

Ein hoch präziser Schalter auf einer RNA-Nachricht**

Bernhard Kräutler*

Stichwörter:

Molekulare Schalter · Aminosäuren · Genregulation · Katabolismus · RNA

In der herkömmlichen Betrachtungsweise handelt es sich bei (Oligo-)Ribonucleotiden (RNA) um molekulare Vehikel in einem hochgradig zuverlässigen Übertragungssystem, das die genetische Information durch Proteinexpression umsetzt.^[1] In zellulären Organismen stellt die Messenger-RNA (mRNA) ein Transkript der DNA mit codierenden und nichtcodierenden Abschnitten dar und kann als „bedingte“ molekulare Nachricht aufgefasst werden: Das weitere Schicksal der Nachricht nach der Transkription hängt von der zellulären Umgebung ab. Ihre Expression wird durch Mechanismen gesteuert, die entweder bei der Transkription (bei der „naszierenden“ RNA) oder bei der Translation eingreifen.

Neuere Arbeiten beschreiben eine bislang unbekannte Funktion der RNA als regulierende Komponente in der Genexpression. Direkte Wechselwirkungen zwischen natürlichen RNAs und niedermolekularen Verbindungen wurden von Breaker et al. als neuer Mechanismus genetischer Kontrolle in Metaboliten erkennenden „Riboschaltern“ aufgezeigt.^[2,3] Solche Riboschalter enthalten konservierte Sequenzen und wer-

den im 5'-untranslatierten (nichtcodierenden) Abschnitt der mRNA gefunden. Mithilfe eines allosterischen Effekts induziert die Bindung des Metaboliten das Umschalten der von der DNA transkribierten mRNA zwischen einem „An“- und einem „Aus“-Zustand, das über die weitere Verarbeitung der codierten Nachricht bestimmt. Metaboliten bindende Riboschalter passen damit die Genexpression der zellulären Umgebung auf effiziente und direkte Weise an. Sie sind unter Bakterien besonders verbreitet, kommen jedoch nicht ausschließlich in Prokaryoten, sondern wohl auch in Eukaryoten zur Anwendung.^[4]

Die Entdeckung der glycinabhängigen bakteriellen Riboschalter ist ein Hinweis auf noch viel ausgeklügelteres natürliches RNA-Engineering.^[5] Glycinabhängige Riboschalter sind eine neuer Art von Riboschaltern, die aus einem Tandem von Glycin bindenden RNA-Motiven bestehen (siehe Abbildung 1 für eine Darstellung des Tandem-Motivs von *Bacillus subtilis*). Diese konservierten RNA-Motive enthalten jeweils ca. 100–120 Nucleotide, die durch einen kurzen RNA-Strang verbunden sind. Die glycinabhängigen Riboschalter sind Teil des 5'-untranslatierten Abschnitts des *gcvT*-Operons, das für Proteine codiert, die beim Ab-

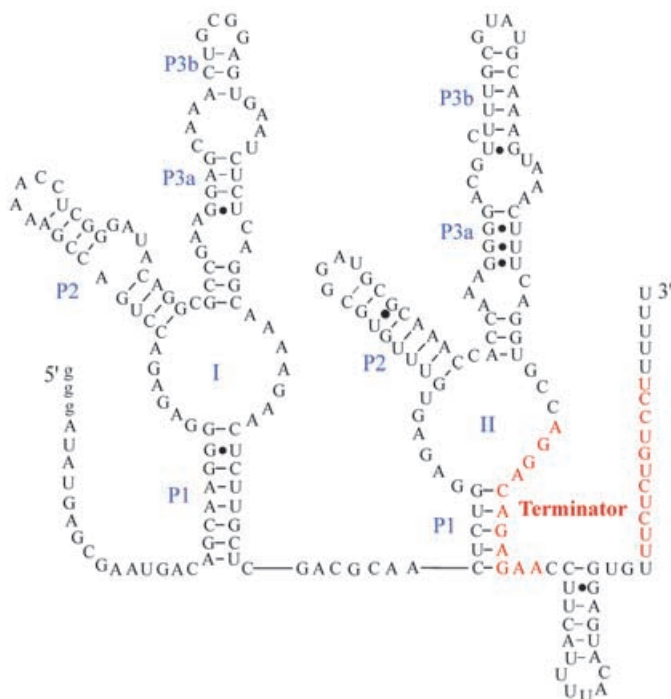


Abbildung 1. Darstellung des Glycin bindenden Tandem-RNA-Motivs von *Bacillus subtilis*. Hervorgehoben sind vermutete Basenpaarmuster (P1–P3) sowie die vermutlich transkriptionsterminierend wirkende Sequenz (rot), die im „An“-Zustand (wie hier gezeigt) die weitere RNA-Transkription zulässt (mit Änderungen übernommen aus Lit. [5]).

[*] Prof. Dr. B. Kräutler
Institut für Organische Chemie
Innrain 52a
und
Zentrum für molekulare
Biowissenschaften (CMBI)
Leopold-Franzens-Universität Innsbruck
6020 Innsbruck (Österreich)
Fax: (+43) 512-507-2892
E-mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (FWF, Projekt Nr. P13595) und von der Europäischen Gemeinschaft (Proj. EU-HPRN-CT-2002-00195) unterstützt.

bau von Glycin zur Energiegewinnung eine Rolle spielen. In der mRNA von *B. subtilis* enthält das zweite (in Richtung des 3'-Endes liegende) Glycin bindende Motiv (Aptamer II) des Tandems vermutlich ein transkriptionsterminierendes Motiv. Ist kein Glycin gebunden, so ist dieses Motiv auf „Aus“ geschaltet – die weitere Transkription der Botschaft wird verhindert (und damit schließlich auch die Exprimierung der am Glycin-Katabolismus beteiligten Proteine). Diese Riboschalter binden Glycin bei Konzentrationen von 10–100 μM und mit erstaunlicher Selektivität für ihr kleines, aus nur 10 Atomen bestehendes Zielmolekül. Beide Glycinaptamer-Motive müssen mit dem Zielmolekül besetzt sein, um die terminierende Haarnadelschleife aufzubrechen und den Riboschalter in die „An“-Stellung zu bringen. Die Tandemanordnung bietet dabei hohe Empfindlichkeit bezüglich der Bindung von Glycin auf „digitale“ Weise und in einem engen Konzentrationsbereich. Dabei ist es auch hochgradig selektiv und fähig, zwischen Glycin und anderen niedermolekularen Verbindungen, zum Beispiel dem Glycin-Homologen Alanin und ähnlichen Aminosäuren, zu unterscheiden.^[5] Diese in vitro gemachten Beobachtungen wurden in vivo bestätigt: Nach dem Einbau ins Genom von *B. subtilis* zeigte ein Fusionskonstrukt, das für den Glycin-Riboschalter gefolgt von einem β -Galactosidase-Reportergen codierte, volle

In-vivo-Transkriptionskontrolle (der Exprimierung der β -Galactosidase in diesem modifizierten Bakterium) durch Glycin.

Die Kooperativität der Glycinbindung durch die beiden Tandemmotive wurde anhand verschiedener RNA-Konstrukte auf der Grundlage des Glycin bindenden Riboschalters von *Vibrio cholerae* untersucht. Mit der Methode des „Inline Probing“ (durch Metaboliten induzierte Änderungen in der RNA-Struktur werden anhand von Änderungen der Geschwindigkeit spontaner RNA-Spaltungen nachgewiesen) wurde gefunden, dass das Aptamertandem von *V. cholerae* auf die Gegenwart von Glycin im engen Konzentrationsbereich von 10–100 μM reagiert, wohingegen in einem entsprechenden Experiment mit einem einzelnen Glycin bindenden Motiv für denselben Effekt ein zehnfach größerer Konzentrationsbereich benötigt wurde. Die Verkleinerung des dynamischen Intervalls deutete auf einen signifikanten kooperativen Effekt hin, für den ein Hill-Koeffizient von 1.64 bestimmt wurde. Demnach führt die Bindung von Glycin an einer Bindungsstelle zur Reorganisation beider Bindungsmotive, und die Bindungsaffinität an der freien Bindungsstelle wird um einen Faktor 100 bis 1000 erhöht.

Die kooperativen Glycin-Riboschalter nehmen damit eine zentrale Steuerungsfunktion im Metabolismus dieser Prokaryoten ein, den sie präzise auf die

Verfügbarkeit von Glycin einstellen. Ist diese einfache Aminosäure in Fülle vorhanden, so herrscht der „An“-Zustand vor (in dem Glycin gebunden ist) und es werden Proteine exprimiert, die im Energie liefernden Abbau von Glycin (einer seiner Hauptverwendungen) eine Rolle spielen (Abbildung 2).^[1] Im anderen Fall steht Glycin für den Anabolismus zur Verfügung (zur Synthese von Aminosäuren und als Baustein von Proteinen). Die Bedeutung eines präzisen molekularen Sensors für den ökonomischen Umgang mit Glycin durch die Mikroorganismen ist offensichtlich: Diese natürliche „Chemikalie“ wird in der Biosynthese gebraucht, wenn sie jedoch in hoher Konzentration vorhanden ist, kann sie auch als „Brennstoff“ verwendet werden.

Die kooperative Bindung des kleinen Moleküls Glycin durch die Glycin-Riboschalter dient den prokaryotischen Zellen als präzises Instrument, um von (rein) anabolischer auf (zusätzliche) katabolische Verwendung von Glycin umzuschalten. Arbeiten mit Hämoglobin lieferten erste Einblicke in die Feinsteuerung eines aus mehreren Einheiten bestehenden Proteins und halfen bei der Beschreibung der kooperativen Bindung.^[1] Bei diesem Phänomen handelt es sich nicht um ein Monopol der Proteine, sondern es kann eine natürliche Eigenschaft auch anderer multimodularer Makromoleküle sein, so zum Beispiel der nichtcodierenden Abschnitte

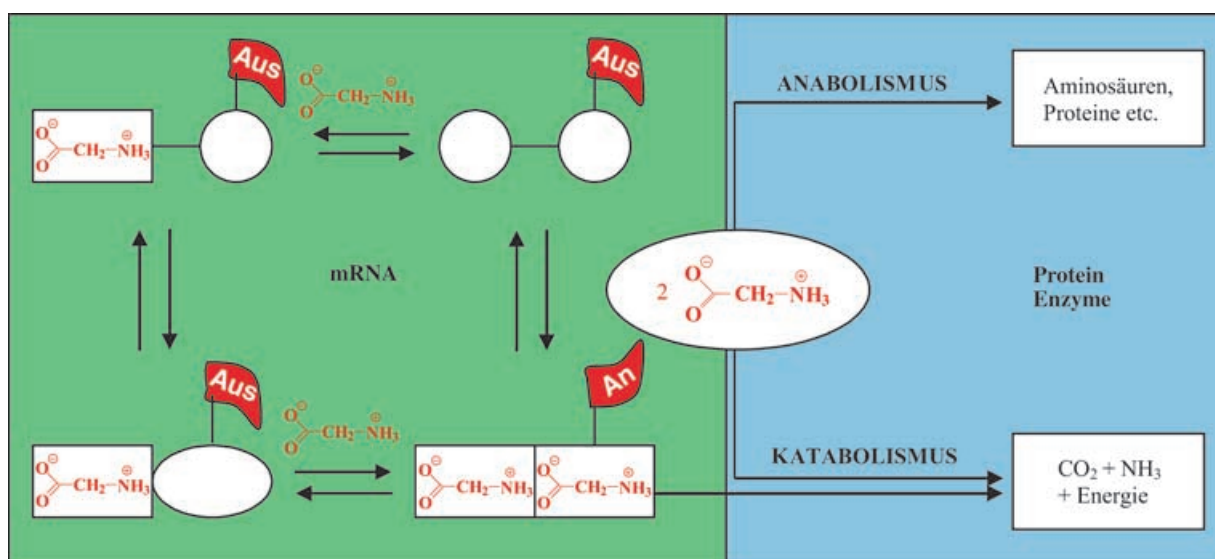


Abbildung 2. Der glycinabhängige Riboschalter, ein zentrales Element in der Regulierung des Glycin-Metabolismus, ist beeinflussbar durch kooperative Bindung von Glycin in einem Tandemmotiv.

von mRNA. Die Gruppe um Breaker hat schon in früheren Arbeiten erstaunliche Fälle von „Kooperativität“ bei der Bindung von kleinen Molekülen durch künstliche RNA aufgezeigt.^[6]

Während die strukturelle Grundlage der beobachteten Kooperativität der Tandem-Glycin-Riboschalter noch weiterer Aufklärung bedarf, haben erste strukturelle Studien bereits detaillierte Informationen über die Mechanismen der hochgradig selektiven molekularen Erkennung durch die konservierten „Aptamer“-Regionen von Riboschaltern geliefert. Vor kurzem durchgeführte kristallographische^[7] (und NMR-spektroskopische^[8]) Studien an Adenin und Guanin bindenden mRNAs zeigten die strukturelle Grundlage für die Verwendung von Oligonucleotiden in der Erkennung kleiner Moleküle. In diesen Arbeiten wurde bestätigt, dass der Bindung an der zentralen Ausbuchtung der Aptamere erfolgt, was den Erwartungen aus Mutationsstudien entspricht;^[9] die außergewöhnliche Selektivität lässt sich auf die Bildung spezifischer Wasserstoffbrücken mit einer strategisch ausgerichteten RNA-Base zurückführen. In früheren In-vitro-Experimenten waren schon einige oligo-

mere RNAs („Aptamere“) hergestellt worden, die kleine Moleküle erkennen und fest binden konnten.^[10] Diese Studien, die Entdeckung selbstspaltender RNA und natürlicher Ribozyme^[11] sowie neuere Experimente zu künstlichen Ribozymen^[12] und *retro*-Riboschaltern^[13] sind im Begriff, unser Wissen über die beeindruckende Vielfalt der RNA-Funktionen zu erweitern.^[14]

Online veröffentlicht am 9. Juni 2005

- [1] *Lehninger Principles of Biochemistry* (Hrsg.: D. L. Nelson, M. M. Cox), 3. Aufl., Worth Publishers, New York, **2000**.
- [2] a) A. Nahvi, N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1043–1049; b) W. C. Winkler, R. R. Breaker, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1024–1032.
- [3] W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, *428*, 281–286.
- [4] M. Famulok, *Science* **2004**, *306*, 233–234.
- [5] M. Mandal, M. Lee, J. E. Barrick, Z. Weinberg, G. M. Emilsson, W. L. Ruzzo, R. R. Breaker, *Science* **2004**, *306*, 275–279.
- [6] A. M. Jose, G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1631–1637.
- [7] a) A. Serganov, Y.-R. Yuan, O. Pikovskaya, A. Polonskaia, L. Malinina, A. T. Phan, C. Hoebartner, R. Micura, R. R. Breaker, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1729–1741; b) R. B. Batey, S. D. Gilbert, R. K. Montagne, *Nature* **2004**, *432*, 411–415.
- [8] J. Noeske, C. Richter, M. A. Grundl, H. R. Nasiri, H. Schwalbe, J. Wöhnert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1372–1377.
- [9] M. Mandal, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 29–35.
- [10] a) J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1994**, *33*, 973–982; b) M. Famulok, A. Jenne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 320–327; c) D. Sussman, J. C. Nix, C. Wilson, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 53–57.
- [11] T. R. Cech, *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 1162–1166.
- [12] F. Joyce, *Nature* **2002**, *418*, 214–221.
- [13] S. Gschösser, K. Gruber, C. Kratky, C. Eichmüller, B. Kräutler, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2324–2328; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2284–2288.
- [14] *The RNA World* (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1999**.