

Direkte Beobachtung einzelner RNA-Polymerasen beim Ablesen eines endogenen Gens in einer lebenden Hefezelle

Barbara Treutlein und Jens Michaelis*

Diffusion · Einzelmolekülstudien · Einzelzellbiologie ·
Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie · Transkription

Die Transkription eines Gens in Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) durch die RNA-Polymerase II (RNAPII) ist der erste Schritt der Genexprimierung. Man unterscheidet dabei die drei Hauptphasen der Initiation (Transkriptionsbeginn), Elongation (mRNA-Verlängerung) und Termination (Transkriptionsabbruch). Jeder Schritt der Transkription wird streng reguliert durch die Bindung und Wirkung zahlreicher Transkriptionsfaktoren. Daher ist ein Verständnis dieser Transkriptionsnetzwerke auf funktioneller und dynamischer Ebene entscheidend für das Verstehen zellulärer Systeme und ihrer Entwicklung. In klassischen biochemischen Transkriptionsstudien wird mRNA aus Zellpopulationen isoliert, um das Ausmaß der Exprimierung zu bestimmen. Die dabei angewendeten Ensemble-Techniken, wie Northern-Blots und quantitative PCR mit reverser Transkription, haben den Nachteil, dass über eine große Zahl von Zellen gemittelt wird; daher liefern sie keine räumlich aufgelösten Informationen, und Variationen zwischen einzelnen Zellen bleiben unberücksichtigt. Ebenso wenig gelingt es, die Dynamik und Regulierung einzelner Transkriptionsereignisse zu erfassen.

Der Einsatz von In-vitro-Einzelmolekülmethoden hat wichtige Einblicke in den Mechanismus des Transkriptionsvorgangs ergeben. Förster-Resonanzenergietransfer zwischen einzelnen Molekülen (single-molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET) sowie die Verwendung magnetischer und optischer Pinzetten vermeiden die Ensemblemittelung, sodass einzelne RNAPIIs auf einem gewünschten Gen in einer streng kontrollierten Umgebung betrachtet werden können.^[1] Phänomene wie das Pausieren und das Zurücklaufen („backtracking“) von RNAPII sowie der Einfluss von Transkriptionsfaktoren konnten dadurch aufgedeckt werden.^[2–4] Um die komplexen Abläufe in lebenden Organismen beschreiben zu können, muss das vereinfachte mechanistische Bild, das aus diesen In-vitro-Studien gewonnen wurde, aber sicher noch angepasst werden.

Nach raschen technologischen Fortschritten in der Abbildung lebender Zellen ist es nun möglich, einzelne Tran-

skriptionsereignisse in lebenden Zellen mithilfe von Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie gezielt zu untersuchen.^[5–8] Studien mit direkter Detektion der entstehenden mRNA belegen starke Variationen in der mRNA-Produktion zwischen einzelnen Zellen und einen stochastischen Transkriptionsprozess („intrinsisches Rauschen“) sowie Transkriptionsschübe („transcriptional bursting“) in Säugerzellen^[7] und Bakterien^[5] und, im Gegensatz dazu, nicht zusammenhängende Transkriptionsereignisse in Hefe.^[8]

Bislang wurden Einzelmolekülstudien zur Transkription unter Verwendung exogener Reportergene ausgeführt, mit denen die untersuchten Zelltypen zuvor transfiziert werden mussten. Larson et al. gelang es nun, in lebenden Zellen einzelne naszierende mRNA-Moleküle in Echtzeit zu verfolgen, die bei der Transkription eines endogenen, durch den Zellzyklus gesteuerten Hefegens entstanden.^[9] Sie entwickelten zudem eine neuartige quantitative Methode der Fluktuationsanalyse für fluoreszenzmarkierte mRNA, um die Kinetik der Transkriptionsinitiation und die Dynamik von Elongation und Termination zu beschreiben. Zum Nachweis der naszierenden RNA wurde eine Kasette in die nicht-translatierte Region (UTR) des gewünschten Gens eingefügt, die für 24 RNA-Haarnadelstrukturen kodiert (Abbildung 1a,b). Diese Haarnadelstrukturen entstehen bei der Transkription der Kasette durch RNAPII und dienen dem Hüllprotein des PP7-Bakteriophagen als Bindestelle. Ein GFP-PP7-Fusionsprotein wird konstitutiv coexprimiert und erfüllt durch sein Binden an die mRNA die Funktion einer Fluoreszenzmarkierung (GFP = Grün fluoreszierendes Protein).

Durch Einfügen der Kasette „stromaufwärts“ von der kodierenden Region (5'UTR) erhielten Larson et al. Informationen über den zeitlichen Ablauf ganzer Transkriptionszyklen (Abbildung 1a): Kurz nach der Initiation (t_1) wird die Kasette transkribiert (t_2). Erkennbar wird diese Transkription durch einen gestuften Anstieg des Fluoreszenzsignals (Abbildung 1c, grüne Kurve). Das Fluoreszenzsignal der naszierenden RNA bleibt während der Elongation ($t_2 + t_3$) konstant, und fällt bei der Transkriptionstermination plötzlich auf das Niveau des Hintergrunds ab, weil sich das Transkript von der Transkriptionsstelle (TS) löst und frei durch den Zellkern diffundiert (t_4).

[*] B. Treutlein, Prof. Dr. J. Michaelis
Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie
Butenandtstraße 11, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: jens.michaelis@cup.uni-muenchen.de
Homepage: <http://www.cup.uni-muenchen.de/pc/michaelis>

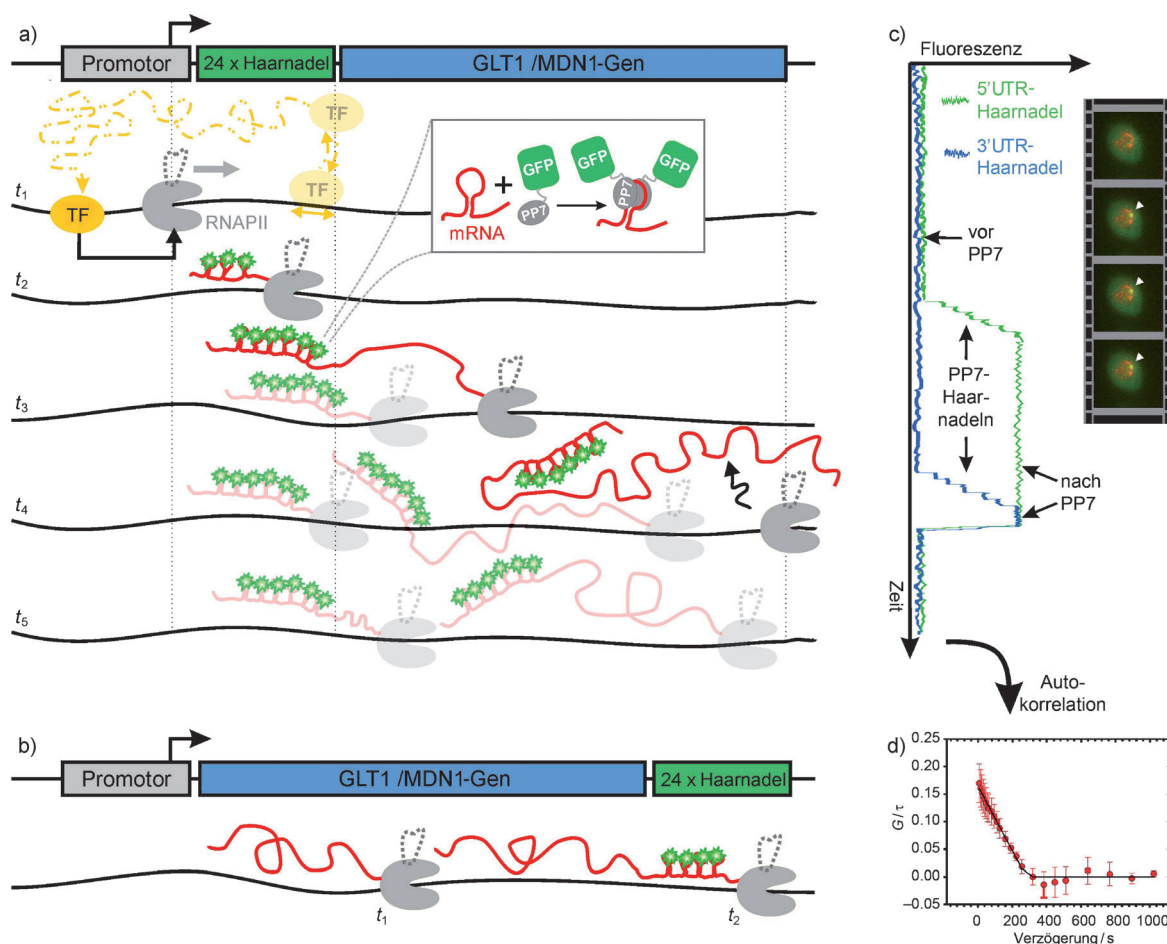


Abbildung 1. Echtzeit-Beobachtung der Initiation und Elongation bei der Transkription eines endogenen Hefegens und Bestimmung der Transkriptionskinetik. a) Schema des Genkonstrukts, das durch 5'UTR-Insertion einer Kassette, die für 24 PP7-Bindestellen kodiert, erhalten wurde. t_1 – t_5 : Verschiedene Stadien der Transkription des Reportergens (TF = Transkriptionsfaktor). b) Schema des Genkonstrukts, das durch 3'UTR-Insertion der PP7-Kassette bezüglich des endogenen Lokus erhalten wurde, und seiner Transkription. c) Fluoreszenz-Zeitspuren für die TS eines Gens mit der Haarnadel-Kassette in der 5'UTR (grün) und in der 3'UTR (blau). In der Beispielsequenz von Weitfeldmikroskopie-Bildern deuten weiße Pfeile auf die TS. d) Autokorrelation für einen aktiven Genlokus (GLT1), berechnet aus langen Zeitspuren mit zahlreichen Transkriptionsereignissen. Rote Kreise: Daten; schwarze Linie: beste Anpassung; Fehlerbalken: Standardfehler.^[9]

Die Vorgänge an der aktiven TS wurden mithilfe eines Weitfeldmikroskops beobachtet (Abbildung 1c). Über ein langes Zeitintervall hinweg traten zahlreiche Transkriptionsereignisse auf. Weil oft mehrere RNAPIIs gleichzeitig an verschiedenen Positionen desselben Gens transkribierten, kam es zur Überlagerung von Transkriptionsereignissen an einer einzigen TS (Abbildung 1a, t_3 – t_5). Somit lag die Frage nahe, ob die Transkription der unterschiedlichen Polymerasen auf einem Gen einen kooperativen Prozess darstellt, ausgelöst beispielsweise durch das kontinuierliche Vorliegen wichtiger Transkriptionsfaktoren an der TS. Diese Frage wurde mithilfe einer quantitativen Fluktuationsanalyse untersucht, die das Berechnen der Autokorrelation von langen Fluoreszenz-Zeitspuren der mRNA an einem aktiven Genlokus beinhaltet. Die Autokorrelationskurve war am besten mit einem Modell in Einklang zu bringen, das keinerlei Zusammenhang zwischen einzelnen Initiationsereignissen vorsieht (Abbildung 1d). Die RNAPIIs wirkten also unabhängig voneinander auf dem untersuchten Gen, und die Transkriptionsinitiation ist somit ein stochastischer Prozess.

Larson et al. entwarfen daraufhin ein zweites Reporter-gen-Konstrukt, in dem sie die für die PP7-Bindestellen kodierende Kassette „stromabwärts“ vom endogenen Lokus in die 3'UTR eingliederten. Dieses Konstrukt lieferte somit Informationen über das späte Stadium des Transkriptionsprozesses (Abbildung 1b und c, blaue Kurve). Naszierende RNA konnte fluorenszenzspektroskopisch nur in dem kleinen Zeitfenster nach der Elongation des natürlichen Gens und vor der Transkriptionstermination detektiert werden. Die Fluoreszenz trat daher erst kurz vor der Termination auf, für das 5'UTR-Konstrukt hingegen bereits am Anfang der Elongationsphase. Durch Kombination der Daten für beide Konstrukte wurden Geschwindigkeiten für Initiation und Elongation ermittelt. Der zeitliche Abstand zwischen der Transkription der Haarnadel-Kassette und dem Abfallen des RNA-Fluoreszenzsignals war für verschiedene Transkriptionsereignisse sehr ähnlich, was anzeigte, dass die Elongation mit gleichmäßiger Geschwindigkeit und ohne größeres Pausieren der RNAPII verlief. Dagegen variierte die Geschwindigkeit der Elongation in verschiedenen Phasen des Zellzy-

klus um den Faktor drei, und auch die Geschwindigkeit der Initiation wurde durch den Zellzyklus beeinflusst.

Der vielleicht interessanteste Aspekt der Studie von Larsen et al. ist das Resultat eines zusätzlichen Experiments, in dem sie die Mobilität des Transkriptionsfaktors Mbp1p betrachteten, der das Gen durch Bindung an seinen Promotor aktiviert. Mbp1p wurde durch Fusion an GFP markiert, und die Fluktuation seiner Fluoreszenzintensität im Zellkern wurde mithilfe von Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie unter Zweiphotonenanregung gemessen, um die Diffusion des Proteins nachzuvollziehen. Ein Vergleich verschiedener Modelle für die Diffusion von Mbp1p im Zellkern mit den gemessenen Zeitabständen zwischen einzelnen Transkriptionsereignissen ergab eine gute quantitative Übereinstimmung. Die Transkriptionsinitiation für ein betrachtetes Gen hängt demnach nur davon ab, wie schnell der Transkriptionsfaktor seine spezielle Promotor-Bindestelle findet. Es ist zu beachten, dass der vorliegende Fall einen Spezialfall darstellt, in dem ein Gen in einer nicht sehr dichten Umgebung durch einen einzigen Transkriptionsfaktor kontrolliert wird. Für andere Gene sind wahrscheinlich dichtere Umgebungen und die Einwirkung mehrerer Faktoren entscheidend; dieses Szenario könnte den so genannten „Transkriptionsfabriken“ zugrundeliegen. Daten aus genomweiten Studien an Genen und ihren regulatorischen Netzwerken, etwa durch Chromatin-Immunfällung (ChIP), sollten nun herangezogen werden,

um interessante Gene für weitere Studien mit der quantitativen Einzelmolekülmethode nach Larson et al. auszuwählen. Solche Untersuchungen werden maßgebend zu einem klaren Bild vom Mechanismus der Transkriptionsregulation in dem komplexen Medium einer Zelle beitragen.

Eingegangen am 5. Juni 2011

Online veröffentlicht am 26. Juli 2011

-
- [1] M. H. Larson, R. Landick, S. M. Block, *Mol. Cell* **2011**, *41*, 249.
 - [2] K. M. Herbert, J. Zhou, R. A. Mooney, A. La Porta, R. Landick, S. M. Block, *J. Mol. Biol.* **2010**, *399*, 17.
 - [3] E. A. Galburt, S. W. Grill, A. Wiedmann, L. Lubkowska, J. Choy, E. Nogales, M. Kashlev, C. Bustamante, *Nature* **2007**, *446*, 820.
 - [4] K. M. Herbert, W. J. Greenleaf, S. M. Block, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 149.
 - [5] I. Golding, J. Paulsson, S. M. Zawilski, E. C. Cox, *Cell* **2005**, *123*, 1025.
 - [6] D. R. Larson, R. H. Singer, D. Zenklusen, *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 630.
 - [7] A. Raj, C. S. Peskin, D. Tranchina, D. Y. Vargas, S. Tyagi, *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e309.
 - [8] D. Zenklusen, D. R. Larson, R. H. Singer, *Nat Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 1263.
 - [9] D. R. Larson, D. Zenklusen, B. Wu, J. A. Chao, R. H. Singer, *Science* **2011**, *332*, 475.