

RNA als Koordinator und Regulator der Genexpression

Patrick Cramer, Katja Sträßer, Dierk Niessing¹, Gunter Meister² und Ralf-Peter Jansen

Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München, ¹Genzentrum und GSF-

Forschungszentrum und ²Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

► Ein mechanistisches Verständnis des Zellwachstums und der Entwicklung von Geweben und Organismen erfordert eine detaillierte Beschreibung der zellulären Prozesse, die der Genexpression und -regulation zugrunde liegen. Seit einigen Jahren weiß man, dass die Genexpressions-Prozesse in der Zelle räumlich und zeitlich gekoppelt sind. Dabei entpuppte sich die mRNA als zentraler Koordinator der Expression Protein-kodierender Gene. Zudem werden im Zellkern viele nicht-kodierende RNAs synthetisiert, die genregulatorische Funktionen haben. Somit wird die Genforschung der Zukunft zu einem großen Teil RNA-Forschung sein. Hier skizzieren wir Ergebnisse von fünf Forschungsgruppen, die am Genzentrum der Universität München und an benachbarten außeruniversitären Instituten die vielfältigen RNA-Funktionen untersuchen. Wir zeigen Wege auf, die die RNA-Forschung gehen kann, um zu einem besseren Verständnis der Genkontrolle zu gelangen.

mRNA-Transkriptionszyklus

Die Synthese der mRNA im Zellkern wird durch RNA-Polymerase II (Pol II) bewerkstelligt. Die atomare Kristallstruktur der gesamten Pol II aus Bäckerhefe, die 12 Polypeptide umfasst und ein Molekulargewicht von 0,5 MDa aufweist, ist nun fertig gestellt^[1, 2, 3]. Darauf aufbauende Röntgenstrukturanalysen visualisierten die DNA-Transkriptionsblase, das RNA-Transkript und das NTP-Substrat am wachsenden Ende der RNA und zeigten, wie die mRNA-Kette verlängert wird (Abb. 1). Es wurden Erklärungen dafür gefunden, wie die eintretende DNA-Doppelhelix und das austretende DNA-RNA-Hybrid entwunden werden^[4, 5]. Pol II hat ein "stimmbares" aktives Zentrum, an dem kurze 3'-Fragmente der mRNA nukleolytisch abgespalten werden können, um diejenigen Pol II-Moleküle zu reaktivieren, die aufgrund eines DNA-Schadens arretiert sind, oder um fehlinkorporierte Nukleotide zu entfernen^[3, 6]. Dazu komplementiert der extrinsische Faktor TFIIS das aktive Zentrum und richtet die mRNA so aus, dass eine Phosphodiesterbindung gebrochen wird.

Die Vorläufer-mRNA, die aus Pol II austritt, wird kotranskriptionell prozessiert. Dazu binden Prozessier-Faktoren an die phosphorylierte C-terminale Domäne (CTD) der Polymerase. Die Struktur eines CTD-Phospho-Peptidfragments im Komplex mit einem 3'-RNA-Prozessierfaktor erklärt, wie es zu einer physikalischen Kopplung von Transkription und 3'-RNA-Prozessierung kommt^[7]. Am Ende des Transkriptions-Zyklus wird die CTD dephosphoryliert, um Initiations-kompetente Polymerase zu regenerieren. Der Mechanismus der hierbei wirksamen CTD-Phosphatasen ist nun etabliert^[8, 9, 10]. Ein Ziel für die nähere Zukunft stellt die Untersuchung des Mechanismus inhibitorischer RNAs dar. Ein längerfristiges Ziel ist es, die Transkriptions-Initiation zu verstehen, in der Hoffnung, auch Promoter-Spezifität und Transkriptions-Regulation zu untersuchen. Schritte in diese Richtung sind die ersten Strukturbestimmungen von Untereinheiten des Mediator-Komplexes,

der eine zentrale Rolle in der Genregulation spielt (Baumli, Hoepfner, Cramer, zwei Artikel im Druck).

mRNA-Export

In Eukaryoten stellt der Export der mRNA vom Nukleoplasma in das Zytoplasma einen weiteren Schritt in der Genexpression dar. Die mRNA wird dabei durch die Kernporen geschleust, die die Kernmembran durchspannen^[11, 12, 13]. Am mRNA-Export und an der mRNA-Verpackung sind eine Vielzahl von Proteinen beteiligt. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* bindet der so genannte THO-Komplex bereits während der Transkriptionselongation und nimmt die nascente mRNA entgegen. Der THO-Komplex ist für einen effizienten mRNA-Export notwendig, da er direkt an die mRNA-Exportfaktoren Sub2 und Yra1 bindet, die für den intranukleären Teil des Exports essentiell sind^[14, 15, 16]. Der Protein-Komplex aus THO, Sub2 und Yra1 wurde TREX-Komplex genannt, da er Transkription und mRNA-Export miteinander verbindet^[16]. Yra1 rekrutiert den mRNA-Exporter Mex67-Mtr2, der wiederum mit den Untereinheiten der Kernpore interagiert (Abb. 2)^[17]. Auf der zytoplasmatischen Seite muss die mRNA freigesetzt werden, damit sie als Matrize für die Proteinsynthese an den Ribosomen zur Verfügung steht. Ein wichtiges Ziel zukünftiger Forschung wird es sein, die zeitliche Abfolge und Regulation der verschiedenen

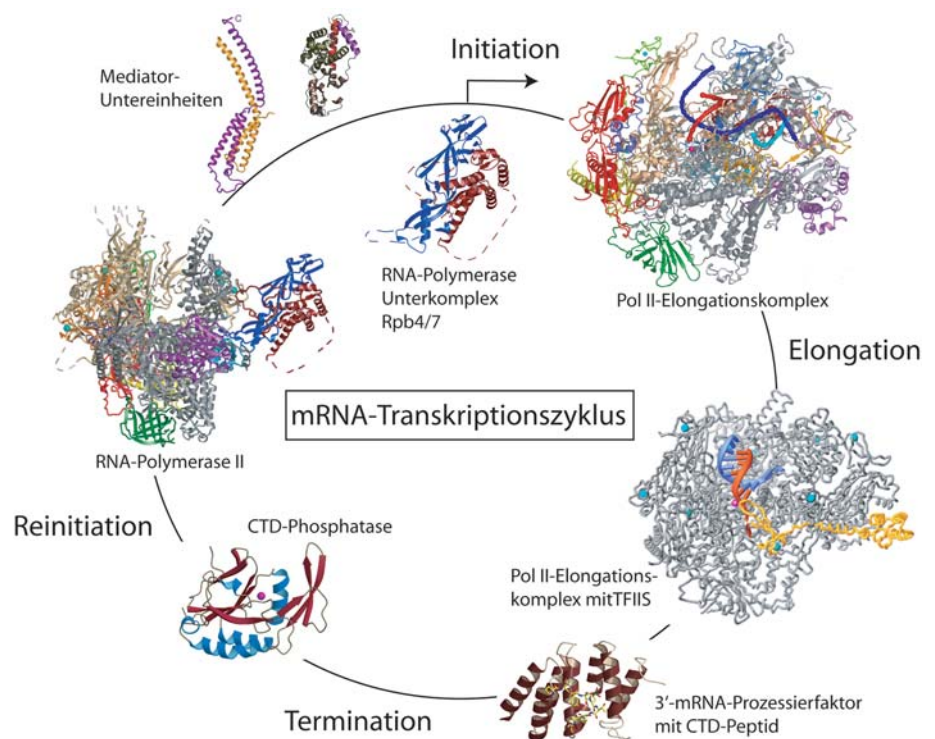


Abb. 1: Biogenese der mRNA. Neuere Strukturinformation gibt mechanistische Einblicke in die verschiedenen Phasen des Transkriptionszyklus. Details siehe Text.

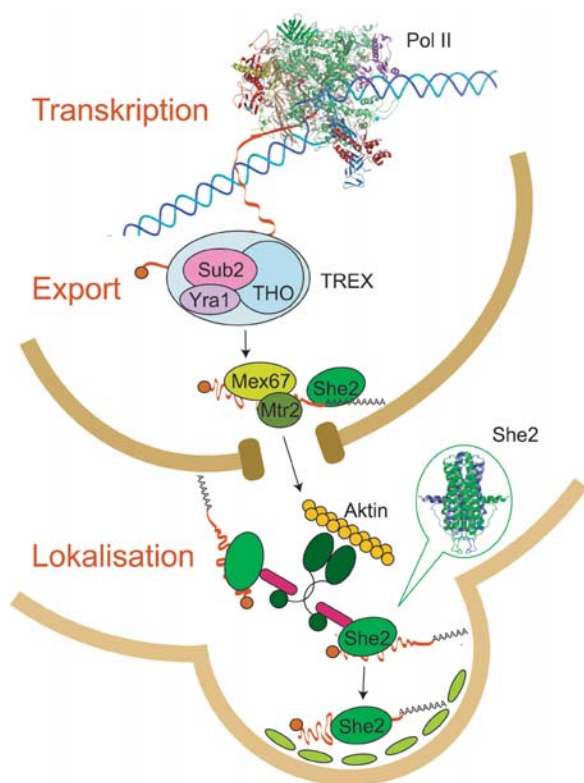


Abb. 2: RNA als Koordinator der Genexpression: mRNA-Synthese, -Export und -Lokalisation in einer eukaryotischen Zelle. Details siehe Text.

Interaktionen der am mRNA-Export beteiligten Proteine aufzuklären. Auch sind die Prozesse, die zur Freisetzung der mRNA auf der zytoplasmatischen Seite der Kernporen führen, größtenteils unverstanden.

mRNA-Lokalisation

Auf den RNA-Export kann eine Lokalisation der mRNA folgen, die eine räumlich kontrollierte Produktion von Proteinen während der Translation an spezifischen Orten im Zytoplasma ermöglicht (Abb. 2)^[18]. Dies kann zu einer asymmetrischen Verteilung von Proteinen während der Zellteilung, zur Generierung von Polarität während der Embryonalentwicklung oder zur koordinierten Synthese von Untereinheiten eines Proteinkomplexes führen. Die mRNA-Lokalisation kann durch den gezielten Transport von mRNAs in Form von Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs) unter Zuhilfenahme des Zytoskeletts erreicht werden^[19].

Der Prozess des mRNP-Transports ist am besten in *S. cerevisiae* verstanden. Signale in lokalisierten Hefe-mRNAs werden vom RNA-bindenden Protein She2p bereits innerhalb des Zellkerns über ein neuartiges RNA-Bindungsmotiv erkannt^[20, 21]. Der aus dem Zellkern exportierte RNP-Komplex enthält neben zu lokalisierenden mRNAs und She2p noch weitere RNA-bindende Proteine wie den Translationsrepressor Puf6p^[22] und bindet im Zytoplasma an einen Myosin-Proteinkomplex, mit dessen

Hilfe das RNP entlang von polarisierten Aktin-Filamenten in die Zellknope transportiert wird^[23]. Dort werden die transportierten mRNAs verankert und lokal translatiert. Eine spannende Frage für die Zukunft ist die Zusammensetzung der transportierten RNPs. Überraschenderweise haben Analysen von neuronalen RNPs, die lokalisierte mRNAs enthalten, ergeben, dass diese Komplexe mehrere hundert Mega-Dalton schwer sein können und Teile der Translationsmaschinerie wie Ribosomen und Elongationsfaktoren enthalten^[24]. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die mRNAs selbst, sondern auch die für die lokale Proteinsynthese nötige Maschinerie transportiert wird. Es muss nun untersucht werden, wie sich lokalisierte RNPs anderer Zelltypen zusammensetzen. Darauf aufbauend wird man verstehen wollen, wie die RNP-Biogenese abläuft, und wie RNP-Komplexe am Zielort bei der Translationsaktivierung wieder zerlegt werden.

Kleine regulatorische RNAs

Neben den Protein-kodierenden mRNAs existiert eine Vielzahl nicht-kodierender RNAs, die an so diversen Prozessen wie dem Spleißen von prä-mRNAs (snRNAs), der Translation (rRNAs und tRNAs), der Protein-Translokation ins Endoplasmatische Retikulum (7SL-RNA) und an einer Vielzahl weiterer Prozesse beteiligt sind. Vor wenigen Jahren wurde eine neuartige Klasse

nicht-kodierender RNAs identifiziert, die so genannten kleinen regulatorischen RNAs, die nur 21–25 Nukleotide (nt) lang sind. Diese kleinen RNAs bilden drei Familien, die small interfering RNAs (siRNAs), die microRNAs (miRNAs), und die repeat-associated siRNAs (rasiRNAs). siRNAs vermitteln den Prozess der RNA-Interferenz (RNAi), indem sie mit vollständig komplementärer Ziel-RNA hybridisieren und deren Abbau steuern^[25], miRNAs hybridisieren an partiell komplementäre Bereiche einer Ziel-mRNA und inhibieren deren Translation^[26, 27], rasiRNAs erkennen komplementäre Chromatinbereiche und rekrutieren Methyltransferasen, die wiederum die Ausbildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin vermitteln^[28].

Kleine nicht-kodierende RNAs werden aus langen doppelsträngigen (ds) RNA-Molekülen mit Hilfe des RNase-III-Enzyms Dicer gebildet. Im Falle der rasiRNAs entstehen solche langen dsRNAs aus *sense*- und *antisense*-Transkription desselben genomischen Locus. rasiRNAs können auch mit ihren langen dsRNA-Vorläufern hybridisieren und als Transkriptions-Startpunkt für RNA-abhängige RNA-Polymerasen wirken, was zu einer Amplifikation des Signals führt. Reife rasiRNAs werden in den so genannten RITS-Komplex inkorporiert, der die Ausbildung von Heterochromatin steuert^[28]. miRNAs werden im Zellkern durch Pol II als primäre miRNA-Transkripte (pri-miRNAs) synthetisiert (Abb. 3). Pri-miRNAs werden vom RNase-III-Enzym Drosha noch im Zellkern zu miRNA-Vorläufermolekülen (prä-miRNAs) prozessiert, die eine Haarnadel-Struktur aufweisen. Prä-miRNAs werden dann durch den Exportrezeptor Exportin-5 in das Zytoplasma gebracht, von Dicer weiter prozessiert und in miRNA-Protein-Komplexe (miRNPs) inkorporiert, die Proteine der Argonaute-Familie beinhalten^[27]. Die miRNA-Profile verschiedener Organismen, Zelltypen und Entwicklungsstadien sind nun bekannt und zeigen, dass miRNAs zentrale Regulatoren der Embryonalentwicklung, der Zelldifferenzierung und der Zellspezifikation sind. So spielen Säuger-miRNAs eine wichtige Rolle bei der Insulin-Sekretion aber auch bei der Entstehung von verschiedenen Krebsarten^[26].

Aufgrund der vielen Entwicklungen der letzten zehn Jahre ist davon auszugehen, dass die RNA-Forschung auch in den nächsten zehn Jahren spannende und unerwartete Ergebnisse hervorbringen wird, die uns dem Ziel, die hochkomplexe Kontrolle der Genaktivität zu verstehen, Schritt für Schritt näher bringen werden.

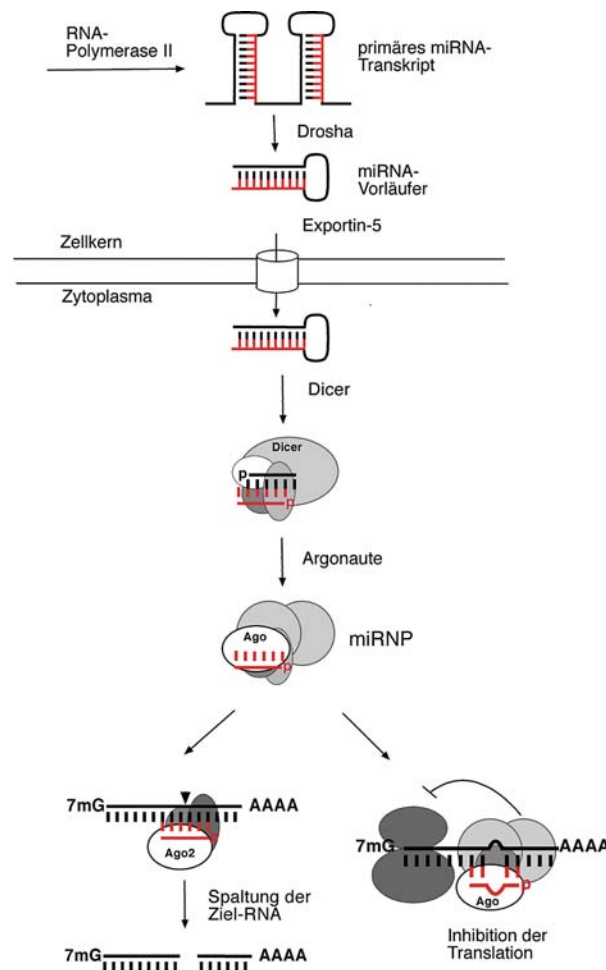


Abb. 3: RNA als Regulator der Genexpression: Biogenese und Funktion von miRNAs. Details siehe Text. 7mG: 7-Methyl-Guanin; AAAA: Poly-A-Schwanz; p: 5'-Phosphat.

Literatur

- [1] **Armache, K.-J., Mitterweger, S., Meinhart, A. & Cramer, P.** (2005): Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex Rpb4/7. *J. Biol. Chem.* 280: 7131–7134.
- [2] **Cramer, P.** (2004): Structure and function of RNA polymerase II. *Adv. Prot. Chem.* 67: 1–42.
- [3] **Cramer, P.** (2004): RNA polymerase structure: from core to functional complexes. *Curr. Op. Genet. Dev.* 14: 218–226.
- [4] **Kettenberger, H., Armache, K.-J., Cramer, P.** (2004): Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIIS. *Mol. Cell* 16: 955–965.
- [5] **Armache, K.-J., Kettenberger, H., & Cramer, P.** (2005): The dynamic machinery of mRNA elongation. *Curr. Op. Struct. Biol.* 15: 197–203.
- [6] **Kettenberger, H., Armache, K.-J., Cramer, P.** (2003): Architecture of the RNA polymerase II-TFIIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* 114: 347–357.
- [7] **Meinhart, A., & Cramer, P.** (2004): Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA processing factors. *Nature* 430: 223–226.
- [8] **Kamenski, T., Heilmeier, S., Meinhart, A., & Cramer, P.** (2004): Structure and mechanism of RNA polymerase II CTD phosphatases. *Mol. Cell*, 15: 399–407.

- [9] **Meinhart, A., Silberzahn, T., & Cramer, P.** (2003): The mRNA transcription/processing factor Ssu72 is a potential tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 278: 15917–15921.
- [10] **Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., & Cramer, P.** (2005): A structural perspective on CTD function. *Genes Dev.* 19: 1401–1415.
- [11] **Reed, R.** (2003): Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr Opin Cell Biol* 15: 326–331.
- [12] **Stutz, F., and Izaurralde, E.** (2004): The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol* 6: 319–327.
- [13] **Vinciguerra, P., and Stutz, F.** (2004): mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr Opin Cell Biol.* 3: 285–292.
- [14] **Strasser, K., and Hurt, E.** (2000): Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *EMBO J.* 19: 410–420.
- [15] **Strasser, K., and Hurt, E.** (2001): Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413: 648–652.
- [16] **Strasser K. et al.** (2002): TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417: 304–308.
- [17] **Strasser, K., Bassler, J., and Hurt, E.** (2000): Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG,

GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol.* 150: 695–706.

- [18] **Lopez de Heredia, M., and Jansen, R. P.** (2004). mRNA localization and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 16: 80–85.
- [19] **St Johnston, D.** (2005): Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 363–375.
- [20] **Kruse, C., Jaedicke, A., Beaudouin, J., Bohl, F., Ferring, D., Guttler, T., Ellenberg, J., and Jansen, R. P.** (2002): Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *J Cell Biol* 159: 971–982.
- [21] **Niessing, D., Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Singer, R. H., and Burley, S. K.** (2004): She2p is a novel RNA binding protein with a basic helical hairpin motif. *Cell* 119: 491–502.
- [22] **Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., and Singer, R. H.** (2004): A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* 18: 1452–1465.

[23] **Böhl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., and Jansen, R.-P.** (2000): She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J* 19: 5514–5524.

[24] **Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N.** (2004): Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43: 513–525.

[25] **Meister, G. and Tuschl, T.** (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343–349.

[26] **Ambros, V.** (2004): The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350–355.

[27] **Bartel, D.P.** (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.

[28] **Lippman, Z. and Martienssen, R.** (2004): The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431: 364–370.

Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. Patrick Cramer, Dr. Katja Sträßer, Dr. Dierk Niessing, Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen
 Dept. für Chemie und Biochemie
 Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Feodor-Lynen-Straße 25
 D-81377 München
 Tel.: 089-2180-76965
 cramer@LMB.uni-muenchen.de,
 strasser@LMB.uni-muenchen.de,
 niessing@LMB.uni-muenchen.de,
 rjansen@LMB.uni-muenchen.de
 www.LMB.uni-muenchen.de

Dr. Gunter Meister
 Arbeitsgruppe RNA-Biologie
 Max-Planck-Institut für Biochemie
 Am Klopferspitz 18
 D-82152 Martinsried
 Tel.: 089-8578-3042
 meister@biochem.mpg.de