

microRNA-vermittelte Repression erfolgt hauptsächlich durch mRNA-Abbau

Stephanie Esslinger und Klaus Förstemann*

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nichtkodierende RNAs, die posttranskriptionell die Genexpression regulieren. Mit ihrer Fähigkeit zur Basenpaarung mit komplementären mRNAs wirken sie im RISC (RNA induced silencing complex) als Spezifitätsuntereinheiten (Abbildung 1 A), ähnlich wie siRNAs im verwandten Prozess der RNA-Interferenz.^[1,2] Die durch miRNAs vermittelte Genregulation spielt eine wesentliche Rolle bei der embryonalen Entwicklung, aber auch während der adulten Lebensphase laufen viele Prozesse in Abwesenheit des miRNA-Systems nicht korrekt ab.^[3] Die biologische Bedeutung von miRNAs steht also außer Frage, allerdings herrscht noch Unklarheit über den Mechanismus der Repression (mRNA-Abbau oder Inhibition der Translation) durch RISC.^[4] Des Weiteren konnte man zwar die De-regulation von vielen mRNAs in Abhängigkeit von einer bestimmten miRNA zeigen, aber es ist meist unklar, welche der mRNAs direkt von dieser miRNA erkannt werden. Eine wichtige Methode zur Bearbeitung dieser Frage sind Experimente mit Reportergenen, mit denen einzelne miRNA/mRNA-Wechselwirkungen nachvollzogen werden können. Leider ermöglicht es dieser Ansatz nicht, eine quantitative Aussage darüber zu treffen, in welchen Ausmaß diese Repression auch auf ein endogenes Zielgen zutrifft, das noch im Genom lokalisiert ist und nicht von einem transfizierten Plasmid aus überexprimiert wird. Zwei Forschergruppen haben nun zumindest für einige miRNAs erste Antworten liefern können, indem sie Proteomik- mit Transkriptomik-Experimenten verknüpften.^[5,6]

Beide Gruppen verfolgten die gleichen Ziele: Eine Quantifizierung des Einflusses der miRNA-vermittelten Regulation auf das Proteom und einen direkten Vergleich mit den auf der mRNA-Ebene beobachteten Änderungen. Wenn eine translationale Repression überwiegt, sollte sich die Proteinmenge stärker verändern als die mRNA-Menge. Ist andererseits mRNA-Abbau der überwiegende Mechanismus,

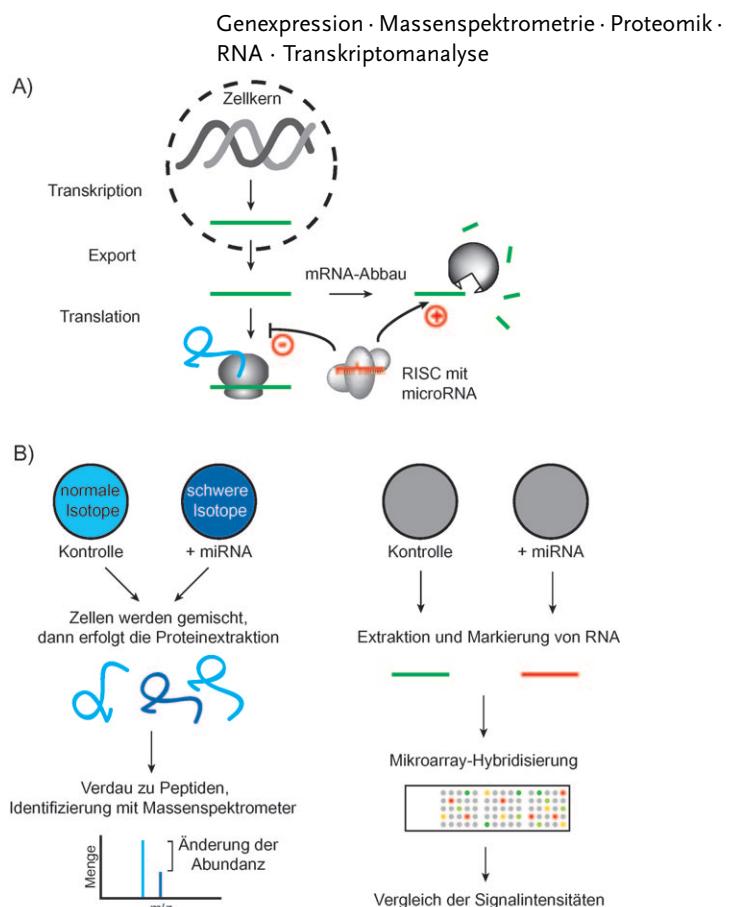


Abbildung 1. A) Posttranskriptionelle Genregulation durch miRNAs; RISC kann entweder die Translation verhindern oder den Abbau der mRNA stimulieren. Bisher war der Beitrag der beiden Mechanismen zur Gesamtrepression unbekannt. B) Quantifizierung des Proteoms und des Transkriptoms. Links: Mit der SILAC-Methode (siehe Text) können die Expressionszustände durch isotopenmarkierte Aminosäuren unterschieden werden. Dazu werden die Zellen zunächst metabolisch markiert und anschließend die noch intakten Zellen vor der Proteinextraktion im Verhältnis 1:1 gemischt und mit dieser gemeinsam weiterverarbeitet. Experimentelle Artefakte können auf diese Weise stark reduziert werden. Rechts: Bei Mikroarray-Experimenten können Unterschiede zwischen Transkriptomen zuverlässig gemessen werden. Beispielsweise wird beim Ansatz der kompetitiven Hybridisierung die RNA von Zellen aus der zu untersuchenden Probe und einer Kontrollprobe mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (im Schema ein rot bzw. grün fluoreszierender Farbstoff). Nach der Hybridisierung mit den komplementären Sequenzen des Mikroarrays (auf dem in der Regel alle mRNAs eines Organismus repräsentiert sind) können dann Expressionsunterschiede anhand der Intensitäten im jeweiligen Fluoreszenzbereich berechnet werden. Die Überlagerung erlaubt es außerdem, Expressionsunterschiede visuell anhand der Farbschattierung abzulesen.

[*] S. Esslinger, Prof. Dr. K. Förstemann
Gene Center, Department Chemie und Biochemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Feodor-Lynen-Straße 25, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-76945
E-Mail: foerstemann@lmb.uni-muenchen.de
Prof. Dr. K. Förstemann
Munich Center for Integrated Protein Science (CiPS^M)
Ludwig-Maximilians-Universität München (Deutschland)

sollte genau das Gegenteil zutreffen. Für eine genomweite Messung der mRNA-Expressionsniveaus gibt es mittlerweile verlässliche Techniken, aber wie kann das Proteom quantifiziert werden? Der Schlüssel dazu ist die so genannte SILAC-Technik (SILAC: Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Cell Culture). Hierbei kann der Ursprung eines gegebenen Proteins durch eine Isotopenmarkierung kodiert werden, die von modernen Massenspektrometern aufgelöst werden kann (Abbildung 1B). Die zu untersuchende Probe und die Kontrollprobe können daher schon sehr früh während der Probenvorbereitung gemischt werden, wodurch experimentelle Artefakte weitgehend vermieden werden.^[7] In einer früheren Studie wurde diese Technik bereits zur Identifizierung von miRNA-Zielgenen angewendet, wobei aber „nur“ ca. 500 Proteine detektiert werden konnten.^[8] Die Veröffentlichungen von Baek et al. und Selbach et al. konnten dieses Ergebnis um einen Faktor von bis zu 10 (je nach Experiment) steigern. Selbach et al. entwickelten zudem eine Strategie zur Pulsmarkierung, die es den Autoren durch Einsatz dreier unterschiedlicher Isotopen-Codes ermöglichte, nicht nur die quasistationären Proteinlevels, sondern auch die Geschwindigkeiten der Proteinsynthese in proteomweitem Maßstab zu bestimmen. Dies ist ein besonderer Vorteil für die Bestimmung früher Abläufe der durch miRNAs induzierten Änderungen, weil es nicht nötig ist zu warten, bis sich ein neues Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau eines Zielproteins eingestellt hat.

Zur Herstellung der experimentellen Proben transfizierten beide Gruppen synthetische RNA-Moleküle, die Intermediate der miRNA-Biogenese imitieren, in Zellkulturen. Dies führt zu einer deutlichen Erhöhung der Menge einer bestimmten miRNA oder bringt sogar eine miRNA in Zellen ein, die von diesen zuvor überhaupt nicht exprimiert wurde. Nachdem den Kulturzellen genügend Zeit zu einer Reaktion auf diesen Eingriff gegeben worden war, wurden die resultierenden Änderungen im Proteom und Transkriptom analysiert. Obwohl die überexprimierten miRNAs der beiden Studien unterschiedlich waren, lassen sich einige allgemeine Schlussfolgerungen ziehen: Wie erwartet änderte sich das Niveau vieler Proteine durch eine gesteigerte miRNA-Dosis, aber das Ausmaß dieser Änderung war eher gering (durchschnittlich weniger als zweifach). In Anbetracht der starken und spezifischen Phänotypen von Mutanten, in denen die miRNA-Biogenese beeinträchtigt ist, war dies eher unerwartet.^[9–16] Des Weiteren fielen die Änderungen auf mRNA-Ebene etwas geringer aus als auf Proteinebene – es ist also in vielen Fällen tatsächlich eine translationale Repression durch miRNAs messbar.

Diese Beobachtungen kann man allerdings nicht direkt interpretieren, da bei den Experimenten wahrscheinlich auch sekundäre Effekte gemessen wurden: Wenn z. B. das primäre Zielgen ein Transkriptionsfaktor ist, dann können viele der beobachteten Änderungen auf einer veränderten Transkriptionsaktivität, die aus der Repression des Transkriptionsfaktors resultiert, zurückgeführt werden. Diese Änderungen sind zwar durchaus eine Konsequenz der miRNA-Transfektion, werden aber nicht durch eine direkte Basenpaarung der miRNA mit der mRNA herbeigeführt. Zur Abschätzung des Beitrags indirekt angesprochener Gene zu den gemessenen

Veränderungen ließen sich beide Gruppen von der Erkenntnis leiten, dass nicht alle Basen einer miRNA gleichermaßen an der Paarung mit Ziel-mRNAs beteiligt sind. Vor allem im Bereich der so genannten Seed-Sequenz (Positionen 2–7 der miRNA) ist eine perfekte Komplementarität wichtig.^[17–19] Eine Blindsuche nach statistisch signifikant angereicherten, sechs bis acht Nucleotide langen Sequenzen innerhalb derjenigen mRNAs, die auf eine miRNA-Transfektion reagierten, ergab in allen Fällen die zur jeweiligen Seed-Sequenz komplementären Basen. Dies belegt, dass eindeutig Änderungen von direkten miRNA-Zielgenen detektiert wurden. Genauer ausgedrückt enthielten die mRNAs von bis zu 40%^[6] oder 60%^[5] der Proteine, deren Expression infolge der miRNA-Transfektion um ≥ 30% abnahm, innerhalb des nicht translatierten Bereichs am ihrem 3'-Ende mindestens eine gute Übereinstimmung mit der miRNA-Seed-Sequenz. In dieser Region findet man bekanntlich eine hohe Dichte an miRNA-komplementären Sequenzen. Wurden nun ausschließlich diejenigen mRNAs mit Komplementarität zur Seed-Sequenz der miRNA betrachtet, ließen sich die Änderungen auf Proteinebene fast vollständig mit den Änderungen im Transkriptom begründen. Dies legt eine lang geführte Debatte auf dem miRNA-Gebiet bei: Es gibt zwar in der Tat eine messbare translationale Repression, aber der mRNA-Abbau macht den Hauptteil der Regulation aus. Es gibt natürlich Ausnahmen von dieser Regel, da sich einige Proteine veränderten, ohne dass eine Variation in der Menge der Transkripte gemessen wurde. Diese translationale Repression scheint bei mRNAs, die an ER-assoziierten Ribosomen (ER: endoplasmatisches Reticulum) übersetzt werden, stärker ausgeprägt zu sein als bei solchen, die an Ribosomen im Cytosol übersetzt werden.

Alle bisher vorgestellten Ergebnisse der beiden Veröffentlichungen wurden erzielt, indem die Dosis einer miRNA innerhalb der Zelle künstlich erhöht wurde. Um herauszufinden, was geschieht, wenn das Niveau einer bestimmten miRNA reduziert wird, führten Selbach et al. einen Antisense-Inhibitor für die *let-7*-miRNA in Kulturzellen ein.^[5] Bei diesem Ansatz sollte daher die Menge der *let-7*-Zielgene steigen, was sich auch bestätigte. Selbach et al. kamen zu dem Schluss, dass die für die *let-7*-Überexpression gezeigten Effekte in gegenläufiger Form auch beim Knockdown von *let-7* auftreten. Diese Übereinstimmung belegt, dass bei Überexpressionsexperimenten mit miRNAs physiologisch relevante Ergebnisse erzielt werden. Auch Baek et al. wollten ihre Ergebnisse in einem miRNA-Loss-of-Function-Ansatz validieren.^[6] Ihre Strategie bestand in der Verwendung von Knochenmarkzellen, die von Wildtyp- oder miR-223-Knockout-Mäusen stammten, und ihrer In-vitro-Differenzierung zu Neutrophilen. Im Wildtypfall wird die miR-223-Expression während dieser Differenzierung stark induziert. Nach Vergleich der Proteome und Transkriptome kamen auch diese Autoren zu dem Schluss, dass das miRNA-Knockout-Experiment die Regeln bestätigt, die aus den Überexpressionsstudien abgeleitet worden waren.

Da die Erkennung einer mRNA durch eine miRNA dem Prinzip der Basenpaarung folgt, sollte es möglich sein, miRNA/Zielgen-Paare aus Gensequenzdaten herzuleiten. Da die perfekte Basenpaarung oft nicht über die Seed-Sequenz hin-

ausgeht, müssen aber noch zusätzliche Kriterien wie evolutionäre Konservierung oder die Position innerhalb der mRNA und der lokale Sequenzkontext in Betracht gezogen werden, um in Algorithmen zur Ermittlung von miRNA-Zielstrukturen falsch-positive Vorhersagen zu reduzieren.

Können uns diese Programme helfen, ausgehend von den nun veröffentlichten Experimenten Rückschlüsse über das Verhalten anderer miRNAs zu ziehen? Zur Beantwortung dieser Frage verglichen beide Gruppen ihre umfangreichen Sätze an experimentell validierten Zielgenen mit den Voraussagen, die von mehreren Programmen berechnet wurden und konnten dabei feststellen, dass die beiden besten Algorithmen (TargetScan und PicTar) von ihnen selbst entwickelt worden waren! Dennoch zeigten sich noch erhebliche Schwächen, da bis zu zwei Drittel der vorausgesagten Zielgene nicht bestätigt werden konnten.

Vom praktischen Gesichtspunkt her haben beide Studien mehrere wichtige Aspekte aufgezeigt: Da der Großteil der Repression auf der mRNA-Ebene erfolgt, kann sich eine experimentelle Identifizierung von miRNA-Zielen – zumindest als ein erster Schritt – auf die gut entwickelten und empfindlichen Techniken zur mRNA-Quantifizierung stützen. Außerdem identifiziert ein miRNA-Überexpressionsexperiment, das oft einfacher durchzuführen ist als eine vollständige Inhibition oder ein genetischer Knockout, offenbar die physiologisch relevanten Ziele. Vorsicht ist hier allerdings durchaus angebracht, da es erst wenige direkte Vergleiche gibt. Gute Programme für die Voraussage von Zielstrukturen können sicherlich dazu beitragen, neue Hypothesen aufzustellen, experimentelle Validierungen bleiben aber unerlässlich. Das wichtigste Ergebnis der beiden Veröffentlichungen ist aber, dass man miRNAs nicht mehr vornehmlich als translationale Repressoren ansehen sollte – sie sind vielmehr ein effizientes und spezifisches Erkennungssystem, mit dem sich Zielgene auf vielfältige Weise beeinflussen lassen. In manchen Fällen können sie sogar die Translation stimulieren!^[20] In Anbetracht einer solch komplexen Wirkung auf die betroffenen mRNAs stellt sich nun die Frage, wie man zwischen Auslöser und Folgeerscheinung unterscheiden kann: Waren alle abgebauten mRNAs zunächst translational re-

primiert, oder sind mRNA-Abbau und translationale Kontrolle komplett unabhängige Vorgänge?

Online veröffentlicht am 29. Dezember 2008

-
- [1] A. Z. Fire, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7094; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6966.
 - [2] C. C. Mello, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7114; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985.
 - [3] A. S. Flynt, E. C. Lai, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 831.
 - [4] W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, N. Sonenberg, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 102.
 - [5] M. Selbach, B. Schwanhauser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, N. Rajewsky, *Nature* **2008**, *455*, 58.
 - [6] D. Baek, J. Villen, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi, D. P. Bartel, *Nature* **2008**, *455*, 64.
 - [7] M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2006**, *7*, 952.
 - [8] J. Vinther, M. M. Hedegaard, P. P. Gardner, J. S. Andersen, P. Arctander, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e107.
 - [9] K. Förstmann, Y. Tomari, T. Du, V. V. Vagin, A. M. Denli, D. P. Bratton, C. Klattenhoff, W. E. Theurkauf, P. D. Zamore, *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e236.
 - [10] K. Okamura, A. Ishizuka, H. Siomi, M. C. Siomi, *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1655.
 - [11] E. P. Murchison, J. F. Partridge, O. H. Tam, S. Cheloufi, G. J. Hannon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12135.
 - [12] E. P. Murchison, P. Stein, Z. Xuan, H. Pan, M. Q. Zhang, R. M. Schultz, G. J. Hannon, *Genes Dev.* **2007**, *21*, 682.
 - [13] A. M. Denli, B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting, G. J. Hannon, *Nature* **2004**, *432*, 231.
 - [14] E. Bernstein, S. Y. Kim, M. A. Carmell, E. P. Murchison, H. Alcorn, M. Z. Li, A. A. Mills, S. J. Elledge, K. V. Anderson, G. J. Hannon, *Nat. Genet.* **2003**, *35*, 215.
 - [15] D. W. Lee, K. Y. Seong, R. J. Pratt, K. Baker, R. Aramayo, *Genetics* **2004**, *167*, 131.
 - [16] S. D. Hatfield, H. R. Shcherbata, K. A. Fischer, K. Nakahara, R. W. Carthew, H. Ruohola-Baker, *Nature* **2005**, *435*, 974.
 - [17] B. Haley, P. D. Zamore, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 599.
 - [18] L. P. Lim, N. C. Lau, P. Garrett-Engle, A. Grimson, J. M. Schelter, J. Castle, D. P. Bartel, P. S. Linsley, J. M. Johnson, *Nature* **2005**, *433*, 769.
 - [19] J. Brennecke, A. Stark, R. B. Russell, S. M. Cohen, *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e85.
 - [20] S. Vasudevan, Y. Tong, J. A. Steitz, *Science* **2007**, *318*, 1931.
-