

NOBELPREIS FÜR PHYSIOLOGIE ODER MEDIZIN 2024

Die Regulation der Genaktivität durch microRNA

Im Rahmen ihrer Studien zur Larvalentwicklung von *Caenorhabditis elegans* entdeckten Victor Ambros und Gary Ruvkun erstmals das Prinzip der posttranskriptionalen Regulation von Genaktivitäten durch microRNA. Sieben Jahre später zeigten Ruvkun und Mitarbeiter anhand der microRNA let-7, dass dieser Mechanismus bei Metazoen bis hin zum Menschen weit verbreitet und nicht nur für die Individualentwicklung, sondern auch für die Physiologie adulter Organismen bedeutsam ist.

Eine Kernfrage der Entwicklungsbiologie betrifft die zeitlich und zellspezifisch regulierte Expression von Genen. Bis 1993 konnte man in diesem Zusammenhang lediglich die Regulation auf der Ebene der Transkription von Genen. Welche Gene zu welchem Zeitpunkt abgelesen werden, bestimmt dabei die Interaktion der genomischen DNA mit speziellen Proteinen, den Transkriptionsfaktoren.

Victor Ambros (*1953, Hanover, USA) und Gary Ruvkun (*1952, Berkeley, USA) stellten als erste fest, dass Genaktivität auch auf der Ebene der Translation reguliert wird. Das vermittelt die Bindung nicht-kodierender microRNA an komplementäre Sequenzen der messengerRNA. Als postranskriptionale Genregulation hat dieses Prinzip mittlerweile Einzug in die Lehrbücher der Molekularbiologie gehalten.



Victor Ambros
(© Ill. Niklas Elmehed, Nobel Prize Outreach)



Gary Ruvkun
(© Ill. Niklas Elmehed, Nobel Prize Outreach)

Die beiden Laureaten kooperierten seit ihrer gemeinsamen Postdoktorandenzeit in den 1980er Jahren,

als sie bei H. R. Horvitz am *Massachusetts Institute of Technology* (Cambridge, USA) Mutanten des Fadenwurms *C. elegans* mit anormaler Individualentwicklung untersuchten. Dieser Nematode war wenige Jahre zuvor dank seiner kurzen Generationszeit, transparenter Gestalt und Empfänglichkeit für genetische Manipulationen zum Modellorganismus der Entwicklungsbiologie avanciert.

Einer der damals bekannten Mutanten, *lin-4*, fehlen manche Organe völlig und im Körper der adulten Würmer häufen sich ungewöhnlich viele Eier an. Bereits diese Abnormalitäten nährten den Verdacht, dass *lin-4* während der Individualentwicklung von *C. elegans* eine Schlüssel-funktion bei der Genregulation einnimmt. Eine weitere Mutante, *lin-14*, verharrt im Larvenstadium und bleibt klein (Abbildung 1). Der Charakterisierung solcher Mutanten widmeten beide Laureaten ihre weitere wissenschaftliche Laufbahn.

Nicht-kodierende RNA ...

Die für einen abnormen Phänotyp verantwortlichen Gene zu identifizieren, war damals eine große Herausforderung – besonders bei kurzen offenen Leserastern wie dem von *lin-4*. Victor Ambros und Mitarbeitern an der Harvard-Universität (Cambridge, USA) gelang die Klonierung dieses Gens, indem sie DNA-Fragmente aus dem Genom von *C. elegans* auf ihre Fähigkeit testeten, den Phänotyp der *lin-4*-Mutante zu korrigieren. Da Verän-

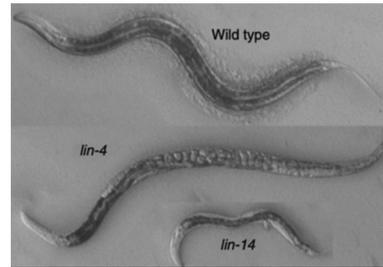


ABB. 1 Durch Mutationen veränderter Phänotyp von *Caenorhabditis elegans*. Aufgrund von Störungen der Individualentwicklung fehlen bei der *lin-4*-Mutante bestimmte Organe und der Körper ist mit Eiern angefüllt. Die *lin-14*-Mutante bleibt klein. Abb. aus [4].

derungen des Leserasters innerhalb der *lin-4* enthaltenden Genomregion die Funktion des Gens nicht beeinträchtigten, mutmaßten sie, dass das *lin-4*-Gen kein Protein kodiert. Den Beweis dafür lieferten Northern-Blot-Analysen und RNase-Schutz-Experimente, die dem *lin-4*-Gen zwei kurze Transkripte von 61 bzw. 22 Nukleotiden zuwiesen.

... als Schlüsselement der Genregulation

Gary Ruvkun hatte sich an der *University of California at Berkeley* (USA) der Charakterisierung des *lin-14*-Genprodukts, eines Proteins im Zellkern mit starker Expression während des ersten Larvenstadiums von *C. elegans*, verschrieben. Dabei fielen Deletionen innerhalb des nicht translatierten 3'-Endes (3'-UTR, UTR = untranslatierte Region) der messengerRNA auf, die zu einer über das erste Larvenstadium hinaus verlängerten Bildung des Lin-14-Proteins führten. Und auch *lin-4*-Mutanten bilden Lin-14 länger als der Wildtyp.

Beim Austausch ihrer Forschungsergebnisse stellten Ambros und Ruvkun teilweise komplementäre Abschnitte innerhalb der unabhängig voneinander gewonnenen Gensequenzen fest. Darauf aufbauende Experimente untermauerten das damals völlig neue Konzept der posttranskriptionalen Regulation der

Genaktivität durch Basenpaarung einer nicht-kodierenden RNA mit der 3'-UTR einer messengerRNA (Abbildung 2).

Bei einigen der zahlreichen *lin-14*-Mutanten fanden sich Veränderungen in der 3'-UTR des Gens, die bewirkten, dass die vier- bis siebenfache Menge des Lin-14-Proteins gebildet wurde, obwohl die Menge der messengerRNA gegenüber dem Wildtyp unverändert blieb. Demnach wirkt *lin-4* als negativer Regulator der Genaktivität von *lin-14*, der nicht nur die Zeitspanne der Bildung des Lin-14-Proteins während der Larvalentwicklung begrenzt, sondern auch die Proteinmenge.

Ein weiteres wichtiges Indiz in der Beweiskette war die Kopplung der 3'-UTR von *lin-14* an ein Reportergen, dessen Expression infolgedessen ebenfalls durch die *lin-4*-RNA reguliert wurde [1]. Dabei kann die Bindung der *lin-4*-RNA an die Ziel-RNA durch eine einzige Punktmutation innerhalb des zur 3'-UTR komplementären Sequenzabschnitts verhindert werden. Infolgedessen büßt die *lin-4*-RNA ihre regulatorische Funktion ein [2]. Zusammengefasst gelten diese Indizien als schlüssige Beweise für die Genregulation auf Ebene der messengerRNA.

Ein während der Evolution konservierter Mechanismus

Solange die posttranskriptionale Genregulation lediglich bei Fadenwürmern gezeigt war – Sequenzhomologe zu *lin-4* fanden sich ausschließlich bei anderen Spezies der Gattung *Caenorhabditis* –, wurde das neue Konzept von der Fachwelt wenig beachtet. Das änderte sich schlagartig mit der Entdeckung einer weiteren nicht-kodierenden RNA, *let-7*, durch Forscher um Gary Ruvkun [3]. Diese 21 Nukleotide kurze, nicht-kodierende RNA spielt beim Übergang zum Adultstadium der Fadenwürmer eine Rolle und weist komplementäre Sequenzen zu

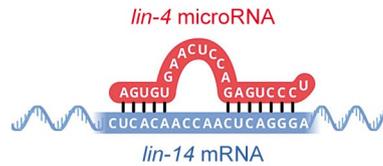


ABB. 2 Bindung der nicht-kodierenden microRNA *lin-4* an komplementäre Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region der *lin-14*-messengerRNA. Abb. aus [4].

mehreren zeitlich regulierten Genen auf, darunter *lin-14*. Auch der Funktionsverlust von *let-7* führt bei Fadenwürmern zu Entwicklungsstörungen.

Anders als bei *lin-4* fanden sich Sequenzhomologe zu *let-7* bei zahlreichen Metazoa, von der Taufliege *Drosophila* bis hin zum Menschen. Entsprechendes gilt für eines der Zielgene von *let-7*, nämlich *lin-41*. Damit nicht genug: Auch die 3'-UTR der *lin-41*-Orthologen von Taufliege und Zebrafisch weist zu *let-7* komplementäre Sequenzen auf.

Damit war der Grundstein gelegt für eine umfassende Prüfung der entwicklungsbiologischen Bedeutung der posttranskriptionalen Regulation von Genaktivitäten. Dieser Mechanismus erwies sich auch bei Insekten und Crustaceen als relevant während der Embryonalentwicklung, und bei Wirbeltieren wird die Expression von *let-7* während der Embryonalentwicklung zeitabhängig gesteuert.

Inzwischen haben zahlreiche weitere Labors dazu beigetragen, eine Vielzahl nicht-kodierender RNAs mit entsprechender regulatorischer Funktion bei unterschiedlichsten Organismen nachzuweisen. Eine Datenbank (miRBase) für diese so genannten microRNAs listet mittlerweile an die 50.000 Sequenzen aus 271 Spezies.

Die anhand verschiedener Organismen charakterisierten molekularen Mechanismen weisen auf ein während der Evolution bewährtes

Prinzip: microRNAs werden aus längeren Primär-Transkripten gebildet. Diese pri-microRNAs sind durch eine Haarnadelstruktur gekennzeichnet und werden noch im Zellkern durch die so genannte Drosha-Endonuklease zu pre-microRNAs mit 60–70 Nukleotiden verkürzt. Nach Translokation in das Cytoplasma spaltet die Endonuklease DICER die Haarnadel zu einer RNA-Duplex mit zwei getrennten Strängen. Nur einer von diesen ist wirksam und bindet an den Protein-Komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*), um mit der Ziel-RNA zu interagieren und entweder deren Translation zu hemmen oder ihren Abbau zu fördern.

Im Hinblick auf die Prozessierung und Assoziation mit RISC zeigen die microRNAs Gemeinsamkeiten mit anderen doppelsträngigen RNAs, darunter siRNAs. Letztere sind für die Abwehr von Viren, Retrotransposons oder anderen mobilen Nukleinsäuren wichtig, unterscheiden sich also in ihrer Funktion von den microRNAs.

Die funktionelle Bedeutung der microRNAs, die hier nur kurz gestreift werden konnte, manifestiert sich anhand seltener Erbkrankheiten des Menschen: Mutationen in der microRNA-184 führen zu Entwicklungsstörungen am Auge und angeborener Linsentrübung (EDICT-Syndrom), Mutationen in der miRNA-96 zu progressivem Hörverlust und Mutationen in der microRNA-140-4p zu einer angeborenen Skelett-Erkrankung [3].

Literatur

- [1] B. Wightman, I. Ha, G. Ruvkun (1993). *Cell* 75, 855–862.
- [2] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros (1993). *Cell* 75, 843–854.
- [3] A. E. Pasquinelli et al. (2000). *Nature* 408, 86–89.
- [4] R. Sandberg (2024). Scientific background for the discovery of microRNA and its role in post-transcriptional gene regulation. www.nobelprize.org

Annette Hille-Rehfeld, Stuttgart