

Molekulare Maschinen

Molekulares Bodybuilding: Wie Zellen RNA-Proteinkomplexe herstellen

ASHWIN CHARI, UTZ FISCHER
THEODOR-BOVERI-INSTITUT, BIOZENTRUM, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

Viele RNAs lagern sich mit Proteinen zu komplexen funktionellen Einheiten zusammen. Entgegen der lange vorherrschenden Meinung, dass sich diese Zusammenschlüsse spontan bilden, mehren sich nun Hinweise, dass dieser Prozess häufig durch *assembly*-Chaperone gesteuert wird.

Many RNAs assemble with proteins to form functional units. Recent evidence suggests that these processes are mediated *in vivo* by a group of proteins termed assembly chaperones.

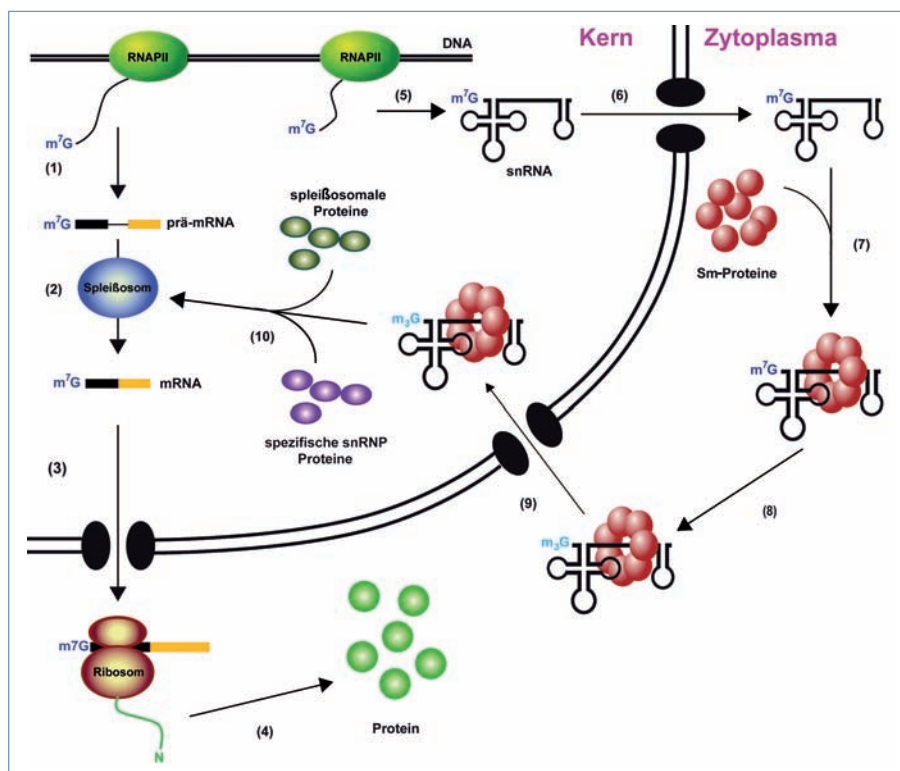
■ Eine große Anzahl von Prozessen, die in unseren Zellen ablaufen, wird von molekularen Maschinen ermöglicht. Diese Funktionseinheiten bestehen entweder ausschließlich aus Proteinen (z. B. das Protein-abbauende Proteasom) oder setzen sich aus Nukleinsäuren (häufig RNA) und Proteinen zusammen. Zur letzteren Klasse gehört das Spleißosom, eine große, dynamische Maschinerie, welche

die Prozessierung von prä-mRNA-Molekülen in translatierbare mRNA katalysiert (Abb. 1, Schritte 1–4).

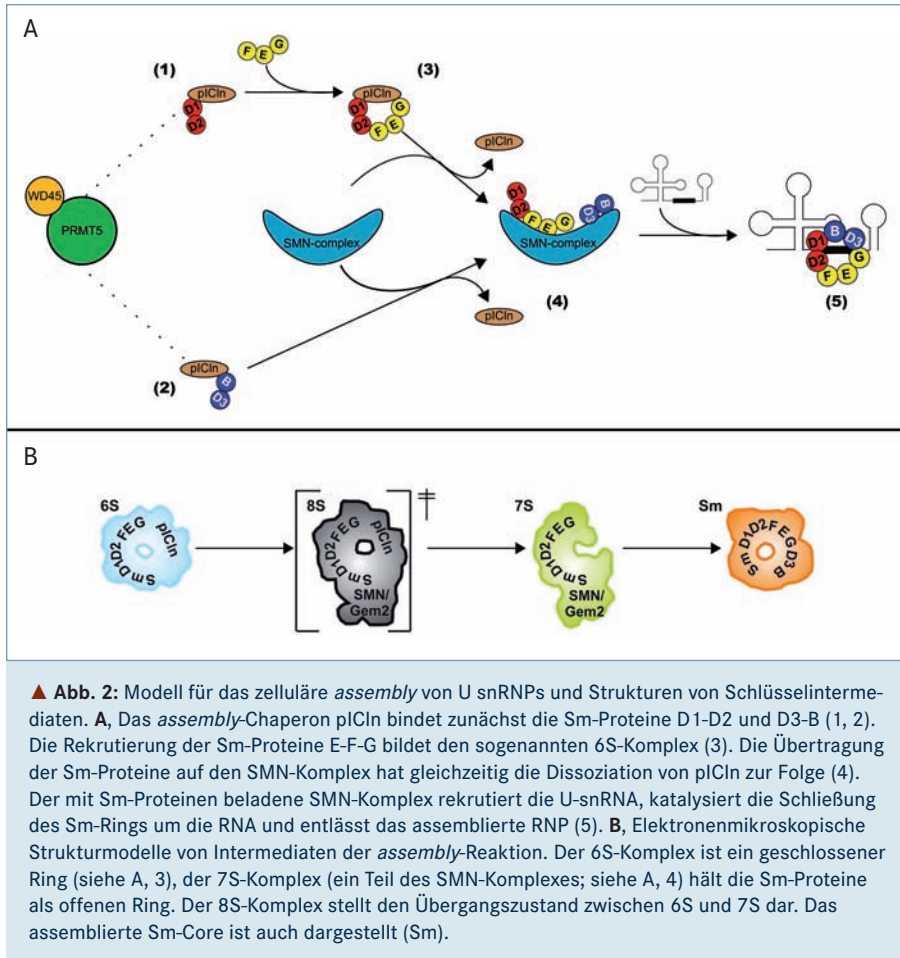
Weit über 100 Proteine und fünf kleine nicht-codierende RNAs sind Bestandteil menschlicher Spleißosomen. Diese Bestandteile sind in definierte Funktionseinheiten oder Module zusammengefasst, deren prominenteste Vertreter die snRNPs U1, U2, U4/6

und U5 sind. Hierbei handelt es sich um RNA-Proteinkomplexe, die eine bzw. im Falle von U4/6 zwei snRNAs und eine variable Anzahl von Proteinen enthalten [1].

Über den räumlichen Aufbau der U snRNPs ist heute einiges bekannt. So besitzen alle U snRNPs einen Satz von sieben gemeinsamen (Sm-)Proteinen, die man als B/B', D1, D2, D3, E, F und G bezeichnet. Diese evolutionär untereinander verwandten Proteine binden an eine definierte Region in den U snRNAs, bestehend aus einer einzelsträngigen Uridinreichen Sequenz (Sm-Site), die von zwei Haarnadelschleifen flankiert wird. Die Sm-Proteine lagern sich so an die RNA an, dass sie einen Ring bilden, durch dessen Mitte die Sm-Site verläuft. Die daraus resultierende Struktur, das Sm-Core, bildet das Grundgerüst aller U snRNPs. Neben den gemeinsamen Proteinen binden an die einzelnen U snRNP-Spezies weitere, Partikel-spezifische Proteine. Diese sind häufig an definierten Funktionen des Spleißprozesses beteiligt, was unter ande-



◀ **Abb. 1:** Die Biogenese spleißosomaler snRNPs ist ein wichtiger Schritt in der eukaryotischen Genexpression. RNA-Polymerase II (RNAPII) transkribiert DNA-codierte Gene in prä-mRNA (1). Das Spleißosom katalysiert das Entfernen nicht-codierender Segmente (Introns) und das Verknüpfen codierender Segmente (Exons), um translatierbare mRNAs zu bilden (2). Die reife mRNA wird ins Zytoplasma exportiert (3). Die Translation von mRNAs am Ribosom führt zur Bildung von Proteinen (4). In der ersten Stufe der Biogenese von snRNPs, werden snRNA-Gene durch RNAPII transkribiert (5). Die snRNA wird danach ins Zytoplasma exportiert (6). Sm-Proteine assemblieren an die Sm-Site der snRNA (7). Die m⁷G Cap-Struktur wird zur m₃G Cap-Struktur hypermethyliert (8). Das nun fertig assemblierte snRNP-Partikel wird nun in den Kern zurück transloziert (9). Nach der Zugabe Partikel-spezifischer und weiterer spleißosomaler Proteine kann das assemblierte snRNP-Partikel ins Spleißosom inkorporiert werden (10).



▲ **Abb. 2:** Modell für das zelluläre *assembly* von U snRNPs und Strukturen von Schlüsselintermediaten. **A,** Das *assembly*-Chaperon piCln bindet zunächst die Sm-Proteine D1-D2 und D3-B (1, 2). Die Rekrutierung der Sm-Proteine E-F-G bildet den sogenannten 6S-Komplex (3). Die Übertragung der Sm-Proteine auf den SMN-Komplex hat gleichzeitig die Dissoziation von piCln zur Folge (4). Der mit Sm-Proteinen beladene SMN-Komplex rekrutiert die U-snRNA, katalysiert die Schließung des Sm-Rings um die RNA und entlässt das assemblierte RNP (5). **B,** Elektronenmikroskopische Strukturmodelle von Intermediaten der *assembly*-Reaktion. Der 6S-Komplex ist ein geschlossener Ring (siehe A, 3), der 7S-Komplex (ein Teil des SMN-Komplexes; siehe A, 4) hält die Sm-Proteine als offenen Ring. Der 8S-Komplex stellt den Übergangszustand zwischen 6S und 7S dar. Das assemblierte Sm-Core ist auch dargestellt (Sm).

rem zu einer Arbeitsteilung der snRNPs im Spleißosom führt [2].

Die Biogenese der U snRNPs

Eine Frage, die Zellbiologen und Biochemiker gleichermaßen interessiert ist, wie sich RNPs *in vivo* zu funktionsfähigen Einheiten zusammenlagern. Zur Beantwortung dieser grundsätzlichen Frage hat die Untersuchung der U snRNP-Biogenese wesentlich beigetragen.

Prinzipiell gilt es, bei der RNP-Zusammenlagerung ein logistisches Problem zu lösen: Die RNA-Komponente wird nämlich im Zellkern transkribiert, die Proteinbestandteile hingegen im Zytoplasma hergestellt. Aktive Transportprozesse müssen daher sicherstellen, dass RNA und Proteine zueinanderfinden. Im Falle der U snRNPs ist der Prozess der Zusammenlagerung primär ins Zytoplasma verlagert. Dementsprechend muss die snRNA zunächst vorübergehend aus dem Kern exportiert und dort mit den Sm-Proteinen beladen werden. Dieser Zusammenschluss ist Voraussetzung für diverse Modifikationsprozesse an der RNA, einschließlich der Methylierung der m⁷G-Capstruktur zum hypermethylierten Trimethyl-

guanosin(m^{2,2,7}G)-Cap und dem anschließenden Import in den Kern zum Ort des Spleißens. Zu welchem Zeitpunkt in der Biogenese die spezifischen Proteine das Partikel vervollständigen ist in vielen Fällen noch nicht klar (**Abb. 1**, Schritte 5–9).

Der U snRNA-Export bzw. der U snRNP-Import wird durch jeweils spezialisierte Transportsysteme gewährleistet. Die Schlüsselfaktoren des Exports binden an den 5'-terminalen Bereich der U snRNA. Der Cap-Bindungskomplex (CBP20/80) bindet direkt an das m⁷G-Cap der snRNA und ermöglicht so die Rekrutierung des Adapters PHAX und des Ran-GTP-gebundenen Exportfaktors CRM1. Dieser snRNA-Exportkomplex transloziert ins Zytoplasma, wo er durch Hydrolyse von GTP und Dephosphorylierung von PHAX zerfällt [3]. Der Kerntransport des zusammengelagerten U snRNPs benötigt hingegen die Importfaktoren Snurportin und Importin β, die das m₃G-Cap bzw. das Sm-Core erkennen [4]. Die Natur des Caps bestimmt daher maßgeblich, in welches Kompartiment die RNA transportiert werden kann: Hat sie ein m⁷G-Cap, bedeutet das Export ins Zytoplasma; das m₃G-Cap erlaubt hingegen (zusam-

men mit dem Sm-Core) den Import des zusammengelagerten snRNPs in den Kern.

Die oben kurz beschriebenen Transportprozesse führen also die RNA und Protein-komponenten an einem gemeinsamen Ort zusammen und schaffen damit die unmittelbare Voraussetzung für den Zusammenschluss zum RNP. Wie wird nun aber dieser *assembly*-Prozess gewährleistet? Aus früheren Studien am U snRNP wusste man, dass der Zusammenschluss *in vitro* spontan ablaufen kann. Dies bedeutet, dass die strukturellen Informationen für die Ausbildung des RNPs in den Komponenten selbst zu finden ist. Ähnliche *selfassembly*-Prozesse hatte man *in vitro* zuvor auch schon für Ribosomen beobachtet, weshalb man davon ausging, dass sich RNPs generell spontan ausbilden können. Nun muss man jedoch bedenken, dass der *assembly*-Prozess *in vivo* ganz andere Grundvoraussetzungen hat: Obwohl keine einzelne makromolekulare Spezies in hoher Konzentration vorliegt, ist dennoch die Gesamtkonzentration aller Proteine, RNAs und anderer Biomoleküle im zellulären Milieu extrem hoch (*molecular crowding*). Dies führt dazu, dass die Wahrscheinlichkeit einer produktiven Interaktion von Proteinen mit den kognaten RNAs beim RNP-*assembly* geringer, die für unspezifische Wechselwirkungen mit nicht-kognaten RNAs hingegen größer wird. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, gibt es in der Zelle eine große Anzahl von assistierenden Faktoren (z. B. Chaperonen), die ungewollte Interaktionen verhindern und gewollte ermöglichen [5].

In der Tat hat man vor Kurzem eine Gruppe von trans-agierenden Faktoren entdeckt, welche die Zusammenlagerung der U snRNPs regulieren bzw. ermöglichen. Über deren Funktionsweise konnte in den letzten Jahren signifikante Fortschritte erzielt werden.

Die *assembly*-Maschinerie der U snRNPs

Zentral für diesen Prozess sind mindestens elf Proteine, die sich in zwei distinkten Komplexen organisieren. Diese als PRMT5- und SMN-Komplexe bezeichneten Einheiten wirken gezielt auf die Zusammenlagerung der Sm-Core-Domäne der U snRNPs [6–8].

Der ca. 1 MDa große SMN-Komplex besteht aus dem SMN(*survival motor neuron*)-Protein und sieben weiteren Faktoren, die als Gemine 2–8 bezeichnet werden. Seine Hauptfunktion ist es, die Sm-Proteine in einer definierten Konfiguration zu binden, und so den Transfer auf die snRNA zu ermöglichen. Die-

ser „*assembly*-Maschinerie“ ist ein Chaperonsystem vorgeschaltet, welches die Ausbildung von RNA-freien Sm-Proteinkomplexen induziert. Hierbei spielt das *assembly*-Chaperon pICln die wichtigste Rolle. pICln rekrutiert fünf der sieben Sm-Proteine und ordnet sie in den Positionen an, wie sie auch im Sm-Core zu finden sind. In diesem Zustand sind die Sm-Proteine aber nicht in der Lage, die snRNA zu binden; pICln verhindert dies durch eine sterische Blockade der RNA-Bindungsstelle in den Sm-Proteinen. Die Assoziation der Sm-Proteine mit dem *assembly*-Chaperon induziert daher eine kinetische Falle, aus welcher Sm-Proteine allein nicht in der Lage sind, das Sm-Core zu formieren. Um diese Blockade aufzulösen und die RNA-Bindung zu erlauben, bedarf es des SMN-Komplexes (**Abb. 2**). Dieser übernimmt die Sm-Proteine in der vom Chaperon angeordneten räumlichen Orientierung und vermittelt die Dissoziation des für die RNP-Bildung inhibitorischen Chaperons. Als Folge dieser Reaktion liegen die Sm-Proteine am SMN-Komplex als offener Ring vor. In diesem Zustand kann nun die RNA an das Innere des Rings binden. Anschließend versiegelt der SMN-Komplex die Sm-Proteine um die Sm-Site zu der für snRNPs charakteristischen Ringstruktur. Der Befund, dass der SMN-Komplex die durch pICln verursachte kinetische Falle aufzulösen vermag, ist konsistent mit einer Funktion des Ersteren als Katalysator für den *assembly*-Prozess (**Abb. 2**) [9].

Ausblick

Der humane SMN-Komplex besteht aus acht Untereinheiten. Für seine katalytische Aktivität im U snRNP-*assembly* sind allerdings nur zwei Untereinheiten, nämlich SMN und Gemin 2, notwendig. Dieser Befund wird dadurch untermauert, dass einige Spezies, wie z. B. das Insekt *Drosophila melanogaster*, einen SMN-Komplex mit nur diesen zwei

Untereinheiten besitzen. Was also ist die Funktion der weiteren sechs Untereinheiten? Eine naheliegende und zu untersuchende Hypothese ist, dass sie andere Prozesse während der snRNP-Biogenese wie etwa die Hypermethylierung der Capstruktur der snRNA oder den Kernimport des snRNPs mit dem *assembly* koppeln.

Die wichtigste Frage, die es in naher Zukunft zu klären gilt, ist sicherlich, wie der SMN-Komplex den Transfer der Sm-Proteine auf die RNA katalysiert. Um diese Frage zu beantworten, kann man sich zunächst die Wirkungsweise verwandter makromolekularer Maschinen zu Hilfe ziehen. Wie oben erwähnt, bilden die Sm-Proteine im Sm-Core eine Ringstruktur. Eine topologisch ähnliche Struktur wird durch DNA-Klemmen (*clamps*) gebildet, um gering-prozessive DNA-Polymerasen auf ihrem DNA-Template zu halten. Analog zum Sm-Core, welches durch den SMN-Komplex assembliert wird, werden *clamps* aktiv durch sogenannte *clamp loader*-Enzymkomplexe auf DNA geladen. Der Ringschluss der Klammer um die DNA erfolgt durch eine ATP-getriebene Konformationsänderung des *clamp loader*. Die Ermittlung der Struktur des SMN-Komplexes wird in Zukunft die Frage klären, ob der SMN-Komplex ähnlich wie ein *clamp loader* wirkt, um Sm-Proteine auf snRNA zu laden. ■

Literatur

- [1] Wahl MC, Will CL, Lührmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136:701–718
- [2] Will CL, Lührmann R (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13:290–301
- [3] Ohno M, Segref A, Bachi A et al. (2000) PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101:187–198
- [4] Neuenkirchen N, Chari A, Fischer U (2008) Deciphering the assembly pathway of Sm-class U snRNPs. *FEBS Lett* 582:1997–2003
- [5] Ellis RJ, Minton AP (2006) Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem* 387:485–497
- [6] Meister G, Bühler D, Pillai R et al. (2001) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat Cell Biol* 3:945–949

- [7] Meister G, Fischer U (2002) Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. *Embo J* 21:5853–5863
- [8] Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G (2002) Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* 298:1775–1779
- [9] Chari A, Golas MM, Klingenhäger M et al. (2008) An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs. *Cell* 135:497–509

Korrespondenzadresse:

Ashwin Chari
 Prof. Dr. Utz Fischer
 Lehrstuhl für Biochemie
 Theodor-Boveri-Institut (Biozentrum)
 Universität Würzburg
 Am Hubland
 D-97074 Würzburg
 Tel.: 0931-888-4029
 Fax: 0931-888-4028
 ashwin.chari@biozentrum.uni-wuerzburg.de
 utz.fischer@biozentrum.uni-wuerzburg.de

AUTOREN



Ashwin Chari (links), Utz Fischer (rechts)

Ashwin Chari

1999–2004 Studium der Biochemie, Molekularbiologie und Biophysik an der ETH Zürich. Seit 2004 Doktorand am Lehrstuhl für Biochemie, Theodor-Boveri-Institut (Biozentrum), Universität Würzburg.

Utz Fischer

1983–1988 Biochemiestudium an der Freien Universität Berlin. 1989–1992 Promotion an der Philipps-Universität Marburg. 1992–1997 Postdoctoral Fellow am IMT in Marburg und am Howard Hughes Medical Institute, Philadelphia. 1997–2003 Leiter einer unabhängigen Arbeitsgruppe am MPI für Biochemie, Martinsried. Seit 2003 Professor für Biochemie am Theodor-Boveri-Institut, Universität Würzburg.