

Genregulation mittels eines natürlichen Metabolit-sensitiven Ribozyms**

Ronald Micura*

Stichwörter:

Genexpression · Nucleotide · Riboschalter · Ribozyme · RNA

In allen Organismen ist die Genexpression ein höchst komplexes Unterfangen, da Hunderte von Genen gleichzeitig koordiniert werden müssen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Natur eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt hat, um diese Prozesse zu regulieren und zu kontrollieren. Als klassische Beispiele gelten Genregulationen in Bakterien, die auf Transkriptions- oder Translationsebene erfolgen können.^[1,2] Hierbei wird ein gemeinsames Prinzip befolgt: Ein externes Ereignis, das mit einem bestimmten metabolischen Zustand der Zelle verbunden ist, bewirkt die Bildung unterschiedlicher, voneinander abhängiger mRNA-Sekundärstrukturen. Im Falle der Translationsregulation kann beispielsweise in einer der beiden Sekundärstrukturen die Shine-Dalgarno(SD)-Sequenz durch intramolekulare Basenpaarung blockiert sein, um die für den Start der Proteinsynthese notwendige Interaktion mit der rRNA zu verhindern. Lange Zeit betrachtete man diesen Typ der Genregulation als eine Domäne von Proteinfaktoren, da das externe Ereignis gewöhnlicherweise die konzentrationsabhängige Bindung eines bestimmten Metaboliten an ein Protein betrifft, das in der Folge mit der mRNA wechselwirkt. Die dabei induzierte Strukturänderung ist für die ge-

netische Ein/Aus-Antwort verantwortlich.

In den letzten zwei Jahren wurden allerdings spezielle Domänen in mRNAs gefunden, die Metaboliten direkt in selektiver und konzentrationsabhängiger Weise binden und dadurch die Genexpression ohne die Mitwirkung von Proteinfaktoren beeinflussen.^[3] Diese RNA-Domänen werden als Riboschalter bezeichnet; sie bestehen aus einer natürlichen Aptamer-Domäne und einer Expressionsplattform, die sich beide in der nicht codierenden 5'-Region befinden. Durch die Wechselwirkung mit einem niedermolekularen Liganden reorganisiert sich ihre Struktur, was wiederum zur Modulierung der Expression des entsprechenden Gens führt. Das erste Beispiel für einen natürlichen Riboschalter wurde von Ronald Breakers Arbeitsgruppe entdeckt und betraf den Transport von Cobalamin in Bakterien.^[4] Bald darauf konnte die Existenz einer Reihe von Riboschaltern für die Regulation wichtiger biologischer Prozesse in Prokaryonten belegt werden. Diese Riboschalter erkennen die Metaboliten Thiaminpyrophosphat (TPP),^[5] Flavinmononucleotid (FMN),^[6] S-Adenosylmethionin (SAM),^[7] Guanin^[8] und Adenin.^[9]

Die neuesten Entdeckungen auf diesem spannenden Forschungsgebiet kommen wiederum aus Breakers Labor: Seine Arbeitsgruppe hat ein neues Ribozym entdeckt, das als Metabolit-sensitiver genetischer Schalter in Grampositiven Bakterien wirkt.^[10] Das Ribozymmotiv liegt in der nicht codierenden Region am 5'-Ende (UTR) der *glmS*-mRNA (Abbildung 1). Das *glmS*-Gen codiert die Glutamin-Fructose-6-phosphat-Amidotransferase, die das Glucos-

amin-6-phosphat (GlcN6P), eine wichtige Komponente für die Zellwandsynthese, aus Fructose-6-phosphat (Fru6P) und aus Glutamin aufbaut. Sobald sich GlcN6P in ausreichendem Maß angesammelt hat, bindet es an das Ribozymmotiv. Dieses Ereignis löst die Selbstspaltung des Ribozyms aus und unterbindet damit die Produktion von Amidotransferase und folglich die Synthese von GlcN6P. Es ist bemerkenswert, dass die Spaltung des Ribozyms die codierende Region der mRNA intakt lässt. Es muss daher entweder die RNA-Stabilität herabgesetzt und dadurch der RNA-Abbau beschleunigt sein oder die Fähigkeit der RNA zur Translation am Ribosom beeinträchtigt sein.

Die experimentellen Belege für diese neue Ribozymklasse beruhen auf detaillierten biochemischen Studien einer 246 Nucleotide umfassenden RNA (246-*glmS*), welche die hoch konservierte Region des *glmS*-Gens von *B. subtilis* aufwies. Zunächst deutete ein In-line-probing-Assay auf eine bevorzugte Selbstspaltungsstelle der RNA hin. Man fand dann aber, dass bei Gegenwart mikromolarer Mengen von GlcN6P die Selbstspaltung der 246-*glmS*-RNA signifikant beschleunigt wurde: Die Spaltungsgeschwindigkeit war 1000-mal höher als ohne Metabolit. Darüber hinaus sind für die Aktivierung des Ribozyms Mg^{2+} -Ionen in physiologischer Konzentration notwendig, die allerdings durch andere zweiwertige Ionen ersetzt werden können. Die Ribozymantwort verläuft linear mit steigender Ligandenkonzentration, und zwar in der Weise, dass eine Verzehnfachung der Konzentration des Metaboliten eine Verzehnfachung der Spaltungsge-

[*] Univ.-Prof. Dr. R. Micura
Universität Innsbruck
Institut für Organische Chemie
Innrain 52a, 6020 Innsbruck (Österreich)
Fax: (+43) 512-507-2892
E-mail: ronald.micura@uibk.ac.at

[**] Der Autor dankt dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF, Wien) für finanzielle Unterstützung.

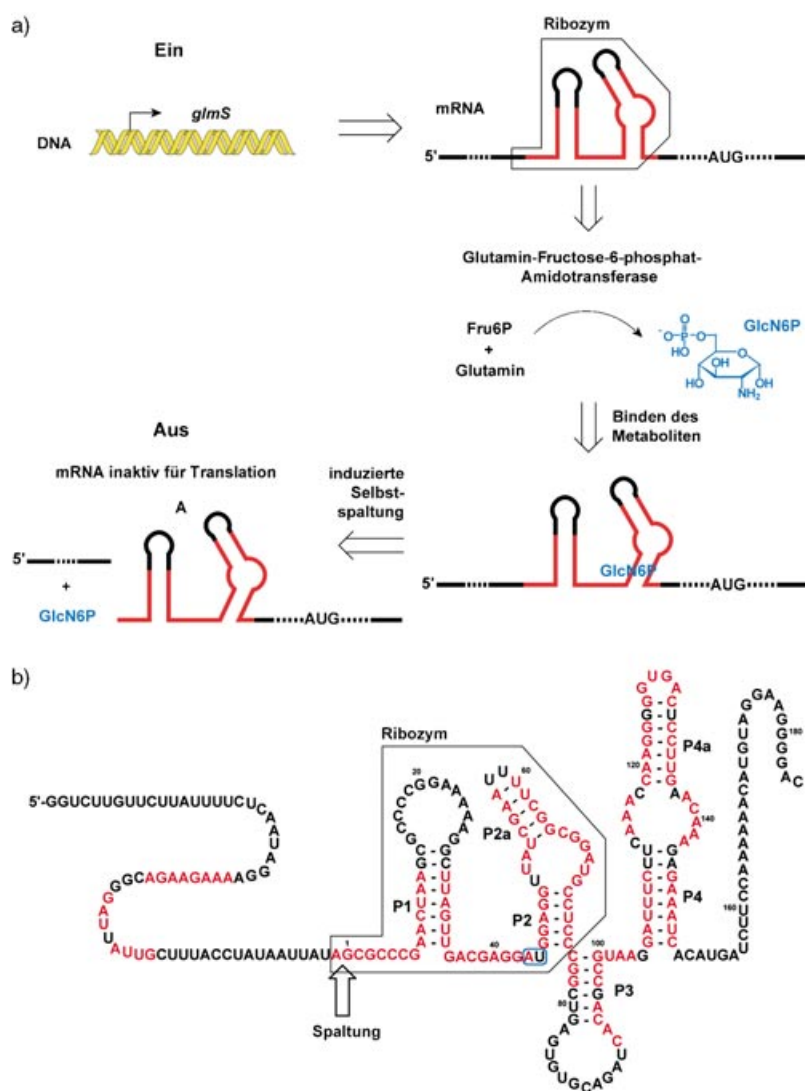


Abbildung 1. a) Ausschalten eines Gens auf RNA-Ebene basierend auf einem Metabolit-sensitiven Ribozym: Die *glmS*-mRNA codiert das Enzym Glutamin-Fructose-6-phosphat-Amidotransferase, das an der Synthese von Glucosamin-6-phosphat (GlcN6P) beteiligt ist. Die 5'-nichtcodierende Region dieser mRNA enthält ein Ribozymmotiv, dessen Aktivität zur Phosphorsäurediesterspaltung durch mikromolare Konzentrationen von GlcN6P signifikant erhöht wird. Durch die Selbstspaltung wird die *glmS*-mRNA inaktiviert und in der Folge die weitere Produktion von GlcN6P verhindert. b) Sekundärstrukturmodell der untersuchten, 246 Nucleotide umfassenden RNA mit dem neuartigen Ribozymmotiv der *glmS*-mRNA aus *B. subtilis*: Die Nucleoside in Rot zeigen die Konsensussequenz von 18 Bakterienarten an. Das AUG-Startcodon liegt 245 Nucleotide strangabwärts von der Spaltungsstelle. Die Nucleotide in den Positionen 43 und 44 (blauer Kreis) zeigen veränderte spontane Spaltungsgeschwindigkeiten in Gegenwart von GlcN6P; dies weist auf eine große Nähe zur Bindungsstelle hin.

schwindigkeit bedingt – dies weist auf einen 1:1-Komplex aus Metabolit und Ribozym hin. Die meisten Analoga von GlcN6P, z. B. GlcP6, GlcP1 oder Glc, werden von der 246-*glmS*-RNA diskriminiert, wodurch die hohe Spezifität des Ribozyms dokumentiert wird. Die 246-*glmS*-RNA spricht unmittelbar auf die Zugabe von GlcN6P an und entspricht

somit einem schnellen Schalter, dessen aktive Struktur ohne Überschreiten hoher Energiebarrieren gebildet wird. Bislang wurde nicht untersucht, ob GlcN6P direkt an der Phosphordiester-spaltung beteiligt und damit ein Teil des aktiven Zentrums ist. Die Autoren argumentieren, dass der Mechanismus der Spaltung sehr wahrscheinlich der Selbstspaltung

anderer kleiner Ribozyme, wie der des Hammerkopfs (Hammerhead)- oder des Haarnadelschleifen (Hairpin)-Ribozyms, gleicht. Dieser Mechanismus verläuft über den nucleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe der Ribose an das benachbarte Phosphorzentrum. Daraus resultieren 5'-Spaltungsprodukte mit einer 2',3'-Cyclophosphatgruppe, wie sie auch im Falle des *glmS*-Ribozyms nachgewiesen wurden.

Tests mit einer Reihe von verkürzten RNA-Konstrukten zufolge entspricht die Minimalgröße des Ribozyms etwa 75 Nucleotiden. Das Ribozym besteht dann aus den Stämmen P1 und P2; allerdings hat der Verlust der Stämme P3 und P4 eine geringere Aktivität zur Folge. Darüber hinaus wurde eine Reihe von Mutanten *in vitro* auf ihre Funktion als selbstspaltende Ribozyme untersucht und *in vivo* auf ihre regulatorische Kontrolle. Es zeigte sich, dass direkt zur Spaltungsstelle benachbarte Mutationen nicht toleriert werden. Das *glmS*-Ribozymmotiv wurde auch am 5'-Ende eines nicht verwandten β -Galactosidase-Reportergens platziert: Die inverse Beziehung zwischen der Ribozymaktivität *in vitro* und der β -Galactosidaseaktivität *in vivo* belegt, dass es sich bei dem neuen Metabolit-sensitiven funktionellen RNA-Motiv durchaus um eine modulare und transplantierbare Einheit handelt.

Es ist anzumerken, dass sich vor der Entdeckung des hier diskutierten, natürlichen Riboschalter-Ribozyms mehrere Arbeitsgruppen – inklusive der von Ronald Breaker – mit der Entwicklung von allosterisch steuerbaren Ribozymen beschäftigt haben.^[11] Die Realisierung solcher künstlichen molekularen Schalter, die aus einem *in vitro* selektierten Aptamer und einer damit direkt verknüpften Ribozymdomäne bestehen, mag für den Erfolg bei der Suche nach einem natürlich vorkommenden Vertreter mitverantwortlich gewesen sein.

Die Entdeckung des Metabolit-sensitiven Ribozyms liefert auch Anregungen für Forscher, die ein besseres Verständnis der Entwicklung von einfachen hin zu komplexen Lebensformen bei der Evolution erlangen wollen. Das neue Ribozym steht möglicherweise für ein bis heute überlebendes Konzept regulativer Mechanismen in frühen Organismen. Es wird eine wichtige Auf-

gabe sein, diese neue Art der Genregulation auch in höheren Organismen nachzuweisen.

Online veröffentlicht am 4. August 2004

- [1] J. Stülke, *Arch. Microbiol.* **2002**, *177*, 433–440.
- [2] P. Romby, M. Springer, *Trends Genet.* **2003**, *19*, 155–161.
- [3] W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Chem-BioChem* **2003**, *4*, 1024–1032.
- [4] A. Nahvi, N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1043–1049.
- [5] W. C. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker, *Nature* **2002**, *419*, 952–956.
- [6] a) W. C. Winkler, S. Cohen-Chalamish, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15908–15913; b) A. S. Mironov, I. Gusarov, R. Rafikov, L. E. Lopez, K. Shatalin, R. A. Krenova, D. A. Perumov, E. Nudler, *Cell* **2002**, *111*, 747–756.
- [7] a) B. A. McDaniel, F. J. Grundy, I. Artsimovitch, T. M. Henkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3083–3088; b) W. C. Winkler, A. Nahvi, N. Sudarsan, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 701–707; c) V. Epshtein, A. S. Mironov, E. Nudler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5052–5056.
- [8] M. Mandal, B. Boese, J. E. Barrick, W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Cell* **2003**, *113*, 577–586.
- [9] M. Mandal, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Biol.* **2004**, *11*, 29–35.
- [10] W. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, *428*, 281–285.
- [11] R. R. Breaker, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 31–39.



ISBN 3-527-30542-4

Prices per volume:

€ 259.– / £ 200.– / US\$ 370.–

Publication dates:

volumes 1–5 Feb 2004

volumes 6–10 Aug 2004

volumes 11–16 May 2005

The Nucleus of Knowledge

Robert A. Meyers (Ed.), Ramtech Ltd., Tarzana, CA, USA

Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine

2nd Edition, 16 Volume Set

Highly acclaimed and referenced by the scientific community, the *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine* is now entering its second edition. The new edition features extensive new material on the molecular aspects of cell biology, which is reflected in its new title: *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. With new articles on functional genomics, proteomics, and bioinformatics, there is no better, cutting-edge reference in the field.

"This series is a classic..."

Molecular Medicine Today / Trends in Molecular Medicine

<http://meyers-emcbmm.de>

John Wiley & Sons, Inc., Customer Care,
Fax: +1 800-597-3299, e-mail: custserv@wiley.com, www.wiley.com
Wiley-VCH, Customer Service Department,
Fax: +49 (0) 6201-606-184, e-mail: service@wiley-vch.de, www.wiley-vch.de
John Wiley & Sons, Ltd, Customer Services Department,
Fax: +44 (0) 1243-843-296, e-mail: cs-books@wiley.co.uk, www.wiley.co.uk

 WILEY

 WILEY-VCH

6833072_ba