

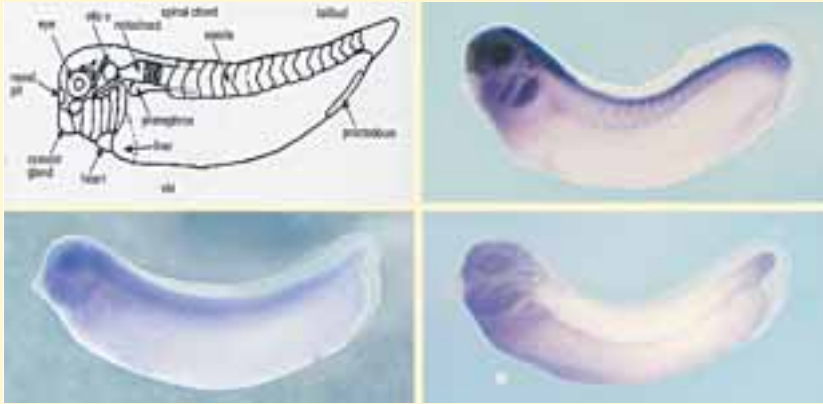
Räumliche und zeitliche Schnittpunkte in der Zelle zu finden und die molekulare Kommunikation ihrer Akteure zu belauschen, ist ein moderner Ansatz der biomedizinischen Forschung. Die drei LMU-Wissenschaftler Professor Ralf-Peter Jansen, Professor Karl-Peter Hopfner, beide Genzentrum, sowie Professor Ralph Rupp vom Adolf-Butenandt-Institut der LMU verfolgen ihn bei ihrer Arbeit – unter anderem auch im Rahmen des Sonderforschungsbereichs „Networks in genome expression and maintenance“.

SUSANNE WEDLICH

DIE ZELLE UND IHR PUBLIKUM

Wäre die biologische Zelle eine Bühne, hätte sie uns bislang nur ein begrenztes Repertoire gegönnt: überwiegend Monologe. Doch zunehmend begnügen sich Forscher nicht mehr nur damit, die Akteure zu identifizieren und deren Funktionen zu entschlüsseln. Das wissenschaftliche Augenmerk richtet sich zunehmend auf die „Handlung“, die Interaktionen zwischen den Molekülen und Multiproteinkomplexen. Eine derart ausgerichtete Forschung verlangt einen interdisziplinären Ansatz, wie er unter anderem auch im Sonderforschungsbereich (SFB) 646 „Networks in genome expression and maintenance“ gepflegt wird. Die daran beteiligten Wissenschaftler untersuchen nicht isolierte Vorgänge in der Zelle, sondern die Koordination molekularer Prozesse, an denen immer mehrere Faktoren beteiligt sein müssen. Und alle Projekte haben mit dem Genom zu tun, dem genetischen Material eines Organismus. Die Umsetzung der genetischen Information gehört ebenso dazu wie die Verdoppelung des Erbmoleküls DNA bei der Zellteilung und dessen anschließende Aufteilung auf die beiden Zellen sowie die Reparatur von DNA-Schäden. „Es hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass man derart zentrale Vorgänge nicht isoliert betrachten sollte“, meint SFB-Sprecher Professor Ralf-Peter Jansen vom Genzentrum. „Sie laufen schließlich auch in der Zelle nicht unabhängig voneinander ab, sondern sind eng verbunden.“

Im SFB stehen deshalb die räumlichen und zeitlichen Schnittstellen der zellulären Vorgänge im Mittelpunkt. Ralf-Peter Jansen beispielsweise beschäftigt sich mit dem Transport von mRNA. Das ist das Botenmolekül, mit dessen Hilfe genetische Information aus dem Zellkern gelangt. Anhand einer mRNA-Sequenz kann dann das korrespondierende Protein synthetisiert werden. Man ging lange davon aus, dass nur fertige Proteine je nach Funktion an verschiedene Orte in der Zelle gebracht werden. Neuere Forschung zeigt aber, dass die Lokalisierung schon einen Schritt früher stattfinden kann: auf Ebene der mRNA. Dann wird das Botenmolekül gezielt zu bestimmten Bereichen in der Zelle transportiert, sodass das entsprechende Protein direkt am künftigen Einsatzort gebaut wird. „Bereits im Zellkern heftet sich eine erste Riege von RNA-bindenden Faktoren an das mRNA-Molekül“, so Ralf-Peter Jansen. „Der RNA-Protein-Komplex wird dann aus dem Zellkern gebracht und assoziiert wohl mit weiteren Faktoren. Manche davon sind molekulare Motoren, die andere Moleküle entlang von Filamenten innerhalb der Zelle transportieren. Am Zielort wird die RNA abgeladen und verankert.“ Diese gezielte Verteilung von mRNA resultiert in der asymmetrischen Verteilung der zugehörigen Proteine. Ein Beispiel dafür ist Ash1p in Hefe, ein Transkriptionsfaktor, der die Aktivität bestimmter Gene reguliert. Während der Zellteilung wird die mRNA dieses Proteins so zielgerichtet aus der Mutterzelle transportiert, dass das fertige Ash1-Protein nur im Kern der Tochterzelle akkumuliert, wo es einige Gene inaktiviert.



Die Lokalisierung der Ash1p-mRNA hängt unter anderem von den so genannten She-Proteinen ab. Mehrere davon agieren als Bindeglied zwischen Motorproteinen und ihrer molekularen Last, der mRNA. Nach

deren Sequenz werden dann unter Umständen Membranproteine oder sekretorische Proteine synthetisiert. Letztere werden in höheren Organismen mit Hilfe eines weit verzweigten Membransystems der Zelle ausgeschieden, an dessen Außenseite auch die Synthese der Membranproteine stattfindet. Dieses so genannte Endoplasmatische Retikulum, kurz ER, wird während der Zellteilung zur Tochterzelle gebracht. „Lange wurde vermutet, dass bestimmte mRNAs zusammen mit dem ER transportiert werden“, so Ralf-Peter Jansen. „Der Nachweis ist uns jetzt in Hefe gelungen. Es gibt aber auch in höheren Organismen lokalisierte mRNAs, die für Membranproteine kodieren, etwa in Nervenzellen oder den Embryonen der Taufliege.“

DIE REIFUNG VON MUSKELZELLEN

Ein anderes zellspezifisches RNA-Bindungsprotein, das ebenfalls bei der frühen Entwicklung eine Rolle spielt, beschäftigt die Arbeitsgruppe von Professor Ralph Rupp am Adolf-Butenandt-Institut. Sein SFB-Projekt untersucht die Koordination der Muskeldifferenzierung. „Wir konnten zeigen, dass das RNA-Bindungsprotein für die Reifung von Muskelzellen während der Embryonalentwicklung des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* essentiell ist“, so Ralph Rupp. „Erstaunlicherweise kann es sogar pluripotente, also noch undifferenzierte Zellen des Froschembryos in Muskelzellen verwandeln. Beide Funktionen waren bislang noch nicht von RNA-Bindungsproteinen bekannt.“ Jetzt wollen die Forscher untersuchen, wie dieses Protein in den RNA-Metabolismus der Zelle eingebunden und mit den verschiedenen Mechanismen der Differenzierung gekoppelt ist. In enger Zusammenarbeit mit anderen SFB-Kollegen wird deshalb nach Proteinen gesucht, die mit dem RNA-Bindungsprotein assoziiert sind, sowie nach dessen Ziel-mRNAs. Wie wichtig mit RNA assoziierte Proteine sein können, konnte auch Professor Karl-Peter Hopfner am Genzentrum und im SFB 646 in Zusammenarbeit mit Ralf-Peter Jansen zeigen. Sie entschlüsselten die Struktur des so genannten RNase-L-Inhibitors, der unter anderem die Hülle und das Erbmateriale von HIV, des AIDS verursachenden Virus, zusammenfügt. „Wir werden in Zukunft auch nach Interaktionspartnern dieses Proteins suchen“, so Ralf-Peter Jansen. „Schließlich ist das Enzym ein interessanter Angriffspunkt für die Entwicklung von HIV-Therapeutika. Anders als virale Proteine kann ein zelluläres Enzym nicht durch Mutationen verändert werden. Es können also keine Resistenzen entstehen, was ja ein Hauptproblem bei HIV-Therapien ist.“

Der RNase-L-Inhibitor, kurz RLI, ist ein für das Überleben der Zelle wichtiger und in der Evolution hoch konservierter Faktor. Er ist an der Bildung der Protein-synthetisierenden Einheiten der Zelle, den Ribosomen, und der Zusammenführung aller Faktoren der Proteinsynthese beteiligt. Die postulierte Fähigkeit des Inhibitors, RNA und Protein zusammenzubringen, macht sich auch HIV zunutze. Denn dessen neu synthetisiertes Erbmateriale in Form von RNA-Molekülen muss in den befallenen menschlichen Zellen mit den ebenfalls neu gebildeten Hüllproteinen des Virus zusammenkommen – was vermutlich durch RLI vermittelt wird. Die Wissenschaftler wiesen eine weit reichende Strukturänderung des Inhibitors nach, die für den Zusammenbau der HIV-Hülle verantwortlich sein könnte und möglicherweise die sehr unspezifische Bildung verschiedener RNA-Protein-Komplexe erlaubt. Hoch präzise läuft dagegen die Verarbeitung von RNA ab. Erzeugt werden die Moleküle durch die Abschrift von Genen, also bestimmter

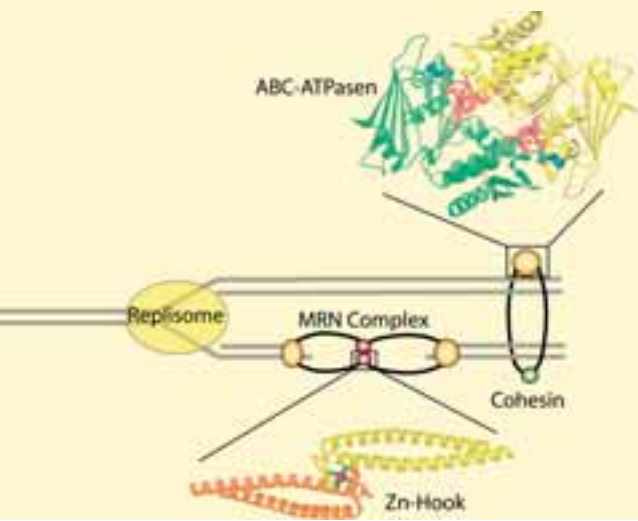
◀ Gewebe-spezifische Expression von Chromatin-Remodellierungsenzymen. Im Frosch-Embryo wurden Schlüsselenzyme der Chromatin-Remodellierungsmaschinen durch Nachweis der mRNA mittels RNA-*in situ* Hybridisierung sichtbar gemacht. Die blau-violette Farbe zeigt die Gewebe des Embryos, die das jeweilige Gen exprimieren, d.h. die in einem Gen gespeicherte Information realisieren. Die Strichzeichnung hilft bei der Zuordnung der gefärbten Regionen. Die unterschiedlichen Expressionsmuster deuten auf gewebe-spezifische Funktionen der einzelnen Enzyme hin.

DNA-Abschnitte. Danach können aber noch zahlreiche Veränderungen vorgenommen werden, die außerordentlich genau reguliert sind. Denn aus einem RNA-Vorläufer können verschiedene RNA-Moleküle mit unterschiedlicher Länge, Sequenz und Funktion entstehen. In höheren Organismen und den Archaea, einer zentralen Gruppe von Mikroorganismen, wurde ein Komplex identifiziert, der sich aus RNA abbauenden Enzymen zusammensetzt. Dieses so genannte Exosom ist maßgeblich am Abbau und der Prozessierung von RNA beteiligt.

Das Forscherteam um Karl-Peter Hopfner konnte die Struktur des Archaea-Exosoms entschlüsseln: Ein Ergebnis mit Relevanz für die Verarbeitung und den Abbau von RNA in allen Organismen sowie den Abbau anderer Moleküle in der Zelle. „Wir konnten zeigen, dass der Enzymkomplex eine Kammer bildet, in der RNA abgebaut wird“, berichtet Karl-Peter Hopfner. „RNA Moleküle werden über eine enge Öffnung in die zentrale Kammer eingefädelt. Dadurch gelangt nur speziell entfaltete RNA in das Exosom, was einen unkontrollierten RNA-Abbau in der Zelle verhindert. Überraschend war für uns auch die Ähnlichkeit des RNA-Abbaus in Exosomen zum Abbau der Proteine in den so genannten Proteasomen.“ Aber nicht nur die RNA hat es mit ringförmigen Strukturen aus Proteinen zu tun, wie Karl-Peter Hopfner zeigen konnte. Das fadenförmige Erbmolekül DNA liegt meist als eher formlose Masse vor. Unorganisiert ist dieser Zustand dennoch nicht, wird dabei doch für Zellteilungen eine exakte Kopie des Erbmoleküls angefertigt. Danach verdichten sich die einzelnen DNA-Fäden zu Chromosomen, von denen je zwei identische Exemplare vorliegen. Diese bleiben zusammen, bis sie auf die beiden Zellen aufgeteilt werden. „Viele Krebserkrankungen werden durch eine fehlerhafte Weitergabe der Chromosomen auf die Tochterzellen verursacht“, so Karl-Peter Hopfner. „Die exakte Verteilung der Erbinformation ist deshalb eine enorm wichtige Aufgabe für die Zelle.“ Eine besondere Rolle spielen dabei die *Structural Maintenance of Chromosome*-Proteine (SMCs) die in allen Organismen vorkommen. Diese Proteine schließen sich in unterschiedlichen Kombinationen paarweise zusammen und bilden dann mit anderen Untereinheiten große Komplexe. In Gegenwart des Energiespeichermoleküls ATP etwa bilden die Proteine ringförmige Strukturen um die DNA. „Je nach Variante helfen sie dann bei der Ausformung der Chromosomen oder sie halten die beiden identischen DNA-Moleküle zusammen“, berichtet Karl-Peter Hopfner. „SMCs wirken wie molekularer Klebstoff für die Erbinformation.“ Wie das genau funktioniert, ist noch unverstanden. Denn die SMCs und ihre Komplexe können nur schwer mit Hilfe struktureller Methoden untersucht werden. „Dennoch ist es uns gelungen, die dreidimensionale Struktur der ATP-bindenden Domäne eines SMC-Proteins im Komplex mit dem Energiespeichermolekül ATP zu analysieren“, so der Forscher weiter. „Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ATP selbst ein molekularer Klebstoff ist, der wiederum die ATP-bindenden Domänen der SMCs zusammenhält.“

AUF DER SPUR DER KRISTALLSTRUKTUR

Letztlich genügt es aber nicht, die DNA auch noch so kunstvoll zu verpacken, sie muss zumindest beispielsweise für die Abschrift der Gene oder die Reparatur von DNA zugänglich sein. Multiproteinkomplexe mit der Untereinheit SWI2/SNF2 als Motor helfen dabei und erleichtern Transkriptions- und Reparaturfaktoren den Zugang zu DNA. Karl-Peter Hopfner und sein Team konnten anhand der Kristallstruktur eines SWI2/SNF2-Faktors aufzeigen, wie dieser Prozess funktioniert. Erstmals konnte damit die Kristallstruktur eines Motorproteins im Komplex mit einem DNA-Molekül entschlüsselt werden. Die Analyse war so schwer, weil das Protein unspezifisch an DNA bindet, sodass keine einheitlichen, quasi identischen Komplexe für die Kristallisation gebildet werden können. „Unsere Ergebnisse sind somit nicht nur inhaltlich interessant. Uns ist auch ein methodischer Durchbruch gelungen – mit medizinischer Relevanz.“ Denn es gibt mehrere Erkrankungen, die auf Defekte im SWI2/SNF2-Enzym zurückzuführen sind.



◀ Molekulare Klebstoffe halten die DNA (graue Linien) nach Schäden bei der Verdopplung durch das Replisom zusammen.

Ein Beispiel ist das *Cockayne-Syndrom*, das zu fortschreitender Neurodegeneration, Kleinwüchsigkeit, Lichtsensitivität und Entwicklungsstörungen führt und von Karl-Peter Hopfner im Rahmen eines SFB-Projekts genauer untersucht wird. SWI2/SNF2 Protein gehört zu etwa 30 evolutionär konservierten, strukturell und funktionell verwandten Enzymen, mit denen sich auch Ralph Rupp beschäftigt. Als Untereinheit von Multiproteinkomplexen modifizieren diese Proteine die Wechselwirkung von DNA mit den so genannten Histonen, die eine wesentliche Rolle bei der räumlichen Verpackung des Erbmoleküls als Chromatin im Zellkern spielen.

„Aktive und inaktive Gene zeichnen sich durch je spezifische Chromatinstrukturen aus, die mit Hilfe dieser Proteinkomplexe eingerichtet werden“, so Ralph Rupp. „Diese Prozesse sind auch bei der Entwicklung eines Organismus wichtig, weil dabei bestimmte Aktivitätsmuster von Genen vorübergehend oder dauerhaft etabliert werden müssen – und das mit höchster Präzision.“

Im Krallenfrosch konnten die Forscher zeigen, dass die Expression der einzelnen Mitglieder der SWI/SNF-Proteinfamilie stadien- und zelltyp-spezifisch reguliert ist. „Nach unseren Ergebnissen unterscheiden sich embryonale Zellen durch verschiedene Kombinationen der Chromatin umbauenden Aktivitäten“, meint Ralph Rupp. „Zudem werden einzelne Mitglieder der SWI/SNF-Proteinfamilie für die Ausbildung spezifischer Muster von Genaktivitäten benötigt, etwa für die Entstehung bestimmter embryonaler Anlagen oder der Körperachsen – beides sind Schwerpunkte unserer Arbeit.“ In vorangegangenen Projekten konzentrierten sich die Wissenschaftler vor allem auf einen zellulären Signalweg, der aus der Taufliege *Drosophila melanogaster* bekannt ist. Sie konnten zeigen, dass dieser Informationsweg mit derselben Funktion auch in Wirbeltieren existiert. Ein Resultat mit historischer Dimension: Schon der Naturphilosoph Geoffroy Saint-Hilaire postulierte 1822 einen gemeinsamen Bauplan von Wirbeltieren und Wirbellosen.



Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner ist seit 2001 Professor am Genzentrum der LMU. 1997 erhielt er den Leopoldina-Preis für junge Wissenschaftler, 2002 folgte der EMBO Young Investigator Award.
hopfner@lmb.uni-muenchen.de
<http://www.lmb.uni-muenchen.de/hopfner/welcome.html>



Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen ist seit 2002 Professor für Biochemie am Genzentrum. Er ist Sprecher des Sonderforschungsbereichs 646 „Networks in genome expression and maintenance“.
rjansen@lmb.uni-muenchen.de
<http://www.lmb.uni-muenchen.de/jansen/default.htm>



Prof. Dr. Ralph Rupp ist seit 2000 Professor für Molekularbiologie am Adolf-Butenandt Institut der LMU. Von 1993 bis 2000 leitete er eine unabhängige Arbeitsgruppe in der Max-Planck-Gesellschaft am Friedrich-Miescher Laboratorium in Tübingen.
ralph.rupp@med.uni-muenchen.de
<http://www.lmb.uni-muenchen.de/sfb646/Projects/SFB646projects.html>