts wissen, die wir aber in der Zukunft gerne verstehen würden. Es ist das Unbekannte, das uns inspiriert und unsere Neugierde entfacht, und deshalb will ich versuchen, Ihnen davon zu erzählen, was wir nicht wissen, und ich will ein wenig darüber spekulieren, was möglich ist.

Wenn man nur aufmerksam hinsieht, wird einem die Komplexität lebender Dinge mit einem Male bewusst. Betrachten wir beispielsweise die natürliche Umgebung von *C. elegans*. Abbildung 3 ist ein elektronenmikroskopisches Bild, das von George Barron – der mit nematophagen Pilzen arbeitet – aufgenommen wurde. Der unglückliche Wurm ist in einer Schlinge gefangen, die von einem Nematoden jagenden Pilz ausgelegt wurde. Für diese armen kleinen Tiere ist es



Craig C. Mello ist Professor für Molekularmedizin (Blais University Chair in Molecular Medicine) an der University of Massachusetts Medical School (UMMS) und hält außerdem (seit 2000) einen Forschungslehrstuhl am Howard Hughes Medical Institute (HHMI), einer medizinischen Forschungseinrichtung mit einem Budget von 13 Milliarden US-\$, die mehr als 350 Forscher an 72 medizinischen Instituten, Universitäten und Forschungsinstituten weltweit beschäftigt. Er erwarb seinen Bachelor of Science in Biochemie an der Brown University und promovierte in Zell- und Entwicklungsbiologie an der Harvard University. Anschließend war er Postdoc am Fred Hutchinson-Krebsforschungszentrum, bevor er 1995 an die UMMS wechselte. Ebenfalls 1995 erhielt er den Pew Scholar Award in Biomedizin. Zusammen mit Andrew Fire, vormals am Carnegie-Institut in Washington, wurde er 2006 für die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Beide fanden, dass eine bestimmte Art von RNA die unvorhergesehene Eigenschaft hat, die Expression eines Gens stummzuschalten (d. h. mit dieser zu interferieren), dessen DNA-Sequenz der Sequenz der eingesetzten RNA ähnelt. Der RNAi-Mechanismus – eine natürliche Reaktion eines Organismus auf doppelsträngige RNA, aus der viele Viren bestehen – zerstört die Genprodukte, die ein Virus zur Selbstreplikation benötigt und blockiert so die Entwicklung der Virusinfektion. Diese Entdeckung, die ein großes Potenzial für Verständnis und Manipulation der zellulären Basis menschlicher Krankheiten birgt, hatte zweierlei Auswirkungen auf die biologischen Wissenschaften, die besonders nachhaltig geblieben sind: Zum einen ist die RNAi heute eine wichtige und häufig verwendete Methode, um die Expression eines spezifischen Gens in Zellen ausschalten und so die biologische

Funktion dieser Gene entschlüsseln zu können. Zum anderen erbrachte sie die Erkenntnis, dass die RNA-Interferenz ein normaler Prozess der Genregulation ist, der während der Entwicklung eines Organismus stattfindet. Mellos und Fires Arbeiten zur RNAi, die 1998 in einer bahnbrechenden Veröffentlichung in *Nature* mündeten, wurden als „elektrisierende Entdeckung“ gefeiert und 2002 in *Science* zum „Durchbruch des Jahres“ ernannt. Im Jahr 2003 erhielten beide den angesehenen National Academy of Sciences Award in Molekularbiologie und den Wiley Prize in Biomedizin der Rockefeller University, den Annual Aventis Innovative Investigator Award der Drug Discovery Technology World Conference und 2004 den Warren Triennial Prize, die höchste vom Massachusetts General Hospital vergebene Auszeichnung. 2005 wurden beide in die National Academy of Sciences nominiert und konnten zahlreiche weitere Ehrungen in Empfang nehmen, einschließlich des Lewis S. Rosenstiel Award der Brandeis-Universität, des kanadischen Gairdner International Award und des Massry Prize. 2006 folgten der Paul-Ehrlich-und-Ludwig-Darmstaedter-Preis, einer der höchsten und international renommiertesten Medizin-Preise, die in Deutschland vergeben werden. C. Mello erhielt vor kurzem den von Johnson & Johnson neu gestifteten Dr. Paul Janssen Award für biomedizinische Forschung. Angesichts der fundamentalen und weitreichenden Bedeutung der RNAi ist damit zu rechnen, dass ein der UMMS und Carnegie erteiltes Patent – „Genetic Inhibition by Double-Stranded RNA“ (US Patent 6,506,559 B1) – ein weitreichendes Lizenzierungspotenzial in der Laborpraxis und der Wirkstoffentwicklung haben wird. Da beide Institutionen darauf aus waren, die RNAi möglichst rasch und umfangreich der genetischen Forschung zugänglich zu machen, wurde ein Lizenzierungsverfahren entwickelt, durch das Firmen (für eine Grundgebühr) eine weiträumige und nicht-exklusive Lizenz für die Anwendung dieser Technik zu Forschungszwecken erwerben können. Eine beträchtliche Zahl von Firmen hat die Erfindung bereits lizenziert, und zahlreiche andere haben ihr Interesse bekundet.

Angew. Chem. 2007, 119, 7114–7124

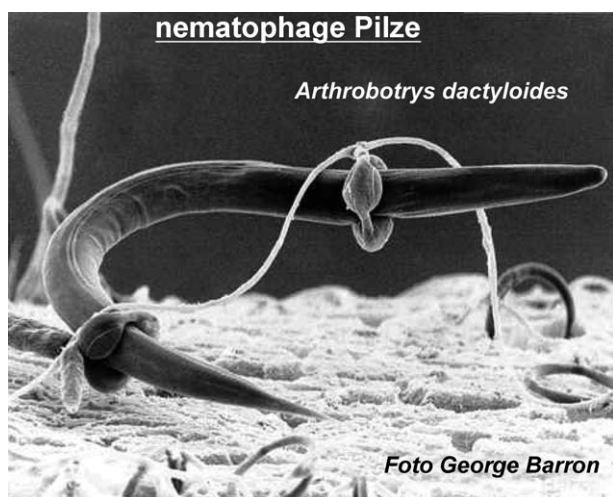


Abbildung 3.

wirklich ein Dschungel da draußen; sie kämpfen um ihr Überleben, genau wie wir auch. Das Erdreich wimmelt von hunderten von Arten dieser Pilze, die Jagd auf herum-schwimmende Würmer machen. Die Pilze können die Bewegung oder die Berührung eines Wurmes spüren, und sobald der Wurm in die Schlinge gegangen ist, bläst der Pilz diese auf, sodass die Beute eingeschnürt wird und gefangen ist. Der Pilz kann dann Zellfäden (Hyphen) in den Wurm schießen, um ihn zu verdauen. Wir müssen uns also vorstellen, dass sich diese armen eleganten kleinen Tiere in der Tat abstrampeln müssen, um zu überleben. Die Natur steckt voller Komplexität, die wir nicht erkennen. Diese Würmer und Pilze sind so winzig, dass Sie jeden Tag auf Ihrem Weg zur Arbeit über Millionen, wenn nicht Milliarden von ihnen rüberlaufen, ohne die Dinge, die sich dort abspielen, je wahrzunehmen.

Einer der großen Triumphe der Biologie war die Entdeckung der DNA-Struktur. Die Struktur der DNA wurde zuerst von Watson und Crick bestimmt, die zeigten, wie zwei aus vier Grundbausteinen bestehende Stränge Polymere bilden, die sich zu einer hübschen Wendeltreppe verflechten. Allein diese Struktur erklärt so vieles über die grundlegende Biologie belebter Dinge. Sie erklärt die Segregationsmuster, die Gregor Mendel für bestimmte genetische Merkmale von Erbsenpflanzen beschrieben hatte. Die Struktur allein gibt schon Hinweise, wie das genetische Material repliziert werden kann. Schon Watson und Crick stellten in ihrer berühmten Abhandlung in *Nature*<sup>[1]</sup> fest: „*It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.*“ Die DNA-Stränge sind miteinander verschlungen, und jeder Strang kann als Matrize für die Erzeugung einer perfekten Kopie des Gegenstrangs dienen; hierzu muss sich der Strang einfach entwinden und so der Polymerase die Möglichkeit geben, ihn zu kopieren. In Roger Kornbergs Vortrag haben wir von einer RNA-Polymerase gehört, die die DNA ablesen kann (Transkription), um so Kopien der genetischen Information in Form einer RNA herzustellen. Diese Kopien dienen als Matrizen für die Polymerisation der Proteine durch einen anderen ausgeklügelten Prozess – die Translation –, auf den ich heute aus Zeitgründen nicht näher eingehen kann.

Wenn Sie an diesen grundlegenden Prozessen in der Zelle interessiert sind – und meiner Meinung nach dürfte das jeder sein –, können Sie sich in der Literatur oder im Internet darüber informieren. Es sind wirklich ganz erstaunliche Vorgänge.

Eines der Probleme aber, die bei einer solchen Entdeckung wie der DNA auftreten, ist die Tatsache, dass wir dazu neigen, allzu sehr auf ihre Aussagekraft zu vertrauen. Kontrolliert die in den DNA-Sequenzen gespeicherte Information all die Vorgänge in der Zelle? Zellen reagieren ständig auf ihre Umgebung und die sie umgebenden Zellen; diese externen Einflüsse können vererbte Veränderungen bewirken, die keine Änderungen der primären Sequenzinformation der DNA erfordern. Betrachten wir *C. elegans* im frühen Embryonalstadium. Bei den ersten Zellteilungen steuern mütterliche mRNA und Proteinprodukte in der Eizelle zahlreiche Signal- und Differenzierungsereignisse, die den multizellulären Organismus hervorbringen. Ein Beispiel ist die Verteilung des Proteins PIE-1 (Abbildung 4). PIE-1 begleitet

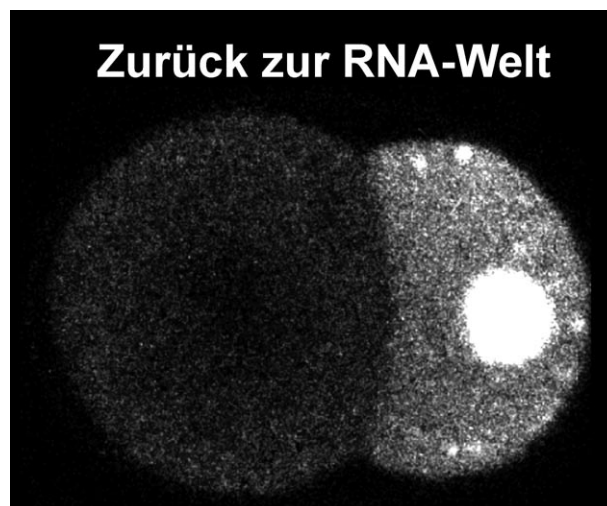


Abbildung 4.

die Keimbahnspezifizierung – und ist für diese essenziell. Wie die Abbildung andeutet, lokalisiert sich PIE-1 – das in diesem Fall mit einem Protein der Leuchtqualle markiert wurde – nach jedem Teilungsereignis in der Keimbahnzelle. In diesem zweizelligen Embryo lokalisiert PIE-1 ausschließlich in der hinteren Zelle, wo es sich im Kern anreichert. Dies geschieht durch einen fundamentalen Entwicklungsprozess, die so genannte asymmetrische (ungleiche) Zellteilung. Als ein Ergebnis dieses Prozesses unterscheiden sich die beiden Tochterzellen im Hinblick auf ihren Gehalt an mütterlicherseits gelieferten Produkten wie PIE-1. Diese Produkte wiederum können die nachfolgende Entwicklung dieser Zellen in der Weise lenken, dass sie, nachdem ihr Differenzierungspfad erst einmal festgelegt wurde, während zahlreicher Zellteilungen auf ihre spezifische Aufgabe festgelegt bleiben. Diese bemerkenswert stabilen Differenzierungsereignisse können über die gesamte Lebensspanne eines Organismus aufrechterhalten bleiben, ohne zugrundeliegende Veränderungen in der DNA-Sequenz. Die Keimbahnzellen, die in *C. elegans* das



Protein PIE-1 ererben, sind die einzigen Zellen, die das Entwicklungsprogramm in der nächsten Generation wieder in Gang setzen können.

Wie schaffen es entstehende Zellen, die alle den gleichen DNA-Inhalt haben, unterschiedliche Programme der Genexpression mitzunehmen, die über so viele Zellteilungsrounden stabil bleiben? Eine Möglichkeit, die ich weiter unten erörtern werde, besteht darin, dass Mechanismen, die mit denen der RNA-Interferenz zusammenhängen, eine Rolle spielen. Es wurde vorgeschlagen, dass das Leben auf der Erde mit selbstreplizierenden Nucleinsäurepolymeren begann, die chemisch eher RNA als DNA ähnelten – eine klassische Hypothese, die als „RNA-Welt“-Hypothese bezeichnet wird. Daher auch die provokante Überschrift in Abbildung 4, „Zurück zur RNA-Welt“ – eine Welt, in der RNA-Moleküle Träger genetischer Information gewesen sein könnten und dies vielleicht immer noch sind. Die direkten Vorfahren der *C. elegans*-Keimzellen waren Urkeimzellen des gemeinsamen vielzelligen (möglicherweise wurmähnlichen) Vorfahren der Würmer und Menschen, die wiederum, wenn man noch weiter zurückgeht, direkte Nachkommen der hypothetischen selbstreplizierenden RNA-Moleküle sind, die vor rund 3.5 Milliarden Jahren alles Leben auf der Erde hervorbrachten. Im Physik-Vortrag haben wir vorhin erfahren, dass die Temperatur der kosmischen Hintergrundstrahlung auf ein Alter des Universums von 13.7 Milliarden Jahren schließen lässt. Das Leben auf der Erde existiert also seit einem Viertel der Zeit des Universums. Lebende Dinge und diese Mechanismen, über die wir heute sprechen, sind unglaublich alt. Die RNA-Interferenz selbst ist mindestens eine Milliarde Jahre alt. Biologische Mechanismen sind sehr viel beständiger als die Lage der Kontinente auf unserem Planeten. Diese Tatsache und das inbegriffene Konzept der Tiefenzeit gehören zu den tiefgreifendsten Entdeckungen der Wissenschaft.

Wenn man die möglichen Ursprünge des Lebens in einer Welt betrachtet, in der Information in RNA-Polymeren gespeichert wurde, und wenn man die bemerkenswerte Raffinesse von lebenden Dingen und die Beständigkeit der wesentlichen und grundlegenden Mechanismen der Biologie betrachtet, und wenn man schließlich bedenkt, was wir über RNA und RNA-Interferenz wissen, so ist es möglicherweise ein guter Zeitpunkt, um die Vorstellung, wonach die genetische Information hauptsächlich in der Nucleotidsequenz unserer DNA gespeichert ist, neu zu überdenken. Hierbei ist es interessant zu erfahren, was Wissenschaftler vor der Entdeckung der DNA und RNA über den Mechanismus der Vererbung gedacht haben. Zum Beispiel prägte der Naturforscher und Evolutionsbiologe August Weismann im ausgehenden 19. Jahrhundert den Begriff „Biophor“, um die Erbsubstanz zu beschreiben.<sup>[2]</sup> Ernst Mayr, der sich in seinem Buch *Die Entwicklung der biologischen Gedankenwelt* mit Weismanns Arbeiten auseinandersetzte, beschrieb dessen Vorstellungen als fehlerhaft. Weismanns Theorie hatte besagt, 1) dass für jedes Merkmal ein besonderes Teilchen – der Biophor – existiert, 2) dass diese Teilchen unabhängig von der Zellteilung wachsen und sich vervielfachen können, 3) dass sowohl der Zellkern als auch das Zellplasma aus diesen Biophoren bestehen, 4) dass ein bestimmter Biophor in einem einzelnen Zellkern, einschließlich der Keimzelle,

durch viele Kopien vertreten sein kann und 5) dass bei der Teilung einer Zelle die Tochterzellen durch ungleiche Zellteilung unterschiedliche Arten und Mengen von Biophoren erhalten können.<sup>[3]</sup> Mayr schloss: „Wie wir (dank Mendel) wissen, sind die Postulate (2) und (5) falsch und verantwortlich für die Tatsache, dass es Weismann nicht gelang, zu einer richtigen Theorie der Vererbung zu finden.“

Nun, sind sie wirklich falsch? Weismanns Konzepte sind sicher unzulänglich, wenn man sie auf alle Gene oder genetischen Merkmale anwenden wollte. Zum Beispiel können Weismanns Biophore nicht die eindrucksvollen Segregationsmuster erklären, die Mendel bei den genetischen Merkmalen seiner Erbsenpflanzen beobachtete. Deshalb wäre es in der Tat falsch, Weismanns Theorie für alle Aspekte der genetischen Vererbung zu verwenden. Aber lassen Sie uns Weismanns Theorie auf einige bestimmte Merkmale anwenden und den Begriff „Biophor“ durch den Begriff „siRNA“ ersetzen. Andy hat in seinem Vortrag die siRNAs als diese „kleinen interferierenden RNAs“, wie wir sie nennen, vorgestellt; diese kleinen Bröckchen von RNA, die losziehen und Gene stummschalten. Wenn wir in Weismanns Theorie das Wort „Biophor“ durchgehend mit „siRNA“ ersetzen, haben wir plötzlich eine ganz andere Situation: 1) Für manche Merkmale gibt es ein Teilchen, das siRNAs enthält; 2) diese siRNAs können unabhängig von der Zellteilung wachsen und sich vervielfachen; 3) sowohl der Zellkern als auch das Zellplasma können siRNAs enthalten; 4) eine bestimmte siRNA kann durch viele Kopien vertreten sein; 5) bei der Teilung einer Zelle können die Tochterzellen durch ungleiche Zellteilung siRNAs in unterschiedlicher Art und Zahl erhalten. Mit diesen kleinen Änderungen und in Anbetracht unserer heutigen Kenntnisse über die RNA-Interferenz (auf die ich im weiteren Verlauf zu sprechen komme) wird deutlich, dass diese Postulate nicht unbedingt falsch sind. Weismann hatte einige sehr gute Ideen, und wir sollten sie nicht leichtfertig verwerfen. RNA kann eine Rolle bei der Vererbung und in der Evolution spielen. Auf einen Mechanismus für die RNA-gesteuerte Vererbung werde ich gegen Ende meines Vortrags zu sprechen kommen. Außerdem werde ich meine Vorstellungen davon erörtern, wie natürliche Abweichungen innerhalb von Stummschaltungsebenen der Veränderung von Phänotypen und damit der Evolution zugrundeliegen könnten.

Um Ihnen die Prinzipien der RNA-Interferenz zu erklären, möchte ich einige kurze Filme aus dem Fernsehen beschreiben, in denen versucht wird, das Wesentliche des RNAi-Prozesses festzuhalten. Andy und ich nehmen uns normalerweise Stunden Zeit, um die RNA-Interferenz zu erklären, aber dies ist bei den heutigen Sehgewohnheiten nicht machbar. Dies ist, wie Sie bestimmt wissen, ein Riesenproblem für die Fernsehmacher. Die Zuschauer sitzen mit der Fernbedienung in der Hand vor ihrem Gerät, und man muss sehr schnell auf den Punkt kommen, bevor sie das Interesse verlieren und einen anderen Kanal einschalten. Folglich versteht es die Fernsehindustrie sehr gut, Modelle und Graphiken zu erstellen, die komplexe Vorgänge wie die RNAi in nur wenigen Sekunden erklären.

In Abbildung 5 sehen Sie, wie in den Abendnachrichten der CBS versucht wurde, die RNAi zu erklären. Beim

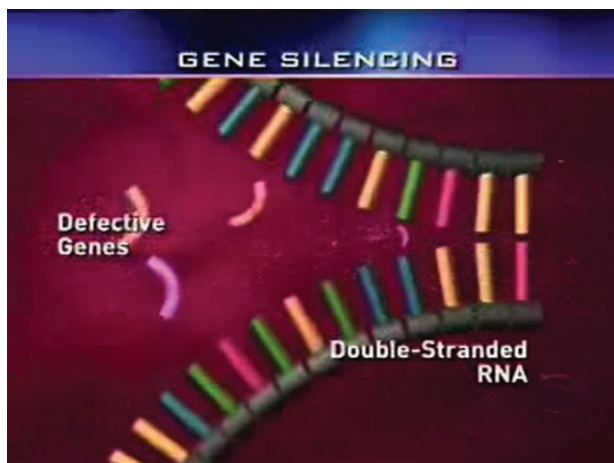


Image © 2005 CBS Evening News

Abbildung 5.

Durchschnittszuschauer zur besten Sendezeit beträgt die Aufmerksamkeitszeitspanne etwa fünfzehn Sekunden. In dem Film fliegt die doppelsträngige RNA in die Szene, öffnet sich an einem Ende und fängt dann an, sich zu schließen und zu öffnen, als würde sie kauen. Defekte Gene, die wie bunte Käsekracker aussehen, beginnen dann von links in das Maul der RNA zu fliegen. Die RNA verspeist die DNA buchstäblich zum Mittagessen. Als Andy und ich mit unseren Arbeiten zur RNA-Interferenz begannen, war uns klar, dass es sich um etwas Unglaubliches handelte. Dass es aber so unglaublich war, ahnten wir nicht. Natürlich gibt es ein paar Details, die man hier ausgespart hat.

Der öffentliche Rundfunk ist in der luxuriösen Situation, eine etwas geduldigere Zuhörerschaft zu haben, und so leistete man sich einen 15-minütigen Beitrag und ließ sich außerdem eine andere Vorgehensweise zur Erklärung der RNAi einfallen, nämlich unter Zuhilfenahme „des Polizisten“ (Abbildung 6). Der Film zeigt einen kleinen Polizisten, der nach Viren und anderem Fehlverhalten in der Zelle Ausschau hält. Sowie er die doppelsträngige RNA bemerkt, weiß er, dass etwas nicht stimmt. Mittels „enzymatischem Kung-Fu“ macht er sich daran, nicht nur die dsRNA mit dieser Sequenz



Image © 2005 PBS NOVA ScienceNOW

Abbildung 6.

zu zerstören, sondern alle RNAs mit dieser Sequenz, die er in der Zelle findet.

Ich mag die beiden Filme, weil sie ein wirklich wichtiges Konzept illustrieren: dass RNAi ein aktiver Prozess ist und dass der Organismus auf die dsRNA reagiert.<sup>[4]</sup> Wir haben dies zu einem sehr frühen Zeitpunkt unserer Forschungen festgestellt, vor allem weil, wie Andy erwähnte, die Stummschaltung vererbbar war. In ein Tier injizierte RNA resultierte in einer Stummschaltung, die an die Nachkommen weitergegeben wurde, und sogar – über die Ei- oder Samenzelle – durch Kreuzungen über viele Generationen. Der Interferenzmechanismus kann also in einer Generation initiiert und anschließend in der Keimbahn weitergegeben werden. Und interessanterweise ist die RNAi auch systemisch; RNA, die an irgendeiner Stelle des Körpers injiziert oder mit der Nahrung aufgenommen wurde, kann in alle Gewebe einschließlich der Keimbahn gelangen. Somit umfasst die RNAi auch einen Transportmechanismus, was bedeutet, dass sie im Körper von Zelle zu Zelle übertragen werden kann.

Die Vererbungseigenschaften und das systemische Wesen der RNAi zusammen mit ihrer bemerkenswerten Wirksamkeit bei *C. elegans* deuteten allesamt auf eine aktive organismische Reaktion auf doppelsträngige RNA hin. Nachdem wir herausgefunden hatten, dass es diese aktive Reaktion gibt, wollten wir sofort die Gene finden, die dieses Antwortverhalten verschlüsseln. Wir begannen also, nach mutierten Stämmen von *C. elegans* zu suchen, bei denen die RNAi defekt war. Unsere Vorstellung war, dass diese Mutationen Gene festlegen, die für die Erkennung der doppelsträngigen Fremd-RNA, für die Übermittlung von Stummschaltungssignalen von Zelle zu Zelle, für die Verstärkung der Stummschaltung und für das Stummschaltungssystem selbst benötigt werden. Hiroaki Tabara (Abbildung 7) war der erste Mensch auf der Welt, der sich mit einer Genetik der RNAi beschäftigte. Er war ein mutiger Postdoktorand, der in meine Forschungsgruppe kam, um Aspekte der Zellentwicklung zu studieren, der aber auch bereit war, etwas so Ungewöhnliches



Hiroaki Tabara

Abbildung 7.

und Skurriles wie die RNA-Interferenz anzupacken. Die Versuchsreihe, die er durchführte, war sehr einfach. Im Wesentlichen veränderte er das Erbgut von Tieren, ließ sie sich über zwei Generationen fortpflanzen – bis die induzierten Mutationen reinerbig geworden waren – und fütterte den Wurm dann mithilfe eines von Lisa Timmons aus Andys Gruppe erfundenen Kunstgriffs<sup>[5]</sup> mit *E.-coli*-Bakterien, die eine doppelsträngige, ein essenzielles Wurm-Gen targetierende RNA exprimierten. Gemäß dieser Strategie sollte die RNAi, sofern die Tiere eine intakte RNAi-Antwort produzieren, die Aktivität des essenziellen Gens ausschalten, was zum Tod führen würde. Wenn nun durch Zufall ein Mutant in der Population existiert, der keine RNAi-Antwort produziert, fände keine RNAi statt und das betreffende Tier und seine Nachkommen wären lebensfähig. Hiroaki setzte diese äußerst leistungsfähige genetische Selektion zur Identifizierung von Mutanten mit fehlerhafter RNAi ein, und seine Versuche liefen sehr, sehr gut.

Hiroaki war in der Lage, zahlreiche Mutanten zu identifizieren. Einigen von ihnen, wie *rde-1* und *rde-4*, fehlte die RNAi-Antwort, davon abgesehen hatten sie aber keine anderen erkennbaren Phänotypen. Einige der Mutanten wiesen jedoch zusätzliche Defekte auf, einschließlich eines sehr verblüffenden Phänotyps, bei dem die Transposone – selbstreplizierende DNA-Elemente, die in den Genomen aller Organismen vorkommen – hyperaktiv wurden und Mutationen verursachten, indem sie im Genom von Platz zu Platz sprangen. Die gleichen Mutanten hatten außerdem eine verringerte Neigung zur Stummschaltung von Transgenen in der Keimbahn (Transgene sind Gene, die zu Versuchszwecken in den Organismus eingebracht werden). Bei normalen Würmern haben Transgene die ärgerliche Eigenschaft, nach ihrer Injektion in das Tier auf stumm zu schalten. Die gleichen Mutanten, die die aktivierten Transposone aufwiesen, zeigten auch eine Aktivierung der Transgene in der Keimbahn.

Diese Beobachtungen legten den Schluss nahe, dass die normale physiologische Funktion der RNAi darin bestehen müsste, Zellen gegen mögliche Schädigungen durch Transposone und andere genetische Fremdelemente, möglicherweise auch Viren, zu verteidigen. Allerdings gab es ein ziemlich großes Problem mit diesem relativ einfachen Modell. Wie ich oben erwähnt habe, besaßen die Mutanten *rde-1* und *rde-4* keine anderen Phänotypen. Sie zeigten keine RNA-Interferenz als Reaktion auf die doppelsträngige RNA, jedoch waren die Mechanismen der Transposon- und Transgen-Stummschaltung immer noch funktionsfähig. Aufgrund dieser Befunde wussten wir, selbst in diesem frühen Stadium unserer Analyse, dass die Situation weitaus komplexer sein musste. All die Forschungen, die noch folgen sollten, beruhten letztlich auf dieser Erkenntnis und brachten als Ergebnis hervor, dass in *C. elegans* zusammengehörige Stummschaltungspfade mit jeweils charakteristischen Auslösemechanismen operieren. Wenn ich bedenke, dass sich das Nobelpreis-Komitee – sehr spezifisch – auf die Aktivierung der Gen-Stummschaltung durch die doppelsträngige RNA bezogen hat, so geht damit meine Hoffnung einher, dass wir künftig auch andere Auslöser der Stummschaltung erkennen werden; beispielsweise endogene Gene, die für dsRNAs codieren, microRNAs oder Transgene.

Hiroaki klonierte das *rde-1*-Gen und wies nach, dass es ein hochkonserviertes Protein, das wir heute als Argonaut-Protein kennen, verschlüsselte.<sup>[6]</sup> Das Protein RDE-1 war aus einer Reihe von Gründen interessant. Es hatte hochkonservierte Domänen, die in verwandten Genen so verschiedener Organismen wie Pflanzen und Menschen gefunden wurden, und über die enzymatischen Aktivitäten oder biologischen Funktionen dieser Domäne war noch nichts bekannt. Dies war eine wirklich aufregende Zeit in unserem Labor. Wir hatten also ein Gen, von dem wir wussten, dass es am Mechanismus beteiligt war. Darüber hinaus war aus früheren Arbeiten zu einem verwandten Gen in *Drosophila* bekannt, dass diese Genfamilie mit einem epigenetischen Stummschaltungspfad in der Fruchtfliege gekoppelt ist,<sup>[7,8]</sup> und Arbeiten an Pflanzen hatten ein Mitglied dieser Genfamilie mit der Regulation der Zellentwicklung in Zusammenhang gebracht.<sup>[9]</sup> Schon kurz nachdem wir unsere Studie veröffentlicht hatten, legten Carlo Cogoni und Giuseppe Macino<sup>[10]</sup> eine sehr interessante Arbeit vor, die zu dem Schluss kam, dass ein Mitglied der RDE-1-Familie an der durch ein Transgen ausgelösten Stummschaltung im Pilz *Neurospora* beteiligt ist. Anhand dieser Befunde für andere Organismen und auf der Grundlage von Hiroakis Genexperimenten stellten wir die Hypothese auf, dass es andere Arten von Auslösern gibt, die miteinander in Beziehung stehende Stummschaltungspfade entweder durch natürliche Entwicklungsmechanismen oder als Reaktion auf Transposone und Transgene initiieren.

Eine sehr aufregende Möglichkeit zeigte sich uns, nachdem wir das *rde-1*-Gen kloniert hatten. Zuerst muss ich jedoch einige grundlegende Fakten über Gene erläutern und Ihnen schildern, wie unglaublich erfolgreich Genomsequenzierungsprojekte die biologische Forschung auf der ganzen Welt beeinflusst haben. Gene bestehen aus langen Sequenzen von Nucleotiden, die das proteinkodierende Potential und/oder andere Funktionen ihrer Genprodukte festlegen und spezifizieren. Das Beziehungsgeflecht zwischen Genen kann von ihren Nucleotidsequenzen abgeleitet werden. Indem man z.B. anhand der Nucleotidsequenz das proteinkodierende Potential aller bekannten mit *rde-1* in Beziehung stehenden Gene ableitete, ließ sich der in Abbildung 8 gezeigte phylogenetische Stammbaum konstruieren. Innerhalb eines solchen Stammbaums befinden sich diejenigen Mitglieder einer Genfamilie, die einander am ähnlichsten sind (häufig als homolog bezeichnet), in räumlicher Nähe zueinander. Interessanterweise stellte sich heraus, dass *rde-1* ein Mitglied einer großen Genfamilie mit 26 verwandten Genen in *C. elegans* ist. Ebenso gibt es mannigfaltige Argonaut-Gene in fast jedem Organismus. Die Organismen, von denen die Gene im Stammbaum abgeleitet sind, sind wie folgt gekennzeichnet: *C. elegans* (Ce), Mensch (Hs), die Pflanze *A. thaliana* (At), Fruchtfliege (Dm) und Spaltheife (Sp). Der schwarze Zweig repräsentiert die am stärksten konservierte Gruppe von Genen mit Mitgliedern in Pflanzen, Tieren und Pilzen. Vertreter der nach ihrem Stammgen oft als Piwi bezeichneten Genfamilie (grün) kommen in allen Tieren vor, nicht aber in Pflanzen oder Pilzen. Der rote Zweig schließlich repräsentiert eine spezifische Unterfamilie von Genen in *C. elegans*, die von den schwarzen und grünen Familien gleichermaßen diver-



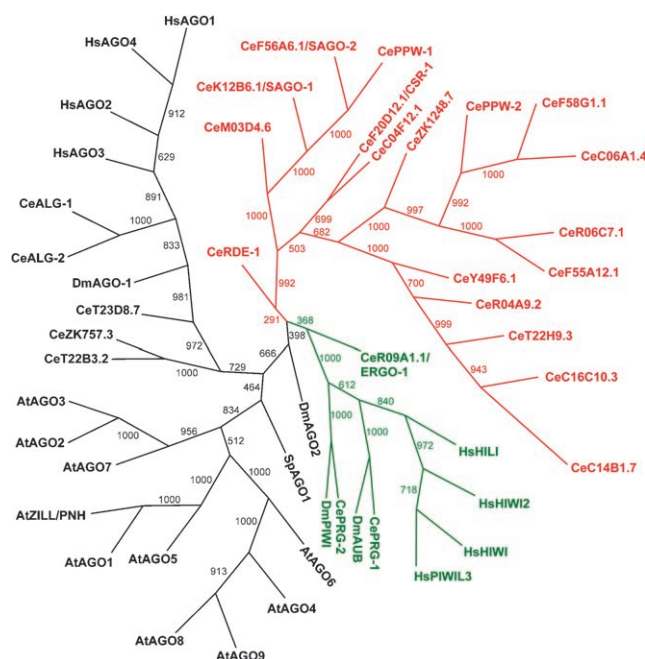


Abbildung 8.

gieren. Diese bemerkenswerte Vielfalt an Argonaute-Genen warf die aufregende Möglichkeit auf, dass sich unterschiedliche Mitglieder einer Familie jeweils spezialisiert haben, um ganz bestimmte Funktionen zu erfüllen. Das Gen *rde-1* beispielsweise ist nach unseren genetischen Studien für die Genstummung als Reaktion auf Fremd-dsRNA erforderlich. Vielleicht sind andere Mitglieder der Argonaute-Genfamilie in *C. elegans* für die Transposon- und Transgenstummung zuständig. Wieder andere könnten bei Zellentwicklungsmechanismen, die mit der RNA-Interferenz zusammenhängen, eine Rolle spielen. Eine hervorragende



Alla Grishok

Abbildung 9.

Doktorandin, Alla Grishok (Abbildung 9), nahm sich der Aufgabe an, diese Ideen auf die Probe zu stellen.

Alla ging dabei so vor, dass sie Mitglieder der Argonaute-Genfamilie in *C. elegans* inaktivierte. Die ersten Gene, die sie abschaltete, kodierten für zwei eng verwandte Mitglieder der am stärksten konservierten Gruppe der Argonaute-Proteine, bezeichnet als *alg-1* und *alg-2* (siehe den schwarzen Bereich des Stammbaums in Abbildung 8). Nachdem Alla diese Gene durch RNA-Interferenz abgeschaltet hatte, beobachtete sie einen verblüffenden Phänotyp. Bevor ich aber auf die Bedeutung dieser Ergebnisse eingehen kann, muss ich für einen Moment abschweifen und eine frühere Studie erläutern, die die Basis für Allas Entdeckung bildete.

In dieser früheren Studie, die aus dem Jahr 1993 stammte, war es Victor Ambros und Mitarbeitern nach mehrjähriger Arbeit gelungen, das Gen *lin-4* zu klonieren.<sup>[11]</sup> Die Klonierung erwies sich unter anderem deshalb als schwierig, weil das Gen sehr klein war und nicht für ein Protein, sondern offenbar für zwei RNA-Produkte codierte: eine ca. 70 Nucleotide (nt) lange RNA, die fähig ist, ein doppelsträngiges RNA-Molekül mit einer Haarnadelstruktur zu bilden, sowie eine einzelsträngige, 22 nt lange RNA, die von dieser langen RNA abgeleitet zu sein schien (Abbildung 10). Diese kurze RNA hatte die Fähigkeit, direkt an das Transkript des *lin-14*-Gens zu binden, eines Gen, das während der normalen Entwicklung des Wurms durch *lin-4* negativ reguliert wird.

Schon bevor wir das RDE-1-Protein identifizierten, hatten wir uns für eine mögliche Verbindung zwischen der RNAi und dem *lin-4*-Genpfad interessiert. Tatsächlich hatte Hiroaki Bedenken, ob RNAi-defiziente Mutanten überhaupt lebensfähig sein könnten, weil gleichzeitig auch der *lin-4*-Genpfad unterbrochen werden könnte. Zu der Zeit, als wir unsere genetischen Experimente mit RNAi-defizienten Stämmen durchführten, erschienen zwei interessante Arbeiten von Hamilton und Baulcombe,<sup>[12]</sup> die kleine RNAs von ca. 21 nt mit der viralen Genstummung in Pflanzen koppelten, sowie von Gary Ruvkun und Mitarbeitern, die ein zweites *lin-4*-artiges Wurmgen – das *let-7*-Gen – identifizierten.<sup>[13]</sup> Während *lin-4* ein wurmspezifisches Gen war, stellte sich heraus, dass das Gen *let-7* Homologe in jeder Tierart hat, und auch im Menschen. Bemerkenswerterweise war jedes einzelne Nucleotid der voll entwickelten RNA-Produkte von *let-7* beim Wurm und Menschen identisch. Die Entdeckung, dass das *let-7*-Gen derart konserviert war, führte zu einer intensiven Suche nach Genen, die für kleine RNAs codierten (bezeichnet als Mikro-RNA-Gene), in den Genomen zahlreicher Organismen. Die Zusammenhänge zwischen RNA-Interferenz und Mikro-RNAs waren jedoch trotz aller Be-

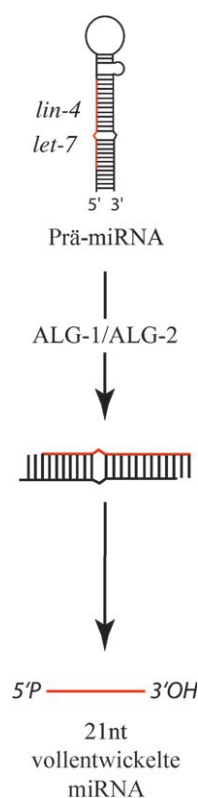


Abbildung 10.

geisterung noch nicht wirklich verstanden. Phil Sharp drückte es bei einem Meeting so aus: „It looks like a horse and smells like a horse“ – dennoch gab es keinen molekularen oder genetischen Anhaltspunkt dafür, dass diese Genpfade gekoppelt waren.

Während diese aufregenden Studien an Würmern und Pflanzen vorangingen, machten Biochemiker rasche Fortschritte bei der Rekonstitution von Komponenten der Stummschaltungspfade in *Drosophila*-Zellextrakten. Führende Arbeiten auf diesem Gebiet stammten von David Bartel und Mitarbeitern, zusammen mit Phil Zamore, Tom Tuschl und Phil Sharp am MIT sowie Greg Hannon's Gruppe in Cold Spring Harbor.<sup>[14,15]</sup> Die Studien zeigten auf, dass Aktivitäten in *Drosophila*-Zellen doppelsträngige RNA zu kleinen, etwa 21 nt langen RNAs verarbeiten konnten. Tom Tuschl und Mitarbeiter waren die ersten, die nachwiesen, dass diese kleinen RNAs die Genexpression in Wirbeltierzellen stummschalten konnten.<sup>[16]</sup> Also ergaben genetische Studien an Würmern Anfang 1993, dass kleine RNAs als Stummschaltungsagentien wirken, experimentelle Studien zur Virusinfektionen in Pflanzen ergaben, dass sich kleine RNAs in infizierten Pflanzen anhäufen, biochemische Studien an Fliegenextrakten ergaben, dass die Extrakte kleine RNAs enthielten, und abermals experimentelle Studien ergaben, dass in Wirbeltierzellen eine Stummschaltungsaktivität vorliegt. Aber waren diese kleinen RNA-Moleküle nur gleich lang oder waren sie an gleichen Mechanismen beteiligt? Die Antwort auf diese Schlüsselfrage war noch nicht gefunden.

Allas Arbeit lieferte eine Antwort. Nachdem sie die Gene *alg-1* und *alg-2* ausgeschaltet hatte, stieß sie auf einen Phänotyp, der demjenigen sehr stark ähnelte, den man nach Ausschalten von *let-7* erhält. Um diesen Zusammenhang zu bestätigen, begannen wir eine Zusammenarbeit mit Gary Ruvkun und Amy Pasquinelli, die kurz zuvor Sonden entwickelt hatten, um die Prozessierung der *lin-4*- und *let-7*-Vorläufer-RNAs in ihre vollentwickelten 21-nt-RNAs zu verfolgen. Bei Wildtyptieren sind diese Vorläufer kaum detektierbar. Nach Inaktivierung von *alg-1* und *alg-2* fanden sie jedoch, dass sich die Vorläufer stark anreicherten, während das Produkt, die vollentwickelte 21-nt-RNA, fast vollständig verschwand (Abbildung 11).<sup>[17]</sup>

Wir untersuchten auch, inwieweit das Dicer-Protein an diesem Prozess beteiligt ist. Dicer war von Greg Hannon und Mitarbeitern in *Drosophila*-Zellen als eine Nuclease identifiziert worden, die für die Prozessierung langer doppelsträngiger RNA in Fragmente von ungefähr 21 Nucleotiden Länge erforderlich ist. Wie auch andere Arbeitsgruppen konnten wir nachweisen,<sup>[18,19]</sup> dass Ausschalten von Dicer zu einer defizienten Prozessierung dieser Mikro-RNAs führte (Abbildung 11).

Mit diesen Ergebnissen war eine erste Verbindung zwischen der RNA-Interferenz und einem natürlichen Entstehungsmechanismus für die Regulierung der Genexpression hergestellt. Dies war extrem aufregend, und wir stellten ein Modell auf (Abbildung 12), in dem die RNAi- und Mikro-RNA-Pfade unterschiedliche Mitglieder der RDE-1-Familie verwendeten und im Dicer-Protein zusammenliefen. Stromabwärts von Dicer schienen die Pfade durch Einwirkung unbekannter Effektoren, die verschiedene Arten der Stummschaltung

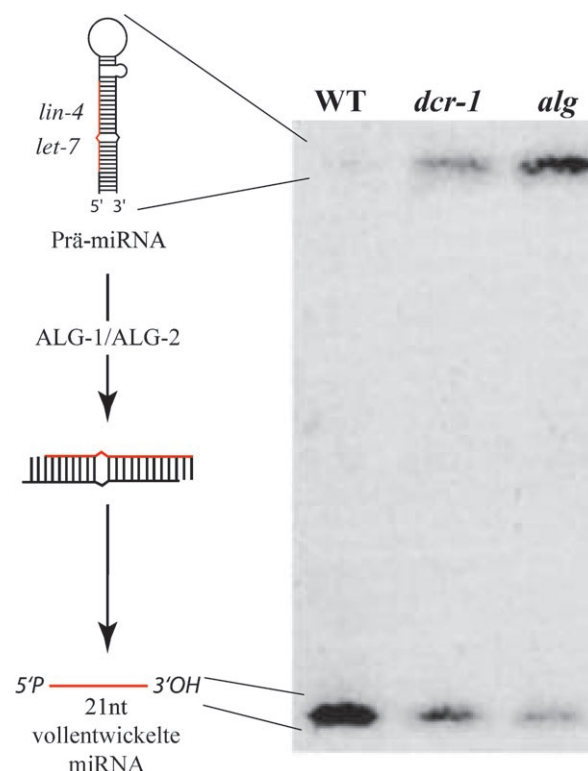


Abbildung 11.

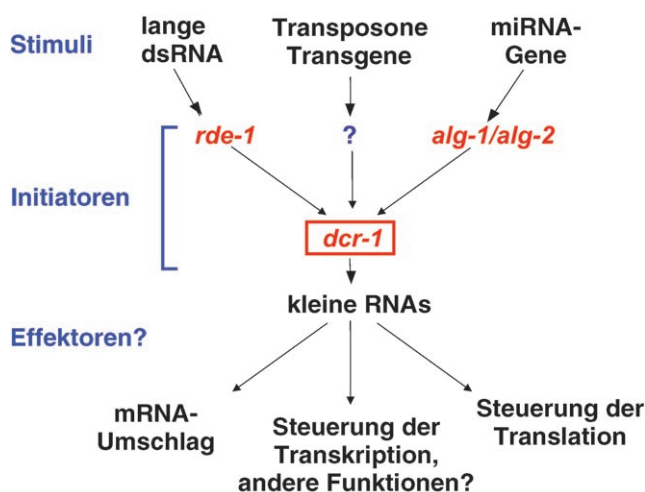


Abbildung 12.

schaltung einschließlich der mRNA-Zerstörung, der transkriptionellen Stummschaltung und der Hemmung der Translation steuern, wieder zu divergieren. Und wir hatten immer noch nicht die an der Transposon- und Transgen-Stummschaltung beteiligten Mitglieder der RDE-1-Familie identifiziert.

Zu diesem Zeitpunkt hielten wir die RDE-1-Proteine (auch bekannt als Argonaut-Proteine) für die Initiatoren der Stummschaltungspfade. Aus genetischen Studien war geschlossen worden, dass RDE-1 in einem frühen Stadium des Stummschaltungspades agiert (stromaufwärts von Dicer) und dass ALG-1 und ALG-2 für die Prozessierung der



Mikro-RNA-Vorläufer erforderlich sind. Es häuften sich aber die Hinweise darauf, dass diese Proteine auch stromabwärts agieren könnten. Gestützt wurde diese Vorstellung durch Studien von Greg Hannon in Zusammenarbeit mit Ji-Joon Song und Leemor Joshua-Tor in Cold Spring Harbor,<sup>[20]</sup> die nachweisen konnten, dass die Argonaut-Proteine eine ähnliche Struktur wie eine Enzymdomäne haben, die die RNA schneiden kann. Sie stellten ein Modell vor, demzufolge die Argonaut-Proteine die Enden der kurzen RNAs binden und deren Sequenzinformation nutzen, um Ziel-mRNAs in den Zellen zu finden und zu zerstören. Diese Studien bewiesen, dass Argonaut-Proteine die lang gesuchte „Slicer“-Aktivität (der „Polizist“) waren, die im Zentrum des RNA-induzierten Stummschaltungsmechanismus stand.

Für uns kam es überraschend, dass RDE-1 wahrscheinlich das Slicer-Enzym war, da unsere genetischen Studien die RDE-1-Aktivität in ein früheres Stadium eingestuft hatten. Die Befunde wurden aber erklärbar, wenn man davon ausging, dass die Argonaut-Proteine bei der RNAi in *C. elegans* mehrere Funktionen hatten. Unsere Vorstellung war (Abbildung 13), dass RDE-1 und kleine RNAs, die durch Pro-

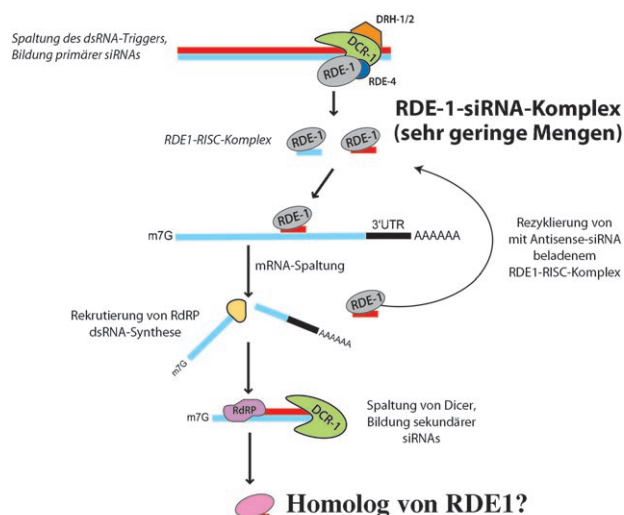


Abbildung 13.

zessierung der Trigger-dsRNA entstehen, gemeinsam die Spaltung der Ziel-mRNA auslösen könnten. Die gesplattene Ziel-mRNA könnte dann als Matrice für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase dienen, die neue siRNAs produziert, die wiederum mit anderen Argonaut-Proteinen wechselwirkt und so eine effiziente Gen-Stummschaltung vermittelt.

Über experimentelle Tests dieses Modells wurde kürzlich berichtet.<sup>[21]</sup> Überraschenderweise fanden wir, dass nicht ein einzelnes zusätzliches Gen zur Stummschaltung herangezogen wird, sondern dass mehrere RDE-1-Homologe in der stromabwärts gelegenen Phase des Stummschaltungspfad zusammen agieren. Ein starker Defekt der RNAi konnte erst bei einem Stamm von Organismen festgestellt werden, der sechs unterschiedliche Argonaut-Mutanten enthielt. All diese funktionell gekoppelten Gene finden sich innerhalb des in Abbildung 8 rot dargestellten Zweigs im Stammbaum der

Argonaut-Gen. Die stromabwärts gelegenen Argonaut-Proteine wirken als die begrenzenden Faktoren der RNAi. Bei Überexpression der Proteine wird die RNAi verstärkt, sind sie inaktiv, wird die RNAi abgeschwächt. Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass die Gene verstärkt wurden, um so eine effiziente Gen-Stummschaltung vermitteln zu können.

Der Mechanismus, durch den die stromabwärts gelegenen Argonaut-Proteine die Gen-Stummschaltung vermitteln, bleibt unbekannt. Er könnte durch Zerstörung der mRNA ausgelöst werden, allerdings lassen Vergleiche dieser Argonaut-Gruppe mit RDE-1 und anderen Vertretern der Proteinfamilie nicht vermuten, dass die stromabwärts agierenden Argonaut-Proteine eine intakte Nucleasedomäne zur RNA-Spaltung haben. Unsere Studien besagen, dass diese Proteine auch in endogenen Stummschaltungspfaden agieren (Abbildung 14), einschließlich solchen, die vermutlich an der

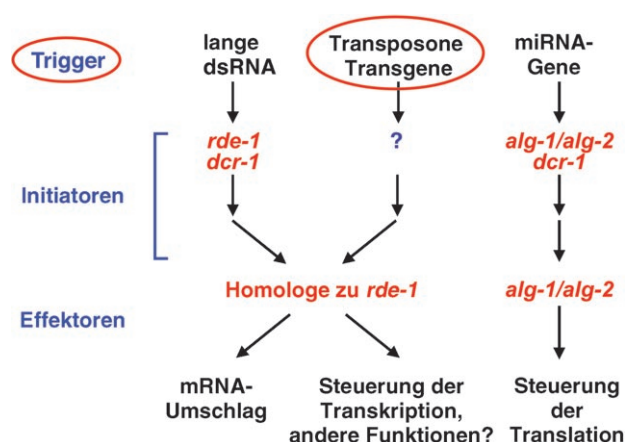


Abbildung 14.

Stummschaltung von Transposonen, Transgenen und anderen Genen auf der Chromatin-Ebene beteiligt sind.<sup>[21]</sup>

Das letzte Konzept, das ich erörtern möchte, betrifft die Frage, wie RNAi durch Wechselwirkung mit Chromatin eine Gen-Stummschaltung bewirken kann und welche Bedeutung dieser Mechanismus für die Genregulation in der Zellentwicklung und Evolution haben könnte. Wie ich bereits angedeutet habe, sind viele der an der RNAi beteiligten Gene auch für die Stummschaltung von Transgenen in der Keimbahn erforderlich. Das Gen *mut-7* z.B., das wir als essenziell für die RNAi identifizierten,<sup>[6]</sup> wurde in früheren Studien auch als essenziell für die Stummschaltung von Transposonen<sup>[22]</sup> und Transgenen beschrieben. Während die RNAi eine posttranskriptionale Wirkung zu haben schien, deuteten mehrere Studien darauf hin, dass die Transgen-Stummschaltung auf der DNA-Ebene (oder genauer der Chromatin-Ebene) reguliert wird. Zum Beispiel sind einige der für die Transgen-Stummschaltung in *C. elegans* erforderlichen Gene mit den Polycomb-Genen assoziiert, die in Wechselwirkung mit Chromatin die Gen-Stummschaltung in anderen Organismen steuern.<sup>[23]</sup> Einen schönen Beweis für die Kopplung zwischen RNAi- und Chromatin-Stummschaltung lieferten

kürzlich Arbeiten zur Spaltheife *S. pombe*, die belegten, dass ein Komplex aus einem Argonaut-Protein und bekannten Chromatinwechselwirkungsfaktoren direkt mit stummgeschalteten Genen im Zellkern wechselwirkt.<sup>[24]</sup>

Um erklären zu können, wie RNAi die DNA direkt regulieren könnte, muss ich einige Sätze über die physiologische Natur der DNA vorausschicken. Ihre DNA liegt nicht nur einfach so herum. Die DNA ist zusammen mit einer Proteinstruktur verpackt – dem so genannten Nucleosom. Die DNA ist zweifach um das Nucleosom gewickelt, und die Nucleosomen ihrerseits sind zu noch dickeren Fasern aufgewickelt. Chromosomen bestehen aus diesen Protein/DNA-Fasern, die auch als Chromatin bezeichnet werden. Durch das Verpacken der DNA zu Chromatin wird zum Teil eine Stummschaltungswirkung erzielt. Strukturelle Untersuchungen des Nucleosomenkerns haben ergeben, dass kurze Proteinschwänze am DNA-Ende in einer Weise herausragen, dass sie für Modifizierungen leicht zugänglich sind.<sup>[25]</sup> Solche Modifizierungen und die daraus resultierenden regulatorischen Wirkungen auf die Genexpression erweisen sich als faszinierendes Thema – und ich bin sicher, dass dieses Komitee einmal in Zukunft damit befasst sein wird. Interessanterweise hat man Mechanismen erkannt, die erklären, wie kleine RNAs die Modifizierung der Chromatinschwänze lenken können.<sup>[24]</sup> Ich möchte diese Mechanismen mit einem Modell illustrieren, das nicht nur die RNAi-vermittelte Chromatin-basierte Stummschaltung erklären könnte, sondern auch einen möglichen Mechanismus für das oben erwähnte Konzept der RNA-vermittelten Evolution aufstellt (Abbildung 15).

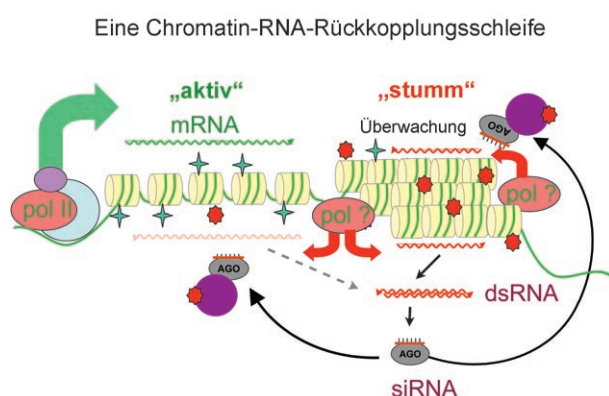


Abbildung 15.

In diesem Modell ist die DNA (grüne Linie) um die Nucleosomen gewickelt, die wiederum zu ihren Chromatinstrukturen höherer Ordnung gepackt sind. Modifizierungen an den Nucleosomschwänzen, die eine aktive Konformation ergeben, sind als vierzackige grüne Sterne, Stummschaltungsmarker sind als mehrzackige rote Sterne dargestellt. In der aktiven Konformation ist die regulatorische Region der Gene, der so genannte Promotor, frei von Nucleosomen und ist durch den RNA-Polymerase-Komplex gebunden (den Komplex, der die mRNAs produziert und Thema des diesjährigen Nobel-Vortrags für Chemie war). In der „stummen“ Region wird eine andere Art von Polymeraseaktivität re-

krutiert. Anstatt mRNA zu produzieren, produziert diese hypothetische Polymerase Transkripte, die in einen RNAi-ähnlichen Stummschaltungspfad eintreten. Die stummschaltenden RNAs könnten aus der Prozessierung der doppelsträngigen RNA mit dem Dicer-Enzym resultieren. Die doppelsträngige RNA könnte als Ergebnis einer bidirektionalen Transkription in dieser Region oder durch Rekrutierung einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase entstehen, die bestimmte Merkmale der Überwachungs-RNA erkennt. Alternativ ist es möglich, dass kurze interferierende RNAs durch Transkription direkt aus Nucleosomen-DNA gebildet und den Argonaut-Proteinen aufgeladen werden, ohne die dsRNA-Zwischenstufe zu durchlaufen. Wie auch immer der Mechanismus zur Bildung der kleinen RNAs aussieht: Die resultierenden Argonaut-siRNA-Komplexe könnten dann über sequenzspezifische Wechselwirkungen mit naszierenden Überwachungstranskripten oder direkt mit der DNA wechselwirken, um so chromatinmodifizierende Enzyme zur Verstärkung der Stummschaltung an den Genlocus zurückzuführen. Diese Stummschaltungskomplexe könnten auch in trans agieren, um andere Gene mit verwandter Sequenz, wie etwa verschiedene Transposone, stummzuschalten.

Dass die Transkription nicht nur bei der Expression des Gens, sondern auch bei seiner Regulation auftritt, ist ein extrem leistungsfähiges Konzept. Die in den „aktiven Regionen“ in niedrigen Konzentrationen vorhandenen Stummschaltungsmarker könnten die Genexpression modulieren, indem sie die Produktion intermediärer Niveaus der Stummschaltungs-RNAs spezifizieren, die wiederum ein intermediäres Niveau der Genexpression spezifizieren. Nach diesem Modell entspräche die DNA der Hardware eines Computers und die RNA-Chromatin-Wechselwirkung entspräche der Software. Durch Wechselwirkung mit dem Chromatin legt die RNA nicht nur fest, welche Regionen der DNA aktiv sind, sondern auch, wie hoch das Niveau der Aktivität ist. Wenn die DNA repliziert und das Chromatin gespalten wird, kann die RNA bei der Reinstallation der Stummschaltungsmarker helfen, wobei sie im Wesentlichen die resultierenden Tochterzellen dahingehend programmiert, dass sie die Genexpressionsmuster der Elternzelle übernehmen. Wie Weismann herausstellte, könnte dieses Regulationspotenzial durch asymmetrische Zellteilung gemodelt werden, sodass die Tochterzellen in einem oder mehreren Genloci verschieden werden.<sup>[2]</sup> Dieser Mechanismus könnte Aufschluss darüber geben, wie der Zellkern einer Körperzelle umprogrammiert werden kann, um nach Transfer in eine Eizelle eine embryonale Entwicklung zu durchlaufen. Mechanismen wie diese könnten auch eine Erklärung dafür liefern, wie Zellen in der Lage sind, ihre Genexpressionsprogramme über Jahrzehnte während der Lebensdauer eines Organismus zu bewahren.

Allerdings – und hier kommt die Evolution ins Spiel – könnte dieser RNA-Chromatin-Rückkopplungsmechanismus auch in der Keimbahn auftreten. Chromatinmarker in der Keimbahn könnten ein Expressionsniveau der Überwachungs-RNA spezifizieren, welche einige Gene komplett fernhält und andere auf eine Weise moduliert, dass ihr Expressionsniveau proportional zur Zahl der an diesem Locus produzierten RNA ist. Die Rückkopplungsschleife ist autark,

unterliegt aber vermutlich natürlichen Niveauschwankungen. Natürlich auftretende Auf- oder Abregulierungen könnten selektiert und in der Keimbahn von einer Generation zur nächsten weitergegeben werden. Diese Art von reversibler Veränderung in den Genexpressionsniveaus könnte eine bedeutende Rolle dabei spielen, wie sich Organismen an Wechsel und Veränderungen in ihrer Umgebung anpassen.

Wir wissen nun aus den Versuchen mit *C. elegans*, dass die durch Stummschaltung induzierte RNA-Interferenz über viele Generationen weitergegeben werden kann<sup>[26]</sup> und dass chromatinmodifizierende Faktoren bei diesem Vererbungsmechanismus eine Rolle spielen.<sup>[27]</sup> In Anbetracht dieser Phänomene kann man spekulieren, dass alle Gene kontinuierlich (durch natürliche Variation) unterschiedliche Niveaus vererbbarer siRNA-Chromatin-Wechselwirkungen ausprobieren. Veränderungen dieser Art könnten dann erhebliche Einflüsse auf „Fitness“ und Evolution haben, indem sie auf diesen schnellen, durch die RNA-Chromatin-Wechselwirkungen vermittelten Mechanismus zurückgreifen, dem keinerlei Änderungen in der DNA-Sequenz zugrundeliegen. Ich will damit schließen, dass wir schlicht noch nicht wissen, welche Bedeutung die kleinen RNAs letztlich für die Entwicklung eines Organismus und die Evolution haben. Ich möchte Sie alle ermutigen, über die Möglichkeiten nachzudenken und mehr über Biologie und RNAi zu lernen – und wenn es Sie inspiriert und begeistert, lassen Sie sich auf das Abenteuer ein und helfen Sie mit, die vielen unbekannten Geheimnisse, die es noch zu entdecken gilt, zu erforschen.

Eingegangen am 18. April 2007

Online veröffentlicht am 21. August 2007

Übersetzt von Charlotte Gentes, Maulbronn

- [1] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [2] A. Weismann, *The Germ-Plasm: A Theory of Heredity*, Charles Scribner, New York, **1893**, vxiii, S. 477.
- [3] E. Mayr, *The Growth of Biological Thought*, Harvard University Press, Cambridge, **1982**, S. 974.
- [4] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, 391, 806–811.

- [5] L. Timmons, A. Fire, *Nature* **1998**, 395, 854.
- [6] H. Tabara, M. Sarkissian, W. G. Kelly, J. Fleenor, A. Grishok, L. Timmons, A. Fire, C. C. Mello, *Cell* **1999**, 99, 123–132.
- [7] J. E. Wilson, J. E. Connell, P. M. Macdonald, *Development* **1996**, 122, 1631–1639.
- [8] A. Schmidt, G. Palumbo, M. P. Bozzetti, P. Tritto, S. Pimpinelli, U. Schafer, *Genetics* **1999**, 151, 749–760.
- [9] K. Bohmert, I. Camus, C. Bellini, D. Bouchez, M. Caboche, C. Benning, *EMBO J.* **1998**, 17, 170–180.
- [10] C. Catalanotto, G. Azzalin, G. Macino, C. Cogoni, *Nature* **2000**, 404, 245.
- [11] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, 75, 843–854.
- [12] A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe, *Science* **1999**, 286, 950–952.
- [13] B. J. Reinhart, F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz, G. Ruvkun, *Nature* **2000**, 403, 901–906.
- [14] P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, D. P. Bartel, *Cell* **2000**, 101, 25–33.
- [15] S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, *Nature* **2000**, 404, 293–296.
- [16] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, 411, 494–498.
- [17] A. Grishok, A. E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D. L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun, C. C. Mello, *Cell* **2001**, 106, 23–34.
- [18] G. Hutvagner, J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, P. D. Zamore, *Science* **2001**, 293, 834–838.
- [19] R. F. Ketting, S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon, R. H. Plasterk, *Genes Dev.* **2001**, 15, 2654–2659.
- [20] J. J. Song, S. K. Smith, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Science* **2004**, 305, 1434–1437.
- [21] E. Yigit, P. J. Batista, Y. Bei, K. M. Pang, C. C. Chen, N. H. Tolia, L. Joshua-Tor, S. Mitani, M. J. Simard, C. C. Mello, *Cell* **2006**, 127, 747–757.
- [22] R. F. Ketting, T. H. Haverkamp, H. G. van Luenen, R. H. Plasterk, *Cell* **1999**, 99, 133–141.
- [23] W. G. Kelly, A. Fire, *Development* **1998**, 125, 2451–2456.
- [24] A. Verdel, S. Jia, S. Gerber, T. Sugiyama, S. Gygi, S. I. Grewal, D. Moazed, *Science* **2004**, 303, 672–676.
- [25] T. J. Richmond, C. A. Davey, *Nature* **2003**, 423, 145–150.
- [26] A. Grishok, H. Tabara, C. C. Mello, *Science* **2000**, 287, 2494–2497.
- [27] N. L. Vastenhouw, K. Brunschwig, K. L. Okihara, F. Muller, M. Tijsterman, R. H. Plasterk, *Nature* **2006**, 442, 882.