

## sRNAs

# Kleine RNAs, soweit das Auge reicht

RENATE RIEDER

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR INFEKTIONS BIOLOGIE, BERLIN

**Die Rolle kleiner nicht-codierender RNAs (sRNAs) als bedeutende Regulatoren der Genexpression wird immer aufmerksamer betrachtet. Unser besonderes Interesse gilt der Identifizierung und funktionellen Charakterisierung solcher RNAs in pathogenen Bakterien.**

Small non-coding RNAs (sRNAs) have received increasing attention as potent regulators of gene expression in virtually all organisms. We are particularly interested in the discovery and molecular characterization of such sRNAs in bacterial pathogens.

■ In den letzten Jahren wurden immer mehr kleine nicht-codierende RNAs (sRNAs) in Prokaryoten entdeckt. Waren vor zehn Jahren erst eine Handvoll der kleinen funktionellen RNA-Moleküle bekannt, ist ihre Zahl heute auf mehrere Hundert angestiegen, und laufend werden weitere sRNAs identifiziert. Früher spielte oft der Zufall eine beträchtliche Rolle bei der Entdeckung von sRNAs, heute dagegen erlaubt der technische Fortschritt die systematische Suche nach solchen RNA-Molekülen.

Die ersten regulatorischen RNAs, die weder rRNA, tRNA noch mRNA waren, fand man schon vor 40 Jahren im Gram-negativen Modellbakterium *Escherichia coli* [1]. Seit Kurzem kennt man solche sRNAs auch in den unterschiedlichsten bakteriellen Pathogenen wie *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* oder *Vibrio cholerae*, um nur einige zu nennen [2]. Auch in Archaeen sind zusätzlich zu den bereits bekannten snoRNAs (small nucleolar-RNAs) weitere Klassen von kleinen RNAs gefunden und untersucht worden (z. B. [3]).

Bakterielle sRNAs sind typischerweise 50 bis 250 Nukleotide lang und zumeist als eigenständige Gene in den intergenischen Regionen der chromosomalen DNA lokalisiert [4]. Ihre Expression ist stark reguliert und wird oft durch spezifische Stresssignale induziert. Das Gros der bisher charakterisierten sRNAs modifiziert die Genexpression durch direkte Basenpaarung mit einer mRNA, welche an einer anderen Stelle im Genom codiert

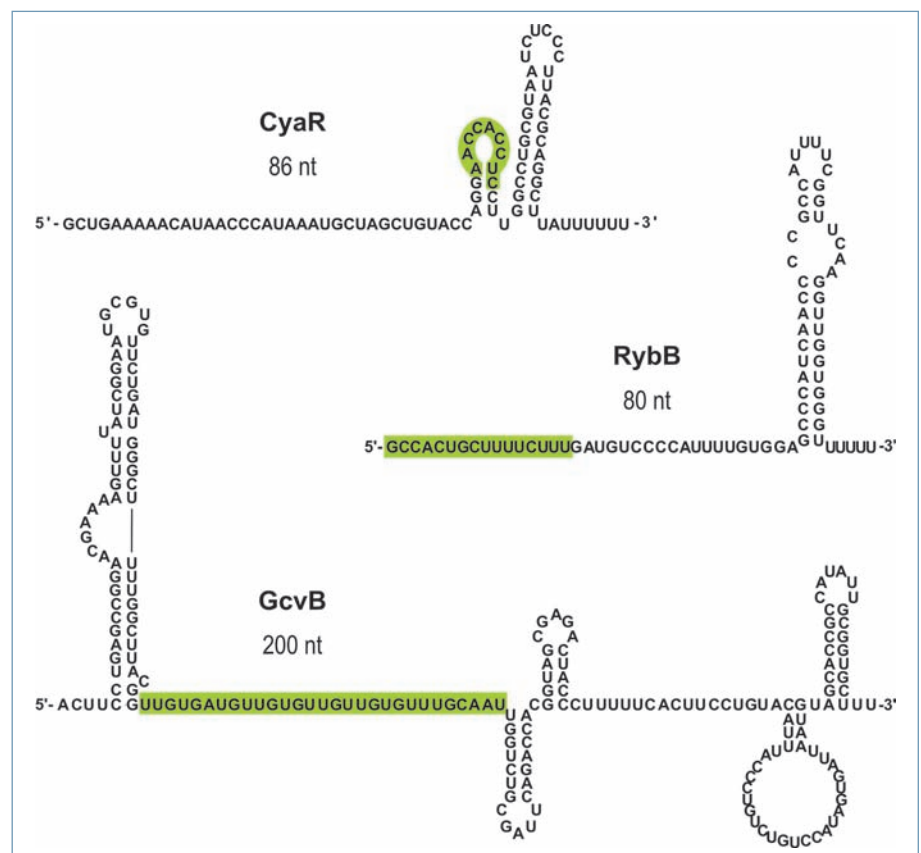
wird. Die Bindung der sRNA führt in weiterer Folge meist zu einer Destabilisierung der mRNA bzw. zur Inhibierung der Translation und somit zu einer Reprimierung des Ziel-

gens – aber auch die Aktivierung von Genen durch sRNAs ist bekannt.

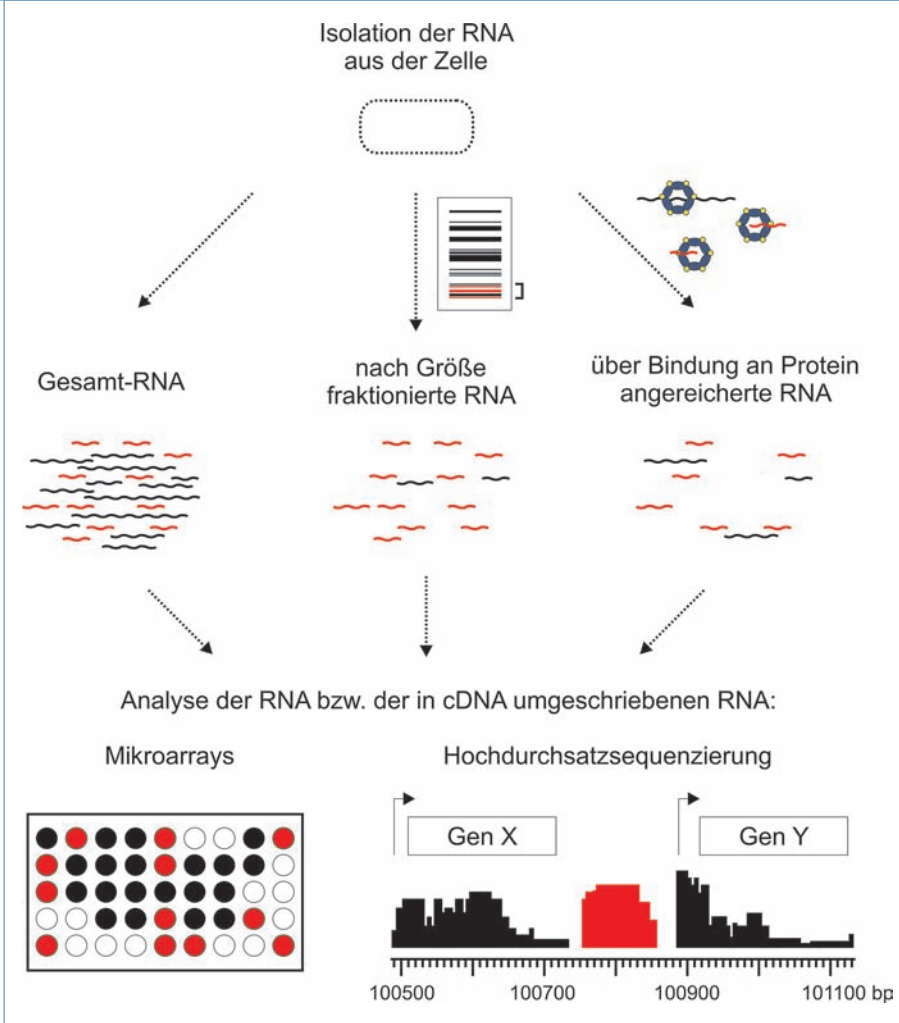
In **Abbildung 1** sind Beispiele für solche *trans*-codierten sRNAs aus *Salmonella typhimurium* gezeigt. *Salmonella* hat sich in den letzten Jahren zu einem neuen Modellorganismus für die Erforschung RNA-basierter Regulationsmechanismen entwickelt, einerseits wegen der nahen Verwandtschaft zu *E. coli* und andererseits wegen der virulenzspezifischen Aspekte dieses wichtigen Pathogens [5].

### Die systematische Suche nach sRNAs

Die ständig steigende Zahl an identifizierten kleinen RNAs korreliert mit dem rasanten Anstieg an sequenzierten Genomen von Mikroorganismen. Die systematische Suche nach sRNAs begann im Jahr 2001 mit vor-



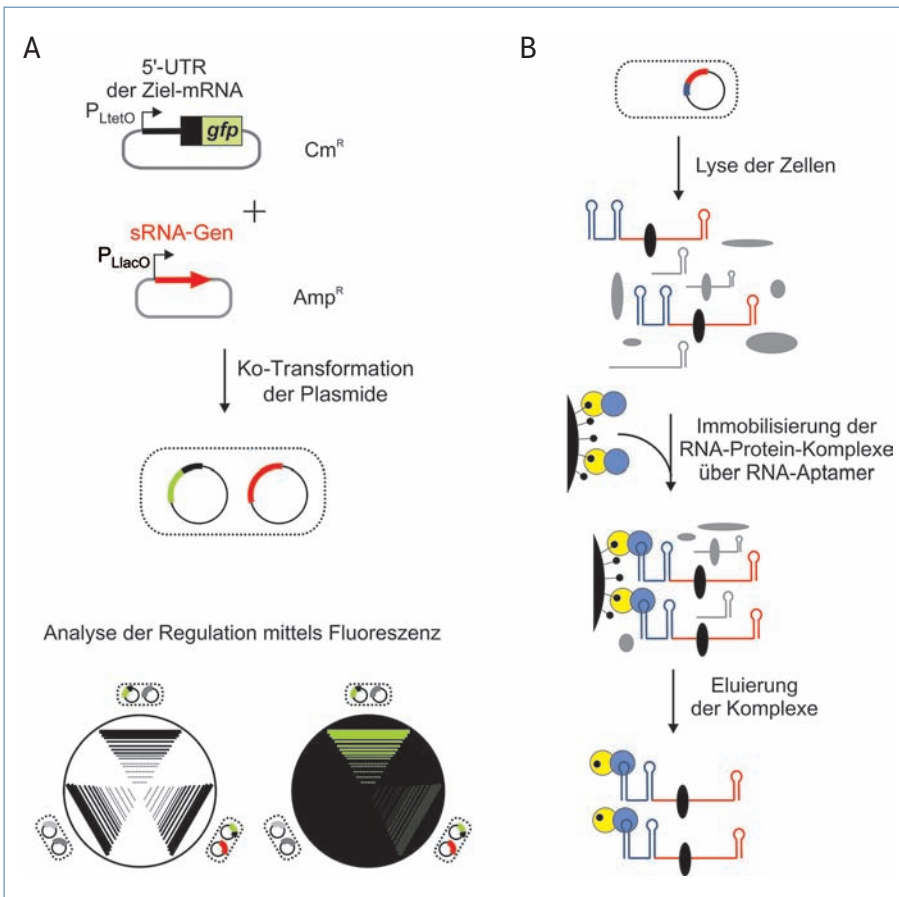
▲ **Abb. 1:** Beispiele für *trans*-codierte sRNAs in *Salmonella*. Die dargestellten sRNAs regulieren durch Ausbildung von Basenpaaren mit den entsprechenden Ziel-mRNAs die Expression von äußeren Membranproteinen. Für grün unterlegte Nukleotide konnte eine Interaktion mit der mRNA gezeigt werden.



◀ **Abb. 2:** Experimentelle Methoden zur globalen Suche von sRNAs. Die Gesamt-RNA der Zelle, ein nach Größe fraktionierter Teil des Transkriptom oder auch über RNA-bindende Proteine angereicherte RNA wird isoliert. Anschließend wird die RNA bzw. die in cDNA umgeschriebene RNA mittels Hybridisierung an Mikroarrays oder durch Sequenzierung analysiert. sRNAs und entsprechende Detektionssignale sind in Rot gezeigt, andere RNA-Moleküle in Schwarz.

rangig bioinformatischen Methoden [6], das heißt unmittelbar nachdem die Genome von *E. coli* und einigen nah verwandten Bakterien wie z. B. *Salmonella* entschlüsselt worden waren. Für die *in silico*-Vorhersage von sRNAs suchte man nach konservierten Bereichen in den intergenischen Regionen, wobei zum Teil auch Transkriptionssignale wie Promotoren oder Terminatoren in die Suche einbezogen wurden. Basierend auf unterschiedlichen bioinformatischen Methoden wurden bis heute zahlreiche sRNAs in verschiedenen Organismen korrekt vorhergesagt [6].

Heute spielen jedoch auch experimentelle Methoden zur globalen Identifikation von sRNAs eine bedeutende Rolle [2]. Die Detektionsverfahren basieren dabei entweder auf Mikroarrays oder auf Sequenzierung (**Abb. 2**). In einem ersten Schritt wird die RNA aus der Zelle gewonnen. Hierbei kann man die Gesamt-RNA isolieren und somit das gesamte Transkriptom analysieren. Will man den Anteil an sRNAs erhöhen, wird die Gesamt-RNA zuvor über Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und nur die Fraktion mit kleinen RNAs wird weiter untersucht; sRNAs können auch gemeinsam mit ihren Ziel-mRNAs angereichert werden, indem vor der Detektion eine Ko-Immunopräzipitation mit einem sRNA/mRNA-bindenden Protein durchgeführt wird. Die Analyse der RNA bzw. der



◀ **Abb. 3:** Funktionelle Analyse von sRNAs. **A**, Validierung der Regulation einer Ziel-mRNA mithilfe eines GFP-Reportersystems. Die Bakterien werden mit zwei Plasmiden transformiert. Die Fluoreszenz des Reporterproteins GFP kann nun direkt von auf Agarplatten gewachsenen Kolonien detektiert und mit Zellen, die eine Kontroll-RNA (Plasmid mit grauem Insert) exprimieren, verglichen werden. **B**, Aufreinigung von *in vivo* ausgebildeten RNA-Protein-Komplexen mittels Affinitätschromatografie. Die sRNA (rot) wird gemeinsam mit einer Aptamersequenz (blau) von einem Plasmid exprimiert. Amp<sup>R</sup>: Ampicillin-Resistenz; Cm<sup>R</sup>: Chloramphenicol-Resistenz; pLtetO: Anhydrotetracyclin-induzierbarer Promotor; pLlacO: IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid)-induzierbarer Promotor. Weitere Erläuterungen im Text.

in cDNA umgeschriebenen RNA-Moleküle erfolgt dann entweder über Hybridisierung auf Mikroarrays oder durch Sequenzierung.

Unser Labor hat basierend auf der Hochdurchsatzsequenzierung eine spezielle Methodik entwickelt, die zusätzlich zur Analyse des gesamten Transkriptoms auch die Unterscheidung von primären Transkripten und prozessierten Molekülen erlaubt. So wurde in Zusammenarbeit mit Gruppen aus Leipzig und Bordeaux eine unerwartet große Anzahl neuer kleiner sRNAs in dem pathogenen Bakterium *Helicobacter pylori* entdeckt [7].

Auch Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit Hfq, einem Proteinbindungspartner von sRNAs, wurden in unserem Labor durchgeführt. Das RNA-Chaperon Hfq wird in der Zelle sowohl für die Stabilität als auch für die Funktionalität vieler sRNAs benötigt. Orthologe dieses Proteins wurden in der Hälfte aller bis dato sequenzierten Bakterien gefunden. Unsere Analyse der über Hfq angereicherten sRNAs in *Salmonella* [8] in Kombination mit vorausgehenden Studien in *E. coli* lassen vermuten, dass etwa die Hälfte

der kleinen RNAs in diesen Gram-negativen Bakterien an Hfq binden.

### Funktionelle Analyse von sRNAs

Nicht nur für die Identifizierung, sondern auch für die Charakterisierung von sRNAs steht ein großes Repertoire an bioinformatischen und experimentellen Methoden zur Verfügung [2, 6]. Da die meisten der charakterisierten sRNAs die Genexpression über direkte Basenpaarung mit der Ziel-mRNA regulieren, empfiehlt es sich, eine globale Suche nach Zielmolekülen durchzuführen, denn diese können Hinweise über die Funktion der kleinen RNAs liefern. In Zusammenarbeit mit Jay Hinton und seiner Gruppe in Norwich konnten wir zahlreiche Kandidaten für regulierte Ziel-mRNAs in *Salmonella* über kurzzeitig induzierte Überexpression der kleinen RNA und anschließender Transkriptomanalyse mittels Mikroarrays identifizieren [9].

In einem weiteren Schritt sollte nun für die einzelnen sRNA-mRNA-Paare die posttranskriptionale Regulation nachgewiesen werden, wobei auch hier unterschiedlichste *in vivo*-

und *in vitro*-Methoden zur Verfügung stehen [2]. Eine in unserem Labor entwickelte Methode [10] basiert auf der Ko-Expression zweier Plasmide in einer Zelle und anschließender Fluoreszenzmessung (**Abb. 3A**). Das eine Plasmid dient zur Überexpression der kleinen RNA, das andere enthält z. B. die 5'-UTR der Ziel-mRNA – jene Region, die häufig von sRNAs gebunden wird – als translationale Fusion zu *gfp* (Gen für das grün fluoreszierende Protein). Die Messung der Fluoreszenz des Reporterproteins GFP ermöglicht dann die Untersuchung des regulativen Potenzials eines sRNA-mRNA-Paares *in vivo*: Führt die Bindung der sRNA an die 5'-UTR der Ziel-mRNA zu einer Reprimierung der Expression, so zeigen diese Zellen eine geringere Fluoreszenz als Zellen, welche eine Kontroll-RNA anstatt den regulierenden sRNAs exprimieren (**Abb. 3A**, unten).

Für die Regulation der Genexpression mittels sRNAs spielen auch andere Faktoren, wie Proteinbindungspartner, eine wichtige Rolle. Viele sRNAs binden an Hfq, aber es ist anzunehmen, dass auch noch andere Protei-

ne wichtige Funktionen erfüllen. Um tiefere Erkenntnisse über die Regulationsweise von sRNAs zu erlangen, haben wir eine Strategie entwickelt [11], welche die Isolierung und Charakterisierung *in vivo* ausgebildeter RNA-Protein-Komplexe erlaubt (**Abb. 3B**): Eine RNA-Aptamersequenz wird an die sRNA fusioniert und mittels eines Plasmids wird die modifizierte sRNA in den Bakterienzellen exprimiert. Ein Lysat dieser Zellen wird auf eine Säule aufgetragen, wobei die RNA-Protein-Komplexe über das Aptamer an die Säulenmatrix binden. Nach dem Waschen der Säule werden die Komplexe eluiert, und durch Phenolextraktion mit anschließender Fällung werden die RNA-bindenden Proteine gewonnen, welche dann z. B. über Massenspektrometrie analysiert werden können.

Umfassende Untersuchungen einzelner sRNAs haben gezeigt, dass deren Regulationsmechanismen sehr komplex sind [4]. In der Klasse der *trans*-codierten sRNAs gibt es Vertreter, welche die Expression von mehreren unterschiedlichen mRNAs regulieren, und auch die Interaktionsstelle zwischen mRNA und sRNA kann sehr unterschiedlich sein. Bis vor Kurzem wurde angenommen, dass solche sRNAs hauptsächlich an die 5'-UTR der mRNA binden und so die Genexpression ändern. In unserem Labor wurden kürzlich zwei sRNAs beschrieben, die im Gegensatz dazu durch Bindung an die codierende Sequenz die mRNA posttranskriptional regulieren [12, 13].

## Fazit

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Forschung an kleinen nicht-codierenden RNAs ein weites Feld eröffnet hat, in dem es noch viele Meilensteine zu entdecken gibt. Die Herausforderung in der Zukunft liegt allerdings nicht nur in der Identifizierung von solchen RNAs, sondern auch in der Charakterisierung ihrer Funktion, denn die Zahl jener, deren Regulationsmechanismus man kennt, ist im Vergleich immer noch sehr gering.

## Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Vogel, den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und den Kollaborationspartnern, deren Ergebnisse in diesem Artikel zusammengefasst präsentiert wurden. ■

## Literatur

- [1] Gottesman S (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol* 58:303–328
- [2] Sharma CM, Vogel J (2009) Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. *Curr Opin Microbiol* 12:536–546
- [3] Jäger D, Sharma CM, Thomsen J et al. (2009) Deep sequencing analysis of the *Methanosarcina mazei* Go1 transcriptome in response to nitrogen availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21878–21882
- [4] Waters LS, Storz G (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136: 615–628
- [5] Vogel J (2009) A rough guide to the noncoding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* 71:1–11
- [6] Backofen R, Hess WR (2010) Computational prediction of sRNAs and their targets in bacteria. *RNA Biol* 7
- [7] Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F (2010) The primary transcription of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* (im Druck)
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Urban JH, Vogel J (2007) Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 35:1018–1037
- [11] Said N, Rieder R, Hurwitz R et al. (2009) *In vivo* expression and purification of aptamer-tagged small RNA regulators. *Nucleic Acids Res* 37:e133
- [12] 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
- [13] 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

## Korrespondenzadresse:

Dr. Renate Rieder  
Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie  
Charitéplatz 1  
D-10117 Berlin  
Tel.: 030-28460-232  
rieder@mpiib-berlin.mpg.de

## AUTORIN



### Renate Rieder

Jahrgang 1979. Chemiestudium an der Universität Innsbruck; dort 2008 Promotion am Institut für Organische Chemie bei Prof. Dr. Micura. Seit 2008 Postdoc (seit 2009 mit Erwin-Schrödinger-Stipendium des FWF) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Vogel am MPI für Infektionsbiologie, Berlin. Demnächst Umzug der Arbeitsgruppe an das Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg.