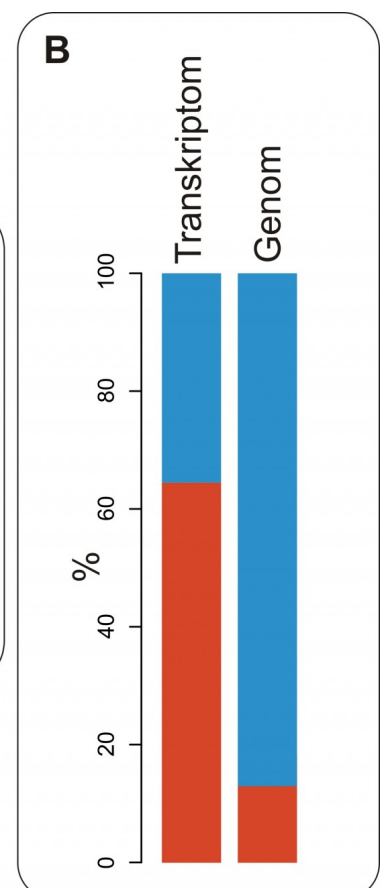
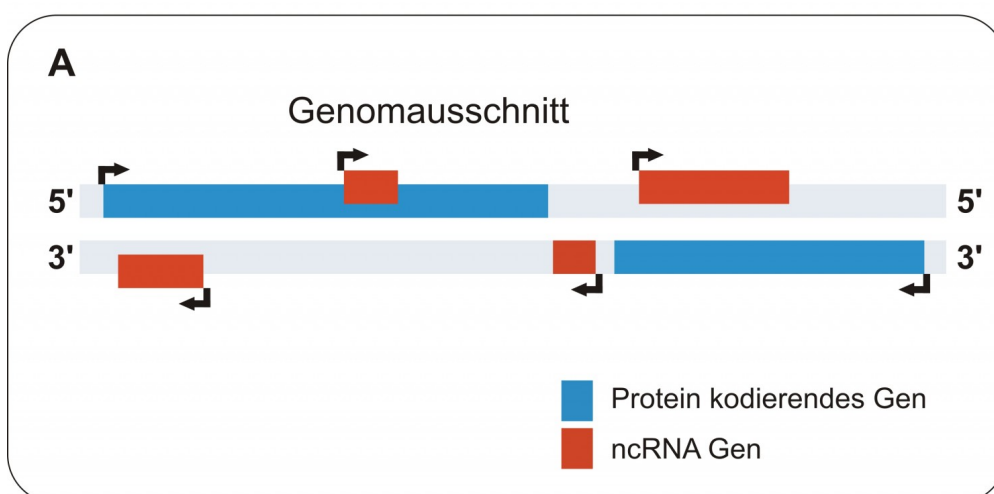


Online-Werkzeug sagt Funktion regulatorischer RNAs voraus

Ob Stoffwechselmetabolismus, Stressantwort oder Genexpression - alles wird in lebenden Systemen durch Regelnetzwerke gesteuert. Die enthaltenen Faktoren darin sind vielfältig und die Interaktionen komplex. Gut bekannt als Regulatoren sind Proteine, die als Enzyme, Chaperone oder Transkriptionsfaktoren zahlreiche Prozesse steuern. Weniger bekannt sind RNA-Moleküle, die ebenfalls eine Vielzahl an Abläufen regulieren: die kleinen RNAs oder sRNAs (small RNAs). Diese zu identifizieren, ihre Interaktionen und physiologischen Funktionen in Bakterien zu charakterisieren, das hat sich Dr. Jens Georg vom Lehrstuhl für Genetik und experimentelle Bioinformatik an der Universität Freiburg zur Aufgabe gemacht. Er entwickelte dafür mit seinen Kollegen ein neues computergestütztes Werkzeug, mit dem sich umfassende Vorhersagen über die kleinen RNAs treffen lassen - die Online-Software CopraRNA.



A) Distribution of protein-encoding (blue) and non-encoding sequences (red, ncRNA) in the bacterial genome. B) The *Synechocystis* genome contains more protein-encoding genes (87%), the transcriptome more ncRNAs (64.5%).
© Dr. Jens Georg, Universität Freiburg

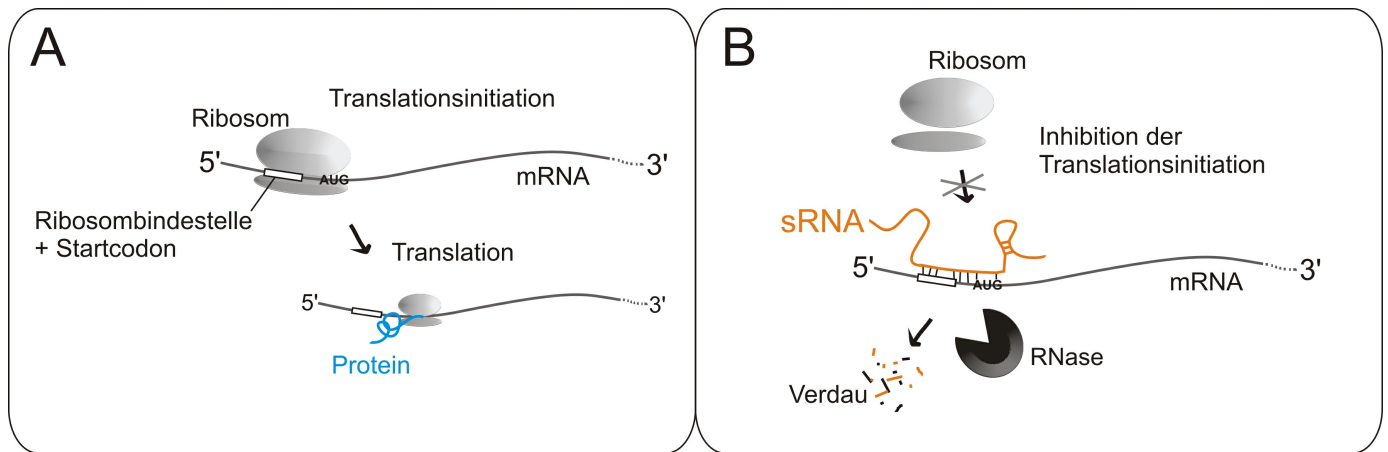
Schon kleinste Organismen wie das Cyanobakterium *Synechocystis* oder das Enterobakterium *E. coli* verfügen über etwa 4.000 Gene, die klassisch durch Proteine reguliert werden. Hierbei binden Transkriptionsfaktoren an die DNA und ermöglichen oder verhindern die Abschrift in RNA und somit die Übersetzung in Proteine. Neben der proteinkontrollierten Steuerung gibt es jedoch noch eine, durch eine andere Molekülklasse gesteuerte Regulation, die lange Zeit unentdeckt blieb. RNA-Moleküle sind offensichtlich nicht nur dafür da, in Proteine translatiert zu werden, sondern bergen zusätzliche Fähigkeiten in sich, wie die Kontrolle metabolischer Ereignisse in der Zelle. Als das menschliche Genom entschlüsselt wurde, erkannte man, dass über 90 Prozent der genetischen Information nicht für Eiweiße kodiert, sondern nicht-kodierende Abschnitte darstellt, die beispielsweise in microRNA transkribiert werden und für einen einwandfreien Zustand der Zelle essenziell sind. Erst seit ein paar Jahren kennt man nun das bakterielle Äquivalent. Die nicht-kodierenden RNA-Moleküle in Bakterien sind etwa 50 bis 400 Nukleotide lang, hochstrukturiert und nachweislich an vielen Steuerungsmechanismen beteiligt. „Das Faszinierende daran ist, dass das nochmal eine komplett neue Ebene der Regulation ist“, bemerkt Dr. Jens Georg von der Universität Freiburg, „bis vor etwa 15 Jahren ging man davon aus, dass die ganze Genregulation durch Proteine gesteuert ist.“ Der Postdoktorand interessiert sich insbesondere für die Genexpression in Bakterien durch sRNA und erforscht am Lehrstuhl für Genetik und Bioinformatik den Modellorganismus *Synechocystis*.

sRNA ermöglicht Stressantwort und Virulenz

„Interessanterweise funktionieren die sRNAs fast wie Transkriptionsfaktoren, haben große Netzwerke an Zielen (Targets), die sie regulieren, ähnlich wie es die microRNAs in Eukaryonten tun“, weiß der Biologe. Die kleinen RNAs stellen eine große heterogene Klasse der bakteriellen Steuerungsfaktoren dar, die sowohl an Proteine binden und deren Funktion modifizieren als auch mit mRNA-Zielen interagieren und die Genexpression regulieren. Sie funktionieren dabei posttranskriptionell, das heißt, die Transkription wird von Proteinen gesteuert und die kleinen RNAs verhindern oder aktivieren dann die Translation. „Im Prinzip kann man sagen, dass jeder Mechanismus in der Zelle an irgendeiner Stelle auch von kleinen RNAs reguliert wird“, sagt Georg.

Die Aufgaben der sRNAs sind mannigfaltig. Manche von ihnen werden unter Stressbedingungen wie oxidativem Stress, Eisenmangel oder Lichtstress erst gebildet und sind Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerks. Andere sind in die Regulation der äußeren Membranproteine eingebunden, und in manchen Bakterien werden Virulenzgene durch sRNAs gesteuert, etwa bei der Toxinproduktion. Die kleine RNA mit Namen RyhB wird beispielsweise nur bei Eisenmangel gebildet und hemmt dann die Translation von eisenhaltigen Proteinen, die nicht essenziell sind.

Viele der sRNAs, ihre individuellen Funktionen sowie die Netzwerke, in die sie eingebunden sind, wurden bislang hauptsächlich durch ausgedehnte experimentelle Arbeit im Labor gefunden. Über neue Sequenzieretechniken, mit denen man auf einen Schlag alle RNAs eines Organismus, das Transkriptom, identifizieren kann, sind in den letzten Jahren Hunderte, möglicherweise über Tausend verschiedene sRNAs ausfindig gemacht worden. Wieviele noch ausstehen, ist nicht bekannt.



A) Während der Translationsinitiation bindet das Ribosom an die Ribosombindestelle (RBS) der mRNA und startet die Proteinsynthese (Translation). B) sRNAs binden über komplementäre RNA-RNA-Interaktionen an die RBS und verhindern das Binden des Ribosoms oder ermöglichen den Verdau der mRNA durch RNasen.

© Dr. Jens Georg, Universität Freiburg

CopraRNA: Mechanismus beruht auf Komplementarität

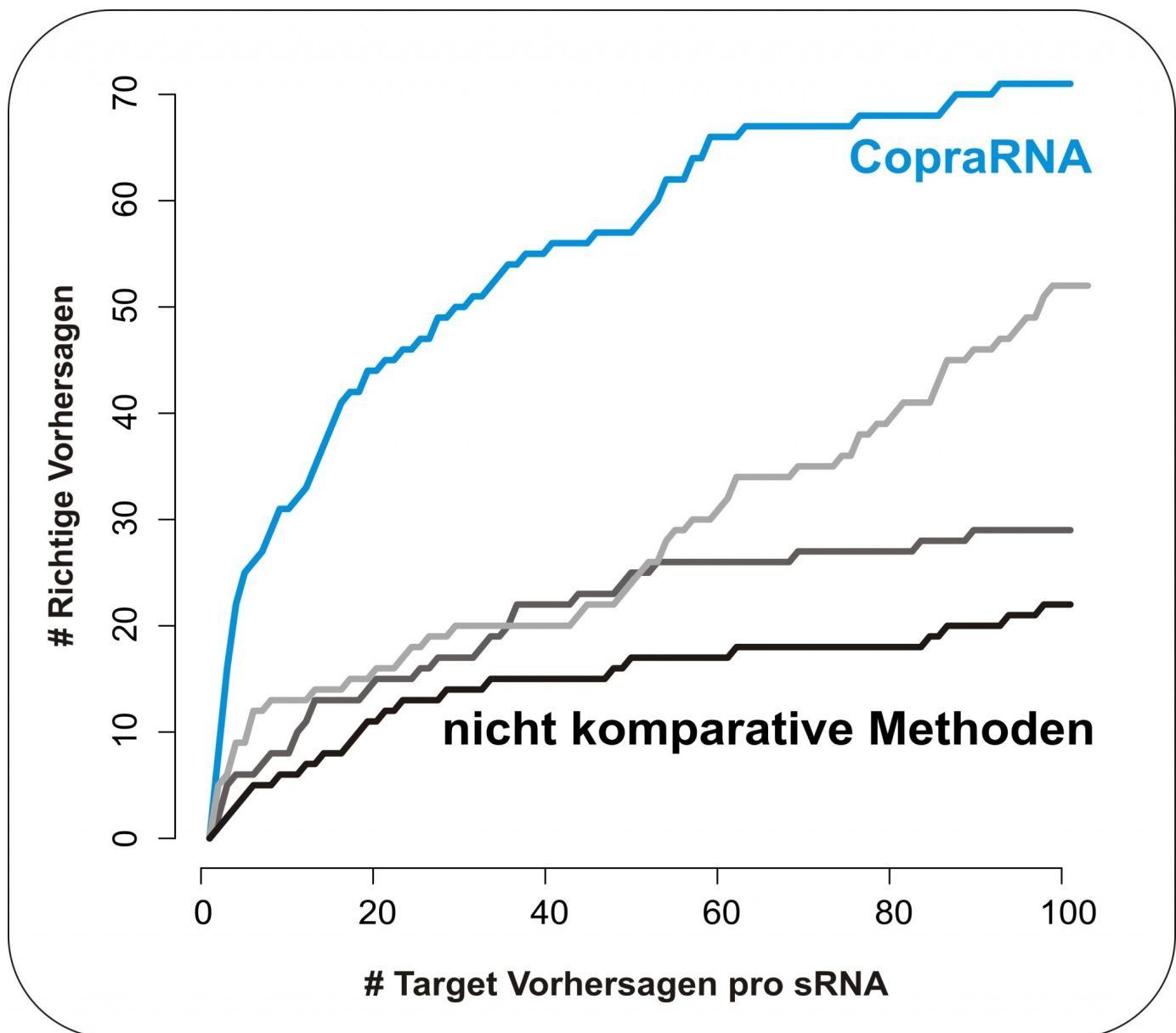
Georg entwickelte nun zusammen mit dem Diplombiologen Patrick Wright, Prof. Dr. Rolf Backofen vom Institut für Bioinformatik und Prof. Dr. Wolfgang Hess das neue Computerprogramm CopraRNA (Comparative Prediction Algorithm for sRNA Targets). Mit diesem können bequem die Genabschnitte vorhergesagt werden, die Interaktions-Bindestellen für sRNA darstellen. Die Funktionsweise dieses Werkzeugs beruht auf der Komplementarität in bestimmten Bereichen der Nukleinsäuren, in denen komplementäre Basen miteinander paaren können. Die Bindestelle dieser RNA-RNA-Interaktion kann allein anhand der komplementären Sequenzen vorhergesagt werden und wird auch als Target oder Ziel bezeichnet. Das Ergebnis sind diejenigen Gene, die von der eingesetzten sRNA angesteuert und reguliert werden.

Um zuverlässigere Resultate der sRNA-Ziele zu bekommen, arbeiten Georg und seine Kollegen im CopraRNA-Programm mit dem komparativen Ansatz aus der Bioinformatik. Hierbei beziehen die phylogenetische Information mit ein, wie stark sich die sRNA-Ziele in verwandten Bakterienstämmen ähneln, das heißt, wie sehr sie in der Evolution beibehalten wurden. Die Wissenschaftler postulieren, wenn eine sRNA bei der Vererbung konserviert wird, passiert dasselbe mit ihrem Target.

Diese Verwandtschaftsbeziehung machen sich die Forscher zunutze. „Wenn sich also jetzt ein Target in der Evolution in nur einem Bakterium neu entwickelt hat, werden wir das mit unserem Programm nicht vorhersagen können“, räumt Georg ein. Die Wissenschaftler, die mit CopraRNA arbeiten, finden die bereits sequenzierten Genome der Bakterien in der Datenbank. Aus der Datenfülle können sie die für sie interessanten Sequenzen herausnehmen, darauf eine Vorhersage machen und erhalten einen Wert, wie wahrscheinlich das Target eine echte Domäne für die sRNA-Zielerkennung ist.

Die Wahrscheinlichkeitswerte homologer Gene in verschiedenen Bakterienstämmen werden dann vom Programm in einen Signifikanzwert von Null bis Eins umgerechnet. „Nach den Werten wird dann die Liste vom Computer sortiert“, erklärt Georg, „wobei die obersten die kleinsten und wahrscheinlichsten Werte für echte Targets sind.“ Diese müssen dann zwar noch im Labor verifiziert werden, aber dafür nimmt man natürlich nur die obersten aus der Liste.

Keine Angst vor großen Datenmengen



CopraRNA erkennt in einem Test mit 18 sRNAs aus Enterobakterien und 101 bekannten Targets deutlich mehr bekannte Targets als häufig benutzte nicht komparative Methoden.
 © Dr. Jens Georg, Universität Freiburg

Da es immer mehr Transkriptom-Studien gibt, die die Gesamtheit aller RNAs in einem Bakterium aufdecken, steht man plötzlich vor Hunderten von potenziellen regulatorischen RNAs. „Es ist experimentell überhaupt nicht zu bewältigen, diese im Labor zu testen“, so Georg, „wir haben daher für alle Forscher, die an RNA-basierter Regulation interessiert sind, das Tool CopraRNA entwickelt, um aus der Fülle der Transkriptomdaten sinnvolle Informationen herausziehen zu können.“

Durch dieses Vorhersageprogramm sparen sich Georg und seine Kollegen viel Zeit und Aufwand. Neben der Information, welches Zielgen durch die gefragte sRNA reguliert wird, spuckt der Computer auch den exakten Ort aus, wo sich auf dem Gen die Interaktionsstellen befinden, sowie die physiologische Funktion der sRNA in verschiedenen Stoffwechselbereichen, etwa bei Eisenmangel oder oxidativem Stress. Das ist wichtig, wenn man in der Medizin pathogene Erreger bezwingen will oder Bakterien für biotechnologische Zwecke nutzen will. „Wie ein Bakterium auf Umweltbedingungen reagiert, kann man im Ganzen nicht verstehen, wenn man die RNA-basierte Regulation nicht kennt“, davon ist Jens Georg überzeugt.

Fachbeitrag

14.10.2013

Stephanie Heyl

BioRegion Freiburg

© BIOPRO Baden-Württemberg GmbH

Weitere Informationen

Dr. Jens Georg

Lehrstuhl für Genetik und experimentelle Bioinformatik

Fakultät für Biologie

Universität Freiburg

Schänzlestr. 1

79104 Freiburg

Tel.: 0761 / 203 - 2708

E-Mail: jens.georg@biologie.uni-freiburg.de

