

Versteckte Signale in der RNA

RNA-Moleküle haben als Bindeglieder zwischen der DNA und Proteinen eine zentrale Bedeutung im zellulären Geschehen. Sie sind flexibel, hochgradig reguliert* und treten in einer großen Formenvielfalt auf. Einer Forschungsgruppe ist es gelungen, mithilfe einer weiterentwickelten Methode die Sekundärstruktur* verschiedener RNA-Spezies* präzise zu kartographieren. Dabei wurden eine neue Ebene der genetischen Regulation und rätselhafte Muster in codierenden messenger RNA (mRNA)-Abschnitten entdeckt. Diese Befunde stellen möglicherweise ein weiteres belastbares Design-Indiz dar.

Boris Schmidtgal

Die Ribonukleinsäure (RNA) ist ein Makromolekül, das genetische Information von der DNA zum Ort der Proteinsynthese (Ribosom) überträgt. Es wurde zu Beginn der Ära der Molekularbiologie (1950er-Jahre) zunächst eher stiefmütterlich behandelt. Denn neben ihrer scheinbar unspektakulären Funktion ist die RNA auch in der Handhabung im Vergleich zur DNA oder Proteinen empfindlicher¹ und ihre chemische

Der RNA-Stoffwechsel ist äußerst kompliziert, hochgradig reguliert und für die Proteinbiosynthese von zentraler Bedeutung.

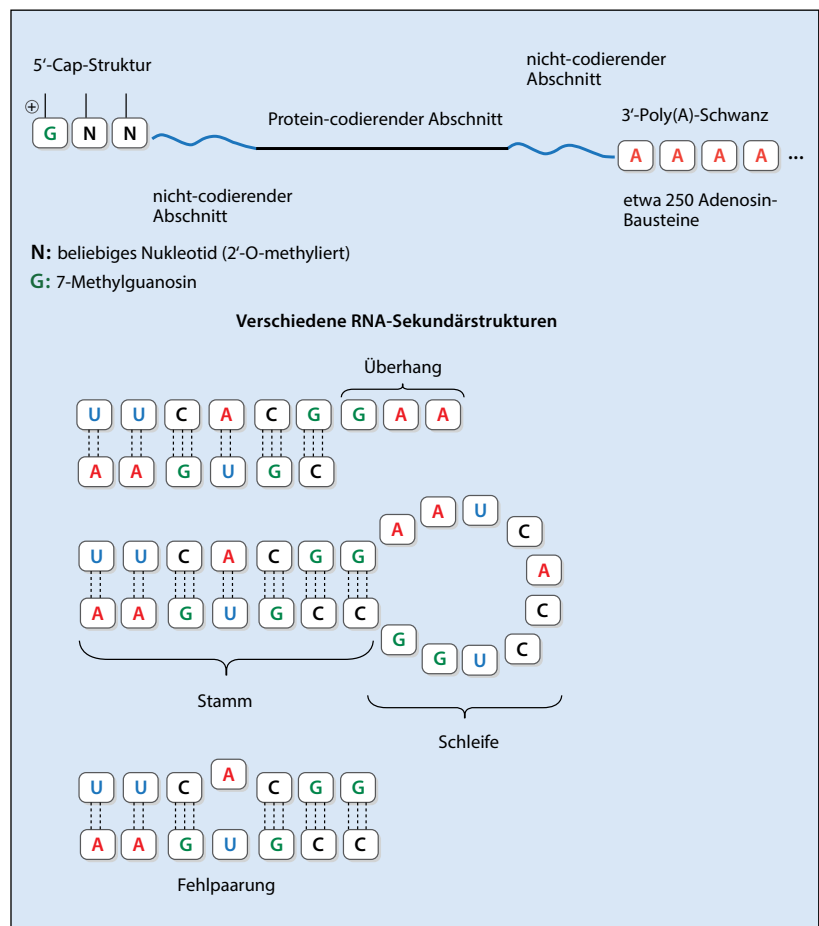
Synthese ist aufwändiger als diejenige der beiden anderen Biopolymere. Erst seit der Entdeckung des Spleißvorgangs* in Eukaryoten* (SHARP 1977) nahm die Zahl an Fachpublikationen auf dem Gebiet der RNA-Chemie und -Biochemie bedeutend zu. Es folgten weitere wichtige Entdeckungen wie der Nachweis katalytischer* Eigenschaften bei der RNA (CECH 1981) und der RNA-Interferenz* (FIRE & MELLO 1998). Es wurde zunehmend deutlich, dass der RNA-Stoffwechsel äußerst kompliziert, hochgradig reguliert und für die Proteinbiosynthese von zentraler Bedeutung ist. In Eukaryoten scheint nach gegenwärtigem Kenntnisstand sogar mehr Regulierung auf der Ebene der RNA stattzufinden als auf der Ebene der DNA.

Struktur der RNA beeinflusst Genregulation

Der Fluss der genetischen Information von der DNA zu den Proteinen wird durch die mRNA vermittelt. Nach der Transkription* werden mRNA-Moleküle auf viele verschiedene Weisen modifiziert. Dies dient im Wesentlichen dazu, die Stabilität der mRNA zu erhöhen und die Erkennung durch das Ribosom zu

verbessern. Dazu zählen die 5'-Cap Struktur, der 3'-Poly-Adenosin-Schwanz und die Faltung der mRNA* zu einer Haarnadel-Struktur (Stamm-Schleife, s. Abb. 1) unter Ausbildung von Basenpaaren. Nach Abschluss der Transkription findet das Spleißen der mRNA statt – ein Vorgang, bei dem aus dem zuerst transkribierten RNA-Molekül verschiedene mRNA-Moleküle hervorgehen können. Für jeden dieser regulatorischen Vorgänge und für viele weitere sind die Sekundär- und Tertiärstruktur (Faltung) der mRNA von besonderer Bedeutung, da sie festlegen, welche Bindungsstellen oder Hohlräume für Interaktionen mit Proteinen oder anderen RNA-Molekülen zugänglich sind.

Abb. 1 Schematische Darstellung des Aufbaus einer mRNA und der Struktur von RNA-Strängen mit unvollständiger Basenpaarung. Ungepaarte Nukleobasen reagieren in einem deutlich größeren Ausmaß mit DMS als gepaarte (s. Text).



Glossar

Chaperone: Proteine, die andere Proteine oder RNA-Moleküle in die richtige Form falten oder fehlgefaltete Biomoleküle korrigieren.

Eukaryoten: Lebewesen, die aus Zellen mit echtem Kern zusammengesetzt sind.

Genexpression (kurz: **Expression**): Synthese von Proteinen anhand der Information aus bestimmten Genen. Ein Gen ist dann exprimiert, wenn das entsprechende Protein am Ribosom synthetisiert ist.

Katalyse (katalytische Eigenschaften): Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit. Katalysatoren greifen zwar in die Reaktion ein, werden aber nicht verbraucht (umgewandelt).

Methylierung (methyliert): Das Anbringen einer CH_3 -Gruppe an einem Molekül.

mRNA: messenger RNA (Boten-RNS), überträgt Information von der DNA zum Protein.

Nukleobase: Die Bausteine der DNA und RNA werden als Nukleotide bezeichnet. Nukleotide sind aus einem Zucker (Ribose) und einem Purin oder Pyrimidin zusammengesetzt. Purine bzw. Pyrimidine werden allgemein als Nukleobasen bezeichnet (Abb. 2).

Regulation: Physiologische Vorgänge können beschleunigt, verlangsamt oder ganz angehalten werden. Dies erfolgt häufig durch das Anbringen molekularer „Signalgruppen“ durch dafür zuständige Enzyme. Die Signalgruppen veranlassen andere Enzyme entweder dazu, das entsprechend gekennzeichnete Biomolekül abzubauen oder es intakt zu lassen.

RNA-Interferenz: Ein Vorgang, bei dem genetische Information auf der Ebene der RNA „stillgelegt“ wird. Unter Beteiligung des Multienzymkomplexes RISC (RNA induced silencing complex) und kleiner RNA-Moleküle (19–23 Basenpaare) werden bestimmte $\rightarrow$ mRNA gespalten oder einfach blockiert. Dadurch wird die $\rightarrow$ Translation dieser mRNA verhindert.

RNA-Sequenzierungsmethode: Vorge-

hensweise zur Bestimmung der Reihenfolge der Bausteine eines RNA-Moleküls (Primärstruktur). Gemäß Übereinkunft werden Nukleinsäurestränge vom 5'-Ende zum 3'-Ende aufgeschrieben. Die mRNA wird vom 5'-Ende zum 3'-Ende synthetisiert.

RNA-Spezies: Allgemeiner Begriff für verschiedene Typen von RNA-Molekülen.

Sekundärstruktur: Als Primärstruktur wird die Reihenfolge der RNA-Bausteine (Nukleotide) bezeichnet. Zwei RNA-Moleküle können – sofern ihre Primärstrukturen zueinander passen – einen Doppelstrang bilden. Dabei bilden sich Watson-Crick-Basenpaare (A-U, C-G) aus. Oft können zwei gleiche RNA-Stränge unterschiedliche Sekundärstrukturen annehmen.

Spleißvorgang: Hierbei werden aus einem zunächst $\rightarrow$ transkribierten RNA-Molekül Teile der Sequenz (sog. Introns) unter Mitwirkung des Spleißosoms (großer RNA-Proteinkomplex) ausgeschnitten. Die anderen Teile (Exons) werden miteinander verbunden, sodass das später ins Protein $\rightarrow$ translatierte RNA-Molekül entsteht. Beim Spleißen können aus zwei gleichen mRNA-Molekülen unterschiedliche Exons entstehen, sodass bei der Translation verschiedene Proteine resultieren.

Startcodon: Eine Kombination aus drei Nukleotiden in der RNA, die am Ribosom den Beginn der Synthese eines Proteins anzeigt.

stromaufwärts: entgegen der Syntheserichtung der mRNA-Sequenz (3' nach 5').

Transkription (transkribiert): Synthese einer „Abschrift“ einer DNA-Sequenz in der Form einer RNA-Sequenz ($\rightarrow$ mRNA) durch die Wirkung einer RNA-Polymerase.

Translation (translatiert): Synthese eines Proteins anhand der entsprechenden mRNA-Sequenz (Primärstruktur) am Ribosom.

einem vertieften Verständnis der Bildung von Sekundärstrukturen sowie der Faltungsdynamik von RNA-Molekülen. Die große Mehrheit der Studien zur Struktur und Funktion von RNA-Molekülen wurde allerdings *in vitro* durchgeführt, d. h. die untersuchten RNA-Moleküle wurden isoliert und unter experimentellen Bedingungen untersucht, die nicht denjenigen des zellulären Milieus entsprechen. Der naheliegende Verdacht, dass sich RNA-Moleküle *in vivo* (in lebenden Zellen) deutlich anders verhalten als *in vitro*, hat sich bestätigt. Denn es konnte nachgewiesen werden, dass RNA-Moleküle im zellulären Milieu bedeutend weniger gefaltet vorliegen, als dies unter *in vitro*-Bedingungen der Fall ist (ROUSKIN 2014). Zwecks sprachlicher Vereinfachung wird die Gesamtheit der strukturellen Beschaffenheit aller RNA-Moleküle in der Zelle als RNA-Strukturoom bezeichnet.

Neben einigen anderen Faktoren hat sich die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen als besonders kritisch für den Faltungszustand von RNA-Molekülen erwiesen. Hohe Konzentrationen von 50 mM Mg^{2+} , wie sie bei *in vitro*-Versuchen oft zum Einsatz kommen, bewirken eine deutlich stärkere Ausbildung von Sekundärstrukturen als die 0,5–1 mM Mg^{2+} , die tatsächlich unter zellulären Bedingungen vorliegen (LEAMY 2017). Folglich hat eine Forschergruppe um P. C. BEVILACQUA und S. M. ASSMANN sich der Aufgabe gewidmet, das Strukturoom der RNA-Moleküle *in vivo* zu untersuchen, und ist dabei zu überraschenden Ergebnissen gekommen.

Methode: Reaktion der Nukleobasen mit Dimethylsulfat *in vivo*

Um die Sekundärstruktur einer RNA zu analysieren, muss herausgefunden werden, ob die Nukleobasen* in Basenpaaren involviert sind oder nicht. Eine *in vitro* angewandte Vorgehensweise basiert auf der Reaktion der RNA mit Dimethylsulfat (DMS) (SENECOFF & MEAGHER 1992). Dieses Reagenz methyliert* selektiv Adenosin und Cytosin (Abb. 2) in Bereichen, wo diese Nukleobasen vorwiegend ungepaart vorliegen (Schleifen, Überhänge, Fehlpaarungen oder Verbindungsbereiche, s. Abb. 1). Der Zustand der anderen zwei Nukleobasen Guanin (G) und Uracil (U) kann dann indirekt erschlossen werden. Anhand einer weiterentwickelten Version dieser Technik in Kombination mit einer modernen RNA-Sequenzierungsmethode* gelang es der Gruppe um BEVILACQUA und ASSMANN 18S-(ribosomale)RNA sowie 10 623 verschiedene mRNA-Moleküle der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) im Hinblick auf die Reaktivität der Nukleobasen mit DMS zu kartographieren (DING et al. 2014).

Faktoren, die sich auf die räumliche Struktur der RNA-Moleküle auswirken

RNA faltet sich zu sehr komplexen Strukturen, die überaus dynamisch sind. Die Faltung ist von vielen Parametern abhängig, wie etwa dem pH-Wert, der Gegenwart von Metallionen und der Konzentration der Biomoleküle. Insgesamt ist das Zusammenspiel der Faktoren derart komplex, dass eine Vorhersage der Sekundärstruktur z. B. mittels Computersimulation ein wenig treffsicheres Verfahren darstellt (BEVILACQUA 2016). Daher besteht aktuell großes Interesse an

Experimente *in vivo* fördern unerwartete Ergebnisse zu Tage

Die durch *in vivo*-Analyse erhaltene Reaktivitätsverteilung der Nukleobasen mit DMS ergab einige interessante Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß an Sekundärstruktur der RNA und ihrer Funktion. Eine Untersuchung nicht translaterter* Regionen einer Reihe von mRNA ergab, dass die Beschaffenheit der Sekundärstruktur dieser Abschnitte (5 Nukleotide stromaufwärts* zum Startcodon*) eine Art Schalterfunktion aufweist (Abb. 3) (DING et al. 2014). In mRNAs, die eine besonders hohe Translationseffizienz aufweisen, ist dieser Bereich unstrukturiert, während mRNAs, die weniger effizient translatiert werden, an dieser Stelle über eine eher geschlossene Sekundärstruktur verfügen. Offenbar handelt es sich hier um eine Bindungsstelle für Ribosomen, die in Abhängigkeit von der Sekundärstruktur entweder aktiv oder weniger aktiv sein kann. Interessanterweise wurden unstrukturierte Regionen auch in der Nähe von Stopp-Codons nachgewiesen. Diese Befunde legen den Autoren zufolge nahe, dass das Ausmaß an Sekundärstruktur schon in der prä-mRNA (vor dem Spleißen) codiert sei.

Ein weiteres Regulationselement der mRNA wurde durch Vergleich der *in vivo*-Reaktivitätsprofile verschiedener mRNA von *Arabidopsis* ausgemacht (TANG et al. 2016). mRNAs mit einer höheren Reaktivität gegenüber DMS (wenig Sekundärstruktur) codieren demnach Proteine, die anschließend schnell eine stabile Tertiärstruktur (Faltung) bilden. Dagegen codieren mRNAs mit geringerer DMS-Reaktivität solche Proteine, die unstrukturierte Regionen enthalten und folglich eher langsam die gefaltete, funktionale Form annehmen. Auf diese Weise wird demnach durch die mRNA-Struktur die Geschwindigkeit der Proteinsynthese reguliert. So können Proteine, die aufgrund langsamer Bildung ihrer Tertiärstruktur zur Fehlfaltung neigen, noch während der Synthese am Ribosom in die richtige Form gebracht werden. Dies beugt der Anhäufung zelltoxischer Protein-Aggregate vor. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass RNA-Moleküle, die im Zusammenhang mit Stressreaktionen stehen, häufig kaum Sekundärstrukturen ausbilden, sondern eher als Einzelstränge vorliegen (DING et al. 2014). Die Autoren der Studie schließen daraus, dass die molekulare Flexibilität schnelle Reaktionen auf zellulären Stress, etwa durch Schwermetallionen oder Kälte, ermöglicht.

Die Analysen legen einen versteckten Code in der *in-vivo*-RNA offen, der die Translation beeinflusst.

tur (Faltung) bilden. Dagegen codieren mRNAs mit geringerer DMS-Reaktivität solche Proteine, die unstrukturierte Regionen enthalten und folglich eher langsam die gefaltete, funktionale Form annehmen. Auf diese Weise wird demnach durch die mRNA-Struktur die Geschwindigkeit der Proteinsynthese reguliert. So können Proteine, die aufgrund langsamer Bildung ihrer Tertiärstruktur zur Fehlfaltung neigen, noch während der Synthese am Ribosom in die richtige Form gebracht werden. Dies beugt der Anhäufung zelltoxischer Protein-Aggregate vor. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass RNA-Moleküle, die im Zusammenhang mit Stressreaktionen stehen, häufig kaum Sekundärstrukturen ausbilden, sondern eher als Einzelstränge vorliegen (DING et al. 2014). Die Autoren der Studie schließen daraus, dass die molekulare Flexibilität schnelle Reaktionen auf zellulären Stress, etwa durch Schwermetallionen oder Kälte, ermöglicht.

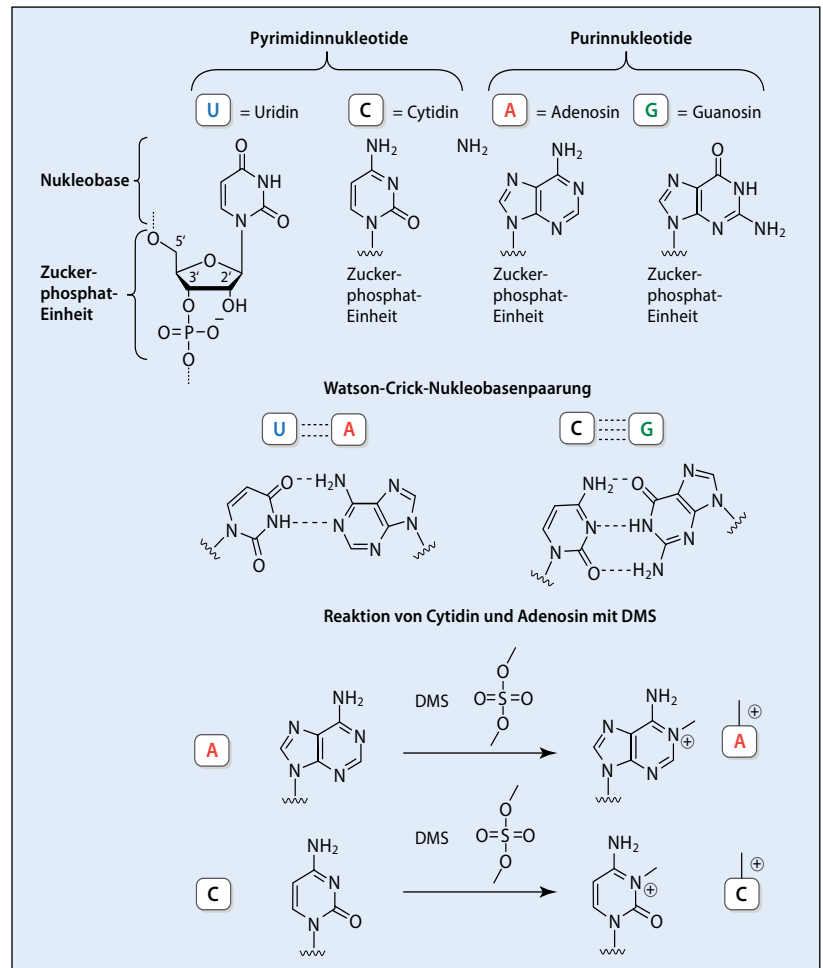
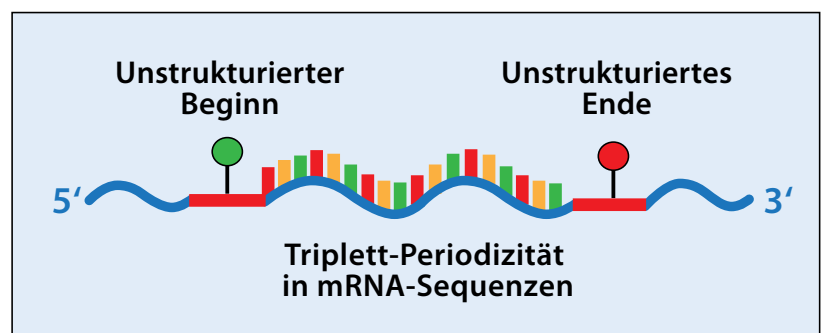


Abb. 2 Die vier Nukleotide der RNA und die Reaktion von A und C mit DMS.

Schließlich wurde durch die Umsetzung mit DMS eine besonders auffällige „Signatur“ in mRNAs ermittelt: In Protein-codierenden Bereichen existiert eine Periodizität von drei Nukleotiden, die in nicht translatierten Regionen abwesend ist (Abb. 3) (DING et al. 2014). Bemerkenswerterweise korreliert dieses Signal mit der Translationseffizienz der jeweiligen mRNA. Codierende mRNA-Sequenzen mit einem robusten Triplet-Signal weisen eine hohe Translationseffizienz auf, während ein wenig ausgeprägtes Triplet-Signal oder dessen Abwesenheit mit einer geringen Translationseffizienz einhergehen. Die Autoren selbst kommentieren diesen Befund mit einem gewissen Erstaunen: „Unsere Analyse legt also einen versteckten Code in *in-vivo*-RNA offen, der die Assoziation mit dem Ribosom beeinflusst und folglich die Translation.“ Da dieses Phänomen auch in He-

Abb. 3 Triplet-Periodizität in mRNA-Sequenzen: Rote Balken stellen Nukleotide hoher Reaktivität mit DMS dar, gelbe mittlerer und grüne geringer. Die codierende Einheit (CDS) wird von unstrukturierten Abschnitten (blau) am Start- bzw. Stopp-Codon (rot) flankiert.



fen nachgewiesen werden konnte und auch bei Säugetieren vermutet wird, stellen die Autoren die Behauptung auf, dass dieses Signal als universelles regulatorisches Muster durch Evolution zustande gekommen sein müsse. Allerdings ist den Autoren zufolge völlig unklar, weshalb oder auf welche Weise die Evolution solche Muster hervorgebracht haben soll.

Fazit: mRNA weist Design-Indizien auf

Die beschriebenen Entdeckungen stellen ein bisher unbekanntes Regulationsprinzip genetischer Information dar: Auf der Ebene der RNA-Sekundärstruktur wird die Expression* bestimmter Gene verstärkt oder abgeschwächt. Wie weit dieses Prinzip in den Domänen des Lebens verbreitet ist, wird sicherlich Gegenstand der zukünftigen Forschung sein. Auch wird es von Interesse sein, zu erfahren, in welchem Ausmaß diese Regulation in Organismen wirksam ist. Es bleibt allerdings festzuhalten, dass mit jeder weiteren Regulationsebene evolutive Erklärungen für das Phänomen Leben umso weniger plausibel erscheinen. Die angeführten Beispiele für Steuerelemente in der mRNA, insbesondere dasjenige zur Regulation der Synthesegeschwindigkeit von Proteinen (verhindert Fehlfaltung), weisen dagegen auf eine planvolle Verursachung biologischer Funktionseinheiten hin und stellen daher ein Design-Indiz dar. Es sollte ferner nicht außer Acht gelassen werden, dass für die korrekte Faltung bzw. Wiederherstellung fehlgefalteter RNA-Moleküle eine Vielzahl an Chaperonen* unverzichtbar ist (RUSSELL 2008). Dies stellt ein weiteres Henne-Ei-Problem für die Evolutionstheorie dar, welches aufgrund der offenbar hohen Relevanz wohldefinierter RNA-Strukturen bedeutend verschärft wird.

Steuerelemente in der mRNA, insbesondere zur Regulation der Synthesegeschwindigkeit von Proteinen, weisen auf eine planvolle Verursachung biologischer Funktionseinheiten hin.

Schließlich noch eine Anmerkung zum Rätsel um die Triplet-Periodizität der DMS-Reaktivitäten von mRNA-Nukleotiden: Die Autoren der Studie bezeichnen diese Erschei-

nung zutreffend als „versteckten Code“, da zu dessen Offenlegung ein sehr aufwändiges Decodierungsverfahren genutzt werden musste. Die Beschreibungen der Muster deuten auf eine sehr regelmäßige räumliche Anordnung der Nukleotide in codierenden Bereichen der mRNA hin – vergleichbar mit einem Schlüsselbart oder einem Strichcode. Dieses Phänomen wirkt artifiziell (künstvoll gefertigt) und hat durchaus auch einen ästhetischen Aspekt, weshalb auch hier ein intelligenter Urheber naheliegend erscheint.

Anmerkung

¹ Die RNA wird schnell durch ubiquitär vorkommende RNasen abgebaut. Daher ist sie durch einen einfachen Aufschluss einer Zelle nicht leicht zu isolieren. Zudem ist die RNA schon bei leicht alkalischem pH-Wert 8 für Hydrolyse (Abbau) anfällig (OIVANEN et al. 1998).

Literatur

- BERGET SM, MOORE C & SHARP PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74, 3171-3175.
- BEVILACQUA PC et al. (2016) Genome-wide analysis of RNA secondary structure. *Annu. Rev. Genet.* 50, 235-66.
- CECH TR, ZAUG AJ & GRABOWSKI PJ (1981) *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27, 487-496.
- DING Y et al. (2014) *In vivo* genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory effects. *Nature* 505, 696-699.
- FIRE A et al. (1998) RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 15502-15507.
- LEAMY KA, YENNAWAR NH & BEVILACQUA PC (2017) Cooperative RNA folding under cellular conditions arises from both tertiary structure stabilization and secondary structure destabilization. *Biochemistry* 56, 27, 3422-3433.
- MELLO CC et al. (1998) RNAi in *C. elegans*: Soaking in the genome sequence. *Science* 282, 430-431.
- OIVANEN M, KUUSELA S & LÖNNBERG H (1998) Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by Brønsted acids and bases. *Chem. Rev.* 98, 961-990.
- ROUSKIN S et al. (2014) Genome-wide probing of RNA structure reveals active unfolding of mRNA structures in vivo. *Nature* 505, 701-705.
- RUSSELL R (2008) RNA misfolding and the action of chaperones. *Front. Biosci.* 13, 1-20.
- SENECOFF JF & MEAGHER RB (1992) *In vivo* analysis of plant RNA structure: soybean 18S ribosomal and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit RNAs. *Plant Mol. Biol.* 18, 219-234.
- TANG Y, ASSMANN SM & BEVILACQUA PC (2016) Protein Structure is related to RNA structural reactivity in vivo. *J. Mol. Biol.* 428, 758-766.