

Bakterien mit neuen Eigenschaften – mithilfe von RNA-Schaltern**

Jörg S. Hartig*

Chemotaxis · Genexpression · RNA · RNA-Schalter ·
Synthetische Biologie

Der Abbau von Umweltgiften durch maßgeschneiderte Bakterien ist eine aussichtsreiche zukünftige Anwendung gentechnisch veränderter Organismen. Ebenso interessant, wenngleich weitaus anspruchsvoller, ist der Entwurf von Organismen, die krankhafte Veränderungen im menschlichen Körper aufspüren und rückgängig machen können. Bis heute ist allerdings die Frage offen, wie sich solche Organismen an den jeweiligen Einsatzort rekrutieren lassen.

Es wurden bereits erste Versuche unternommen, das sensorische System von Bakterien dergestalt zu verändern, dass sie sich entlang eines Gradienten bestimmter Lockstoffe bewegen. Durch Änderung der Substratspezifität der chemosensorischen Rezeptoren wurden Bakterien in die Lage versetzt, neuen chemischen Signalen zu folgen.^[1] Ungeachtet dieses Erfolges ist die Umgestaltung der Rezeptorspezifität anspruchsvoll und bleibt wahrscheinlich auf Substanzen mit großer Ähnlichkeit zu natürlichen Stimulantien der chemosensorischen Maschinerie beschränkt. Gallivan und Topp haben nun eine elegante Variante vorgestellt, mit der sich Bakterien unter Einsatz von RNAs anstelle von Proteinen entlang von Pfaden neuer Signalmoleküle leiten lassen.^[2]

RNAs eignen sich besonders gut als Werkzeuge zur Umprogrammierung zellulärer Funktionen, da sie entscheidend an grundlegenden Prozessen wie der Genexpression und deren Regulation beteiligt sind. Darüber hinaus sind immer mehr RNAs verfügbar, die spezifisch an Zielmoleküle binden (Aptamere) und bestimmte Reaktionen katalysieren können (Ribozyme). Solche funktionalen RNAs lassen sich immer leichter in bestehende biologische Systeme integrieren, da unser Wissen über den programmierbaren und modularen Charakter solcher RNA-Elemente stetig wächst. Selbst die Natur macht sich den Baukastencharakter solcher RNA-Werkzeuge zunutze: In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von RNA-basierten Mechanismen entdeckt, bei denen

Stoffwechselprodukte über mRNA-Wechselwirkungen einen Einfluss auf die Genexpression ausüben.^[3,4]

Ähnlich zu diesen so genannten RNA-Schaltern sind artifizielle Schalter, deren Herstellung durch den Einbau von Aptameren in nicht translatierte Bereiche von mRNAs gelang – und das bereits vor der Entdeckung des natürlichen Phänomens.^[5,6] Seitdem wurde eine Reihe von artifiziellen, RNA-basierten Schaltern konstruiert (Beispiele: Theophyllin-abhängige Aktivierung der Genexpression in *Bacillus subtilis*,^[7] Hemmung eukaryotischer Genexpression^[5,8–10] und *in-trans*-wirkende Schalter in Eukaryoten^[11,12]). Bislang war allerdings noch keine allgemeine Strategie verfügbar, nach der sich artifizielle RNA-Schalter zur Liganden-vermittelten Induktion der Genexpression in Bakterien entwickeln lassen. Vor kurzem beschrieben Gallivan und Mitarbeiter eine Methode zur Herstellung solcher Schalter.^[13,14] Durch eine innovative Anwendung dieser Schalter gelang es nun, Bakterien entlang von Pfaden einer bestimmten Substanz zu leiten.

Die In-vivo-Durchmusterung einer Bibliothek von teilweise randomisierter mRNA, die ein Theophyllin bindendes Aptamer enthielt, ermöglichte die Identifizierung von Klonen, die auf das Xanthin-Analogon Theophyllin ansprechen.^[13,14] Diese artifiziellen Schalter befolgen das gleiche Prinzip wie eine Vielzahl natürlicher Schalter: Durch Bindung eines bestimmten Liganden wird die Ribosomenbindestelle (RBS) der mRNA besser zugänglich, wodurch die Genexpression steigt (Abbildung 1). Desai und Gallivan setzten eine Technik ein, mit der sowohl die Durchmusterung als auch die Selektion von Theophyllin-abhängigen Schaltern der Genexpression in lebenden Bakterien möglich ist.^[13] Sie entwickelten ein Verfahren, das auf der Detektion von β -Lactamase-Aktivität beruht und mit dem Klone identifiziert werden konnten, die auf die Zugabe von Theophyllin in Form einer veränderten Genexpression reagieren.^[13] Durch Austausch des β -Lactamase-Gens gegen eine Gensequenz, die für das Enzym Chloramphenicol-Acetyl-Transferase codiert, wurde eine Theophyllin-abhängige Resistenz gegen das Antibiotikum erreicht. Die Zugabe von Theophyllin bewirkt die Expression der Transferase, welche das Antibiotikum desaktiviert. In einer zweiten Arbeit wurden die Theophyllin-abhängigen RNA-Schalter weiter optimiert, indem Varianten mit geringerer Hintergrundexpression identifiziert und charakterisiert wurden. Dabei wurden Klone isoliert, die durch Zugabe von 1 mM Theophyllin die Genexpression um einen Faktor 35 steigern.^[14]

[*] Prof. Dr. J. S. Hartig
Fachbereich Chemie
Universität Konstanz
78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-5140
E-Mail: joerg.hartig@uni-konstanz.de
Homepage: <http://www.uni-konstanz.de/fuf/chemie/jhartig>

[**] Ich danke der Volkswagen-Stiftung für die großzügige Förderung im Rahmen des Lichtenberg-Programms und Justin P. Gallivan für die freundliche Bereitstellung des Fotos in Abbildung 2b.

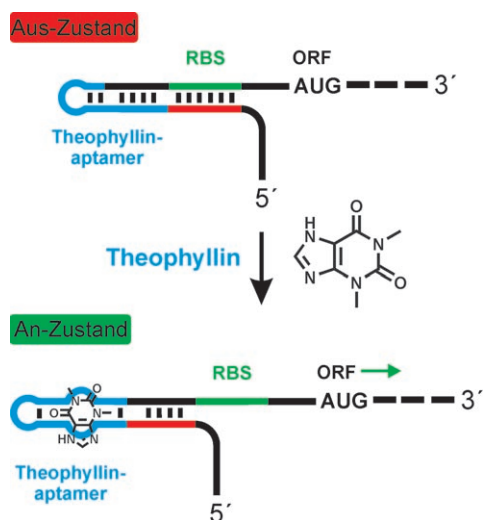


Abbildung 1. Das Einfügen eines Aptamers (blau) in den 5'-untranslatierten Bereich einer bakteriellen mRNA verdeckt die Ribosomenbindestelle (RBS, grün); ORF: offenes Leseraster. Bei Zugabe eines kleinen Moleküls (Theophyllin), das an das Aptamer bindet, wird die RNA umstrukturiert, und über die Freisetzung der RBS kommt es zu einer gesteigerten Genexpression. Grüner Pfeil: Translation; roter Bereich: Anti-RBS-Sequenz.

In der Folge wurde einer dieser Theophyllin-abhängigen Schalter eingesetzt, um eine artifizielle Chemotaxis (Steuerung der Bewegungsrichtung) von *E. coli*-Bakterien zu erreichen. Anstatt die Expression eines Reportergens zu regulieren, verwendeten Topp und Gallivan den Theophyllin-induzierbaren Schalter, um ein essenzielles regulatorisches Protein der Chemotaxis-Maschinerie zu kontrollieren.^[15] Das Protein CheZ kontrolliert die Zellbewegung in *E. coli* durch Dephosphorylierung von CheY. In einem CheZ-defizienten Stamm bleibt CheY permanent phosphoryliert, wodurch eine Bewegung der Flagellen im Uhrzeigersinn beibehalten wird. Dies führt zum Taumeln der Bakterien (Abbildung 2a). Wird nun in einen CheZ-defizienten Stamm ein Plasmid eingeführt, das ein CheZ-Gen unter Kontrolle eines Theophyllin-abhängigen Schalters enthält, beginnen sich die Bakterien zu bewegen, sobald sie auf Theophyllin stoßen. In Gegenwart von Theophyllin wird die CheZ-Expression aktiviert, wodurch CheY dephosphoryliert wird und sich die Flagellen gegen den Uhrzeigersinn bewegen. Dies führt zu einer Vorwärtsbewegung der Bakterien (Abbildung 2a). Derart veränderte Bakterien können sich nun entlang eines Pfades von Theophyllin fortbewegen (Foto in Abbildung 2b). Die Autoren benannten dieses Phänomen der artifiziellen Chemotaxis „Pseudotaxis“, da sich beide Mechanismen in einigen Aspekten voneinander unterscheiden: Die natürliche Chemotaxis erkennt z.B. Unterschiede in der Konzentration von Lockstoffen ungeachtet ihrer absoluten Konzentration,^[16] wohingegen die Theophyllin-empfindlichen Bakterien sich erst ab einem bestimmten Grenzwert, festgelegt durch eine absolute Konzentration, fortbewegen.

Die hier vorgestellten Arbeiten demonstrieren, dass sich RNA-Schalter zur Herstellung von Bakterien eignen, die

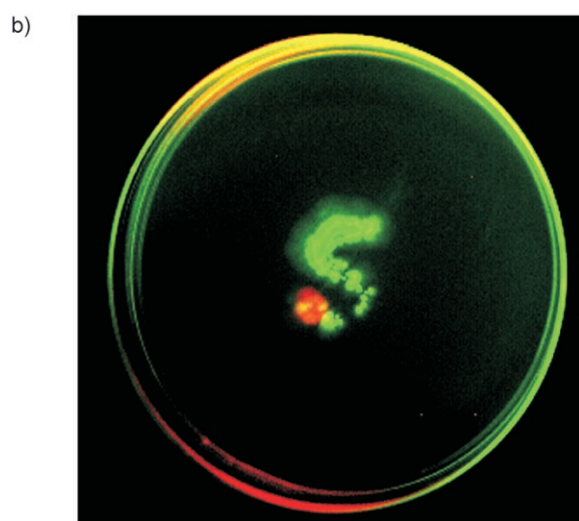
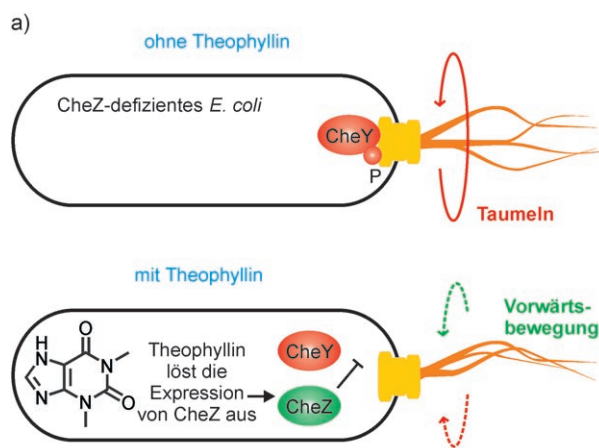


Abbildung 2. a) Bakterien ohne CheZ sind bewegungsunfähig. Wird die CheZ-Expression durch einen Theophyllin-abhängigen RNA-Schalter kontrolliert, bewegen sich die Bakterien vorwärts, sobald sie auf Theophyllin stoßen. b) Bakterien (sichtbar gemacht durch GFP-Expression, grün) mit einer durch einen RNA-Schalter kontrollierten CheZ-Expression wandern entlang einer S-förmigen Theophyllin-Spur (Bakterien wurden am oberen rechten Ende des Theophyllin-Pfads angeimpft). Ein zweiter Klon (sichtbar gemacht durch RFP-Expression, rot; angeimpft am unteren linken Ende der S-förmigen Theophyllin-Spur) ohne Theophyllin-abhängige CheZ-Expression vermag dem Theophyllin-Pfad nicht zu folgen. GFP/RFP: grün/rot fluoreszierendes Protein.

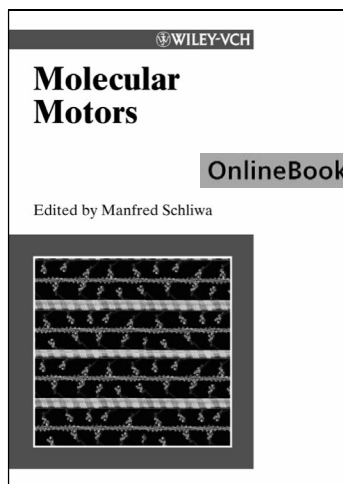
durch einen artifiziellen chemischen Stimulus angelockt werden. Nun, da am Beispiel des Theophyllins die Eignung einer solchen Strategie nachgewiesen wurde, stehen die Entwicklung und Anwendung von Aptameren auf dem Programm, die interessante Lockstoffe zu erkennen vermögen, z.B. Umweltgifte oder Indikatoren von krankhaften Veränderungen. Die besprochenen Arbeiten können dem gerade im Entstehen begriffenen Gebiet der synthetischen Biologie zugeordnet werden. Ziel dieses Forschungsgebietes ist es, biologische Systeme mit völlig neuen Eigenschaften zu entwerfen, die neuartige Aufgaben erfüllen können. Aktuelle Anwendungen von RNA-Techniken in der synthetischen Biologie wurden kürzlich zusammengefasst.^[17] Zukünftige Anstrengungen auf diesem Gebiet werden von einer Re-

duktion der Komplexität bestehender Mikroorganismen und von der Etablierung universeller Design-Kriterien profitieren.

Online veröffentlicht am 20. September 2007

- [1] P. Derr, E. Boder, M. Goulian, *J. Mol. Biol.* **2006**, 355, 923.
- [2] S. Topp, J. P. Gallivan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6807.
- [3] W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, 59, 487.
- [4] H. Schwalbe, J. Buck, B. Furtig, J. Noeske, J. Wohnert, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1232; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1212.
- [5] G. Werstuck, M. R. Green, *Science* **1998**, 282, 296.
- [6] Y. Tor, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1681; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1579.
- [7] B. Suess, B. Fink, C. Berens, R. Stentz, W. Hillen, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 1610.
- [8] D. Grate, C. Wilson, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2565.
- [9] B. Suess, S. Hanson, C. Berens, B. Fink, R. Schroeder, W. Hillen, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 1853.
- [10] I. Harvey, P. Garneau, J. Pelletier, *RNA* **2002**, 8, 452.
- [11] T. S. Bayer, C. D. Smolke, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 337.
- [12] R. Micura, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 32; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 30.
- [13] S. K. Desai, J. P. Gallivan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13247.
- [14] S. A. Lynch, S. K. Desai, H. K. Sajja, J. P. Gallivan, *Chem. Biol.* **2007**, 14, 173.
- [15] S. Topp, J. P. Gallivan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6807.
- [16] J. S. Parkinson, S. E. Houts, *J. Bacteriol.* **1982**, 151, 106.
- [17] F. J. Isaacs, D. J. Dwyer, J. J. Collins, *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 545.

Concise Insight of 20 Years of Research



2002. XXII, 582 pages,
129 figures 48 in color,
20 tables. Hardcover.
ISBN 978-3-527-30594-0
€ 189.- / £ 120.- / US\$ 230.-

MANFRED SCHLIWA, *University
of Munich, Germany (Ed.)*

Molecular Motors

Cell motility, virus transport and developmental asymmetry are examples of biological processes related to the function or malfunction of the minute machinery of molecular motors. This handbook brings together current knowledge on the functionality, regulation, and interactions of cytoskeletal, DNA, and rotary motors. Leading experts present principles and applications ranging from atomic structure, biochemistry, and biophysics to

cell biology, developmental biology and pathology - all set to become a "classic" in the years to come.

"...essential reading for graduate students in the field of cell motility and molecular motors...
recommend it enthusiastically..."
- *Nature Cell Biology*

35180705_kn

Register now for the free
WILEY-VCH Newsletter!
www.wiley-vch.de/home/pas

WILEY-VCH • P.O. Box 10 11 61 • D-69451 Weinheim, Germany
Fax: +49 (0) 62 01 - 60 61 84
e-mail: service@wiley-vch.de • <http://www.wiley-vch.de>

 **WILEY-VCH**