

Biochemie und Molekulargenetik 2001

Dank der Strukturanalyse der RNA-Polymerase II verstehen wir die Gentranskription in Eukaryonten jetzt besser. Die massenspektrometrische Proteomanalyse entschlüsselt Protein-Protein-Wechselwirkungen und Multiproteinkomplexe in Zellen. Pharmakogenomik soll die Effizienz und Sicherheit von Arzneimitteln erhöhen. Neue Erkenntnisse zur physiologischen Funktion von Inositphosphaten zeichnen ein immer differenzierteres Bild der intrazellulären Signalübertragung.

Strukturbiologie der Transkription

◆ Die Strukturanalyse der RNA-Polymerase offenbarte die wunderbare Architektur und Funktion der Multiproteinmaschine, die unsere Gene transkribiert.

Eine fehlerfreie Transkription der Gene ist die Grundvoraussetzung für das Entstehen und den Erhalt eines Organismus. Die verantwortungsvolle Aufgabe, die DNA im Zellkern zu kopieren, obliegt dem zentralen Enzym RNA-Polymerase II. Diese Polymerase synthetisiert den Botenstoff mRNA, der als Vorlage für die Proteinsynthese durch das Ribosom dient [siehe Trendberichte 2000, *Nachr. Chem.* 2000, 48, 291–297]. Die lang ersehnte und nun gelöste dreidimensionale Struktur von RNA-Polymerase II offenbart atomare Details einer biologischen Nanomaschine, die sich an die DNA-Vorlage ebenso klammert wie an ihr RNA-Produkt.

Die zentrale Genexpressionsmaschine

◆ Das große Interesse an Struktur und Funktion der RNA-Polymerase II rührt daher, dass dieses Enzym einen der wichtigsten Lebensprozesse katalysiert. Die Transkription ist der erste Schritt der Genexpression und wird daher umfassend reguliert. Die mannigfaltige Regulation der Polymerase steuert die Organismenentwicklung, das Zellwachstum sowie viele lebenserhaltende Prozesse, darunter die Immunantwort. Regulatorfehler verursachen eine Vielzahl menschlicher Krankheiten. Um bestimmte Gene zu einer bestimmten Zeit und in bestimmten Geweben zu transkribieren, integriert die Polymerase unterschiedlichste Signale. Diese Mechanismen ziehen weltweit hunderte von Forschungsgruppen in ihren Bann.

Eine technische Tour de Force

◆ Für unser Verständnis des Transkriptionsmechanismus und seiner Regulation hat die molekulare Struk-

tur der Polymerase eine zentrale Bedeutung. Trotzdem lag eine Strukturbestimmung lange Zeit außer Reichweite, was auf die enorme Größe und Komplexität von RNA-Polymerase II und die daraus resultierenden technischen Schwierigkeiten zurückzuführen war: Der Enzymkomplex besteht aus 12 Proteinuntereinheiten und weist ein stolzes Molekulargewicht von einer halben Million Dalton auf. Es ist langjähriger biochemischer Arbeit, rasanten technischen Entwicklungen auf dem Gebiet der Röntgenstrukturanalyse sowie den leistungsstarken modernen Computern zu verdanken, dass es im vergangenen Jahr gelang, die Kristallstruktur von RNA-Polymerase II aus Bäckerhefe zu bestimmen.^{1,2)}

Der Weg zur Strukturaufklärung war mit Hindernissen gepflastert. Um die nötigen Mengen des Enzyms in Reinform zu erhalten, mussten viele tausend Liter Hefekultur aufgearbeitet werden. Erste Kristalle waren außerdem nicht gut geordnet, wurden aber mittels eines neuartigen Verfahrens der Kristall-Schrumpfung verbessert. An den kalifornischen Syn-

chrotrons von Stanford und Berkeley wurden mit Hilfe modernster Technik schließlich Röntgenbeugungsdaten erhalten, die eine Strukturbestimmung mit einer Auflösung von 2,8Å erlaubten. Diese Daten offenbaren chemische Aspekte einer makromolekularen Maschine, die aus etwa 30000 Atomen besteht (Wasserstoffatome nicht mitgerechnet) und somit zu den größten asymmetrischen Molekülkomplexen zählt, deren dreidimensionale Struktur in atomarem Detail bekannt ist.

DNA in einer Spalte

◆ Die Struktur der RNA-Polymerase II zeigt, dass zwischen den beiden großen Proteinuntereinheiten eine tiefe Spalte klafft, die die DNA aufnimmt (Abbildung 1). Am Eingang der Spalte erfassen „Ober- und Unterkiefer“ der Polymerase die zu transkribierende DNA. Am Boden der Spalte, unterhalb der DNA, befindet sich das aktive Zentrum. Die kleinen Proteinuntereinheiten scharen sich außen um die zwei großen Untereinheiten. Mit Hilfe dieser Daten wurde in einem zweiten Schritt die Struktur eines aktiv transkribierenden Polymerase-Komplexes aufgeklärt, in dem eintretende DNA und neu synthetisierte RNA sichtbar sind (Abbildung 2).³⁾ Diese Ergebnisse schaffen eine Grundlage, um den Mechanismus der Gentranskription in Eukaryonten zu verstehen.

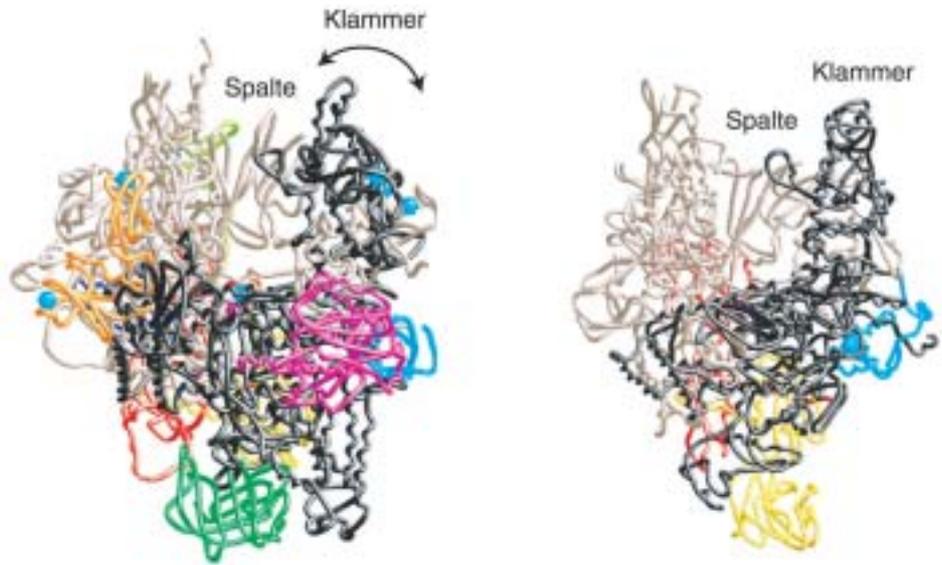


Abb. 1. Die Kristallstrukturen der eukaryontischen RNA-Polymerase II^{1,2)} (links) und einer bakteriellen RNA-Polymerase⁸⁾ (rechts) zeigen eine gemeinsame Architektur. Fünf entsprechende Proteinuntereinheiten sind in der gleichen Farbe dargestellt. Eine pinkfarbene Kugel am Boden der Spalte markiert das aktive Zentrum.

tenden DNA-Doppelhelix, das Offenhalten der entstehenden Transkriptionsblase sowie das Ablösen der RNA von der DNA zu sorgen. Da die Spalte oberhalb des aktiven Zentrums vollständig mit DNA und RNA gefüllt ist, stellt sich die Frage, wie die zur Synthese benötigten Substrate zum aktiven Zentrum gelangen. Auch dafür hat die Kristallstruktur eine Antwort parat: Eine Pore im Proteinkomplex dient als Substrat-Transportweg zum aktiven Zentrum.

Katalytische Metallionen

◆ Die Anordnung der Nucleinsäuren um zwei Metallionen im aktiven Zentrum lässt vermuten, dass der chemische Mechanismus der Nucleinsäure-Polymerisation bei der Synthese von RNA (Transkription) und DNA (Replikation) der gleiche ist. Eine Reihe von DNA-Polymerasen hat nämlich im aktiven Zentrum zwei ähnlich angeordnete Metallionen, die für die Katalyse verantwortlich

Eine molekulare Klammer

◆ Ein Vergleich der Struktur der freien Polymerase mit der des transkribierenden Komplexes zeigt, dass sich eine Domäne des Proteins wie eine molekulare Klammer über der DNA-Vorlage und dem RNA-Produkt schließt. Die geschlossene Klammer gewährleistet, dass die Transkription eines Gens nicht vorzeitig beendet wird, selbst wenn das Gen viele tausend Basen lang ist. Dies verhindert den Verlust eines partiellen RNA-Transkripts.

Konservierte Strukturelemente auf der Oberfläche des Enzyms scheinen für die Entwindung der eintretenden

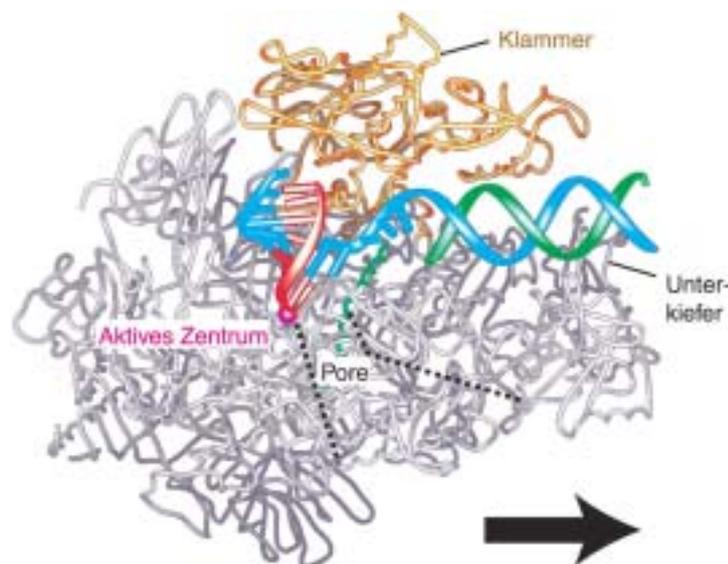


Abb. 2. Struktur der transkribierenden RNA-Polymerase II.³⁾ Eine Klammer (gelb) schließt sich über der DNA (blau/grün) und der RNA (rot), die vor der Kristallisation im aktiven Zentrum synthetisiert wurde. Während der Transkription bewegt sich die Polymerase nach rechts.

sind.⁴⁾ Allerdings sind weitere Studien nötig, um den exakten Reaktionsmechanismus der RNA-Polymerisation aufzuklären.

Polymerase integriert die Kernprozesse

◆ Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die Transkription nicht isoliert abläuft. Vielmehr integriert RNA-Polymerase II die biochemischen Prozesse im Zellkern.⁵⁾ So kommt es sofort nach Beginn der Transkription zur Reifung der entstehenden RNA (RNA processing). Sobald die entstehende RNA die Oberfläche der Polymerase verlässt, wird sie an ihrem Ende mit einer Cap-Struktur versehen, die vor Degradation schützt. Ebenso werden Teile der RNA, die nicht für Protein kodieren, bereits während der RNA-Synthese entfernt (splicing). Des Weiteren laufen verschiedene Prozesse ab, die das Ende der RNA-Synthese einläuten und mit der Transkription koordiniert sind.

Die Synthese der RNA ist somit eng an ihre nachfolgende Reifung gekoppelt. Ein wahrscheinlicher molekularer Mechanismus dieser Kopplung wird durch die Strukturdaten gestützt. Die C-terminale Domäne der größten Untereinheit von RNA-Polymerase II wird bald nach dem Beginn der Transkription phosphoryliert, was zur Bindung von Proteinen führt, die verschiedene RNA-Reifungsprozesse bewirken. Diese C-terminale Domäne ist beweglich mit dem Kern der Polymerase verbunden, um als Landeplatz für die Reifungsfaktoren zu dienen. In unmittelbarer Nähe dieser Domäne tritt auch die neu synthetisierte RNA an die Oberfläche.

Die Transkription ist auch an eine gezielte Reparatur von Schäden in der DNA gekoppelt.⁶⁾ Fehler in der DNA werden ständig durch UV-Licht oder chemische Stoffe verursacht und bringen die Polymerase zum Stillstand. Die gestoppte Polymerase wird allerdings durch bestimmte Proteine erkannt, die wie molekulare Brücken wirken und einen Proteinkomplex heranführen, der die DNA repariert. Es scheint also in Kernen lebender

Zellen gigantische Transkriptionsfabriken zu geben, in denen Transkription, RNA-Reifung und DNA-Reparatur koordiniert werden.

Fehler werden nicht geduldet

◆ Wie stellt die Polymerase sicher, dass ein Gen korrekt transkribiert wurde? Die Natur hat die molekulare Maschine zu diesem Zweck mit einer Funktion zur Fehlerkorrektur ausgestattet (proofreading). Ist versehentlich eine Base in die RNA eingebaut worden, die nicht zur entsprechenden Base in der DNA-Vorlage komplementär ist, so entsteht eine Fehlpaarung, die den Komplex aus Polymerase mit DNA und RNA destabilisiert.⁷⁾ Das führt dazu, dass die Polymerase innehält und Ihre Bewegungsrichtung ändert. Bei der Rückwärtsbewegung wird ein kurzes Stück RNA, das die falsch inkorporierte Base enthält, durch die Pore unter dem aktiven Zentrum hinausgefädelt. Am Ausgang der Pore bindet ein Helferprotein, das das hinausgefädelt Stück RNA abtrennt und somit den Fehler korrigiert. Nun schaltet die Polymerase wieder in den Vorwärtsgang und setzt die RNA-Synthese fort.

Im Vergleich: Bakterien

◆ In einer bahnbrechenden Arbeit wurde 1999 auch die Struktur einer bakteriellen RNA-Polymerase bestimmt, die aus fünf Proteinuntereinheiten besteht (Abbildung 1).⁸⁾ Ein Vergleich dieser Struktur mit der eukaryontischen RNA-Polymerase II zeigt eine erstaunliche Übereinstimmung rund um das aktive Zentrum, was darauf hindeutet, dass die Grundmechanismen der Transkription in allen Lebensformen die gleichen sind. Die Oberflächen der beiden Transkriptionsmaschinen sind allerdings sehr unterschiedlich. Dies hängt sicher damit zusammen, dass an die Oberfläche zusätzliche Initiationsfaktoren andocken, die sich in den jeweiligen Organismen unterscheiden. Die Initiationsfaktoren werden benötigt, um DNA am Anfang eines Gens gezielt zu binden, zu

öffnen und die Transkription zu beginnen.

Ein Mittelsmann der Regulation

◆ Vermutlich sind es diese Wechselwirkungen an der Oberfläche, die auch der Regulation der Transkription zu Grunde liegen. In Eukaryonten sind hunderte spezifischer Aktivator- und Repressorproteine in der Lage, die Transkription bestimmter Gene an- oder abzuschalten. Diese Regulatoren beeinflussen vor allem die Initiation der Transkription. Sie tun dies allerdings indirekt mit Coaktivatoren. Ein zentraler Coaktivator ist der Mediator, der aus etwa 20 Proteinuntereinheiten besteht und Signale von verschiedenen Regulatoren integriert und an die Polymerase weiterleitet.⁹⁾ Zu bestimmen, wo und wie der Mediator an die Polymerase bindet und welche Konsequenzen dies hat, bleibt weiterhin eine große Herausforderung.

Eine Fundgrube für Designer

◆ Die neue Strukturinformation wird Anwendung bei der rationalen Entwicklung von Medikamenten finden, die die Funktion von RNA-Polymerasen beeinflussen (structure-based drug design). Die bakterielle Polymerase ist ein hervorragendes pharmazeutisches Zielmolekül für die Verbesserung bekannter und die Entwicklung neuer Antibiotika.¹⁰⁾ Durch Homologie-Modellieren der menschlichen RNA-Polymerase II, die der Polymerase der Hefe ausgesprochen ähnlich ist, sollte es auch möglich werden, Verbindungen zu finden, die die Polymerase niederer Eukaryonten spezifisch hemmen und somit der Bekämpfung von Pilzkrankungen dienen könnten.

Ausblick

◆ Die Kristallstrukturen von RNA-Polymerasen haben uns die wunderbare Architektur und Funktion dieser Multiproteinmaschinen vor Augen geführt. Die Strukturaufklärung hat viele Fragen zum Mechanismus der Transkription beantwortet. Aufgabe

der Zukunft ist es, die Initiation und später die vielfältige Regulation der Polymerase mechanistisch zu verstehen. Dazu müssen die strukturellen Untersuchungen auf wechselwirkende Faktoren wie den Mediator oder Initiationsfaktoren und deren Komplexe mit Polymerase ausgedehnt werden. Dies sind Unterfangen, die noch vor wenigen Jahren aussichtslos schienen, aber nun in den Bereich des Möglichen gerückt sind.

*Patrick Cramer
Institut für Biochemie
Genzentrum der Ludwig-Maximilians-
Universität München
cramer@LMB.uni-
muenchen.de*

- 1) P. Cramer, D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David, R. D. Kornberg, *Science* 2000, 288, 640.
- 2) P. Cramer, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Science* 2001, 292, 1863.
- 3) A. L. Gnatt, P. Cramer, J. Fu, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Science* 2001, 292, 1876.
- 4) T. A. Steitz, *Nature* 1998, 391, 231.
- 5) Y. Hirose, J. L. Manley, *Genes Dev.* 2000, 14, 1415.
- 6) S. A. Leadon, *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 64, 1259.
- 7) M. L. Kireeva, N. Komissarova, D. S. Waugh, M. Kashlev, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 6530.
- 8) G. Zhang, E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov, S. A. Darst, *Cell* 1999, 98, 811.
- 9) L. C. Myers, R. D. Kornberg, *Annu. Rev. Biochem.* 2000, 69, 729.
- 10) E. A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaev, M. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, S. A. Darst, *Cell* 2001, 104, 901.