

## **Forschungsschwerpunkte**

Die Erbinformation ist in der DNA im Zellkern gespeichert. Für sich genommen ist die DNA aber stumm. Es muss ihr Sprache verliehen werden. Wie ein Bauplan wird sie in der lebenden Zelle umgesetzt, indem DNA-Abschnitte, die Gene, in Proteine übersetzt werden. Proteine erfüllen dann vielfältige Aufgaben, der Organismus kann sich entwickeln. Den ersten Schritt übernimmt dabei das Enzym RNA-Polymerase II. Diese biologische Nanomaschine erstellt während der so genannten Transkription Abschriften von Genen in Form von Boten-RNA (messenger-RNA oder mRNA). Zusätzliche Faktoren helfen der RNA-Polymerase, die DNA-Doppelhelix an der Startstelle eines Gens zu erkennen und aufzudröseln. Die Polymerase gleitet dann an der DNA entlang und produziert einen RNA-Strang. Noch während der Synthese wird die RNA von weiteren Enzymen prozessiert, was zur reifen mRNA führt.

### ***Blick ins Innere: strukturelle Grundlage der Gen-Transkription***

Im Jahr 2000 gelang es Patrick Cramer an der Stanford-Universität, die dreidimensionale Struktur des Kernbereichs der RNA-Polymerase II zu bestimmen, der aus zehn Protein-Untereinheiten besteht. In den Jahren 2001-2004 konnte die Arbeitsgruppe Cramer dann am Münchner Genzentrum die komplette RNA-Polymerase II, die zwölf Untereinheiten umfasst, kristallisieren und durch Röntgenanalyse strukturell aufklären. Die Polymerase-Struktur konnte auch als aktiver Komplex bestimmt werden, in dem die eintretende DNA und das austretende RNA-Produkt sichtbar sind. Diese vollständigen Polymerase-Strukturen ermöglichen ein Verständnis des Transkriptions-Mechanismus: Eine tiefe Spalte in der Polymerase nimmt die DNA auf und beherbergt das katalytische Zentrum. Die Anlieferung der RNA-Bausteine erfolgt durch eine Pore im Boden der Spalte. Eine molekulare Klammer umschließt DNA und RNA, sodass die Transkription nicht vorzeitig abbricht.

### ***Retter in der Not: Reaktivierung der Transkription von außen***

Was passiert, wenn die Polymerase wegen eines Schadens in der DNA oder aus anderen Gründen während der Transkription stecken bleibt? Die Arbeitsgruppe Cramer konnte zeigen, wie die Polymerase-Maschine in solchen Fällen durch einen externen Faktor, TFIIS, reaktiviert wird. TFIIS lagert sich an die Polymerase an und reicht mit einem Fortsatz bis ins aktive Zentrum hinein. Dies bewirkt ein Umschalten der Polymerase-Funktion und führt zur RNA-Spaltung. So wird ein überschüssiges Stück RNA aus dem aktiven Zentrum entfernt. Die Transkription kann nun fortgeführt

werden, ohne dass die bereits synthetisierte RNA verloren geht. Derselbe Mechanismus dient wohl auch zur Korrektur von Kopierfehlern, wobei fälschlicherweise eingebaute RNA-Bausteine entfernt werden. Damit verfügt die Polymerase über ein einzigartiges aktives Zentrum, das zwischen RNA-Synthese- und RNA-Spaltungsfunktion hin- und herschalten kann.

### ***Am Fließband der Nanowelt: koordinierte RNA-Produktion***

In der Zelle laufen Transkription und RNA-Modifizierung nicht isoliert ab, sondern sind räumlich und zeitlich gekoppelt. In der Nanowelt des Zellkerns existiert eine Art Fließband für die RNA-Herstellung: Die bei der Transkription entstehende RNA wird wie am Fließband weitergereicht zu Proteinen, die für die RNA-Prozessierung nötig sind. Diese Proteine lagern sich entlang einer schwanzartigen Verlängerung der RNA-Polymerase II an, der so genannten C-terminalen Domäne. Einen Teil dieser hochflexiblen Domäne konnte die Arbeitsgruppe Cramer atomar aufklären. Dabei konnte auch gezeigt werden, wie die CTD durch einen RNA-Prozessierfaktor erkannt wird. Während der Transkription wird die C-terminal-Domäne verändert, indem Phosphatgruppen angelagert und wieder entfernt werden. Dabei entstehen Phosphatmuster, die die spezifische Bindung von RNA-Prozessierfaktoren bewirken. Die Forschungsgruppe trug dazu bei, den hochkomplexen Code dieser Phosphatmuster zu entschlüsseln.

### ***Recycling der RNA-Polymerase II***

Am Ende der Transkription müssen die Phosphatmuster in der RNA-Polymerase II entfernt werden. Nur dann kann die Polymerase wieder am Beginn eines Gens anknüpfen und die Transkription neu starten. Die Phosphatgruppen werden von einem speziellen Enzym abgetragen, einer so genannten Phosphatase. Die Arbeitsgruppe Cramer konnte die atomare Struktur der Phosphatase in einem Zwischenzustand der Reaktion einfrieren, was den chemische Mechanismus des Recyclings der RNA-Polymerase II offenbarte. Zudem hat die Arbeitsgruppe eine neue Phosphatase-Aktivität entdeckt, die auch auf die RNA-Polymerase II einwirkt.

### ***Die technischen Grenzen nach vorne verschieben***

All diese Forschungsarbeiten wurden erst durch die Verbesserung der Methode der biologischen Röntgen-Kristallstrukturanalyse ermöglicht. Der Arbeitsgruppe Cramer ist es gelungen, große und instabile Molekülkomplexe zu präparieren und durch Kristallisation einer Strukturanalyse zuzuführen. Insbesondere wurden große

Komplexe aus natürlichen und gentechnisch produzierten Proteinkomplexen sowie Nucleinsäuren wie in einem Baukastensystem zusammengesetzt und kristallisiert. Zudem konnte ein Faktor durch Tränkung von vorgeformten Proteinkristallen in einen bestehenden Komplex eingebracht werden. Zum Nachweis von angelagerten Faktoren und Nucleinsäuren in Kristallen wurde eine neue Methode der Fluoreszenz-Detektion entwickelt. Die neuen Methoden führten zu einer der größten bekannten Molekularstrukturen, der Struktur der RNA-Polymerase II im Komplex DNA, RNA und TFIIS.

### **Zukünftige Forschung**

Das langfristige Ziel ist es, die Regulation der Gen-Transkription zu verstehen, die der Entwicklung und dem Erhalt eines Organismus zu Grunde liegt. Dazu muss zuerst die Arbeit der Transkriptionsmaschine wie in einem Film aufgenommen werden. Der Film soll dreidimensional und detailliert sein, um chemische Mechanismen zu beschreiben. Die einzelnen Bilder des Films werden der Natur mühsam abgerungen. Dazu müssen die Strukturen von verschiedenen funktionalen Komplexen der RNA-Polymerase durch Röntgenanalyse oder Elektronenmikroskopie entschlüsselt werden. In einem weiteren Schritt können dann die Regulationsmechanismen der Gen-Transkription untersucht werden, indem man fragt, wie und an welcher Stelle ein regulatorisches Protein in die Abläufe des Prozesses eingreift. Man schätzt, dass etwa 10 Prozent aller Proteine im Organismus der Transkriptionsregulation dienen. Zwar versteht man oft, wie diese Proteine ihre Zielgene erkennen, doch bleibt unklar, wie ihre regulatorische Wirkung entfaltet wird. Erste Schritte zur Aufklärung der Genregulation wurden getan. Eben konnte die Arbeitsgruppe zeigen, wie ein regulatorisches Molekül den Neustart der Transkription verhindert, während bereits arbeitende Polymerasen ungestört zum Ende eines Gens laufen. Auch wurden die ersten Bausteine eines Proteinkomplexes aufgeklärt, der regulatorische Signale auf die RNA-Polymerase II überträgt.

**Prof. Dr. Patrick Cramer**  
**Dezember 2005**