

Strukturen von RNA-Schaltern: Einblick in molekulare Erkennung und Tertiärstruktur

Harald Schwalbe,* Janina Buck, Boris Fürtig, Jonas Noeske und Jens Wöhnert*

Stichwörter:

Genregulation · NMR-Spektroskopie · RNA ·
RNA-Schalter · Röntgenkristallographie

RNA-Schalter erfüllen wichtige Funktionen in der Genregulation. Sie bestehen aus einer Aptamerdomäne, die eine spezifische und hochaffine Bindung mit einem Liganden eingeht, und einer Expressionsplattform, die durch eine allosterische Umorientierung auf den Ligandbindungszustand der Aptamerdomäne reagiert. Die Genexpression kann sowohl während der Transkription wie auch während der Translation reguliert werden, außerdem wurde postuliert, dass RNA-Schalter die Prozessierung von mRNA steuern. Dieser Kurzaufsatz fasst den Kenntnisstand über die Strukturen und Regulationsmechanismen von RNA-Schaltern zusammen. Besonderes Augenmerk gilt sekundären und tertiären Wechselwirkungen, die die Faltung der globulären RNA-Struktur stabilisieren und so die Funktion der Aptamerdomänen bestimmen.

1. Natürliche und nichtnatürliche RNA-Aptamere

Seit einiger Zeit sind RNA-Aptamere bekannt, die durch SELEX-Verfahren (selection of ligands by exponential amplification) entwickelt wurden und die eine große Zahl von niedermolekularen Liganden mit hoher Selektivität und Affinität binden.^[1] Zu diesen Liganden gehören sehr unterschiedliche Spezies,^[2] z.B. Nucleotide, Aminosäuren, aromatische Farbstoffe, Coenzyme wie Flavinmononucleotid (FMN), Aminoglycoside und S-Adenosylmethionin (SAM).^[3]

[*] Prof. Dr. H. Schwalbe, J. Buck, B. Fürtig, J. Noeske
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz (BMRZ)
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
Max von Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
Fax: (+ 49) 69-798-29515
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

Prof. Dr. J. Wöhnert
University of Texas Health Science Center SA
Department of Biochemistry
7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78229 (USA)
Fax: (+ 1) 210-567-6595
E-Mail: jewoe@biochem.uthscsa.edu

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können vom Autor angefordert werden.

Die RNA-Aptamere sind aus einem stochastischen Pool von RNA-Molekülen abgeleitet, der typischerweise 10^{14} – 10^{16} Mutanten umfasst. Im Allgemeinen beobachtet man, dass durch SELEX generierte Aptamere ihre Liganden mit Affinitäten im mikromolaren Bereich binden. Strukturuntersuchungen von Aptamer-Ligand-Komplexen belegen, dass

Aptamere hochstrukturierte Bindungstaschen unter Einbeziehung einer Vielzahl nichtkanonischer RNA-Strukturelemente bilden. Die Wechselwirkungen zwischen den RNA-Aptameren und ihren Liganden umfassen elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken. Erstaunlicherweise ist in der freien Form der Aptamere die Ligandbindungsregion oft völlig unstrukturiert, die Ligandbindung geht also mit einer induzierten Strukturumwandlung einher („induced fit mechanism“).

Es war überraschend, dass man vor kurzem auch natürlich vorkommende RNAs – so genannte RNA-Schalter (riboswitches) – entdeckte, die niedermolekulare Liganden binden.^[4] In Bakterien sowie auch in manchen Pflanzen und Pilzen ist diese RNA-Ligand-Wechselwirkung an eine neue Form der Regulation der Genexpression gekoppelt.^[5] Bislang wurden RNA-Schalter entdeckt, die spezifisch an essenzielle Coenzyme und Vitamine, Aminosäuren, Glucosamin-6-phosphat und die Purinbasen Guanin und Adenin binden. RNA-Schalter sind vor allem in den 5'-nichttranslatierten Bereichen (5'-UTR) der Messenger-RNAs (mRNAs) lokalisiert und gehören damit zum nichtcodierenden Teil der mRNA. Viele RNA-Schalter sind modular aufgebaut und bestehen aus einer Aptamerdomäne (auch als Sensorregion bezeichnet), die den Liganden bindet, und einer Expressionsplattform, die durch eine allosterische Umorientierung

auf den Ligandbindungszustand der Aptamerdomäne reagiert und so die Genexpression moduliert. Die Bindung des Liganden an die Aptamerdomäne kann zum Abbruch der Transkription führen, die Ribosomenbindung aufheben oder unterschiedliche Stabilitäten der mRNA durch veränderte mRNA-Prozessierung induzieren (Abbildung 1 und Tabelle 1).

Sequenz- und Sekundärstrukturanalysen weisen darauf hin, dass 2 % aller Gene in *B. subtilis* zumindest teilweise durch einen RNA-Schalter reguliert werden. Die Bindung des niedermolekularen Liganden an die Aptamerdomäne erzeugt einen direkten Regelkreislauf, um die De-novo-Synthese von denjenigen Proteinen entweder zu erhöhen oder zu unterdrücken, die am metabolischen oder katabolischen Kreislauf des Metaboliten beteiligt sind. Die Aptamerdomänen natürlich vorkommender RNA-Schalter sind für gewöhnlich viel größer als diejenigen nichtnatürlicher Aptamere; beide binden aber ähnliche Liganden mit Affinitäten im nanomolaren Bereich.



Harald Schwalbe, geboren 1966, studierte Chemie an der Goethe-Universität Frankfurt und promovierte bei Prof. Griesinger. Nach einem Postdoktorat bei Prof. Dobson in Oxford und seiner Habilitation 1999 wurde er Assistant Professor am Massachusetts Institute of Technology. Seit 2001 ist er Professor für organische Chemie an der Universität Frankfurt. Seine Forschungsinteressen gelten der NMR-spektroskopischen Untersuchung der Struktur, Dynamik und Funktion von Proteinen und RNA.



Jens Wöhner, geboren 1970, studierte Biochemie an der Martin-Luther-Universität in Halle/Saale und promovierte am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena über NMR-spektroskopische Studien zur Struktur von RNA und RNA-Protein-Komplexen. Im Jahr 2000 schloss er sich der Gruppe von Prof. Schwalbe am Francis Bitter Magnet Laboratory am MIT an, und ab 2002 war er Gruppenleiter im Sonderforschungsbereich 579 „RNA-Ligand-Wechselwirkungen“ an der Universität Frankfurt. Seit 2005 ist er Assistant Professor an der Universität von Texas in San Antonio.



Boris Fürtig, geboren 1978, studierte Biochemie an der Universität Frankfurt und fertigte 2003 seine Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Schwalbe an. Im selben Arbeitskreis arbeitet er zurzeit an seiner Dissertation über die Untersuchung der RNA mit NMR-spektroskopischen Methoden.

2. RNA-Schalter als Regulationselemente für Transkription und Translation

Es wurden RNA-Schalter gefunden, die die Genexpression sowohl während der Transkription als auch während der Translation regulieren. Außerdem wurde postuliert, dass RNA-Schalter die Prozessierung von mRNA regulieren und so die zelluläre mRNA-Stabilität verändern können.

Bisher geht man davon aus, dass der Adenin-RNA-Schalter aus *V. vulnificus* das *add*-Operon während der Translation als „Einschalter“ reguliert (Abbildung 1a). Nach einem Vorschlag von Patel und Mitarbeitern löst die Bindung von Adenin die Bildung eines helicalen Strukturelements aus, woraufhin die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) und das Startkodon freigesetzt werden.^[8b] Die Translation des *add*-Operons ist somit bei hoher Konzentration des Liganden Adenin hochreguliert. Wir weisen aber darauf hin, dass für diese RNA-Schalter noch eine andere Sekundärstruktur vorhergesagt werden kann. In dieser Konformation bindet Adenin an die komplett ausgebildete Aptamerdomäne, und die SD-Sequenz würde dann durch eine Helixumorientierung maskiert (siehe Hintergrundinformationen).

Auch der Thiaminpyrophosphat(TPP)-RNA-Schalter (Abbildung 1d) moduliert die Translation. In Gegenwart des Liganden ist die SD-Sequenz einzelsträngig, da eine komplementäre Anti-SD-Sequenz durch weitreichende Wechselwirkungen mit einer Anti-anti-SD-Sequenz wechselwirkt. Die Bindung des Metaboliten TPP setzt die Anti-SD-Sequenz frei, die dann mit der SD-Sequenz paart. Aus diesem Grund – und im Unterschied zum Adenin-RNA-Schalter aus *V. vulnificus* – fungiert der TPP-RNA-Schalter als „Ausschalter“, indem er die Translation des *thiM*-Operons in *E. coli* bei hoher Konzentration des Metaboliten inhibiert. Einen TPP-



Jonas Noeske, geboren 1978, studierte Biochemie an der Universität Frankfurt und fertigte 2004 seine Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Schwalbe an. Im Rahmen seiner Doktorarbeit, die er im selben Arbeitskreis anfertigt, beschäftigt er sich mit Untersuchungen von RNA-Schaltern mit NMR-spektroskopischen Methoden.



Janina Buck, geboren 1980, studierte Chemie an der Universität Frankfurt und fertigte 2005 ihre Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Schwalbe an. Thema ihrer Doktorarbeit, die sie im selben Arbeitskreis anfertigt, sind kinetische Untersuchungen der ligandinduzierten RNA-Faltung unter Anwendung NMR-spektroskopischer Methoden.

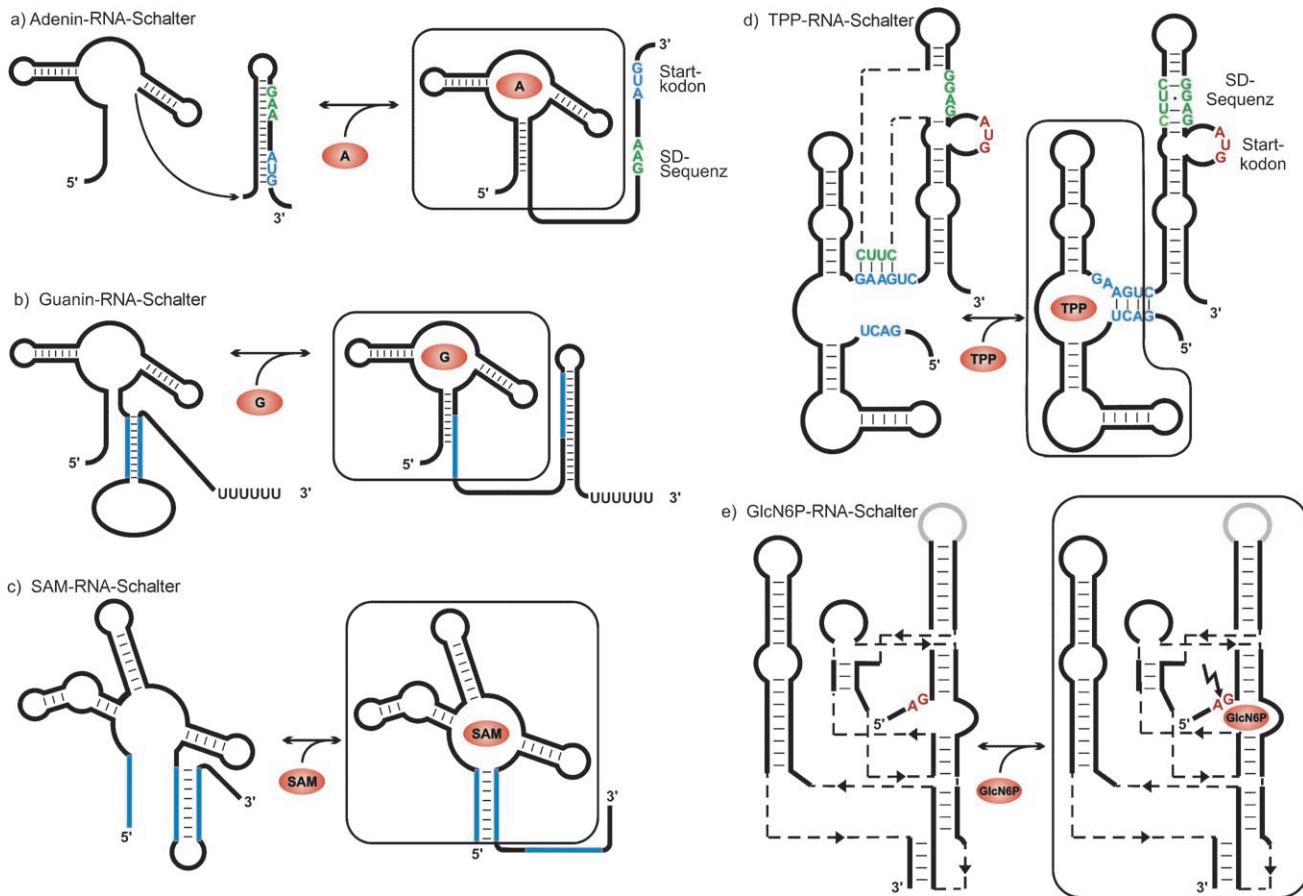


Abbildung 1. RNA-Schalter, deren Aptamerdomänen strukturell aufgeklärt wurden: a) Adenin-RNA-Schalter aus *V. vulnificus*, b) Guanin-RNA-Schalter aus *B. subtilis*, c) SAM-RNA-Schalter aus *T. tengcongensis*, d) TPP-RNA-Schalter aus *E. coli*, e) *glmS*-Ribozym aus *T. tengcongensis*.

RNA-Schalter findet man auch im 3'-nichttranslatierten Bereich (3'-UTR) des *thiC*-Operons aus *A. thaliana*. Es wird angenommen, dass dieser RNA-Schalter die Stabilität der mRNA verändert und – anders als beim *thiM*-Operon aus *E. coli* – nicht über eine Translationssteuerung reguliert.^[6]

Es gibt eine Reihe weiterer, faszinierender Regulationsmechanismen. Die gleiche adeninbindende Aptamerdomäne, die die Translation in *V. vulnificus* reguliert, fungiert für das *ydhL*-Operon (jetzt *pbuE*-Operon genannt) aus *B. subtilis* als transkriptionaler „Einschalter“. Die Aptamerdomänen fungieren demnach wie Module und werden zur Steuerung sowohl der Transkription als auch der Translation eingesetzt, je nach Kontext und Funktion der Expressionsplattform. Zudem kann die Mutation eines einzigen Nucleotids (U74C) die Affinität des Adenin-RNA-Schalters verändern, der dann Guanin/Hypoxanthin, aber nicht mehr Adenin bindet (Abbildungen 1b und 2a,b).^[14] Der Guanin/Hypoxanthin-RNA-Schalter reguliert das *xpt-pbuX*-Operon aus *B. subtilis*; dieses Operon codiert für Gene, die an der Rezyklisierung von Purinen und der De-novo-Biosynthese von Purin beteiligt sind. Der Guanin/Hypoxanthin-RNA-Schalter ist ein Transkriptionsausschalter.

Ein indirekter Mechanismus der Genregulation wird für das als RNA-Schalter fungierende *glmS*-Ribozym postuliert, welches das *glmS*-Gen aus *B. subtilis* reguliert. Die Genregulation ist in diesem Fall nicht an eine konformativ

Umwandlung von Sekundärstrukturen gekoppelt, sondern an einen Bindungsbruch im 5'-UTR der mRNA, wenn der Ligand Glucosamin-6-phosphat an die Aptamerdomäne bindet. Es wird angenommen, dass diese enzymatische In-vitro-Aktivität des *glmS*-RNA-Schalters auch der zellulären Regulation zugrundeliegt, was wiederum im Einklang mit der in vivo beobachteten Verringerung der Genexpression wäre.^[7]

3. Molekulare Erkennung der Liganden durch RNA-Schalter

Hochauflöste Strukturen folgender Ligand-Aptamer-Komplexe wurden bisher veröffentlicht: Guanin/Adenin-bindende RNA-Schalter,^[8] TPP-bindende RNA-Schalter,^[9] SAM-bindende RNA-Schalter^[10] und *glmS*-Ribozym^[11,12] (Abbildung 1 und Tabelle 1). Einige dieser Strukturen wurden bereits in Übersichtsartikeln beschrieben.^[13]

Die Aptamere binden unterschiedlichste Arten von Liganden, sodass in den Komplexen auch verschiedenste RNA-Ligand-Wechselwirkungen vorliegen. Nichtkanonische Strukturelemente wie Basentripel, Basenquadrupel und Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen werden zur Bildung der Ligandbindungstaschen genutzt. Die Strukturen erschließen eine Vielzahl neuer Wechselwirkungsmotive, die aufzeigen, wie RNA-Moleküle niedermolekulare Liganden hochaffin

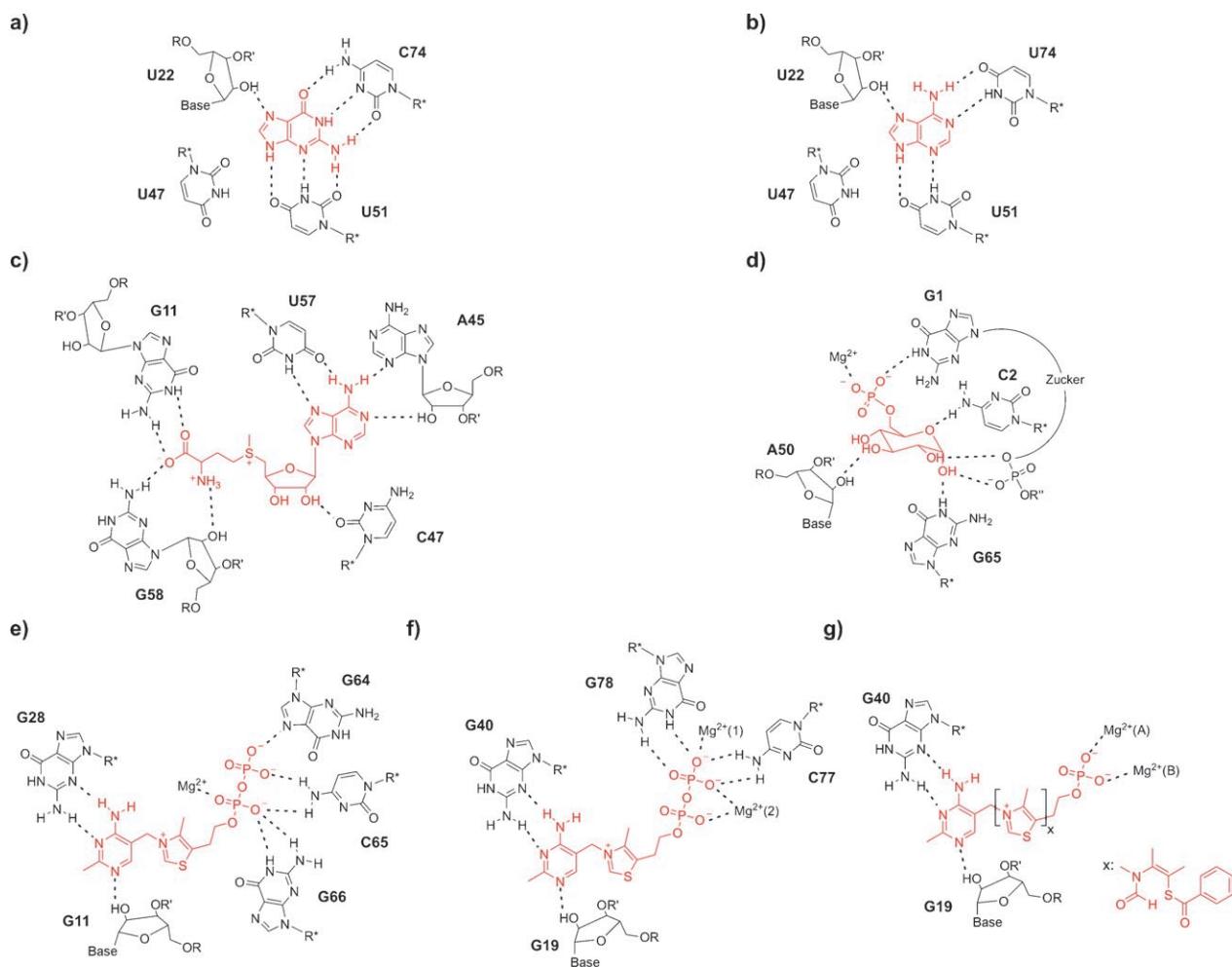


Abbildung 2. Molekulare Erkennung von Liganden (rot) durch RNA-Schalter: a) Guanin-RNA-Schalter aus *B. subtilis* (Ligand Guanin), b) Adenin-RNA-Schalter aus *B. subtilis* oder *V. vulnificus* (Ligand Adenin), c) SAM-RNA-Schalter aus *T. tengcongensis* (Ligand SAM), d) *glmS*-Ribozym aus *T. tengcongensis* (Ligand Glucose-6-phosphat), e) TPP-RNA-Schalter aus *A. thaliana* (Ligand TPP), f) TPP-RNA-Schalter aus *E. coli* (Ligand TPP), g) TPP-RNA-Schalter aus *E. coli* (Ligand Thiaminmonophosphat) (x: Ligand Benfotiamin).

Tabelle 1: Kristallographisch gelöste Aptamerdomänen von RNA-Schaltern.

RNA-Schalter	regulierte Gen	Ligand	Auflösung [Å]	PDB-Code	Lit.
Guanin	xpt-pbuX aus <i>B. subtilis</i>	Hypoxanthin	1.95	1U8D	[8a]
Guanin	xpt-pbuX aus <i>B. subtilis</i>	Guanin	2.4	1Y27	[8b]
Guaninmutante C74U	n.b.	2,6-Diaminopurin	2.15	2B57	[8d]
Adenin	add aus <i>V. vulnificus</i>	Adenin	2.1	1Y26	[8b]
Thiaminpyrophosphat	thiC aus <i>A. thaliana</i>	TPP	2.9	2CKY	[9a]
Thiaminpyrophosphat	thiM aus <i>E. coli</i>	TPP	2.05	2GDI	[9b]
S-Adenosylmethionin	metF-metH2 aus <i>T. tengcongensis</i>	S-Adenosylmethionin	2.9	2GIS	[10]
Thiaminpyrophosphat	thiM aus <i>E. coli</i>	TPP	2.5	2HOJ ^[a]	[9c]
Thiaminpyrophosphat	thiM aus <i>E. coli</i>	TMP	2.89	2HOM	[9c]
Thiaminpyrophosphat	thiM aus <i>E. coli</i>	Benfotiamin	3.0	2HOO	[9c]
Thiaminpyrophosphat	thiM aus <i>E. coli</i>	Pyrithiamin	3.3	2HOP	[9c]
glmS-Ribozym	glmS aus <i>T. tengcongensis</i>	Glucose-6-phosphat	2.10	2HO7 ^[b]	[13c]

[a] Siehe auch: 2HOK, 2HOL. [b] Siehe auch: 2GCS, 2GCV, 2H0S, 2H0W, 2H0X, 2H0Z, 2H06.

binden können. Neben ihrer Bedeutung für die Erforschung der Regulationsmechanismen von RNA-Schaltern sind diese Strukturmotive daher auch für den Entwurf von niedermolekularen Spezies mit hoher Affinität ($K_D < 100 \text{ nm}$) und Spezifität für die Bindung an RNA wichtig.

Aus biophysikalischen Studien ist bekannt, dass die Unterschiede in der chemischen Struktur von Purinanalogen großen Einfluss auf die Bindungsaffinitäten dieser Liganden für die Bindung an Purin-RNA-Schalter haben.^[5a,14] Röntgenkristallstrukturen^[8a,b,d] und NMR-spektroskopische Un-

tersuchungen^[8c] von Purin-RNA-Schaltern (Guanin- und Adenin-RNA-Schalter) im Komplex mit ihrem Liganden lassen die Bildung einer komplexen Bindungstasche erkennen, in der fast alle Positionen des heterocyclischen Purinmetaboliten durch die RNA erkannt werden (Abbildung 2a,b). In beiden RNA-Schaltern wird die N3/N9-Seite des Liganden durch das Nucleotid U51 gebunden, und das N7-Atom auf der Hoogsteen-Seite der Purine bildet eine Wasserstoffbrücke zur 2'-OH-Gruppe von U22. Zu einem gewissen Grad lassen die Röntgenkristallstrukturen^[8a,b] auch eine Wasserstoffbrücke vom N9-Atom des Liganden zum Rest U47 erkennen. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Purin-RNA-Schaltern ist das Nucleotid an Position 74, das eine spezifische Watson-Crick-Basenpaarung des Liganden mit dem jeweils komplementären Nucleotid ermöglicht. Der Guanin-RNA-Schalter erkennt eine Guaninbase mit einem Cytidinrest, während der Adenin-RNA-Schalter einen Uridinrest zur Erkennung einer Adeninbase nutzt. Die direkte Bindung der RNA an die N3/N9-Seite des Purinliganden selektiert die Nucleobase gegenüber N9-glycosylierten Nucleosiden und Nucleotiden, die ebenfalls in der Zelle vorhanden sind.

Auch im SAM-RNA-Schalter (Abbildung 1b) sind fast alle funktionellen Gruppen des Liganden an der molekularen Erkennung des Liganden durch die RNA beteiligt (Abbildung 2c).^[10,15] Die Struktur des Liganden SAM kann in zwei Untereinheiten zerlegt werden: die Adenosyleinheit und eine vom Methionin abgeleitete Seitenkette, die ein methyliertes, positiv geladenes Schwefelatom und eine geladene α-Aminosäuregruppe am 5'-Ende des Nucleosids trägt. Die kompakte Konformation des gebundenen Liganden wird dadurch stabilisiert, dass die beiden Untereinheiten π-Kation-Stapelwechselwirkungen miteinander eingehen. Der Heterocyclus der Adeningruppe ist an der Bildung eines Basentripels mit den flankierenden Basen A45 und U57 beteiligt. Die 2'-OH-Gruppe des Zuckerrestes im Liganden bildet eine Wasserstoffbrücke zum O4 von Rest C47. Die Sauerstoffatome der terminalen Carboxylatgruppe gehen Wasserstoffbrücken mit der Watson-Crick-Seite des Restes G11 und der exocyclischen Aminogruppe des Nucleotids G58 ein; beide Nucleotide sind Teil des Basentripels G11-C44-G58. Das positiv geladene Schwefelatom befindet sich in einem ungefähren Abstand von 4 Å zu den O2-Atomen von U7 und U88 und kann so elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden. Diese Wechselwirkungen erklären den etwa 100fach höheren K_D -Wert des Liganden SAM im Vergleich zum neutralen Liganden S-Adenosylhomocystein (SAH), dessen Schwefelatom weder methyliert noch positiv geladen ist. Die Kristallstruktur des SAM-RNA-Schalters lässt allerdings erkennen, dass die am Schwefel kovalent gebundene Methylgruppe nicht direkt durch die RNA gebunden wird.^[11d] Interessanterweise sind an der Ligandbindung dieses RNA-Schalters weder Mg²⁺-Ionen in der Bindungstasche zur Kompensation der negativ geladenen Carboxylatgruppe des Liganden beteiligt, noch geht das Phosphatrückgrat direkte Wechselwirkungen mit dem Liganden zur Kompensation dessen positiv geladener funktioneller Gruppen ein.

Die Kristallstruktur des *glmS*-Ribozyme im Komplex mit Glucose-6-phosphat (Glc6P)^[12] gibt einen Einblick in die

katalytische Aktivität dieses RNA-Schalters. Obwohl Glc6P isosterisch zum aktivierenden Liganden Glucosamin-6-phosphat (GlcN6P) ist, wirkt es als ein kompetitiver Inhibitor, sodass die RNA in Gegenwart von Glc6P in der Konformation ihres Grundzustandes vor der Spaltung verbleibt (Abbildung 2d). Da Kristallstrukturen der freien RNA und der RNA nach der Spaltung ebenfalls gelöst wurden, konnten Informationen über die Korrelation zwischen der Ligandbindung und der Funktion des Ribozyme abgeleitet werden. Die katalytische Aktivierung findet in der als katalytisches Zentrum fungierenden Bindungstasche des Ribozyme statt, wodurch Ligandbindung, Liganderkennung und ligandinduzierte Aktivierung korreliert sind.

Im Vergleich zu anderen Strukturen von RNA-Schaltern weist das *glmS*-Ribozyme eine starre und konformativ vorgeformte Ligandbindungstasche auf,^[16,12] die den Liganden nicht komplett umschließt, sondern offen und für das Lösungsmittel zugänglich ist. Dennoch ist die Ligandbindung spezifisch und geht mit einer signifikanten katalytischen Aktivierung einher. Die Struktur des (RNA-Schalter)-Ligand-Komplexes liefert eine Erklärung für diese Beobachtung: Der gesamte Ligand mit seiner Zuckereinheit und der Phosphatgruppe wird von der RNA erkannt. Die katalytische Aktivität ist vom Vorliegen einer Aminogruppe abhängig, wie sie im Liganden Glc6P vorhanden ist. Die Aktivierung scheint die korrekte Orientierung der funktionellen Gruppe zu erfordern, sodass diese an der postulierten Säure-Base-Reaktion teilnehmen kann. Diese Beobachtung erklärt auch, weshalb Wassermoleküle im katalytischen Zentrum vorliegen müssen, damit der Spaltungsprozesses stattfinden kann. Komplexe, in denen die Spaltung katalysierende Liganden in einer aktiven RNA-Konformation vor der Spaltung abgefangen sind, wurden bisher nicht beschrieben.

Wasserstoffbrücken, die den RNA-Ligand-Komplex stabilisieren, finden sich zwischen dem als α-Anomer gebundenen Glc6P und dem ungepaarten Nucleotid G1. G1 umschließt den Liganden und bindet an das Phosphat und die Hydroxygruppen des Zuckers. Außerdem bildet der Ligand Wasserstoffbrücken zu C2, G65 und zur 2'-OH-Gruppe von A50. Die negative Ladung der Phosphatgruppe wird durch die Koordination eines Mg²⁺-Ions kompensiert, das sich in einem Abstand von ca. 10 Å von der gespaltenen Phosphodiesterbindung befindet und deshalb nicht an der Katalyse beteiligt ist. Darüber hinaus bildet die 2'-OH-Gruppe des Liganden eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül im katalytischen Zentrum.

Im Unterschied zu vielen anderen RNA-Schaltern erkennt der TPP-RNA-Schalter nicht alle funktionellen Gruppen des biologisch aktiven Metaboliten TPP (Abbildung 2e-g). Die TPP-Struktur kann in einen Pyrimidinheterocyclus, einen Thiazolring und eine Pyrophosphateinheit zerlegt werden. Alle Kristallstrukturuntersuchungen des TPP-RNA-Schalters (siehe Tabelle 1)^[9a-c] lassen erkennen, dass die beiden heterocyclischen Einheiten des Liganden eine gestreckte Konformation einnehmen, wohingegen die Pyrophosphateinheit in einer gekrümmten Konformation vorliegt. Im TPP-Komplex findet man in der RNA zwei Helices in paralleler Orientierung. Der Pyrimidinring des Liganden bindet an die eine und das Pyrophosphat-Ende an die andere der beiden

Helices. Der Pyrimidinring und die Phosphateinheit gehen direkte Wechselwirkungen mit der RNA ein, wohingegen der verbrückende Thiazolring nicht direkt gebunden wird und deshalb auch durch andere Strukturelemente ersetzt werden kann (Abbildung 2g).^[9c,17] Die Kristallstrukturen zeigen in der Pyrophosphatbindungsstasche das Vorliegen von Mg²⁺-Ionen, die die negative Ladung der Phosphatgruppen kompensieren. Diese Beobachtung ist im Einklang mit biochemischen und NMR-spektroskopischen Befunden, die eine starke Abhängigkeit der Ligandbindung von der Mg²⁺-Konzentration ergeben.^[9d,17] Die Watson-Crick-Position des Pyrimidinrings bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Zuckerkante eines Guanosinrestes, außerdem findet man eine Wasserstoffbrücke zwischen N1 des Liganden und einer 2'-OH-Gruppe eines weiteren Guanosinrestes. Die TPP-RNA-Schalter aus unterschiedlichen Organismen unterscheiden sich bezüglich der Pyrophosphatbindungsstasche und der molekularen Erkennung des Pyrophosphatrestes. Beide – Topologie der Bindungsstasche und molekulare Erkennung – hängen außerdem von der Art des Liganden ab.

Die von Ban und Mitarbeitern gelöste Kristallstruktur des TPP-RNA-Schalters aus *A. thaliana*^[9a] (Abbildung 2e) lässt direkte Wasserstoffbrücken der Nucleotide G64, C65 und G66 zum Pyrophosphat-Ende des Liganden sowie ein Mg²⁺-Ion in der Bindungsstasche erkennen. Die Struktur des TPP-RNA-Schalters aus *E. coli* nach Patel und Mitarbeitern^[9b] (Abbildung 2f) weist dagegen ein anderes Bindungsschema in der Pyrophosphatbindungsstasche auf. Hier ist die Phosphatgruppe an zwei Mg²⁺-Ionen koordiniert und geht Wasserstoffbrücken zu den Nucleotiden C77 und G78 ein. Edwards et al.^[9c] berichten, dass neben den Mg²⁺-Kontakten lediglich noch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Nucleotid G78 und dem nichtverbrückten Sauerstoffatom des endständigen Phosphats als die einzige direkte Wechselwirkung zwischen Ligand und Pyrophosphatbindungsstasche auftritt. Die Kristallstruktur des (RNA-Schalter)-Thiaminmonophosphat(TMP)-Komplexes^[9c] lässt ein weitgehend ähnliches Muster an Wasserstoffbrücken wie der TPP-Komplex erkennen (Abbildung 2g). Im Unterschied zu letzterem findet man lediglich keine Wasserstoffbrücke zwischen dem Liganden und dem Nucleotid G78, und außerdem bindet im TPP-Komplex ein Mg²⁺-Ion an beide Phosphatgruppen und ein weiteres Mg²⁺-Ion an die endständige Phosphatgruppe, während im TMP-Komplex zwei Mg²⁺-Ionen an die einzige (endständige) Phosphatgruppe binden. Beim Austausch des Liganden TMP durch Benfotiamin (BTP),^[9c] das einen anderen zentralen Heterocyclus enthält (Abbildung 2g), ändert sich die molekulare Erkennung des Liganden nicht. Des Weiteren ist noch die Kristallstruktur der RNA-Schalters im Komplex mit dem Liganden Pyritthiamin (PT) bekannt (hier nicht gezeigt).^[9c] Obwohl dieser Ligand ebenfalls den Pyrimidinrest wie in TPP und TMP enthält, wurden keine Wasserstoffbrücken zwischen dem Nucleotid G40 und dem Liganden beobachtet. Stattdessen findet man lediglich die Wasserstoffbrücke zwischen N1 von PT und der 2'-OH-Gruppe des Nucleotids G19, wie sie für alle anderen Liganden beschrieben wurde.

4. Sekundäre und tertiäre Wechselwirkungen stabilisieren die Aptamerdomänen der RNA-Schalter

Anders als in den relativ kleinen Aptameren, die durch SELEX-Verfahren entwickelt wurden, findet man in den Strukturen der RNA-Schalter eine große Zahl von weitreichenden RNA-RNA-Tertiärkontakte (z.B. Pseudoknotenstrukturen), die nicht Teil der Ligandbindungsstasche sind, sondern die Faltung der globalen RNA-Struktur stabilisieren. Die Strukturen der bisher untersuchten Aptamerdomänen sind aufgrund einer starken Packung der helicalen Elemente sehr kompakt. Als stabilisierende Strukturmotive fungieren bekannte A-Minor-Triplettmotive vom Typ I/II, aber auch erst kürzlich entdeckte Strukturelemente wie Basenquadrupel in den purinbindenden RNA-Schaltern.^[18]

Anhand des Aufbaus der Aptamerdomänen können die RNA-Schalter in zwei Arten klassifiziert werden:

- Typ-I-RNA-Schalter mit Dreiwegekreuzung (three way junction) als primärem Strukturmotiv der Aptamerdomäne; hierzu zählen die purinbindenden RNA-Schalter, die TPP-bindenden RNA-Schalter und das *glmS*-Ribozym.
- Typ-II-RNA-Schalter mit Vierwegekreuzung (four way junction) als primärem Strukturmotiv der Aptamerdomäne; hierzu zählt der SAM-I-bindende RNA-Schalter.

4.1. Typ-I-RNA-Schalter

Die Aptamerdomänen der Purin-RNA-Schalter im Komplex mit ihrem Liganden enthalten als Strukturmotiv eine Dreiwegekreuzung. Hierbei sind die beiden parallelen Helices P2 und P3 durch eine Reihe von Wasserstoffbrücken zwischen den beiden apikalen Schleifen L2 und L3 eng gepackt (Abbildung 3a,b). Die Wasserstoffbrücken verbinden zwei Basenquadrupel aus jeweils einem G-C-Watson-Crick-Basenpaar und einem nichtkanonischen A·A- oder A·U-Basenpaar, das auf der Seite der kleinen Furche lokalisiert ist. Die räumliche Nähe des negativ geladenen RNA-Phosphodiestergrats hat abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen zur Folge, die durch Bindung positiv geladener Kationen ausgeglichen wird. Die Purinbindungsstasche ist im Zentrum der Dreiwegekreuzung lokalisiert, in welchem Basentripel den Ligand oberhalb (durch H₂O vermitteltes Basentripel U22-A52·A73 und Basentripel A23-G46-C53) und unterhalb (Basentripel U20-A76·U49 und Basentripel A21-U75-C50) umschließen und eine fast vollständig geschlossene Tasche bilden. Die Bindung des Liganden hängt entscheidend von der Bildung der Tertiärstruktur ab, wie aus Mutationsstudien bekannt ist, in denen Schleifen aus vier Nucleotiden (tetraloops) statt der natürlich vorkommenden Schleifen aus sieben Nucleotiden als Capping-Motiv der parallel gepackten Helices eingeführt wurden. Ein in solcher Weise mutierter RNA-Schalter kann den Purinliganden nicht mehr binden. NMR-Studien beweisen zudem, dass die Schleife-Schleife-Wechselwirkung in Abwesenheit des Liganden präorganisiert ist.^[18]

Der TPP-RNA-Schalter weist eine ähnliche Dreiwegekreuzung auf (Abbildung 3c). Auch hier befinden sich zwei helicale Strukturelemente in einer parallelen Anordnung, im Unterschied zu den Purin-RNA-Schaltern sind die miteinander wechselwirkenden helicalen Elemente aber keine kontinuierlichen Helices, sondern zwei helicale Arme, die durch „Scharniere“ (junctions) miteinander verbunden sind (P2/P3 durch J2/3 und P4/P5 durch J4/5). Während die Ligandbindung der Purin-RNA-Schalter durch Scharnierelemente in der zentralen Dreiwegekreuzung stabilisiert wird, ist für die Bindung von TPP und TPP-Analoga das Scharnierelement J4/5 als Bindungsstelle für die Pyrophosphateinheit und das Scharnierelement J2/3 als Bindungsstelle für die Pyrimidineinheit maßgeblich. Die Bindung von TPP induziert eine signifikante Wechselwirkung, die die helicalen Arme verbrückt und das gesamte Molekül in die ligandgebundene Form überführt. Zusätzlich wird dieser Aufbau durch eine Helix-Schleife-Wechselwirkung zwischen der Helix P3 und der Schleife L5 begünstigt, die durch einwertige Kationen stabilisiert wird.

Das *glmS*-Ribozym gehört ebenfalls zu den Typ-I-RNA-Schaltern mit Dreiwegekreuzung, allerdings ist dieses Struk-

turmotiv in dem Fall nicht das strukturbestimmende Element des RNA-Schalters. Stattdessen wird die globuläre Struktur von drei koaxialen Helices bestimmt, die Seite an Seite angeordnet sind. Zwei helicale Elemente, eines bestehend aus den Helices P1, P2.2, P2, P3 und P3.1 (ca. 100 Å) und das andere aus den Helices P4 und P4.1, umgeben den kürzeren zentralen helicalen Zylinder P2.1. Das Ribozym ist deshalb ein stark anisotropes Molekül. Das Hauptmerkmal der Struktur ist ein Kern aus einer doppelten Pseudoknotenstruktur des Ribozyms, das für die Positionierung der zu hydrolysierenden Phosphodiesterbindung notwendig ist. Diese befindet sich in der Nähe des 5'-Endes der Helix P2.2 und ist in die große Furche der Helix P2.1 eingebettet. Um eine solche doppelte Pseudoknotenstruktur der Helices P2.1 und P2.2 zu ermöglichen, werden vier nichthelicale Überkreuzungen benötigt, die durch eine Reihe von nichtkanonischen Wechselwirkungen stabilisiert werden. Klein et al.^[12] bezeichnen die oberen beiden Überkreuzungen als das „Dach“ des katalytischen Zentrums. Ihm gehören zwei konservierte Basentripel an (G34-G7-C30 und A35-C36-G53), die gleichzeitig als Verzweigungspunkte für die Dreiwegekreuzung aus P1, P2.2 und P2.1 fungieren. Interessanterweise findet man

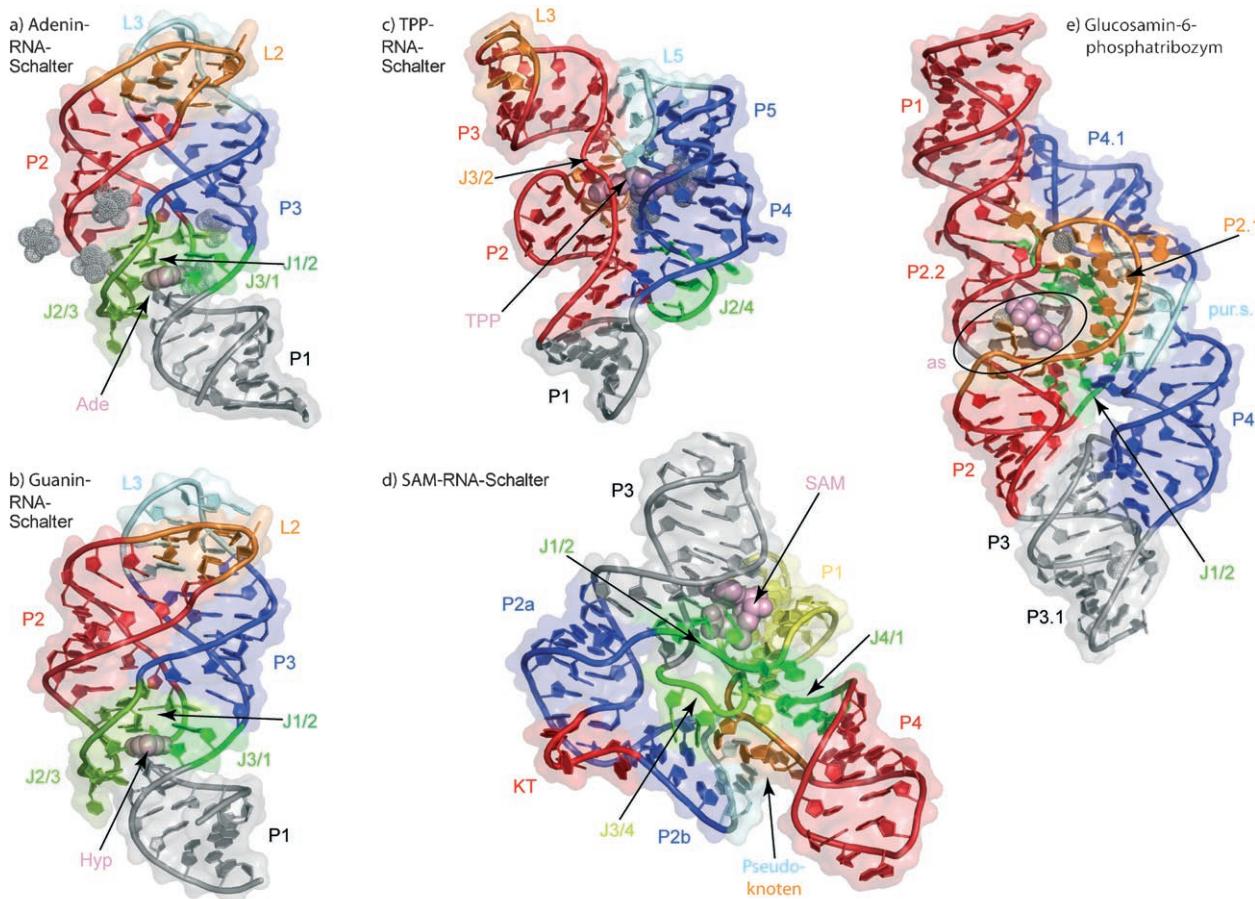


Abbildung 3. Dreidimensionale Strukturen der Aptamerdomänen von RNA-Schaltern (RNA-Strukturen in Bänderdarstellung, Liganden in Kugeldarstellung und hellviolett, Oberflächen schattiert): a) Adenin-RNA-Schalter aus *V. vulnificus* im Komplex mit Adenin (PDB 1Y26), b) Guanin-RNA-Schalter aus *B. subtilis* im Komplex mit Hypoxanthin (1U8D), c) TPP-RNA-Schalter aus *E. coli* im Komplex mit TPP (2GDI), d) SAM-RNA-Schalter aus *T. tengcongensis* im Komplex mit SAM (2GIS), e) *glmS*-Ribozym aus *T. tengcongensis* im Komplex mit Glucose-6-phosphat (2HO7). Die einzelnen Strukturelemente werden farblich unterschieden, die Nummerierung folgt der Nomenklatur in der Originalliteratur; P: Helices, J: Scharnierelemente (junctional elements), L: Schleifen (loops), KT: Knick-Dreh-Element (kink turn), as: katalytisches Zentrum (active site), pur.s.: Stapel von Purinnukleotiden (purine stretch).

auf dem „Boden“ des katalytischen Zentrums zwei Nucleotide, die zwischen einer Schleife aus P2 und P2.1 eingeschlossen sind; diese stapeln dann auf die Nucleotide der beiden unteren Überkreuzungen. Zum einen wird im unteren Teil des Moleküls ein kanonisches Pseudoknotenstruktur-element bestehend aus den Helices P3 und P3.1 gefunden, das auf P2 stapelt, zum anderen bilden die Helices P4 und P4.1 einen koaxialen Zylinder als Gerüstelement, das als stützendes Element für P2.1 dient. Die genaue Position des Gerüst-elements wird durch zahlreiche tertiäre Wechselwirkungen stabilisiert. Hierzu gehören eine A-Minor-Wechselwirkung zwischen A117 der Vier-Nucleotid-Schleife L4.1 und dem Basenpaar C10-G31 aus P1 sowie eine sechs Purinnucleotide umfassende Stapelung der Purine A129, G128, A127, A104, A105 und A106 durch eine interne Schleife zwischen P4 und P4.1, die in der kleinen Furche von P2.1 enthalten ist. Die Konformationen vor und nach der Spaltung des RNA-Moleküls sind sehr ähnlich – die Ligandbindung induziert im *glmS*-Ribozym also keine großen konformativen Änderungen. Die Änderung beschränkt sich stattdessen auf die Spaltung der hydrolyzierbaren Phosphodiesterbindung und unterscheidet sich damit vom Regulationsmechanismus der anderen bisher beschriebenen RNA-Schalter.

4.2. Typ-II-RNA-Schalter

Der SAM-RNA-Schalter weist eine Vierwegekreuzung als zentrales Strukturelement auf (Abbildung 3d). In der Umgebung dieser Vierwegekreuzung findet man doppelsträngige Bereiche, die teilweise durch Schleifenstrukturen abgeschlossen sind. Zwei Arten von koaxial gestapelten Helices werden beobachtet: Helices P2a und P3 sowie P1 und P4, die ein unterbrechendes Scharnierelement J4/1 aufweisen. Diese beiden Stapel werden durch Paarung der Reste A85 in J4/1 mit U64 in J3/4 und A24 in L2 zusammengehalten. Dieser Aufbau bewirkt, dass die beiden Stapel in einem Winkel von 70° angeordnet sind und damit eine Bindungstasche für SAM bilden, die sich in den kleinen Furchen der Helices P1 und P3 befindet.

Der SAM-RNA-Schalter enthält zwei ligandunabhängige Tertiärstrukturmotive, die für die globuläre Struktur wichtig sind. Dies ist zum einen ein Knick-Dreh-Motiv (kink-turn motif), das die beiden Helices P2a und P2b verbindet und die Bildung einer Pseudoknotenstruktur durch Paarung von L2 und J3/4 ermöglicht. Die Struktur dieses Pseudoknotens wird darüber hinaus durch Basentripel zwischen den Resten A85-U64-A24 in den Helices P1 und P4 und durch die Wechselwirkung von Resten aus dem Scharnier J3/4 und der Helix P2b stabilisiert, die adeninvermittelte Basentripel bilden.

5. Offene Fragen zum Regulationsmechanismus der RNA-Schalter

Biophysikalische Untersuchungen werfen eine Reihe von Fragen auf im Hinblick auf das einfache allosterische Modell der konformativen Umwandlung, das zur Erklärung der transkriptionalen und translationalen Regulation herange-

zogen wird. Nach diesem Modell sollte die Bindung eines Liganden an die Aptamerdomäne einen strukturellen Übergang von Sekundärstrukturelementen stromabwärts der mRNA induzieren und dadurch Transkriptions- oder Translationsregulationselemente freisetzen oder maskieren (siehe Abbildung 1). Dem stehen Ergebnisse von Stopped-Flow-Fluoreszenzmessungen^[19,8d] und zeitaufgelösten NMR-spektroskopischen Untersuchungen^[20] der Purin-RNA-Schalter und des FMN-RNA-Schalters entgegen: Die Geschwindigkeitskonstanten für die Ligandbindung bei physiologischen Ligandkonzentrationen sind zu klein für ein Modell, in dem eine Ligandbindung der konformativen Umwandlung vorgeht und dadurch die Genexpression reguliert. Insofern müsste im Mechanismus berücksichtigt werden, dass die Regulation während der Transkription stattfindet und dass auch allgemeine Faktoren, die die Proteintranskription abbrechen, eine Rolle spielen könnten. In diesem Sinne wollen wir diesen Kurzaufsatz mit einem Zitat Nudlers schließen:^[13b] „Therefore, to fully understand riboswitch functioning, the atomic resolution picture of ligand-RNA contacts needs to be put in the context of the whole expression platform, its folding process, and kinetic coupling dictated by the RNA polymerase.“

Unsere Arbeiten werden von der DFG (SFB 579, „RNA-Ligand-Wechselwirkungen“), dem Fonds der Chemischen Industrie (Promotionsstipendium für J.N.), der Studienstiftung des Deutschen Volkes (Promotionsstipendium für B.F.) und dem Bundesland Hessen (Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz) unterstützt.

Eingegangen am 10. Oktober 2006,
veränderte Fassung am 13. November 2006
Online veröffentlicht am 17. Januar 2007

- [1] a) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822; b) S. J. Klug, M. Famulok, *Mol. Biol. Rep.* **1994**, *20*, 97–107; c) J. Joyce, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 331–336.
- [2] a) M. Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 324–329, zit. Lit.; b) T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, *287*, 820–825.
- [3] D. H. Burke, L. Gold, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2020–2024.
- [4] a) J. Miranda-Rios, M. Navarro, M. Soberón, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9736–9741; siehe auch: G. D. Stormo, Y. Ji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9465–9467; b) W. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker, *Nature* **2002**, *419*, 952–956; c) A. Mironov, I. Gusarov, R. Rafikov, L. Lopez, K. Shatalin, R. Kreneva, D. Perumov, E. Nudler, *Cell* **2002**, *111*, 747–756; d) S. D. Gilbert, R. T. Batey, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2401–2404.
- [5] a) M. Mandal, B. Boese, J. E. Barrick, W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Cell* **2003**, *113*, 577–586; b) N. Sudarsan, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *RNA* **2003**, *9*, 644–647; c) T. Kubodera, M. Watanabe, K. Yoshiuchi, N. Yamashita, A. Nishimura, S. Nakai, K. Gomi, H. Hanamoto, *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 516–520.
- [6] N. Sudarsan, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *RNA* **2003**, *9*, 644–647.
- [7] W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, *428*, 281–286.
- [8] a) R. T. Batey, S. D. Gilbert, R. K. Montange, *Nature* **2004**, *432*, 411–415; b) A. Serganov, Y. R. Yuan, O. Pikovskaya, A. Polonskaia, L. Malinina, A. T. Phan, C. Hobartner, R. Micura, R. R. Breaker, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1729–1741; c) J.

- Noeske, C. Richter, M. A. Grundl, H. R. Nasiri, H. Schwalbe, J. Wöhnert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1372–1377; d) S. D. Gilbert, C. D. Stoddard, S. J. Wise, R. T. Batey, *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 754–768.
- [9] a) S. Thore, M. Leibundgut, N. Ban, *Science* **2006**, *312*, 1208–1211; b) A. Serganov, A. Polonskaia, A. T. Phan, R. R. Breaker, D. J. Patel, *Nature* **2006**, *441*, 1167–1171; c) T. E. Edwards, A. R. Ferre-D'Amare, *Structure* **2006**, *14*, 1459–1468; d) J. Noeske, C. Richter, E. Stirnal, H. Schwalbe, J. Wöhnert, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1451–1456.
- [10] R. K. Montange, R. T. Batey, *Nature* **2006**, *441*, 1172–1175.
- [11] a) J. E. Barrick, K. A. Corbino, W. C. Winkler, A. Nahvi, M. Mandal, J. Collins, M. Lee, A. Roth, N. Sudarsan, I. Jona, J. K. Wickiser, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6421–6426; b) G. Mayer, M. Famulok, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 602–604; c) J. A. Jansen, T. J. McCarthy, G. A. Soukup, J. K. Soukup, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 517–523; d) J. Lim, W. C. Winkler, S. Nakamura, V. Scott, R. R. Breaker, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 978–982; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 964–968.
- [12] D. J. Klein, A. R. Ferre-D'Amare, *Science* **2006**, *313*, 1752–1756.
- [13] a) S. Reichow, G. Varani, *Nature* **2006**, *441*, 1054–1055; b) E. Nudler, *Cell* **2006**, *126*, 19–22; c) S. D. Gilbert, R. T. Batey, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 805–807.
- [14] M. Mandal, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 29–35.
- [15] W. C. Winkler, A. Nahvi, N. Sudarsan, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 701–707.
- [16] K. J. Hampel, M. M. Tinsley, *Biochemistry* **2006**, *45*, 7861–7871.
- [17] T. Yamauchi, D. Miyoshi, T. Kubodera, A. Nishimura, S. Nakai, N. Sugimoto, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2583–2589.
- [18] J. Noeske, J. Buck, B. Fürtig, H. Nasiri, H. Schwalbe, J. Wöhnert, *Nucleic Acids Res.* **2007**, im Druck.
- [19] a) J. K. Wickiser, W. C. Winkler, R. R. Breaker, D. M. Crothers, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 49–60; b) J. K. Wickiser, M. T. Cheah, R. R. Breaker, D. M. Crothers, *Biochemistry* **2005**, *44*, 13404–13414.
- [20] a) J. Buck, B. Fürtig, J. Noeske, J. Wöhnert, H. Schwalbe, unveröffentlichte Ergebnisse; b) J. Buck, Diplomarbeit, Frankfurt, **2005**.