

RNA-Biologie

Von ein wenig *antisense* zu globalen RNA-Regulons

JÖRG VOGEL

INSTITUT FÜR MOLEKULARE INFektionsBIOLOGIE, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VAAM-Forschungspreis 2010

Kleine RNAs sind spektakuläre Neuankömmlinge im Feld der Genregulation. *Salmonella* besitzt an die 100 kleine regulatorische RNAs, und kann damit unter Stressbedingungen über „ein bisschen *antisense*“ globale RNA-Regulons kontrollieren.

Small RNAs have been spectacular new arrivals in the field of gene regulation in the last decade. *Salmonella* encodes close to 100 small RNAs and uses them under specific stresses to control global RNA regulons with stunningly short antisense pairing.

■ *Antisense*-Regulation durch nicht-codierende RNA ist schon seit den 1980er-Jahren bekannt, doch galt diese Form der Genregulation bis vor zehn Jahren eher als Ausnahme. Es wurde vermutet, dass hauptsächlich Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren. Doch seit 2001 wurden immer mehr kleine RNAs entdeckt, die gezielt mRNAs binden und ursprüngliche Transkriptionsmuster umprogrammieren können. Die bestuntersuchten Klassen sind die mikro-RNAs (miRNAs) in Eukaryoten und die Hfq-abhängigen sRNAs (*small RNAs*) in Gram-negativen Bakterien. Mikro-RNAs sind etwa 22 Nukleotide lang und entstehen aus längeren Vorläufern. Reife miRNAs paaren mit der 3'-UTR (nicht-translatierte Region) eukaryotischer mRNAs, um deren Translation zu unterbinden oder Abbau zu stimulieren. Hfq-abhängige sRNAs sind hingegen meist als 50 bis 250 Nukleotide lange Primärtranskripte aktiv. Im Gegensatz zu miRNAs binden sie, vermittelt durch das RNA-Chaperon Hfq, im 5'-Bereich von mRNAs und können diese sowohl inhibieren als auch aktivieren.

Normalisiert auf die Zahl der Protein-codierenden Gene (20.000 in Eukaryoten; 4.500 in Bakterien) sind beide Klassen ähnlich häufig: Eukaryoten besitzen 100 bis 1.000 miRNAs, *Escherichia coli* oder *Salmonella* an die 100 sRNAs. Gemeinsam ist auch die Kon-

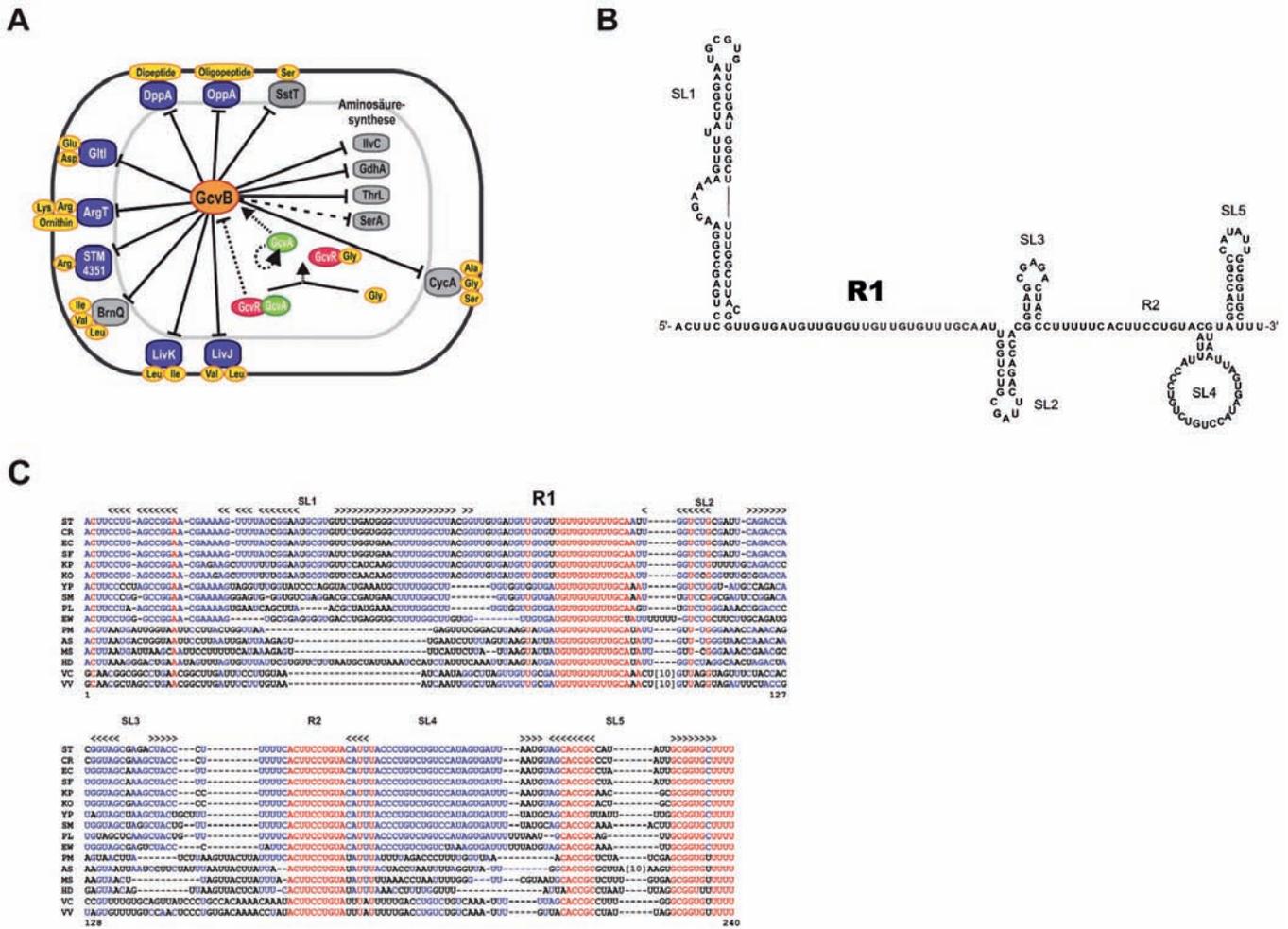
trolle von mehreren mRNAs durch ein und dieselbe miRNA oder sRNA. Bei den miRNAs erfolgt dies über *seed pairing*: Lediglich sechs bis sieben hochkonservierte Nukleotide im 5'-Bereich der miRNA erkennen die mRNAs. Entsprechende kurze Bindestellen finden sich, oft in mehreren Kopien, in Hunderten von zellulären mRNAs.

Dagegen beginnen wir erst jetzt zu verstehen, wie die sehr viel längeren bakteriellen sRNAs spezifisch mRNAs erkennen. Man ging zunächst davon aus, dass eine sRNA nur eine mRNA bindet, und zwar an der Ribosomenbindestelle (RBS). Dieses Prinzip entsprang der Entdeckung der prototypischen MicF-sRNA von *E. coli* im Jahr 1984. Damals wurde vorhergesagt, dass MicF mit dem Großteil seiner rund 100 Nukleotide durch imperfekte Basenpaarung die RBS der in *trans* codierten *ompF*-mRNA regelrecht maskiert und so die Translationsinitiation verhindert. Da Ribosomen-freie, sozusagen „nackte“ mRNAs schnell von bakteriellen Nukleasen gespalten werden, wird die Synthese des OmpF-Porins irreversibel verhindert. Dieser elegante Mechanismus fand sich später auch bei anderen sRNAs, doch es blieb die Frage nach der Spezifität [1]. Denn die RBS (Shine-Dalgarno-Sequenz und Startcodon) ist wie kaum ein anderer Bereich bakterieller mRNAs konserviert; wie also kann eine sRNA echte Ziel-

mRNA von Tausenden anderen unterscheiden?

Unsere Untersuchungen in Salmonellen, bedeutende Krankheitserreger des Menschen, haben hier neue Erkenntnisse gebracht [1–7]. Viele der *Salmonella*-sRNAs wie GcvB, MicC oder RybB sind weit über den eng verwandten Laborstamm *E. coli* K12 hinaus in anderen Erregern wie etwa *Yersinia* konserviert [8]. GcvB ist in schnell wachsenden Bakterien, also bei gutem Nahrungsangebot, aktiv und inhibiert dann die Synthese vieler ABC-Transporter von Peptiden und Aminosäuren (**Abb. 1**). Bei der erfolgreichen Suche nach Homologen der etwa 200 Nukleotide langen *Salmonella*-GcvB-sRNA in anderen Bakterien fiel uns eine stark konservierte 30 Nukleotide lange Kette aus Guanosinen und Uridinen auf, die wir Region 1 (R1) nennen. Biochemische Strukturanalysen zeigten, dass R1 einzelsträngig in der ansonsten stark gefalteten GcvB-RNA vorliegt, sich somit für Kontakte mit mRNAs anbot. Mittels Struktur- und bioinformatischen Analysen entdeckten wir auch die GcvB-Bindestellen in den mRNAs der regulierten ABC-Transporter. Dies sind kurze, an Cytosinen und Adenosinen reiche Abschnitte in der 5'-UTR, die normalerweise die Translation verstärken. GcvB hat sich also eine Achillesferse ausgesucht, um eine ganze Gruppe funktional verwandter mRNAs zu regulieren. Und anders als bei MicF-*ompF* bindet GcvB meist außerhalb der RBS und kann weit davon entfernt mit der Ribosomenbindung interferieren. Insgesamt zeigte sich mit GcvB erstmalig, dass sRNAs ähnlich Transkriptionsfaktoren mittels einer konservierten Domäne als globaler Regulator der Genexpression wirken können [7].

Ähnlich konservierte Domänen haben wir in MicC und RybB entdeckt, allerdings wie bei den miRNAs direkt am 5'-Ende [1, 5]. Von *E. coli* wussten wir, dass MicC (100 Nukleotide) die Translation eines zweiten Porins, OmpC, inhibiert, und wie bei MicF-*ompF* erkannte MicC die *ompC*-RBS. Das wichtigste *Salmonella*-Porin aber ist das mit OmpC eng verwandte OmpD. MicC reguliert auch OmpD,



▲ **Abb. 1:** A, Die GcvB-sRNA ist als globaler posttranskriptionaler Regulator von Aminosäure-Transportern und Biosyntheseproteinen schematisch in einer bakteriellen Zelle dargestellt. B, RNA-Struktur von GcvB. R1 und R2 sind zwei stark konservierte, einzelsträngige Abschnitte der RNA. SL1–5: Stemloop (Stammsschleifen)-Strukturen. C, Die starke Konservierung der RNA-Domänen R1 und R2 ist im Sequenzvergleich von Homologen der GcvB-RNA gut erkennbar. Invariable Nukleotide sind in Rot dargestellt; blaue Nukleotide deuten Konservierung in den meisten der verglichenen GcvB-Moleküle an.

doch fanden wir in dessen 5'-UTR keine MicC-Bindestelle. Mittels Reporterfusionen konnten wir die regulatorische Region auf einen kurzen Abschnitt in der codierenden Region (CDS) eingrenzen. Gerade einmal zehn Nukleotide um Codon 25 reichen MicC zur Erkennung der *ompD*-mRNA. So tief in der CDS können sRNAs allerdings keine elongierenden Ribosomen stoppen, deren starke Helikase-Aktivität mühelos Paarungen mit einer Schmelztemperatur von 70 °C entwirrt, also auch keine Probleme mit der kurzen MicC-*ompD*-Duplex haben dürfte. MicC muss in der CDS also einen grundlegend anderen Mechanismus nutzen. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass MicC die wichtige RNase E rekrutiert, um mit deren Hilfe die *ompD*-mRNA zu spalten [5].

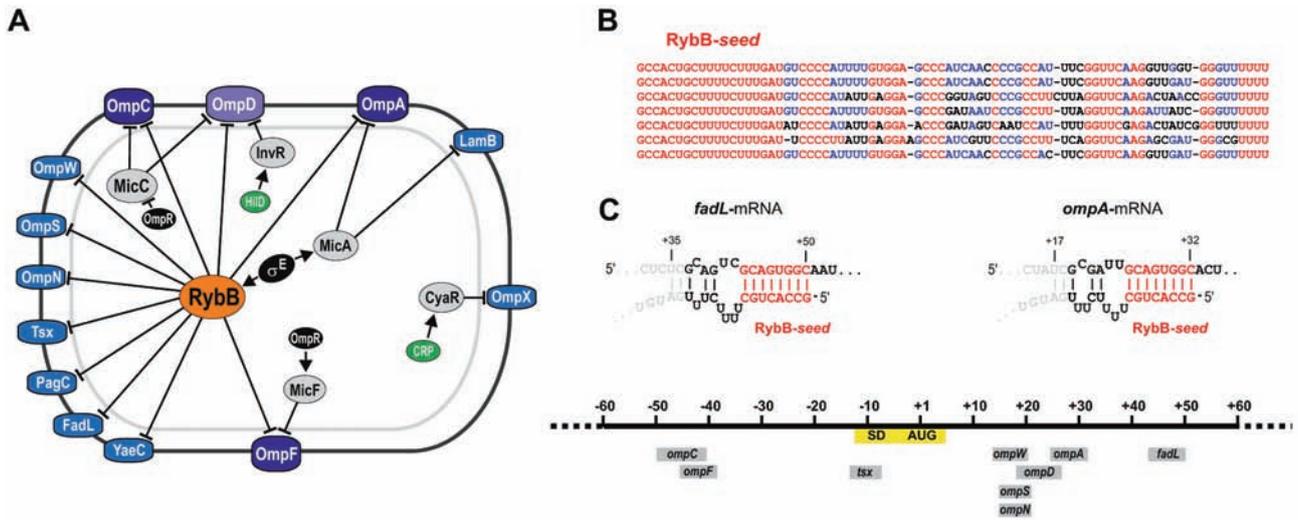
In RybB spiegelt sich die Vielfalt dieser neuen Mechanismen am besten wider (**Abb. 2**). RybB wird vom alternativen Sigmafaktor σ^E aktiviert, sobald eine Überproduktion von äußeren Membranproteinen die periplasma-

tische Faltungskapazität zu erschöpfen droht oder die Zellhülle beschädigt wird. σ^E kann über RybB umgehend die Synthese aller abundanten Porine herunterregulieren [3]. Die systematische Kartierung von RybB-Bindestellen in den mRNAs vieler Porine hat gezeigt, dass dabei kaum die RBS erkannt wird; fast immer bindet RybB in der codierenden Region oder weit vor der RBS in der 5'-UTR. Bei RybB lässt sich gut erkennen, wie die Selektivität der Regulation gesichert wird: RybB erkennt jeweils den Bereich der mRNA, der am besten passt, also nicht zwangsläufig die RBS. Obwohl RybB 80 Nukleotide lang ist, dienen immer nur die ersten Nukleotide am 5'-Ende von RybB – also wieder eine hochkonservierte Domäne – der mRNA-Erkennung. Das Bindungsmuster von RybB ist also dem *seed pairing* der miRNAs verblüffend ähnlich.

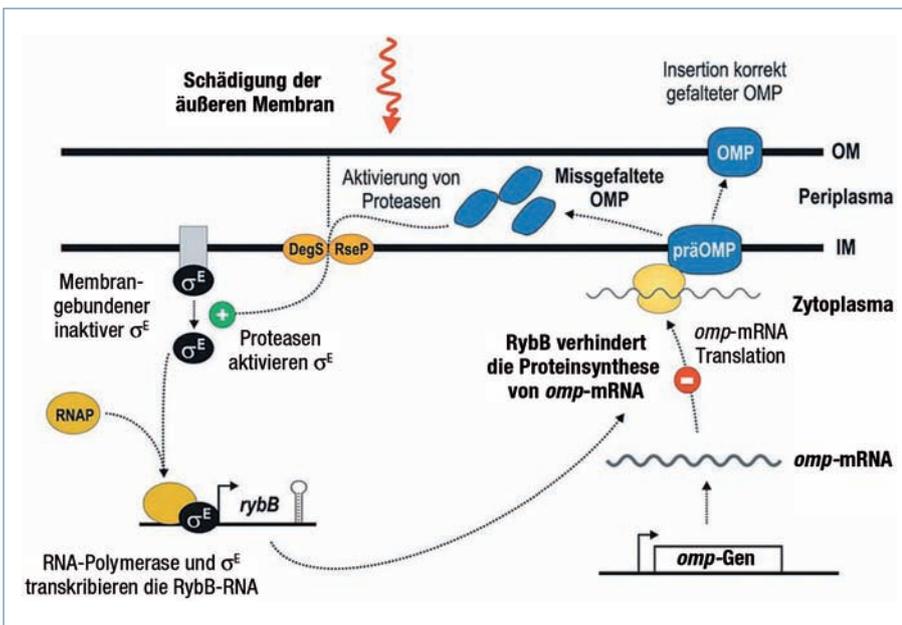
Physiologisch gesehen ist RybB eine der faszinierendsten heute bekannten sRNAs. Durch RybB wird der Aktivator σ^E auch zum Repressor und kann damit ein schnelles

Abschalten der Membranproteinsynthese sowie eine aktive Qualitätskontrolle von Periplasma und Zellhülle erreichen (**Abb. 3**). RybB könnte es *Salmonella* und anderen Pathogenen auch ermöglichen, die äußere Membran rasch neu zu bestücken, sobald ein Umgebungswechsel im oder außerhalb des Wirtes dies erfordert [1, 3]. GcvB und RybB sind exzellente Beispiele dafür, wie sRNAs ganze Regulons steuern, nachdem die mRNAs bereits synthetisiert sind. Bisher kennen wir gerade einmal für ein Fünftel der sRNAs in *Salmonella* und *E. coli* die physiologische Funktion, und selbst dann noch nicht alle regulierten mRNAs [8]. Weitere Überraschungen aus der Welt der sRNAs sind also vorprogrammiert.

Neue Technologien wie etwa die Hochdurchsatz-Sequenzierung (*deep sequencing*, *RNA-seq*) helfen uns enorm bei der Suche nach neuen sRNAs und regulierten mRNAs. Mit *deep sequencing* konnten wir zeigen, dass über 20 Prozent aller *Salmonella*-mRNAs an



▲ **Abb. 2:** A, Zentrale Stellung der RybB-sRNA in der posttranskriptionalen Kontrolle von äußeren Membranproteinen. B, Der Vergleich von RybB-Homologen verschiedener Bakterien zeigt, dass auch die sRNA eine stark konservierte RNA-Domäne, als RybB-seed bezeichnet, besitzt. Diese ist als Abfolge invariabler Nukleotide (rot) am 5'-Ende der sRNA erkennbar. Ebenfalls hochkonservierte Nukleotide sind in Blau gesetzt. C, Der RybB-seed erkennt mit sehr kurzen Basenpaarungen die mRNAs vieler Porine. Die Position dieser Paarungen relativ zum mRNA-Startcodon (AUG) ist durch graue Kästchen angegeben. Interessanterweise werden die meisten mRNAs außerhalb der RBS (gelbes Kästchen) erkannt. SD: Shine-Dalgarno-Sequenz.



▲ **Abb. 3:** In der σ^E -kontrollierten Stressantwort ist RybB ein wichtiger Faktor, der die schnelle Abschaltung der Synthese von Porinen vermittelt. Anreicherung von misgefalteten Proteinen im Periplasma zwischen der äußeren (OM, outer membrane) und inneren Membran (IM) induziert den Stressfaktor σ^E , der viele Gene für die Reparatur und verbesserte Faltung von äußeren Membranproteinen (OMP) aktiviert. Gleichzeitig aber schaltet σ^E auch die Transkription des *rybB*-Gens an, und die RybB-sRNA unterdrückt dann unmittelbar die Synthese neuer Porine und OMP, bis das Gleichgewicht der Zellhülle wieder hergestellt ist. Dann wird σ^E wieder abgeschaltet, und auch die intrinsisch instabile RybB-sRNA verliert schnell wieder ihre Aktivität, sodass das System in den Normalzustand zurückkehren kann.

Methode haben wir überraschend viele sRNAs im Magenpathogen *Helicobacter pylori* entdeckt, einem Organismus ohne Hfq [12]. Diese Arbeit bietet einen exzellenten Ansatzpunkt, um sRNA-Netzwerke ohne Hfq zu verstehen und vielleicht sogar andere sRNA-Chaperone aufzuspüren.

Bisher verstehen wir allerdings wenig darüber, wie Hfq eigentlich die Regulation vermittelt und wo genau im Bakterium dies stattfindet. Gibt es wie in Eukaryoten Kompartimente, in denen sRNAs und mRNAs zueinanderfinden? Deshalb muss das sich gerade entwickelnde Feld „Bakterielle Zellbiologie“ auch die intrazelluläre Lokalisation von RNA-Molekülen einbeziehen; wir entwickeln dafür gerade neue Methoden [9]. Mit unserem gewachsenen Verständnis, wie sRNAs gezielt mRNAs erkennen, können wir nun auch damit beginnen, neue Funktionen in Bakterien zu programmieren und damit der Synthetischen Biologie neue Möglichkeiten eröffnen. Insgesamt ist aus „ein bisschen antisense“ ein neues und rasant wachsendes Forschungsfeld zu globaler Genregulation entstanden, in dem die wichtigsten Aufgaben noch vor uns stehen.

Danksagung

Den VAAM-Forschungspreis 2010 hätte ich kaum ohne die fortlaufende Unterstützung vieler Freunde und Kollegen über die Jahre erhalten. Hier möchte ich besonders danken: Thomas Börner und Fritz Melchers (Berlin), Wolfgang Hess (Freiburg), Gerhart Wagner (Uppsala), Shoshy Altuvia (Jerusalem), Reinhard Lührmann (Göttingen); meinen Laborlokomotiven Kai Papenfort und Cynthia Shar-

Hfq binden und damit prinzipiell von sRNAs reguliert werden könnten [10]. Dies entsprach unserer früheren Beobachtung, dass sich ohne Hfq die Expression von mindestens einem Fünftel aller *Salmonella*-Gene ändert [11]. Viele dieser Hfq-regulierten Gene codieren für Virulenzfaktoren, und entsprechend ist *Salmonella* ohne Hfq avirulent. Anders als der harmlose Verwandte *E. coli* K12 bietet sich

Salmonella vorzüglich dafür an, die Rolle von sRNAs in der bakteriellen Virulenz und neue Behandlungsstrategien von Infektionen zu erforschen.

Wir haben inzwischen *deep sequencing* so weiterentwickelt, dass wir sehr genau alle Transkriptionsstartpunkte in einem beliebigen Organismus kartieren können. Mit unserer *differential RNA sequencing* (dRNA-seq)-

ma; Franz Narberhaus (Bochum), Ruth Schmitz-Streit (Kiel) und Gabi Klug (Gießen) für die wunderbare Zusammenarbeit im DFG SPP1258 *Sensory and Regulatory RNA in Prokaryotes* und Eingewöhnungshilfe bei meiner Rückkehr nach Deutschland. ■

Literatur

- [1] Bouvier M, Sharma CM, Mika F et al. (2008) Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Mol Cell* 32:827–837
- [2] Papenfort K, Pfeiffer V, Lucchini A et al. (2008) Systematic deletion of *Salmonella* small RNA genes identifies CyaR, a conserved CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis. *Mol Microbiol* 68:890–906
- [3] Papenfort K, Pfeiffer V, Mika F et al. (2006) Sigma(E)-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Mol Microbiol* 62:1674–1688
- [4] Papenfort K, Said N, Welsink T et al. (2009) Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Mol Microbiol* 74:139–158
- [5] Pfeiffer V, Papenfort K, Lucchini S et al. (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol* 16:840–846
- [6] Pfeiffer V, Sittka A, Tomer R et al. (2007) A small non-coding RNA of the invasion gene island (SPI-1) represses outer membrane protein synthesis from the *Salmonella* core genome. *Mol Microbiol* 66:1174–1191
- [7] Sharma CM, Darfeuille F, Plantinga TH et al. (2007) A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev* 21:2804–2817
- [8] Papenfort K, Vogel J (2010) Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 8:116–127
- [9] Said N, Rieder R, Hurwitz J et al. (2009) In vivo expression and purification of aptamer-tagged small RNA regulators. *Nucleic Acids Res* 37:133
- [10] Sittka A, Lucchini S, Papenfort K et al. (2008) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* 4:e1000163
- [11] Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K et al. (2007) The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 63:193–217
- [12] Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F et al. (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 464:250–255

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Jörg Vogel
 Institut für Molekulare Infektionsbiologie
 Universität Würzburg
 Josef-Schneider-Straße 2/D15
 D-97080 Würzburg
 Tel.: 0931-3182576
 Fax: 0931-3182578
 joerg.vogel@uni-wuerzburg.de
 www.infektionsforschung.uni-wuerzburg.de/
 research/vogel

AUTOR



Jörg Vogel

1991–1999 Diplom/Promotion in Biochemie, HU Berlin. 1994 Erasmus-Student, Imperial College London, UK. 2000–2001 Postdoc, Uppsala Universität, Schweden. 2002–2003 EMBO Fellow, Hebräische Universität Jerusalem, Israel. 2004–2009 Nachwuchsgruppe, MPI für Infektionsbiologie, Berlin. Seit 2009 Professor und Leiter des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg.