

RNA-Silencing

Knock-down-Systeme bei Hyphenpilzen

DANIELLE JANUS, BIRGIT HOFF, ULRICH KÜCK
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND BIOTECHNOLOGIE, LEHRSTUHL FÜR ALLGEMEINE UND MOLEKULARE BOTANIK, RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

Die Entdeckung der RNA-Interferenz hat wesentlich zur Funktionsanalyse von Zielgenen beigetragen. Bei diesem Prozess wird die transkriptionelle Expression herabreguliert und führt so zum Funktionsausfall des Gens. Am Beispiel des Hyphenpilzes *Acremonium chrysogenum* stellen wir ein Fluoreszenzprotein-basiertes System zum Nachweis von Knock-down-Stämmen vor.

We present a novel and efficient fungal RNA silencing system using the autofluorescent DsRed protein as a reporter.

■ Bereits im Jahr 1992 beobachteten Giuseppe Macino und seine Mitarbeiter^[1] bei Hyphenpilzen ein Phänomen, das sie als „Quelling“ bezeichneten. Dieser Begriff aus dem Englischen bedeutet wörtlich übersetzt „etwas unterdrücken“ und ist heute besser unter den Stichworten „RNA-Interferenz“ (RNAi) oder „RNA-Silencing“ bekannt. Macino und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die zusätzliche, ektopische Integration eines Gens die eigene Expression sowie die von endogenen, homologen Genen unterdrückt. Aufgrund von Carotinoiden besitzen Wildtyp-Stämme von *Neurospora crassa* orange gefärbte Myzelien. Werden jedoch zusätzliche Kopien von Carotinoid-Biosynthesegenen in das Genom integriert, so entstehen wider Erwarten farblose Stämme, die als Albino-Mutanten bezeichnet wurden^[1]. Inzwischen ist bekannt, dass es sich bei dem „Quelling“ um einen RNA-vermittelten Mechanismus zur Herabregulation der Genexpression (Knock-down) handelt. Kleine, doppelsträngige RNA-Moleküle (beispielsweise siRNAs) induzieren hierbei den spezifischen Abbau der Messenger-RNA (mRNA). Dieser Vorgang ähnelt damit der RNA-Interferenz bei Tieren oder der Kosuppression bei Pflanzen. Die Analyse von *N.-crassa*-Mutanten hat wesentlich zur Identifizierung von Komponenten des Quelling-Mechanismus beigetragen^[2]. Wir wissen heute zum Beispiel, dass Dicer- und Argon-

naut-Proteine sowie RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRP) Grundkomponenten des Quelling-Systems darstellen. Damit ist auch molekular nachgewiesen, dass Pilze Proteine, die den Komponenten der RNAi-Systeme bei tierischen und pflanzlichen Systemen ähnlich sind, zum Abbau von mRNAs nutzen^[3].

Effektive RNAi-Systeme in Hyphenpilzen

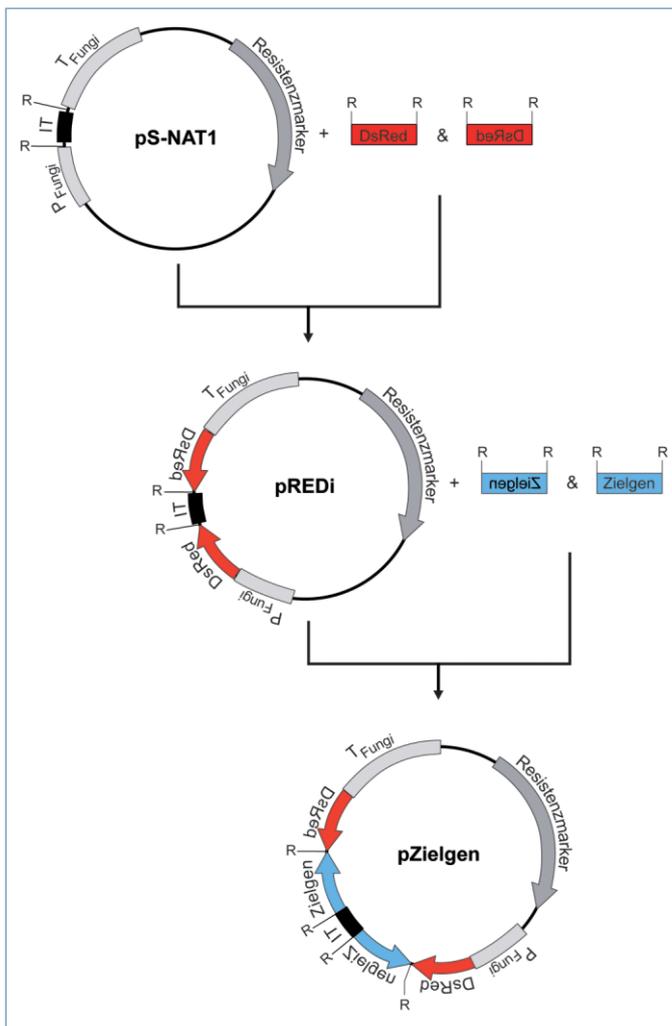
Für verschiedene Hyphenpilze konnte bereits gezeigt werden, dass RNAi-Systeme zur Funktionsanalyse von Genen genutzt werden können^[3]. In den meisten Fällen wird das Gen-Silencing durch Transformation mit Vektoren erreicht, die invers angeordnete repetitive Sequenzen des Zielgens tragen. Nach Transkription wird eine RNA gebildet, die sich aufgrund der Sequenzwiederholungen zu einer doppelsträngigen RNA (dsRNA) falten kann. Diese dsRNA stellt wiederum ein Signal für den gezielten intrazellulären Abbau der mRNA des Zielgens dar. Dieser Prozess wird als RNA-Silencing bezeichnet. Nakayashiki und Mitarbeiter^[4] entwickelten effektive Vektor-Systeme, um gezielt dsRNA der Ziel-mRNA zu erhalten. Einer dieser Vektoren, pSilent-1, trägt beispielsweise ein Intron, das beide Sequenzen des Zielgens trennt. Nach Transkription des Zielgens wird aufgrund der Intronsequenz die Bildung der

dsRNA durch Ausbildung einer Haarnadelstruktur gefördert^[4]. In den pilzlichen Rezipientenstämmen beobachtet man jedoch, dass der Silencing-Effekt in einzelnen Transformanten sehr unterschiedlich stark ausgeprägt wird. Genfunktionsanalysen müssen deshalb mit ausgewählten Stämmen erfolgen. Wir haben ein neues DsRed-basiertes System entwickelt, um Knock-down-Transformanten einfach durch Farbveränderungen auf Festmedien zu detektieren^[5].

DsRed-vermitteltes RNAi-System

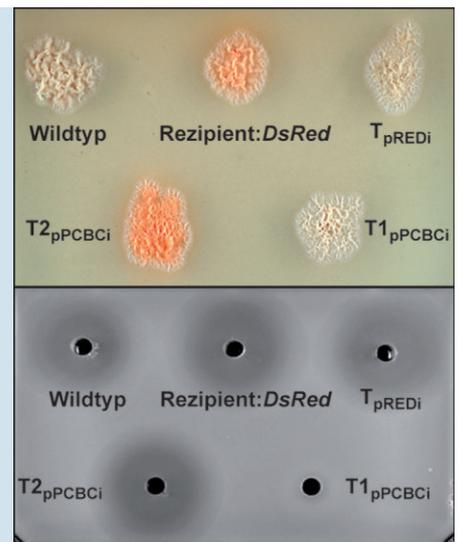
Das *DsRed*-Gen codiert für ein autofluoreszierendes Protein, das Absorptions- und Emissionspektren von 558 und 583 nm aufweist^[6]. Das Gen wurde im Jahr 1999 aus der Koralle *Discosoma spec.* isoliert und codiert für ein Protein von 225 Aminosäuren. In der Zelle bildet das DsRed-Protein ein Homotetramer, dessen Assemblierung relativ langsam nach Synthese des Proteins erfolgt. Allerdings weist das Tetramer eine hohe intrazelluläre Stabilität auf und kann in pilzlichen Zellen auch nach mehrtägiger Lagerung der Stämme qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Schon geringe Mengen des Proteins können in Gesamtproteinextrakten einfach durch Verwendung empfindlicher spektrofluorimetrischer Messungen bestimmt werden. Die Synthese des DsRed-Proteins kann in dem von uns gewählten Experimentalsystem *Acremonium chrysogenum* einfach auf Festmedien beobachtet werden^[5]. Bei diesem biotechnologisch relevanten Hyphenpilz handelt es sich um den Hauptproduzenten des β -Laktam-Antibiotikums Cephalosporin C. Stämme, die eine rote Färbung des Myzels aufgrund der DsRed-Synthese aufweisen, sind als Rezipienten für die Transformation mit RNAi-Vektoren geeignet.

Wir haben deshalb einen DsRed-RNAi-Vektor konstruiert, bei dem zwei Genfragmente des *DsRed*-Gens in den oben beschriebenen Vektor pSilent-1 in Nachbarschaft zu einer Intron-Sequenz eingebaut wurden. Ein Typ dieses Vektors stellt pREDi dar, der in **Abbildung 1** dargestellt ist. Die Transformation von pREDi in den roten Rezipienten-Stamm von *A. chrysogenum* führt zu Transformanten, bei denen ein Silencing des *DsRed*-Gens erfolgt. Korrelierend zur Stärke des Silencing-Effekts können rote, rosafarbene oder farblose Stämme isoliert werden (**Abb. 2**). In einem derartigen Experiment zeigen bis zu 70 % der erzielten Transformanten phänotypisch ein Silencing des *DsRed*-Gens. Dies lässt sich auch auf Ebene der Transkription und der Protein-Bio-



◀ **Abb. 1:** Strategie zur Konstruktion effizienter RNAi-Vektoren für die Transformation von Hyphenpilzen. IT: Intron; P_{Fungi}: pilzlicher Promotor; R: Schnittstellen für Restriktionsenzyme; T_{Fungi}: pilzlicher Terminator.

▶ **Abb. 2:** *Acremonium chrysogenum*. **A**, Transformanten auf Festmedium und **B**, deren Kulturüberstände im Hemmhofstest.



farblos, sondern weisen eine geringere oder fehlende antibiotische Aktivität auf, welche das Wachstum von Bakterien hemmt. Dies lässt sich, wie in **Abbildung 2** gezeigt, einfach durch Hemmhofstests demonstrieren. Zum Vergleich werden die pilzlichen Transformanten auf Festmedium vorgestellt, um noch einmal den Silencing-Effekt der *DsRed*-Expression zu dokumentieren.

Literatur

- [1] Romano, N., Macino, G. (1992): Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6: 3343–3353.
- [2] Cogoni, C., Macino, G. (1999): Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399: 166–169.
- [3] Nakayashiki, H. (2005): RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Lett.* 579: 5950–5957.
- [4] Nakayashiki, H., Hanada, S., Nguyen, B. O., Kadotani, N., Tosa, Y., Mayama, S. (2005): RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet. Biol.* 42: 275–283.
- [5] Janus, D., Hoff, B., Hofmann, E., Kück, U. (2007): An efficient fungal RNA-silencing system using the *DsRed* reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 962–970.
- [6] Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., Lukyanov, S. A. (1999): Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17: 969–973.

synthese nachweisen^[5]. Dieser Experimentalanatz verdeutlicht, dass das *DsRed*-Gen als Reporter genutzt werden kann, um Transformanten zu selektionieren, die einen Silencing-Effekt aufweisen.

Regulation der Expression von endogenen und heterologen Genen

In dem Vektor pREDi können *DsRed*-Sequenzen mit Zielgenen fusioniert werden (**Abb. 1**). Dies eröffnet die Möglichkeit, Transkripte von zwei Genen gleichzeitig herabzuregulieren. Wir haben das beispielhaft mit Genen der Cephalosporin C-Biosynthese durchgeführt. So wurden Fragmente des *pcbC*-Gens, der für die Isopenicillin N-Synthetase codiert, mit den *DsRed*-Fragmenten fusioniert. Ein derartiger Vektor ist in **Abbildung 1** durch die Bezeichnung „pZielgen“ gekennzeichnet. Analysen von entsprechenden Rezipienten haben verdeutlicht, dass ein Knock-down des *DsRed*-Gens in 87,5 % der Transformanten mit einer gleichzeitigen Herabregulation der *pcbC*-Expression korreliert ist. Derartige Transformanten sind nicht nur

Transformanten auf Festmedium vorgestellt, um noch einmal den Silencing-Effekt der *DsRed*-Expression zu dokumentieren.

Mit dem hier dargestellten RNAi-System für Hyphenpilze ist eine schnelle und einfache Analyse der Genfunktion möglich. Die leichte visuelle Identifizierung von Transformanten mit einem Silencing-Effekt ermöglicht auch die Hochdurchsatzanalyse der Genfunktion durch Verwendung von komplexen Genbibliotheken. Dieser Ansatz wird in Zukunft eine steigende Bedeutung erlangen, da die wachsende Anzahl sequenzierter pilzlicher Genome postgenomische Funktionsanalysen lohnenswert macht.

Danksagung

Die Autoren danken allen Angehörigen des Lehrstuhls für Allgemeine und Molekulare Botanik der Ruhr-Universität Bochum sowie Herrn Prof. Dr. E. Hofmann (AG Röntgenstrukturanalyse an Proteinen) und der Sandoz GmbH (Kundl, Österreich) für experimentelle und finanzielle Unterstützung. ■



v. li. n. re.: Danielle Janus, Birgit Hoff, Ulrich Kück

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Ulrich Kück
Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150
D-44780 Bochum
Tel.: 0234-32 26212
Fax: 0234-32 14184
ulrich.kueck@rub.de
www.ruhr-uni-bochum.de/allgbotanik