

Gentherapie met RNase P: een schone slaapster

RNA interferentie (RNAi) is niet de enige methode om genexpressie te onderdrukken, en misschien niet eens de beste. Nobelprijswinnaar Sidney Altman ontwikkelde een alternatieve methode op basis van het enzym RNase P.

Door Els van den Brink en Tineke van der Struik, gepubliceerd in het Chemisch2Weekblad (C2W), 14 mei 2005.

RNA interferentie staat volop in de belangstelling. De methode werd in 1998 ontdekt door Andrew Fire, die daarvoor in 2004 de Heinekenprijs ontving. Door middel van kleine stukjes RNA kan men de expressie van afzonderlijke genen verstoren, voor therapeutische toepassingen of om de functie van deze genen te achterhalen. Toch zitten er nog wel wat haken en ogen aan. De stukjes RNA blijken niet altijd even selectief en kunnen ook een zelfmoordmechanisme van de cel in werking zetten. Volgens nobelprijswinnaar Sidney Altman heb je daar geen last van als je gebruik maakt van RNase P. Deze zogenaamde External Guide Sequence (EGS) methode werd in 1992 voor het eerst gepubliceerd, maar kreeg daarna weinig belangstelling. Een snelle zoektocht met PubMed levert wel vijfendertighonderd artikelen over RNAi, maar niet meer dan zevenhonderdvijftig artikelen over RNase P. Het aantal artikelen dat specifiek gaat over de EGS methode is zelfs beperkt tot ongeveer vijfentwintig. Hebben we een Doornroosje ontdekt? Wanneer kust een wetenschapper deze schone slaapster wakker?

Mechanisme

Net als RNAi maakt de EGS methode gebruik van RNA om genexpressie te onderdrukken. Maar het mechanisme van beide methodes is heel verschillend.

In het geval van RNA interferentie worden dubbelstrengs RNA in een cel gebracht, dat door het enzym Dicer in kleine stukjes wordt geknipt. Dit levert zogenaamd *short interfering* RNA (siRNA) op. Een enkele streng van dit siRNA vormt samen met een cellulair eiwit een *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC). Dit complex bindt aan het overeenkomstige *messenger* RNA (mRNA) en knipt dat vervolgens kapot. Het bijbehorende eiwit wordt daardoor niet meer gevormd en de genexpressie is zo dus gestopt.

De EGS methode van Sidney Altman is gebaseerd op de werking van het enzym RNase P. Normaal gesproken knipt RNase P een stuk van een *transfer* RNA precursor (ptRNA), waardoor *transfer* RNA (tRNA) ontstaat. Altman ontdekte dat het RNase P het ptRNA ook knipt als het molecuul sterk versimpeld is. De enige voorwaarde voor de knipreactie bleek een karakteristieke sequentie van vier nucleotiden naast een stuk dubbelstrengs RNA. Dit leidde tot de hypothese dat het RNase P elk willekeurig stuk RNA kan knippen, zolang dit maar samen met een ander stuk (kunstmatig) RNA een dubbele streng kan vormen. Dit kunstmatige RNA, de External Guide Sequence (EGS), moet dan wel eindigen in de karakteristieke sequentie als herkenningspunt voor het RNase P. Als zo'n EGS in een cel wordt

gebracht, leidt dit uiteindelijk tot afbraak van het target-mRNA, en dus tot vermindering van genexpressie.

Consortium

Sinds de ontdekking van RNA interferentie zijn er ontzettend veel wetenschappers mee aan de slag gegaan. Onderzoekers van het Nederlands Kanker Instituut gebruikten de methode bijvoorbeeld om achtduizend verschillende genen te testen op hun mogelijke relatie met kanker. Dat leverde direct al vijf kandidaten op, zo publiceerden ze vorig jaar in Nature. Ook bedrijven zien de mogelijkheden van RNAi. Het Amerikaanse bedrijf Acuity startte vorig jaar oktober al een serie experimenten met patiënten voor de behandeling van een oogziekte. Begin 2005 werd in Amerika een publiek-privaat RNAi consortium gestart met een fonds van achttien miljoen dollar om een bibliotheek van genenremmers te creëren op basis van RNAi.

De EGS methode lijkt daarentegen zo goed als vergeten. Toch zijn er wel wetenschappers die het juweeltje van Altman op waarde weten te schatten. Verschillende Amerikaanse en Japanse onderzoekers gebruiken de methode om virussen, zoals griep, aids en hepatitis C te bestrijden. Maar ze zijn daarbij nog niet verder dan het stadium van de weefselkweek. Bedrijven hebben al wel interesse getoond, vertelt Altman. Maar verder kan hij daar niets over zeggen.

Resistentie

Altman is overtuigd van de schoonheid van zijn Doornroosje. “De EGS methode is net zo betrouwbaar als RNAi wat betreft de mogelijkheden om genexpressie te remmen”, zegt hij. “Maar net als bij RNAi en andere RNA methodes is het grootste probleem bij dieren en patiënten om het RNA bij het juiste weefsel te krijgen.”

Volgens Altman heeft zijn EGS techniek belangrijke voordelen ten opzichte van RNA interferentie. De EGS techniek werkt bijvoorbeeld sneller. “Bij EGS zie je na 24 uur al een effect, bij RNAi pas na vijf dagen”, vertelt Altman. “Bovendien heeft RNAi bepaalde neveneffecten, waar je bij EGS geen last van hebt”, vervolgt hij. De selectiviteit van RNAi is namelijk beperkt, waardoor het ingebrachte RNA soms ook de expressie van heel andere genen verstoort. Verder kan het ingebrachte dubbelstrengs RNA de stof interferon activeren, wat uiteindelijk leidt tot zelfmoord van de cel. Bij EGS heb je daar allemaal geen last van. Ander voordeel is dat EGS niet alleen bruikbaar is bij menselijke en dierlijke cellen, maar ook bij bacteriën. Dat is niet het geval voor RNAi, omdat bacteriën niet beschikken over het eiwitcomplex RISC. Altman heeft EGS bijvoorbeeld gebruikt om resistente bacteriën weer gevoelig te maken voor bepaalde antibiotica.

Anderzijds heeft de EGS methode ook zijn beperkingen. Bij toepassing in menselijke en dierlijke cellen moet de EGS verlengd worden met een extra stuk RNA, zodat het meer lijkt op tRNA. Anders wordt het namelijk niet herkend door het eukaryote RNase P. Bovendien komt niet elk gedeelte van een gen in aanmerking om gebruikt te worden als EGS. Er moet een knipplaats aanwezig zijn voor RNase P en het mRNA moet wel toegankelijk zijn.

Effectiviteit

Deena Gibbons en Adrian Hayday, werkzaam in het Guy's Hospital in Londen, hebben beide methodes uitgeprobeerd. In hun experimenten leek de EGS techniek minder effectief dan RNAi (35% vergeleken met 90%), maar de selectiviteit van RNAi was wel beperkt (de expressie van een ander gen werd ook met 35% onderdrukt). Dat lijkt echter geen algemene trend. Andere onderzoekers behaalden met EGS wel

een effectiviteit van tachtig tot honderd procent voor verschillende genen. Gibbons en Hayday adviseren daarom om beide technieken uit te proberen om te zien wat het beste werkt. Welke methode je uiteindelijk kiest, is ook afhankelijk van het doel. Een halvering van de genexpressie kan al voldoende zijn om een klinisch effect te geven. “In geval van klinische toepassingen kunnen specificiteit, stabiliteit en functionele opname van het RNA veel belangrijker criteria zijn in plaats van effectiviteit”, stellen Gibbons en Hayday.

Natuurlijke machinerie

De schone slaapster begint dus zo langzamerhand een beetje wakker te worden. Maar de

Nederlandse onderzoekers staan nog niet echt voor haar in de rij.

“De kracht van beide technieken zit hem met name in het gebruiken van een natuurlijke machinerie om mRNA te degraderen, wat de efficiëntie ten goede komt”, aldus biofarmaceut dr. Raymond Schiffelers van de Universiteit Utrecht. De methode van Altman heeft volgens hem echter een flinke achterstand op RNA interferentie. “Er is in de afgelopen zes jaar een enorme hoeveelheid gegevens verzameld over de RNA interferentie techniek. Wetenschappers weten bijvoorbeeld al veel over het mechanisme, de efficiëntie van mRNA degradatie, de afhankelijkheid van sequenties, de mogelijkheden om het dubbelstrengs RNA in de cel te brengen, de duur van het onderdrukken van genexpressie, en de specificiteit/aspecificiteit. Voor RNase P zijn deze data tot nog toe beperkt of afwezig.” Volgens Schiffelers is het interessant om nog meer onderzoek te doen met RNase P. Hij verwacht dat RNase P even goede of zelfs betere karakteristieken zou kunnen hebben dan RNA interferentie. Wie weet wat we nog gaan beleven als Doornroosje eenmaal echt tot leven komt.

© Copyright: Els van den Brink, Life & Science Producties