

Programmierbare Ligand-kontrollierte Riboregulatoren**

Ronald Micura*

Stichwörter:

Antisense-Wirkstoffe · Aptamere · Genexpression · Riboregulatoren · RNA

In allen lebenden Organismen ist die Genexpression eine hoch komplexe Angelegenheit, bei der Hunderte von Genen gleichzeitig koordiniert werden müssen. Um dieser Herausforderung gerecht zu werden, hat die Natur eine Vielzahl von Kontroll- und Regulationsmechanismen entwickelt. In diesem Zusammenhang ist in den letzten Jahren die große Bedeutung von nichtkodierender RNA (ncRNA) erkannt worden.^[1] Diese Gruppe von Ribonucleinsäuren umfasst sowohl *cis*- also auch *trans*-agierende RNA-Elemente. Zu den *cis*-agierenden ncRNA-Elementen gehören z.B. Riboschalter, bei denen es sich um Sequenzabschnitte in den 5'-nichtkodierenden Regionen (5'-UTRs) von mRNAs handelt, die strukturelle Erkennungsmotive für bestimmte Metaboliten enthalten. Durch die Bindung dieser kleinen Moleküle werden alternative Strukturen gebildet, die zur Initiation der Translation oder zur Termination der Transkription führen können.^[2] Des Weiteren sind Riboschalter mit Ribozymaktivität entdeckt worden, die die Spaltung der mRNA und die Herunterregulation des entsprechenden Gens bewirken.^[3] Zur den *trans*-agierenden ncRNA-Elementen gehören die microRNAs (miRNAs), die mit kom-

plementären Sequenzen der mRNA und des Genoms wechselwirken;^[4] kurze interferierende RNAs (siRNAs), die den Weg der RNA-Interferenz nutzen;^[5] und nicht zuletzt Ribozyme^[6] und Antisense-RNA.^[7]

Die weite Verbreitung von regulatorischen Systemen auf RNA-Basis in diversen Organismen hat Wissenschaftler zur Entwicklung artifiziellicher Riboregulatoren angeregt. Bereits 1998 konnte gezeigt werden, dass in Säugerzellen durch die Insertion eines *in vitro* selektionierten Aptamers in die 5'-UTR einer mRNA die Translation in Gegenwart des entsprechenden Liganden unterdrückt wird.^[8] Erst in jüngerer Zeit wurde ein kombiniertes regulatorisches *cis/trans*-System konstruiert, bei dem *cis*-agierende RNA-Elemente die Translation inhibieren und *trans*-agierende RNA-Elemente durch die Wechselwirkung mit den *cis*-agierenden die Translation wieder anschalten.^[9] Kürzlich wurde auch über ein *cis*-agierendes, Ribozym-gestütztes regulatorisches System berichtet, das auf die Gegenwart niedermolekularer Liganden reagiert.^[10]

Eine neue, vielversprechende Entwicklung auf dem Gebiet künstlicher Riboregulatoren sind die so genannten Antischalter („Antiswitches“), die von Bayer und Smolke für einzellige Eukaryonten, *Saccharomyces cerevisiae*, gefunden wurden.^[11] Ein Antischalter agiert *trans* und kann im Prinzip so entworfen werden, dass er die Expression jedes beliebigen Zieltranskripts reguliert und auf jeden beliebigen Liganden anspricht. Er besteht aus einer Aptamerdomäne zur spezifischen Erkennung des Liganden (Effektor) und einer Antisensedomäne (Abbildung 1). Entscheidend ist, dass durch die Bin-

dung des Effektors eine Änderung der RNA-Konformation erzwungen wird, durch die die Antisensedomäne dann in der Lage ist, mit der Ziel-mRNA zu wechselwirken und folglich die Translation zu modulieren.

Die Autoren unterscheiden zwei Typen Ligand-sensitiver Riboregulatoren – den „Aus-Antischalter“ (off antiswitch) und den „An-Antischalter“ (on antiswitch). Ist kein Ligand vorhanden, verbirgt der „Aus-Antischalter“ seine Antisensesequenz intramolekular in einem doppelhelicalen Segment und kann sie dementsprechend nicht für die Basenpaarung mit der Ziel-RNA zur Verfügung stellen. Erfolgt jedoch die Bindung des Liganden, wird eine allosterische Konformationsänderung induziert, die die Antisensesequenz als Einzelstrangabschnitt zugängig macht und daher die intermolekulare Basenpaarung mit der mRNA ermöglicht. Als Folge wird das entsprechende Gen herunterreguliert.

Im Gegensatz dazu enthält der „An-Antischalter“ eine freie einzelsträngige Antisenseregion und kann so bei Fehlen eines Effektors mit der Ziel-mRNA wechselwirken. Bindet der Effektor an die Aptamerdomäne, wird wiederum eine allosterische Konformationsänderung induziert, die bewirkt, dass die Antisensesequenz eine thermodynamisch bevorzugte, intramolekulare Stamm-Schleifenstruktur bildet. Der An-Antischalter geht damit in die inaktive Form über, und entsprechend wird das Gen hochreguliert.

Das Konzept der Antischalter wurde am Beispiel des gut charakterisierten Theophyllin-Aptamers^[12] demonstriert, in Kombination mit einer 15 Nucleotide langen Antisensesequenz, die mit der

[*] Prof. Dr. R. Micura
Institut für Organische Chemie
Center for Molecular Biosciences CMBI
Universität Innsbruck
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) für großzügige Unterstützung und Claudia Höbartner für das kritische Lesen des Manuskripts.

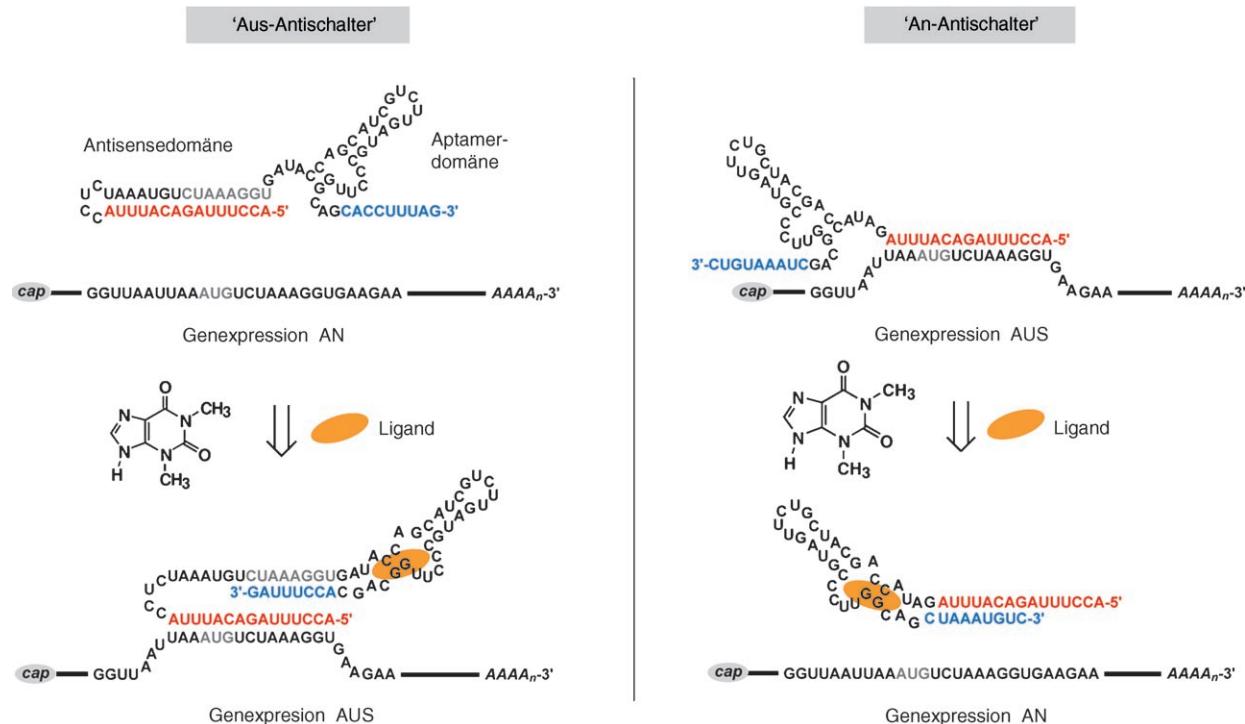


Abbildung 1. Programmierbare Ligand-kontrollierte Riboregulatoren für die eukaryontische Genregulation. Die so genannten Antischalter sind *trans*-agierende ncRNAs, die aus einer Antisense- und einer Aptamerdomäne bestehen. Im Falle des „Aus-Antischalters“ (links) ist die Antisensesequenz (rot) in einer Stamm-Schleifenstruktur versteckt. In Gegenwart des Liganden (Theophyllin; orange) wird eine allosterische Konformationsänderung bewirkt und die Antisensesequenz freigegeben. Sie kann nun mit der mRNA am 5'-Ende wechselwirken und die Genexpression unterdrücken. Im Falle des „An-Antischalters“ (rechts) liegt die Antisensesequenz frei und kann an die mRNA binden. Die Genexpression ist damit unterdrückt. Durch Bindung des Liganden wird der Antischalter von der mRNA losgelöst und die Genexpression ermöglicht.

Region um das Startcodon einer GFP-kodierenden mRNA wechselwirkt (GFP = grün fluoreszierendes Protein). Die Antischalter-RNA wurde in *S. cerevisiae* exprimiert, indem sie zwischen zwei Hammerhead-Ribozyme kloniert wurde, die für effiziente Spaltung in vivo bekannt sind und die Bildung definierter 5'- und 3'-Enden garantieren. Dieselben Zellen wurden mit einem speziellen Hefe-GFP-Plasmid transformiert.

Bemerkenswert ist, dass die vorgestellten Riboregulatoren einen scharfen Übergang zwischen den Zuständen der Genexpression bei nur kleinen Änderungen der Effektor-Konzentration aufweisen. Dieses binäre An/Aus-Schalterverhalten ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Aptamer und Antisensesequenz um die Basenpaarung mit demselben internen Sequenzabschnitt des Antischalters konkurrieren.

Die hohe Flexibilität des neuen Konzepts für Riboregulatoren wurde durch weitere Varianten der Antischalter unterstrichen. So kann durch strategisch positionierte Punktmutationen der

Schwellenwert des An/Aus-Schaltens als Funktion der Effektor-Konzentration manipuliert werden. Darüber hinaus ersetzen die Autoren die Aptamerdomäne für Theophyllin mit jener für Tetracyclin und konnten ein vergleichbares Verhalten für diesen alternativen Liganden belegen. Zusätzlich zeigten sie, dass zwei Antischalter mit unterschiedlichen Aptamer- und Antisensedomänen in derselben Zelle voneinander unabhängig auf ihre jeweiligen Liganden ansprechen und so zwei unterschiedliche Gene regulieren.

Die neuen Antischalter repräsentieren ein hoch flexibles und rationales Konzept, das für sowohl die positive als auch die negative Regulation von potenziell jedem beliebigen Gen in unterschiedlichsten Organismen geeignet ist. Die Berücksichtigung von besonders kleinen Aptamerdomänen könnte das Design zukünftiger Antischalter zusätzlich beeinflussen. So reduzierten Anderson und Mecozzi kürzlich das ursprüngliche Theophyllin-Aptamer auf eine nur 13 Nucleotide umfassende RNA und

fanden, dass die hohe Affinität und Spezifität nahezu erhalten blieben.^[13] Eine Kombination dieser kleinsten Aptamerdomänen mit entsprechenden Antisensedomänen würde Antischalter in der Größe von siRNAs ergeben, die weitere interessante Anwendungen zur Regulation der Genexpression in Aussicht stellen.

Online veröffentlicht am 20. September 2005

- [1] A. Hüttenhofer, P. Schattner, N. Polacek, *Trends Genet.* **2005**, *21*, 289–297.
- [2] M. Mandal, R. R. Breaker, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 451–463.
- [3] a) W. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, *428*, 281–285; b) R. Micura, *Angew. Chem. 2004*, *116*, 4797–4799; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4692–4694.
- [4] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281–297.
- [5] „RNA Interference“: D. R. Engelke, J. J. Rossi, *Methods Enzymol.* **2004**, 392.
- [6] D. M. Lilley, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 495–501.
- [7] L. Good, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 823–824.

- [8] a) G. Werstuck, M. R. Green, *Science* **1998**, *282*, 296–298; b) Y. Tor, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1681–1685; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1579–1582.
- [9] F. J. Isaacs, D. J. Dwyer, C. Ding, D. D. Pervouchine, C. R. Cantor, J. J. Collins, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 841–847.
- [10] L. Yen, J. Svendsen, J.-S. Lee, J. T. Gray, M. Magnier, T. Baba, R. J. D'Amato, R. C. Mulligan, *Nature* **2004**, *431*, 471–476.
- [11] T. S. Bayer, C. D. Smolke, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 337–343.
- [12] D. J. Patel, A. K. Suri, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74*, 39–60.
- [13] P. C. Anderson, S. Mecozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5290–5291.

Quality counts...

The best of chemistry every week

Wiley-VCH
P.O. Box 10 11 61
69451 Weinheim
Germany
Phone +49 (0) 6201–606-400
Fax +49 (0) 6201–606-184
e-mail: angewandte@wiley-vch.de
www.angewandte.org

12180404_gu

Angewandte Chemie International Edition is a journal of the GDCh, the German Chemical Society

GDCh

WILEY-VCH