

RNAi-teknologien

Årtiers største forskningsgennembrud Knockout af mRNA

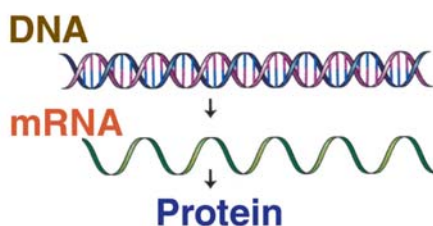
Det er blevet kaldt det største gennembrud i den medicinske forskning i årtier, og så var det nogle planteforskere, der nærmest snublede over det, da de ville gøre en violet petuniablomst endnu mørkere. I stedet for blev den hvid! Planteforskerne havde ved et tilfælde opdaget, hvordan naturen på sin egen måde lukker for et gen. I dette tilfælde det gen, der gør petuniaer violette.

En revolution

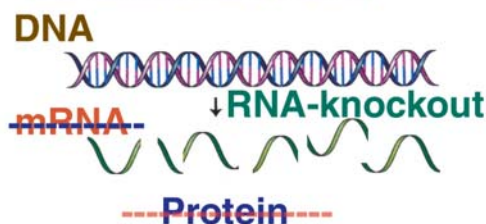
I dag er man klar over, at opdagelsen indvarsler en revolution i behandlingen af virussygdomme, sygdomme som vi ellers ofte står magtesløse over for. Den nye metode gør det også muligt at studere geners aktivitet. Dette kan få stor betydning, da virkningen af ca. 85% af menneskets gener stadig er ukendt, selv om DNA-sekvensen er kendt ⁽³⁰⁷⁷⁾.

Forskerne på University of Arizona kendte et

Normal afkodning af DNA (gener) til dannelse af et protein



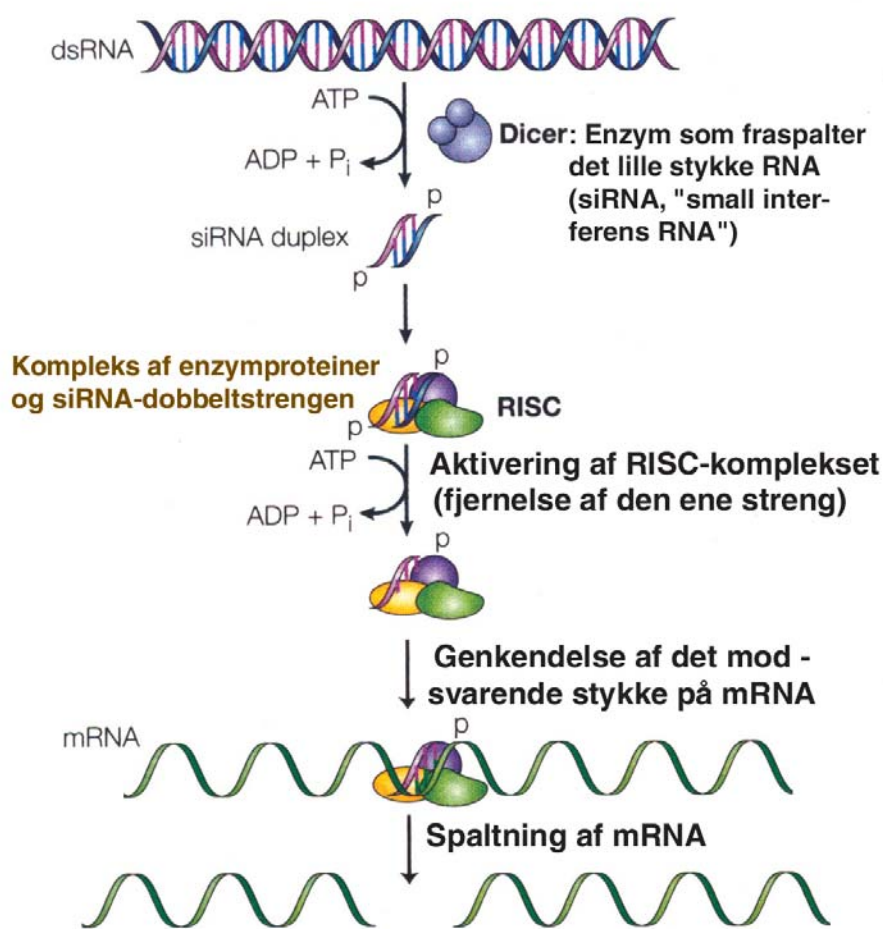
Situationen efter en RNA-knockout (der dannes ikke protein)



gen, som gør en Petuniaplantes kronblade mere violette. Man troede derfor naturligvis, at blomsten ville blive mørkviolet, hvis man indsprøjtede ekstra kopier af dette gen i planten. Resultatet var som sagt, at blomsterne i stedet blev helt hvide. Artiklen med beskrivelsen af dette forsøg udkom i 1990, og først 8 år senere fik man en forklaring.

Umiddelbart kunne forskerne konstatere, at genet for violet farve var blevet slået helt ud - og at også de indsatte ekstra kopier af genet havde mistet deres effekt i planten. Violetgenet var blevet inaktiveret - men hvordan? Genet selv, dvs. det DNA som det var opbygget af, var der ikke noget i vejen med. Det var kun genets proteindannende egenskab, som var bremset. Man kunne altså indsatte et ekstra gen, og risikere at den oprindelige kopi blev inaktivt. Alt var mystik, tilsyneladende.

Senere samme år opdagede andre forskere samme fænomen i andre planter, Man fandt også samme mekanisme hos mikroorganismer. Det kunne tyde på, at fænomenet var universalt, - at det forekom i alle organismer. Senere



viste det sig da også, at celler hos pattedyr og mennesker også kunne lukke deres geners funktion på denne måde. (Når det gælder basale fænomener er der ikke langt fra en menneskecelle til en plante- eller bakteriecelle!)

En forklaring

Der gik mange år, inden der kom en forklaring. Det skete først i 1998, hvor Andrew Fire fra Johns Hopkins University i Baltimore arbejdede med en rundorm. Han opdagede, at optagelse af små dobbeltstrengede RNA-stumper stopper for produktion af det protein, som

Opdagelsen af hvordan naturen inaktiverer gener på RNA-niveau

kan dannes ud fra en gens kode. (Et gen virker som kode for dannelsen af et protein. Men genets kode oversættes ikke direkte til protein - det sker via en arbejdskopi af genet, som kaldes meddeler-RNA (mRNA). Gener er opbygget af DNA. Kodeaflysningen sker altså sådan: DNA → mRNA → protein.

Petuniablomstens violet-gen inaktiveres ved at mRNA'et ødelægges inden det når at blive afkodet til dannelsen af et protein).

De små RNA-stumper, som Andrew Fire studerede, pirrer cellen til at nedbryde de mRNA-molekyler, som har samme sekvensopbyg-

ning, som RNA-stumperne selv. Da nedbrydningen sker før mRNA er blevet aflæst til dannelsen af en proteinkæde, ser det ud som om genet er blevet inaktivt.

Største medicinske gennembrud i årtier

Offentliggørelsen af denne opdagelse fik forskningen på området til at eksplodere. På et år steg antallet af videnskabelige artikler om emnet fra et hundrede stykker til over tusinde titler. For nylig skrev forskere i *Nature*, at det kan »revolutionere virusforskningen hos pattedyr« og give nye behandlingsmetoder mod virus⁽³⁰⁷³⁾. Opdagelsen af, hvordan naturen inaktiverer gener, blev kaldt det største medicinske gennembrud i årtier - af betydning på linie med opdagelsen af penicillin - en revolution inden for cellebiologi - og snart måske en revolution inden for kræftbehandling.

Lægemidler fungerer ofte ved indirekte at inaktive gener, og man kender desuden en lang række gener, som virker fremmede eller hæmmende på kræftudvikling. Gener, som medvirker til kræftudvikling, kaldes onkogener. Lægerne ville gerne kunne lukke for sådanne gener i kræftsvulsters celler.

Lad os igen repetere: Når et gen er aktivt (dvs. når dets kode aflæses), må der først dannes en kopi af genets DNA-streng. Kopien laves i form af et mRNA-molekyle. mRNA er altså cellens kopi af cellekerne-arvematerialets gener. mRNA bliver transporteret ud af cellekernen, og bliver ude i cellen brugt som kodemateriale under proteinkædens opbygning.

mRNA er hidtil blevet anset for at være et lidt kedeligt molekyle, som blot var transportbånd for cellekernens gen-information til cel-

lens cytoplasma, hvor proteindannelsen altså sker. mRNA er faktisk blot en simpel kopi af DNA, men mRNA er enkeltstrengt, hvorimod DNA er dobbeltstrengt.

Hemmeligheden bag den nye teknik er små dobbeltstrengede RNA-molekyler. Dobbeltstrengt-RNA (dsRNA) er grus i oversættelsesmekanismen af genetisk information. De små RNAi-stykker giver cellen besked på at ødelægge alt RNA, som har den pågældende sekvens - både det dobbeltstrengede og det enkeltstrengede! (Da mRNA

Dermed ville man kunne stoppe dannelsen af det protein, som normalt ville blive dannet på grundlag af mRNA-sekvensen.

Det viste sig, at RNAi-teknikken fungerer i praksis som man forventede. RNAi-teknikken vil kunne bruges mod inflammationstilstande og autoimmune sygdomme, bl.a. mod gigt. Det er proteiner, som skaber inflammation, og ved at blokere for disse proteins dannelse vil sygdomme som f.eks. gigt kunne lindres eller undgås.

disse genes funktion. Det ville blive lettere at studere dette, hvis man kunne slukke for enkeltgenes aktivitet, dvs. forhindre at genets kode bliver udnyttet til dannelse af dets tilsvarende protein.

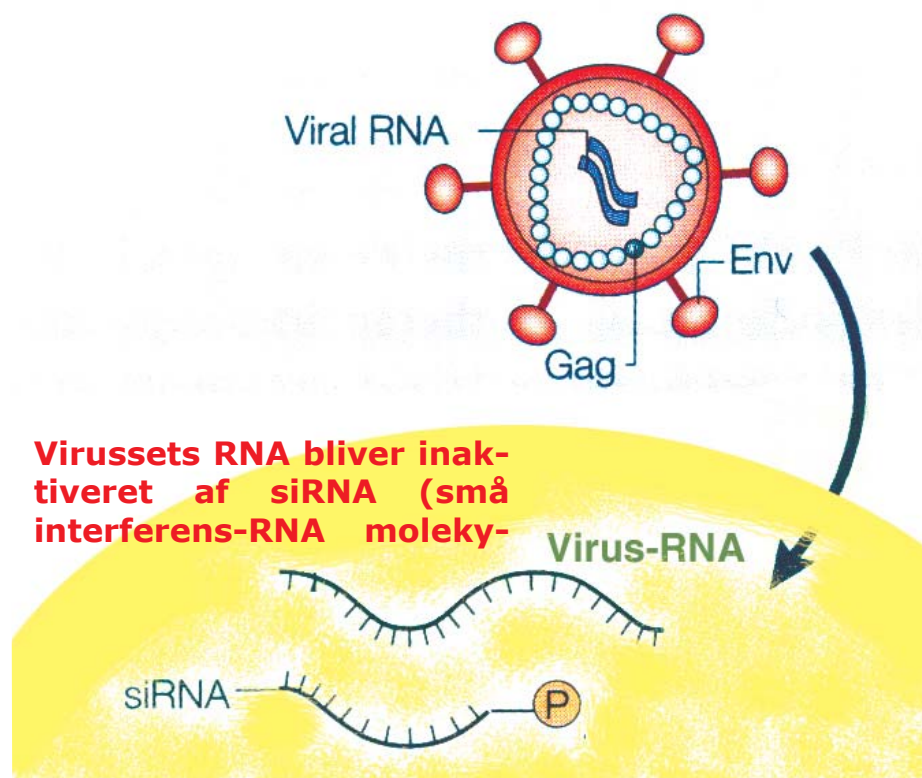
Den nye teknik kaldes RNA-interferens (»RNAi«) eller »naturens egen måde at lukke gener på«. Et enormt potentiale åbner sig, når man kan lukke og slukke for udvalgte gener.

Dobbeltstrengt RNA består af to komplementære strenge, ligesom man ser hos DNA. Hvis dobbeltstrengt RNA kommer ind i cellen bliver det hurtigt klippet i småstumper. Cellen opfatter det som fremmed og farligt. Cellen tror, at det er et virus, hvilket dobbeltstrengt RNA undertiden faktisk kan være. Vira, som danner dobbeltstrengt RNA, kan kun eksistere, fordi de har fundet på metoder til at undgå cellens forsvar.

De små stykker dobbeltstrengt RNA finder sammen med et særligt proteinkompleks, som regulerer aktiviteten af det gen, som genkendes af RNAi-stumperne.

Middel mod HIV ?

Man har i laboratorieforsøg vist, at RNAi-molekylerne kan bruges som våben mod HIV-virus og andre virus. Det viser sig, at hvis en celle på forhånd har et RNAi-beredskab mod HIV-proteiner, kan cellen ikke inficeres af HIV-viruset - fordi virusproteinerne ikke kan dannes. Og hvis cellen allerede er HIV-smittet, vil indførsel af RNAi-stumper forhindre virusets formering og spredning til andre celler. På samme måde har man eksperimentelt vist, at RNAi kan hæmme poliovirus samt virus, som giver livmoderhals-kræft.



er dannet ud fra koden i DNA, vil sekvenskoden naturligvis også kunne genfindes i DNA'et, men dette ødelægges ikke).

Dermed opstod ideen om RNAi-teknikken. Man burde derved kunne konstruere dobbeltstrengede RNAi-stykker, hvor den ene streng er lig med et område af et bestemt gen i cellen. Dette RNAi skulle så kunne standse oversættelsen af det mRNA, som svarer til genet.

Ny virusforskning

Virusinfektioner er svære at bekæmpe, men da de er baseret på dannelsen af bestemte proteiner ud fra virusgener, vil et stop for dannelsen af virusproteinerne være lig med en effektiv virusbekæmpelse.

Ud over disse anvendelsesmuligheder vil RNAi-teknik kunne blive fremtidens vigtigste værktøj til at udføre bioteknologi. Man kender i dag talrige gener, men ofte ikke

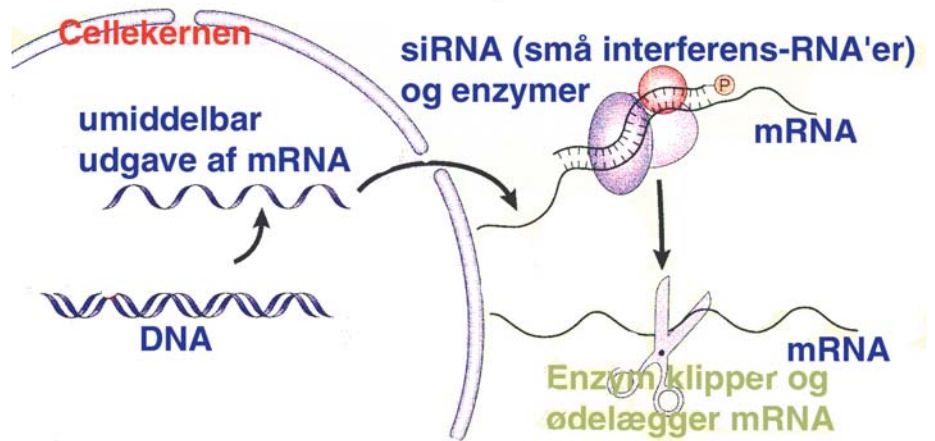
Hepatitis C virus, der menes at have ramt over 270 millioner mennesker verden over, er et enkeltstretet RNA-virus, som både fungerer som proteinkodende mRNA og som virussets arvemateriale. RNAi-molekyler mod dette virus reducerer »dramatisk« aktiviteten af virusgenerne til under 10%, skriver forskere. Man benyttede i forsøget dyrkede, inficerede menneskeceller, og virkningen begyndte inden der var gået 72 timer efter indførelsen af RNAi, og effekten var stadig til stede 3 uger senere. Forskerne til dette forsøg konkluderede, at RNAi vil kunne bruges til behandling af hepatitis-C infektion⁽³⁰⁷⁰⁾. Andre forsøg har vist, at RNAi kan bruges mod f.eks. Moloney leukemia virus og lentivirus⁽³⁰⁷¹⁾.

Et er teori - noget andet er praksis

Dette er altsammen kun laboratorieforsøg. Anvendelse i praksis kan være vanskeligere. Måske vil RNAi aldrig nå hen til det sted i kroppen, hvor det vil have en effekt - eller måske vil det ikke nå ud til alle de nødvendige steder i kroppen. Måske er høj koncentration af RNAi giftigt i blodet. Måske vil det aktivere immunsystemet på uheldig måde. Måske vil det blive nedbrudt før det når sit mål - således at man må finde på måder til at sammenkoble RNAi-molekylerne med andre stoffer, der kan virke beskyttende og transporterende.

Selv om man har forhåbninger om anvendelse af RNAi mod HIV-virus, kan der være vanskeligheder. F.eks. kan HIV-virus gemme sig i rum i cellen (bl.a. MHC-II compartments og vesikler). Her vil virusset være beskyttet og utilgængeligt for RNAi-molekylerne i flere måneder.

Desuden vil HIV-virus hurtigt udvikle mutationer, som er resistente overfor individuelle siRNA-stykker. Det har f.eks. allerede vist sig, at poliovirus kan undslippe et siRNA-knockout ved at mutere til nye virusformer. Men visse dele af HIV-genomet vil det være svært for



virusset at ændre på, fordi det kun sjældent muterer, som følge af at mutationer disse steder vil skade virussets evne til infektion. RNAi mod disse steder på virusset vil derfor virke bedre.

Et samtidigt angreb, som foretages af flere siRNA-molekyler mod forskellige dele af virusgenomet vil gøre det sværere for virussets mutationsforsvar: Det ville nemlig kræve flere samtidige mutationer. I praksis har det dog vist sig vanskeligere end det lyder, fordi forskellige siRNA-stykker kan konkurrere med hinanden, f.eks. er der konkurrence mellem CD4-specifik siRNA og CD8-specifik siRNA⁽³⁰⁷⁷⁾.

RNAi-teknikken kan under alle omstændigheder hjælpe forskerne til at få bedre forståelse af samspillet mellem HIV-virus og værten, og RNAi-teknikken kan vise nye målsteder i cellen, som kan bruges i virusbekæmpelse.

En naturlig teknik

Organismens celler er fra naturens hånd indrettet til at udføre RNAi-teknik, ja faktisk forstærker cellerne RNAi-signalet, idet cellen selv fabrikerer en masse nye kopier af det dobbeltstrengede RNAi. Laboratorieforsøg har vist, at RNAi-teknik-

ken derfor kan være hundrede eller tusinde gange mere effektiv end antisense-teknikken.

I planter synes RNAi at udgøre et immunsystem, som bekæmper virus og skadeligt DNA. I planter er RNAi også involveret i at guide vækstvæv (meristemer), hvilket er plantens stamcellevæv. Derfor er RNAi måske tilsvarende involveret i at hjælpe pattedyrs stamceller medens de udvikler sig til andre væv. RNAi er måske et vigtigt middel til at manipulere og styre stamceller. Men det betyder også at små ændringer i RNAi måske kan føre til kræft.

Påvisning af gensers funktioner

Alle 19.099 gener i rundormen *Caenorhabditis elegans* blev som det første dyr påvist ud fra den færdige kortlægning i 1998 af de 96.893.008 basepar i ormens DNA (menneskets DNA er 30 gange større), men genernes funktion forblev ukendt.

Nu er man imidlertid begyndt at studere de enkelte geners funktion: Man er i dag nået så langt, at alle generne i 2 ud af ormens 6 par kromosomer er blevet slukket ét ad gangen for at studere virkningen. Ormen bliver fodret med kolibakterier, som er i stand til at danne et bestemt RNAi-molekyle. Når ormen har ædt dette RNAi bliver det spredt til ormens forskellige celler, ja selv til gonaderne, og her slukker RNAi for det gen, som det er rettet imod. Resultatet ses som en ændring i ormens fysiologi, adfærd, udvikling osv.

Samme metode bliver nu anvendt til at studere andre celler i laboratorieforsøg: Man blokerer for enkeltgeners aktivitet og studerer virkningen på cellerne. Metoden anvendes i stadig flere laboratorier til studier af bananfluer, gåsemadplanter, zebrafisk, kolibakterier og Neurospora-svampe. RNAi-teknikken bruges nu også til at lukke for humane cellers aktivitet i cellekulturer.

Det har vist sig, at små RNAi-stumper på kun 21-23 nukleotid-enheder (såkaldte siRNA) dannes naturligt ved opklipping af større RNAi-molekyler. Opklippingen sker ved hjælp af et enzym, kaldet

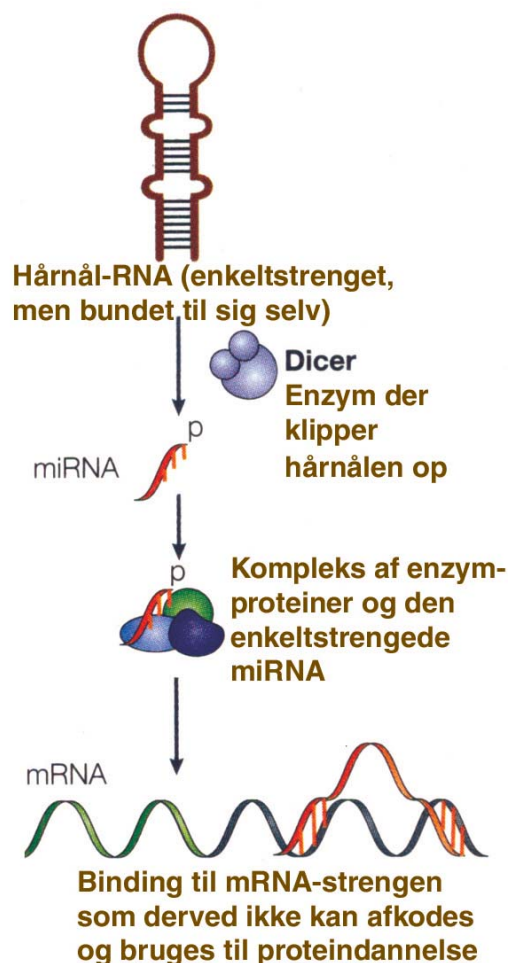
»Dicer«. mRNA-molekylerne klippes også i stumper på 21-23 nukleotid-enheder, og mister derved deres funktion som kode og skabelon for proteindannelsen. I denne lille størrelse kan RNAi virke blokerende i bananflue-celler og i pattedyr-celler uden at aktivere disse cellers forsvar mod RNAi. Det er vigtigt, fordi

pattedyrceller har et særligt forsvar (»gamma-interferon-responset«), som træder i kraft, når RNAi-stykkerne er på over 30 basepar.

Cellen har et mobilt destruktionsanlæg for RNA. Det er velkendt, at mRNA er et ustabil molekyle i cellen, fordi det hurtigt nedbrydes af cellens enzymer. RNAi-stumperne virker i cellen som en førerhund, der viser hen til det mRNA, som skal destrueres: De små stumper af siRNA på 21-23 enheder kobles i cellen sammen med forskellige proteiner, som har enzymaktivitet (enzymerne endonuklease, og helicase). Dette enzymkompleks kaldes RISC (RNA-induced Silencing Complex). Det er dette, som udgør det mobile destruktionsanlæg: I RISC-komplekset opsnoes det dobbeltstrengede, snoede siRNA af helicase-enzym, hvorefter RISC-destruktionsanlægget benytter sekvensen fra den siRNA-streng, som har antisense-virkning mod mRNA, til at lokalisere dette mRNA i cellen og nedbryde det ved hjælp af ribonuklease-enzymet

i RISC-komplekset (ref.3, ref.3073).

Specielt til pattedyr kan man alternativt anvende særlige »små hårnåle-RNA« (»small hairpin«, shRNA). Derved kan man opnå en blivende hæmningsvirkning på et gen. Dette kan tænkes anvendt til at fremstille transgene pattedyr og til udvikling af nye medicinske anvendelser. Man kan også opnå en vedvarende hæmning ved at få et gen til på kontinuerligt måde at producere siRNA.



Hårnåle-udgaver af RNA kan give mere varige hæmninger af proteinkodningen fra et gen

Geners funktion kan studeres med andre metoder end RNAi, men de er mere besværlige, mindre effektive, mere tidsrøvende og dyrere. Man har tidligere forsøgt at afbryde geners funktion ved at inaktivere mRNA'et med den såkaldte antisense-teknik, hvor syntetiske DNA- eller RNA-enkeltstrengede binder sig til udvalgte mRNA-analoger, som derved inaktiveres, således at proteindannelsen stoppes. Man troede meget på antisense-teknikken, men den viste sig vanskelig at udnytte. RNAi-teknikken er anderledes, fordi det er en naturlig proces. Tidligere anvendte metoder er:

- »antisense-vektorer«

RNA eller DNA, som komplementær-bindes til mRNA eller dets gen

- »ribozymer«

Enzymatiske RNA-molekyler, som spalter mRNA med komplementær-sekvens

- »aptamer-biblioteker«

cDNA-som koder for korte peptide)

- »genetiske suppressor-elementer«

cDNA-fragmenter, der indvirker på funktionen af et gen.

Funktionen af et gen hos mennesket kan ofte studeres i andre dyr, som har næsten samme gen. F.eks. er der i ormen *Caenorhabditis elegans* fundet 305 gener, som formindsker fedtdepoterne og 112 gener, som forøger fedtdepoterne. Nogle af disse gener har homologe partnere i andre pattedyr, hvor de også er involveret i fedtstofskiftet. Det viser at fedtstofskiftet er bevaret gennem evolutionen, og at ormen derfor kan bruges som en model for menneskets fedtstofskifte og stofskiftesygdomme. Det er iøvrigt interessant at visse fejl i stofskiftfunktionen og fejl i mitokondrierne hos ormen medførte længere (!) levetid⁽³⁰⁷⁷⁾.

Ændret gén-udtryk uden at genet er blevet ændret

Man har undret sig over et genetisk fænomen, hvor ændringer i génudtryk (genekspresion) forekommer over mindst én generation - uden at der er tale om ændringer i DNA-koden. Fænomenet kaldes »epigenetics« (ref.2). En forklaring på fænomenet kan være, at kromosomerne bliver mindre kompakte eller mere kompakte, hvorved aktiviteten af visse gener ændres. Årsagen kan være RNAi, idet RNAi har stor indflydelse på formen af kromatinet, - dvs. det DNA+protein materiale, som kromosomerne er opbygget af. Hvis gærceller gøres ude af stand til at lave RNAi, kan de ikke danne det tætte såkaldte »heterokromatin«, som opstår omkring centromeren under en celledeling, og som udgør kromosomernes slanke »talje«. RNAi-molekylerne

er derfor nødvendige for korrekt celledeling.

Det tætte »heterokromatin« har meget lidt genaktivitet, og RNAi-molekylerne synes i det hele taget at kunne begrænse genaktiviteten.

Udvikledes RNAi som beskyttelse mod hoppende gener ?

Hoppende gener, dvs. DNA-områder, som kan flytte mellem flere destinationer, kan ødelægge gens funktion ved at hoppe midt ind i et gen. Måske udvikledes RNAi som et modtræk hertil^(ref.2). RNAi udvikledes måske allerede meget tidligt i evolutionen for at beskytte genomet mod ustabilitet.

RNAi - betydning for fosterudviklingen

Der er tegn på, at RNAi-stumperne måske bruges af biologiske organismer under deres udvikling. Under en organismes udvikling vil mange celler skulle gå til grunde for at give plads til andre celletyper. Her kan RNAi måske spille en rolle (ref.2).

Sygdommen »fragile X syndrom« har måske noget med RNAi at gøre⁽³⁰⁶⁹⁾. Sygdommen er den hyppigste mentale sygdom med arvelig baggrund, og rammer 1 ud af 4000 mænd og 1 ud af 8000 kvinder. Defekten skyldes manglende funktion hos et gen, som kaldes »fragile X mental retardation 1 gene (FMR1)«. Det FMRP-protein, som genet koder for, er nødvendig for den tidlige udvikling af nervesystemet. FMRP-proteinet synes at arbejde sammen med RNAi, enzymkomplekset RISC og det såkaldte Dicer-enzym, som klipper dobbeltstrengt RNA i små stykker. Det kan tyde på, at defekter i RNAi-systemet i cellen kan medføre sygdomme og arvelige defekter.

Industrielt brug af RNAi

Nogle firmaer er begyndt at udvikle lægemidler på grundlag af RNAi-teknikken. Det gælder f.eks. et lille nyt tysk firma, Cenix Bioscience, der blev etableret til formålet. Firmaet afprøver metoden i kræftforsøg på mus, og har umiddelbart ikke konstateret toksiske virkninger. Ifølge firmaets direktør Christoph Echeverri fra firmaet er RNAi-teknikken ekstremt lovende.

Firmaet Qiagen har markedsført et testsæt, som på grundlag af RNAi-teknik kan afprøve 5000 forskellige stoffer samtidig. Firmaet markedsførte i 2003 et siRNA-testsæt, der var specifik for SARS-coronavirus, samt indledte kliniske forsøg med et lægemiddel mod SARS (mod virussets protease-enzym). Desuden har firmaet indgået en aftale med Novartis om at syntetisere et siRNA-bibliotek for hele menneskets genom.

Også siRNA'ets *sense*-streng kan undertiden virke inaktiverende på mRNA, og firmaet Dharmacon har udviklet en metode, så kun *antisense*-strengen virker, hvorimod *sense*-strengen blokeres^(ref.6).

Ref.1: Biotech Denmark nov.2002 s.14-15 (Lone Frank). Artiklen bygger på interviews med Peter Arctander, prof. KU, afd. f. evolutionsbiologi; Peter E. Nielsen, prof. KU, inst. f. medicinsk biokemi & genetik, samt forskningschef i Pantheco A/S; Daniel Jeffares, post. doc. på KU, afd. f. evolutionsbiologi; Finn Cilius Nielsen, overlæge i klinisk biokemi, Rigshospitalet; og Christoph Echeverri, direktør i Cenix Bioscience. **Ref.2:** Science bd.298 20. dec.2002 s.2296-97. **Ref.3** BioZoom nr.4 2002 s. 30-33 (Rikke Møller, Ole Hørring, Nils J. Færgeman, Inst.f.Biokemi og Molekylær Biologi, SDU, nils.f@bmb.sdu.dk). **Ref.4:** Nature bd. 391, s.806-11, 1998 (A.Fire m.fl.). »Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*«. **Ref.5** Nature Reviews, dec. 2003 "RNAi collection". **Ref.6:** <http://www.dharmacon.com>. **Kilde iøvrigt:** www.rnai.net.



Opbygningen af det dobbeltstrengede RNA-interferens molekyle