

# Neuer Mechanismus der Genregulation

## MicroRNAs schalten direkt Gene ab



► Prof. Dr. Ralf Reski, Fakultät für Biologie, Lehrstuhl Pflanzenbiotechnologie Universität Freiburg



► PD Dr. Wolfgang Frank, Fakultät für Biologie, Lehrstuhl Pflanzenbiotechnologie Universität Freiburg

### DICER-Proteine im Moos *Physcomitrella patens*

MiRNAs spielen für fast alle Lebewesen eine zentrale Rolle bei der Genexpression. Die beiden US-amerikanischen Forscher Mello und Fire erhielten 2006 den Nobelpreis für Medizin, weil sie zeigten, wie kleine RNAs im Fadenwurm *C. elegans* mit

**MicroRNAs (miRNAs) sind kleine RNA Moleküle, die typischerweise aus 21–23 Nukleotiden bestehen. MiRNAs können sich komplementär an die Boten-mRNA anlagern, was zu deren Spaltung führt oder die Translation verhindert. Forscher des Exzellenzclusters BIOS, Centre for Biological Signalling Studies, der Universität Freiburg entdeckten nun, dass miRNAs die Genexpression schon bei der Transkription beeinflussen, indem sie die DNA methylieren und damit Gene direkt epigenetisch abschalten.**

den Boten-RNAs (mRNAs) bestimmter Gene wechselwirken und dadurch die Genexpression herunter regulieren. In diesem Prozess spielt das DICER-Protein des Wurms eine zentrale Rolle.

Im Gegensatz dazu hat das Moos *Physcomitrella patens* vier verschiedene DICER-Proteine. Das Kleine Blasenmützenmoos ist der bevorzugte Forschungsorganismus des Freiburger Biologenteams. Moos ist die einzige bekannte Landpflanze, bei der Gene vergleichbar gezielt wie in der Hefe abgeschaltet oder verändert werden können. Um die Funktion der DICER-Proteine aufzuklären, zerstörten die Freiburger zunächst die DICER-Proteine PpDCL1a und PpDCL1b, von denen bekannt war, dass ein ähnliches Protein AtDCL1 in der Blütenpflanze *A. thaliana* die miRNA-Biogenese steuert.

Die Null-Mutanten von PpDCL1a zeigten starke phänotypische Abweichungen, sie wuchsen kaum und bildeten keine Blätter (Abb. 1). Um die miRNA-Bildung in ihnen zu untersuchen, maßen die Forscher die Konzentrationen verschiedener miRNAs. Es stellte sich heraus, dass die Expression aller miRNAs stark reduziert war, die Konzentrationen ihrer Ziel-RNAs hingegen zeigten sich deutlich

erhöht. Dies bewies nun, dass PpDCL1a als ausschlaggebendes Protein für die miRNA-Biogenese in *P. patens* zuständig ist.

### Ähnlich, aber doch verschieden

Die Prüfung auf mögliche Gemeinsamkeiten der beiden homologen DICER-Proteine 1a und 1b ergab, dass PpDCL1b Null-Mutanten gleichfalls starke Entwicklungsstörungen aufweisen (Abb. 2). Sie wachsen aber signifikant schneller und bilden vereinzelt sogar beblätterte Gametophoren aus. Die gemessenen Konzentrationen verschiedener miRNAs unterschieden sich jedoch nicht vom Wildtyp (WT). Folgerichtig wird PpDCL1b nicht für die Bildung von miRNAs benötigt und die Missbildung des Moooses kann nicht durch fehlende miRNAs ausgelöst sein. Bei der Überprüfung der Ziel-RNAs zeigte sich den überraschten Forschern dann, dass die durch miRNA-vermittelte Spaltung der Ziel-RNAs trotz normaler miRNA-Konzentrationen ausblieb: PpDCL1b ist also an der Spaltung von RNA durch miRNAs beteiligt.

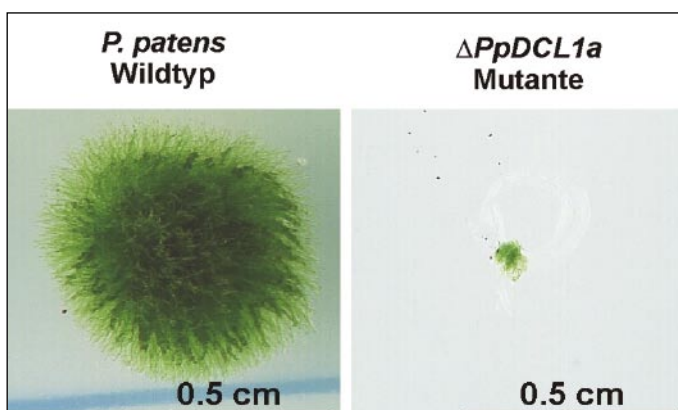


Abb. 1: Vergleich von *P. patens* Wildtyp und der PpDCL1a-Mutante

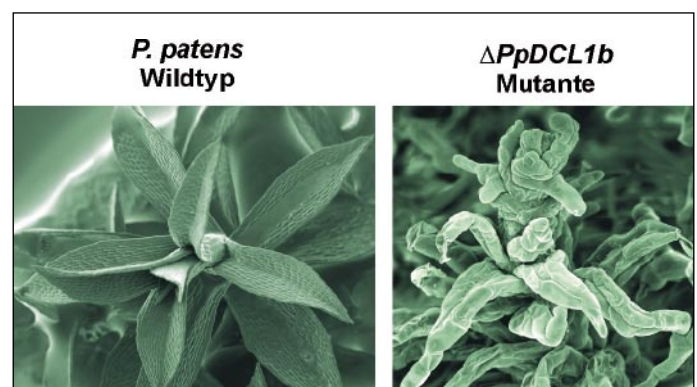


Abb. 2: Vergleich von *P. patens* Wildtyp und der PpDCL1b-Mutante (elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gametophoren)

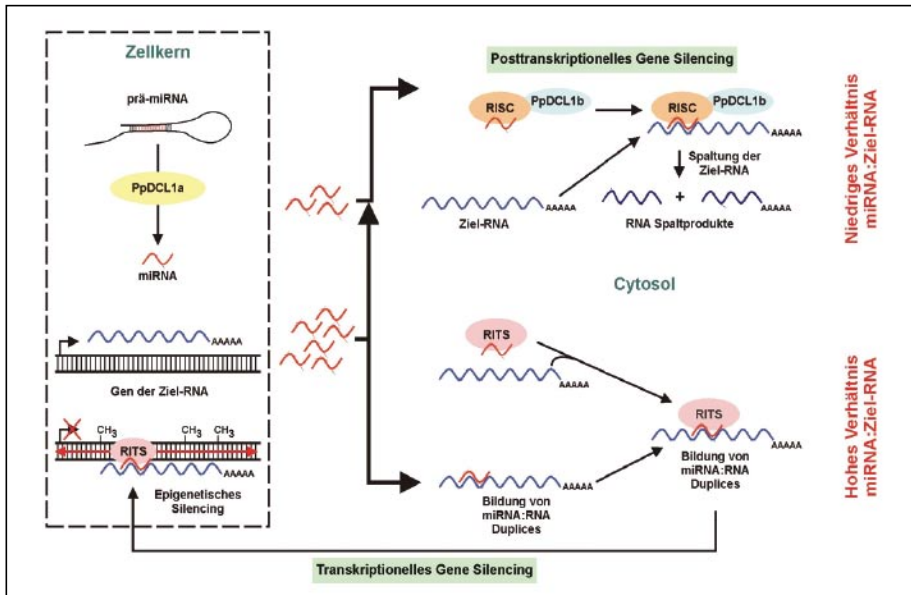


Abb. 3: Modell zur posttranskriptionellen und transkriptionellen Regulation von miRNA-Zielgenen

### Epigenetische Kontrolle

Ein weiteres unerwartetes Ergebnis ergab die Untersuchung der Ziel-RNA-Mengen in den PpDCL1b-Mutanten. Obwohl diese Ziel-Transkripte nicht durch miRNAs gespalten wurden, lagen sie in deutlich geringerer Konzentration vor.

Mögliche Ursache konnte eine epigenetische Kontrolle derjenigen Gene sein, die die miRNA-Ziele kodieren: Nun untersuchten die Forscher verschiedene Bereiche der entsprechenden Gene, in PpDCL1b Mutanten waren alle methyliert, im WT dagegen nicht. Demnach werden Gene, die miRNA-Ziele kodieren, in PpDCL1b-

Mutanten spezifisch durch DNA-Methylierung abgeschaltet. Um sich dieses Phänomen erklären zu können, entwarfen die Wissenschaftler ein Modell (Abb. 3), in dem miRNAs nicht wie gewohnt in einen RNA-induced silencing complex (RISC) geladen werden und ihre entsprechenden Ziel-RNAs abbauen. Stattdessen werden sie in einen RNA-induced transcriptional silencing complex (RITS) eingelagert. Dabei bilden sich stabile miRNA:mRNA Duplices, die den RITS-Komplex an die richtige Stelle der DNA leiten, wo er dann die Methylierung der Gene bewirkt. Während PpDCL1a für die miRNA-Biogenese benötigt wird, ist PpDCL1b essentiell für einen spaltungsfähigen RISC Komplex. Bei geringem miRNA:Ziel-RNA Verhältnis wird die Genexpression posttranskriptionell durch RISC gesteuert. Nach dem Beladen von miRNAs in RISC bilden sich durch Basenpaarung miRNA: Ziel-RNA Duplices, was zur Spaltung der RNA führt. Das Ausschalten von PpDCL1b verhindert diese Funktionsweise und führt zur Genabschaltung durch RITS. Hormonbehandlung erhöht im Wildtyp die miRNA-Konzentration und somit das miRNA:Ziel-RNA Verhältnis. Überschüssige miRNAs werden entweder in einen RITS Komplex aufgenommen und bilden dann mit ihrer Ziel-RNA einen Duplex oder sie bilden zuerst Dupli-

ces und werden dann in RITS integriert. Die an RITS gebundenen miRNA:RNA Duplices vermitteln anschließend die DNA-Methylierung der komplementären Gen-Loci. Der Komplex ist dabei in der Lage, die DNA-Methylierung über große Bereiche des Gens auszuweiten.

Diese basengepaarten miRNA:mRNA Duplices konnten auch in PpDCL1b Mutanten nachgewiesen werden, im WT aber nicht.

## Die Menge macht's

Um das Modell zu stützen, brachten die Freiburger Forscher eine künstliche miRNA, genannt amiRNA, die gegen ein Kontrollgen (PpGNT1) gerichtet war, in die PpDCL1b-Mutanten und den Wildtyp ein. Wie vorhergesagt, ließen sich im Wildtyp PpGNT1 mRNA-Spaltprodukte finden, in den Mutanten nicht. Die Konzentration der PpGNT1-Transkripte war daher im WT geringer, in den Mutanten aber noch tiefer, weil das PpGNT1-Gen methyliert und entsprechend nicht normal transkribiert wurde. Allerdings zeigten sich auch bei einer Wildtyp-Linie, die hohe Mengen exprimierter amiRNA-GNT1 aufwies, methylierte PpGNT1-Bereiche. Weil dies bei geringen amiRNA-GNT1 Konzentrationen jedoch nicht der Fall war, vermutete das Forscherteam, die Methylierung hänge vom Mengenverhältnis von miRNA zu seiner Ziel-RNA ab. Auch beim WT könnten also Gene abgeschaltet werden, falls die miRNA-Konzentration einen Schwellenwert überschreitet und sich dann stabile miRNA:RNA Duplices ausbilden.

## Hormone können die Methylierung steuern

Kann dies ein genereller Mechanismus der Genregulation sein? Um das herauszufinden, überprüften die Biologen einen WT unter ver-

änderten physiologischen Bedingungen. Sie gaben ihm das Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA), einen Regulator der Stressantwort, der die Expression des Gens PpbHLH in *P. patens* unterdrückt. Die PpbHLH-mRNA wird von miRNA1026 reguliert, und nun zeigte sich bei der Zugabe von ABA, dass die miRNA1026-Konzentration anstieg und sich Spaltprodukte der PpbHLH-mRNA fanden. Nach der Behandlung mit dem Hormon ließ sich darüber hinaus eine Methylierung des PpbHLH-Gens feststellen, bei einem Kontrollgen hingegen nicht. Analog zu dem Modell der Forscher wiesen auch nur Proben, die mit ABA behandelt wurden, stabile miRNA1026:PpbHLH-mRNA Duplices auf. Das miRNA-gesteuerte Abschalten des PpbHLH Gens könnte also Teil der Anpassung an abiotischen Stress sein. In Pflanzen ist dies ein neu entdeckter Mechanismus, auf Stress zu reagieren.

## Ausblick

Es ist gut möglich, dass dieser neu entdeckte Mechanismus der Genregulation nicht nur für das Kleine Blasenmützenmoos Geltung besitzt, sondern auch für andere Eukaryoten, eventuell sogar den Menschen.

## Literatur

- [1] Fire A. S. et al.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–11 (1998)
- [2] Khraiweh B. et al.: Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 140, 111–122 (2010)
- [3] Khraiweh B. et al.: Specific gene silencing by artificial microRNAs in *Physcomitrella patens*: An alternative to targeted gene knockouts. *Plant Physiology* 148, 684–693 (2008)
- [4] Swami M. An epigenetic silencing influence. *Nature Reviews Genetics* 11, 172–173 (2010)

Der Originaltitel der Veröffentlichung lautet: „Transcriptional control of gene expression by microRNAs“ und erschien in *CELL* 140( 8. Januar 2010, S. 111)

**Co-Autoren: Jacob Anz, ETH Zürich und Christiane Gieseck-Anz, BIOS, Universität Freiburg**

Neben PD Dr. Wolfgang Frank und Prof. Ralf Reski waren Dr. Basel Khraiweh, Dr. M. Asif Arif, Dr. Gotelinde I. Seumel aus Freiburg sowie Stephan Ossowski und Prof. Detlef Weigel vom MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen an dieser Studie beteiligt. Gefördert wurden die Arbeiten der Freiburger Biologen durch die Exzellenzinitiative von Bund und Ländern über BIOS, von der Landesstiftung Baden-Württemberg, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) über die Freiburger Initiative für Systembiologie (FRISYS). Einer der Erstautoren der Veröffentlichung (M. Asif Arif) war ein Stipendiat des Deutschen Akademischen Auslandsdienstes (DAAD).

## ► KONTAKT

### Kontakt

**Prof. Dr. Ralf Reski**

Tel.: 0761/203 6969

Fax: 0761/203 6967

ralf.reski@biologie.uni-freiburg.de

**PD Dr. Wolfgang Frank**

Tel.: 0761/203 2820

Fax: 0761/203 6945

wolfgang.frank@biologie.uni-freiburg.de

Fakultät für Biologie

Lehrstuhl Pflanzenbiotechnologie

Universität Freiburg

www.plant-biotech.net