

Ein Aptazym-Design für die RNA-basierte Schaltung der Genexpression in Bakterien**

Markus Wieland und Jörg S. Hartig*

Die Expression eines bestimmten Gens kann durch das Einbringen eines künstlichen RNA-basierten Schaltelements effektiv reguliert werden. Bei der Entwicklung eines solchen Schaltelements kann man sich an einer Vielzahl natürlicher RNA-Schalter orientieren, die bereits charakterisiert wurden.^[1] Der *glmS*-RNA-Schalter stellt dabei den einzigen bisher bekannten „riboswitch“ dar, der auf einer autokatalytischen Spaltung der Boten-RNA (mRNA) nach der Bindung eines Metaboliten beruht.^[2] Andererseits werden bereits seit einiger Zeit durch die Verknüpfung von Aptameren mit „Hammerhead“-Ribozymen (HHR) so genannte Aptazyme hergestellt, deren Aktivität sich durch Ligandenbindung spezifisch regulieren lässt.^[3,4] In den letzten Jahren zeigte sich indes, dass die katalytisch aktive Konformation natürlicher HHRs durch tertiäre Wechselwirkungen zwischen den Helices I und II stabilisiert wird.^[5–7] Diese Wechselwirkungen führen dazu, dass das längere, in seiner Faltung stabilisierte HHR eine viel höhere Aktivität aufweist als die früher für die Konstruktion von Aptazymen genutzten Minimalmodule des HHR. Das natürliche HHR-Motiv kann selbst bei sehr niedrigen Magnesiumkonzentrationen, wie sie auch in Zellen vorherrschen, RNA effizient spalten.^[5] Im Folgenden werden wir ein neuartiges ligandgesteuertes „Hammerhead“-Ribozym vorstellen, das den Einsatz solcher Aptazyme für die RNA-basierte Kontrolle der Genexpression in Bakterien ermöglicht.


Schon 2004 fügten Mulligan und Mitarbeiter schnell spaltende „Hammerhead“-Ribozyme mit den oben beschriebenen Helix-I/Helix-II-Wechselwirkungen in die mRNA eines Reportergens ein. Die Expression des Reporters wurde daraufhin sowohl in Säugerzellkultur als auch im Tierversuch drastisch reduziert.^[8,9] Durch Zugabe von Nucleosidanaloga konnte die Expression des Reportergens zumindest teilweise wiederhergestellt werden, da die Nucleosidanaloga in die zelluläre RNA und damit auch in das Ribozym eingebaut und dieses somit inaktiviert wurde.^[8,9] Für eine allgemeine Anwendung künstlicher Schalter in un-

terschiedlichen Organismen, auch in Bakterien, sollten diese jedoch durch möglichst ungiftige Verbindungen reguliert werden können. Ein erster Schritt in diese Richtung war der Einbau eines Aptamers in die mRNA eines Reportergens, dessen Expression nach Zugabe des aptamerspezifischen Liganden gehemmt wurde.^[10] Später wurde ein Aptamer, das das Xanthin-Analogon Theophyllin spezifisch bindet,^[11] in die mRNA von Bakterien eingefügt, was eine achtfache Reduktion der Genexpression durch Zugabe von Theophyllin zur Folge hatte.^[12] Kürzlich durchmusterten Gallivan und Mitarbeiter eine randomisierte Bibliothek von bakteriellen mRNA-Varianten, die Theophyllin-Aptamere enthalten, und identifizierten dabei Sequenzen, die eine ligandenvermittelte Induktion der Reportergenexpression zeigen.^[13–15] Diese RNA-Schalter zeichnen sich dadurch aus, dass die Ribosomenbindungsstelle (RBS) nach der Bindung von Theophyllin zugänglich wird. Eine einsträngige Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz in der RBS ist wichtig für eine effiziente Auslösung der Translation.^[16] Die Regulation der Expression durch ligandenvermittelte Änderung der Zugänglichkeit der RBS findet sich oft auch in natürlichen RNA-Schaltern.^[17]

Bei der Entwicklung eines HHR-basierten RNA-Schalters nutzten wir als Grundlage ein schnell spaltendes „Hammerhead“-Ribozym, das tertiäre Wechselwirkungen zwischen den Helices I und II zulässt. Des Weiteren konstruierten wir das Ribozym so, dass erst durch die Spaltung der mRNA die RBS einsträngig und damit leicht zugänglich vorliegt. Dieses neue Design war notwendig, da das alleinige Spalten in der 5'-untranslatierten Region der mRNA in Bakterien im Unterschied zu eukaryotischen Zellen oft keinen nennenswerten Einfluss auf die Genexpression hat. Hierzu integrierten wir die SD-Sequenz in die Helix I des HHR, sodass diese doppelsträngig vorliegt (SD/Anti-SD, Abbildung 1 A). In diesem Zustand ist die Genexpression vollständig ausgeschaltet, was durch ein Kontrollexperiment, in dem man das HHR durch eine gezielte Punktmutation im aktiven Zentrum inaktivierte, bestätigt wurde (inaktiviertes HHR, Abbildung 1 B). Das aktive HHR hingegen spaltet die mRNA derart, dass die Anti-SD-Sequenz entfernt und die Expression des Reportergens ermöglicht wird (HHR, Abbildung 1 B). Dieses Design, bei welchem die blockierte RBS erst durch das Spalten der mRNA zugänglich wird, sollte es erstmals ermöglichen, Ribozyme in Bakterien als künstliche RNA Schalter zu nutzen. Interessanterweise hat das schon erwähnte natürliche Ribozym, das Teil des *glmS*-RNA-Schalters ist, den entgegengesetzten Effekt: Durch die spezifische Bindung von Glucosamin-6-Phosphat wird das Ribozym zwar auch aktiviert, führt dann aber zu einer reduzierten Genexpression. Die Wirkungsweise des *glmS*-Schalters basiert darauf, dass

[*] M. Wieland, Prof. Dr. J. S. Hartig
Fachbereich Chemie
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-5140
E-Mail: joerg.hartig@uni-konstanz.de
Homepage: <http://www.uni-konstanz.de/FuF/chemie/jhartig>

[**] J.S.H. dankt der VolkswagenStiftung für die großzügige Förderung im Rahmen des Lichtenberg-Programms. Weiter möchten wir Astrid Joachimi für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung danken.

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

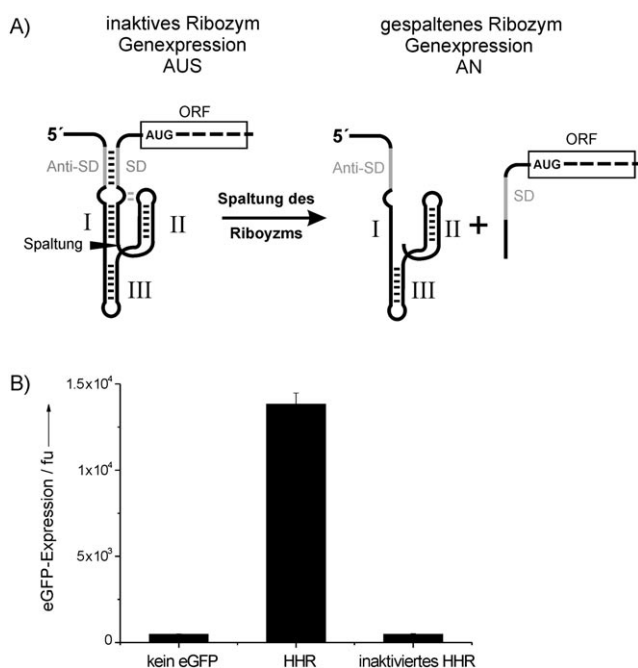


Abbildung 1. Design eines schnell spaltenden „Hammerhead“-Ribozyms (HHR), das durch Spaltung der mRNA in Bakterien die Expression des Reportergens *eGFP* aktiviert. A) Neues Design zur Modulation der Expression in Bakterien. Wichtige Merkmale sind die Konservierung der Wechselwirkungen zwischen Helix I und II des Ribozyms sowie die Maskierung der Shine-Dalgarno-Sequenz (SD/Anti-SD, grau). Die autokatalytische Spaltung der mRNA macht die Ribosomenbindungsstelle zugänglich und aktiviert so die Genexpression. B) In-vivo-Expression von *eGFP* in *Escherichia coli*: Das Kontrollplasmid enthält kein *eGFP*-Gen (kein *eGFP*); ein aktives HHR mit tertiären Wechselwirkungen zwischen Helix I und II wurde, wie in (A) gezeigt, in die 5'-UTR des *eGFP*-Gens kloniert (HHR), ebenso eine HHR-Variante, die durch eine Punktmutation inaktiviert wurde (inaktiviertes HHR, Details in den Hintergrundinformationen).

die gesplattene mRNA von einer Nuclease erkannt und abgebaut wird.^[2,18]

Nachdem wir zeigen konnten, dass das beschriebene Design eine Induktion der Genexpression durch ribozymvermittelte Spaltung der mRNA ermöglicht, versuchten wir nun, die Aktivität des Ribozyms durch Liganden zu steuern. Bereits seit längerem wird die Helix II genutzt, um verschiedene Aptamere mit dem Minimalmotiv des HHR zu verbinden. Diese Aptazyme waren zwar sehr gut schaltbar, aber auch in ihrer katalytischen Aktivität stark eingeschränkt. Erst vor kurzem gelang es Smolke und Mitarbeitern, die Helix II eines ungekürzten HHR mit einem Aptamer zu verknüpfen, ohne dass die tertiären Wechselwirkungen und die katalytische Aktivität beeinträchtigt werden.^[19]

Wir verknüpften das Aptamer an einer anderen Position mit dem HHR: Damit die tertiären Wechselwirkungen einerseits nicht gestört werden, andererseits aber auch eine Regulation der Aktivität möglich ist, fügten wir ein Theophyllin bindendes Aptamer an der Helix III des HHR ein (Abbildung 2A). Die Verknüpfungssequenz zwischen Aptamer und Ribozym muss so gestaltet sein, dass die Information über die Bindung des Liganden am Aptamer an das Ribozym weitervermittelt wird. Wir optimierten diese Verknüpfungs-

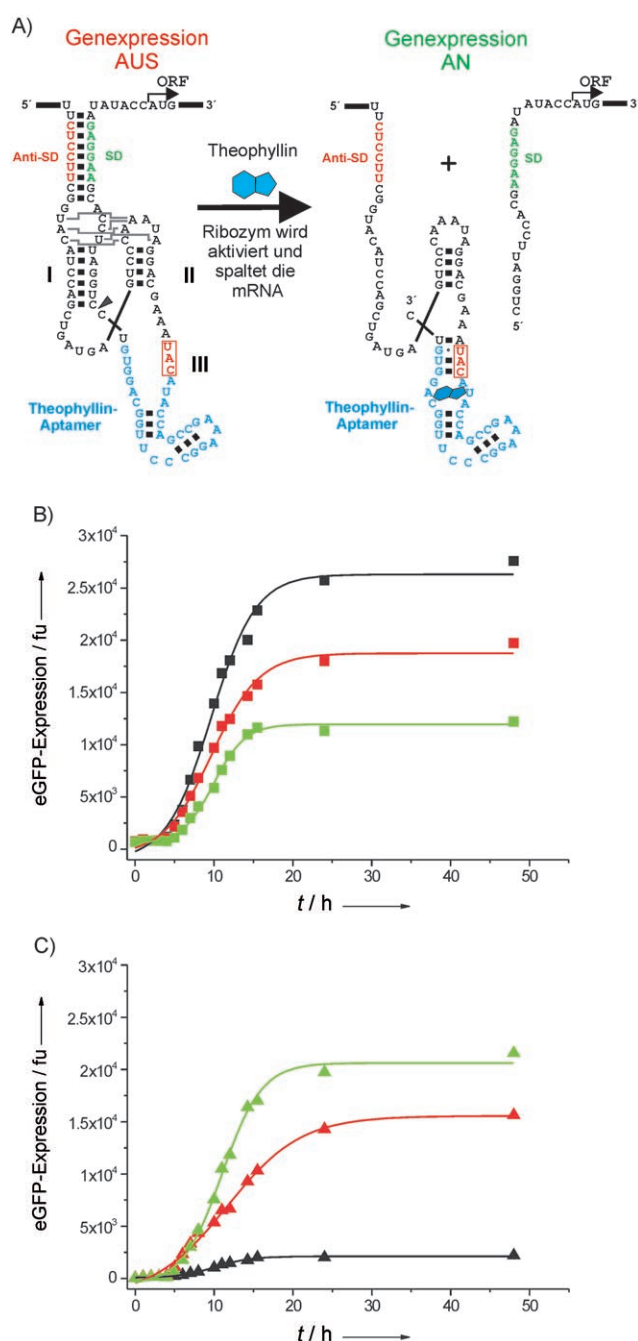


Abbildung 2. Ein Theophyllin-abhängiges Ribozym als künstlicher RNA-Schalter: A) Design des Theophyllin-abhängigen „Hammerhead“-Aptazyms (theo-HHAz): Ein Theophyllin-Aptamer wird über Helix III in das HHR eingefügt, sodass die tertiären Wechselwirkungen zwischen den Helices I und II (graue Linien) nicht gestört werden. Die Zugabe von Theophyllin aktiviert das Ribozym und somit die Genexpression. Theo-HHAz wurde beim In-vivo-Screening einer Bibliothek von Klonen identifiziert, die durch Randomisieren der Sequenz an den rot umrandeten Positionen erhalten wurden. B) In-vivo-eGFP-Expression des HHR-Klons (Sequenz siehe Abbildung 1) in Abhängigkeit von der Theophyllinkonzentration. Schwarz: kein Theophyllin, rot: 800 µM Theophyllin, grün: 4 mM Theophyllin. C) eGFP-Expression des theo-HHAz-Klons in Abhängigkeit von der Theophyllinkonzentration (Kennzeichnung wie in B). Während Theophyllin die eGFP-Expression des HHR-Klons auf die Hälfte reduziert, wird bei der theo-HHAz-Variante eine zehnfache Aktivierung beobachtet.

stelle, indem wir drei Nucleotide randomisierten (rot umrandet in Abbildung 2 A) und diese Bibliothek vor ein *eGFP*-Reportergen in *E. coli* klonierten. Isolierte Klone wurden anschließend auf Veränderungen der *eGFP*-Expression in Abhängigkeit von Theophyllin untersucht. Der Vorteil dieses In-vivo-Screenings liegt darin, dass man ausschließlich RNA-Schalter erhält, die tatsächlich in vivo schaltbar sind. Mit diesem Verfahren identifizierten wir einen Klon (theo-HHAz, Theophyllin-abhängiges „Hammerhead“-Aptazym), der in Gegenwart von Theophyllin eine bis auf das Zehnfache erhöhte Expression von *eGFP* aufweist (Abbildung 2 C). Dagegen wurde beim Referenzklon mit der ursprünglichen HHR-Sequenz (Abbildung 1) eine verminderte *eGFP*-Expression beobachtet (Abbildung 2 B). Koffein, das sich nur durch eine zusätzliche Methylgruppe an der 7-Position des Purins vom Theophyllin unterscheidet, wirkt nicht aktivierend auf die Genexpression (siehe die Hintergrundinformationen). Somit konnte gezeigt werden, dass die hochspezifische Bindung des Aptamers an Theophyllin in der Sequenz des Ribozyms erhalten geblieben ist. Als nächstes untersuchten wir den Schaltmechanismus durch gezielte Mutationen, um die Stabilität der identifizierten Verknüpfungssequenz in Helix III zu modulieren. Die Genexpression wurde in Abhängigkeit der Mutationen beobachtet, und die Ergebnisse bestätigen, dass die Duplexstabilität von Helix III die Grundlage für die Ribozymregulation bildet: Die Schwächung der Helix III inaktiviert Ribozym-spaltung und Genexpression vollständig, während die Stabilisierung zu einer verstärkten, nicht mehr schaltbaren Expression führt (siehe die Hintergrundinformationen).

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob der Anstieg der *eGFP*-Expression in vivo von einer durch Theophyllin hervorgerufenen Änderung der Spaltungsgeschwindigkeit herrührte, wurde das entsprechende *in-cis*-schneidende Ribozym durch In-vitro-Transkription hergestellt.^[20] Die Spaltungsreaktionen wurden in vitro bei einer niedrigen Mg^{2+} -Konzentration ($200 \mu M$) ausgeführt, um die Verhältnisse in vivo nachzuahmen.^[21,22] Die gemessene Spaltungsgeschwindigkeit (k_{obs}) ohne Theophyllin liegt für HHR über 8 min^{-1} und für theo-HHAz bei 1.3 min^{-1} . Bei der Zugabe von 1 mM Theophyllin bleibt die Spaltungsgeschwindigkeit für HHR unverändert, wohingegen sich k_{obs} für theo-HHAz fast verdreifacht (3.6 min^{-1} , Abbildung 3). In Übereinstimmung mit den In-vivo-Ergebnissen zeigt Koffein ebenfalls keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität der Ribozyme (siehe die Hintergrundinformationen).

Die gemessenen Spaltungsgeschwindigkeiten entsprechen den Werten für schnell spaltende Ribozyme, die bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen noch katalytisch aktiv sind.^[5,7] Im Unterschied zu vielen Literaturdaten weisen die Ribozyme in unseren Experimenten aber einen fast kompletten Reaktionsumsatz auf (90 %).^[5,7] Die Theophyllin-Abhängigkeit der Spaltungsaktivität ist für theo-HHAz viel geringer aus bei einer Verknüpfung des Aptazyms mit der Helix II.^[3] Trotzdem lässt sich die Genexpression durch das Ribozym theo-HHAz in vivo durch Ligandenbindung zu steuern. Es scheint, dass selbst die mäßige Induzierbarkeit, die hier in vitro beobachtet wurde, ausreichend ist für die Regulation der Expression in vivo. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre,

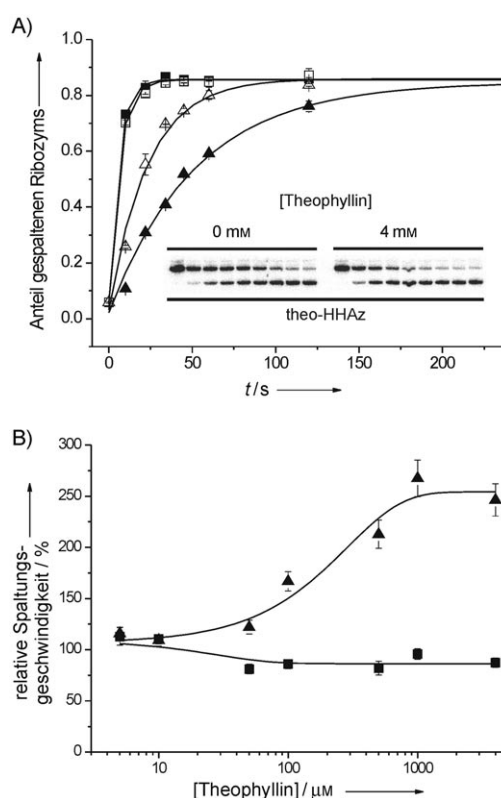


Abbildung 3. Reaktionskinetik der In-vitro-Spaltung von isolierten Ribozymen. A) Zeitverlauf der Spaltungsreaktion der Ribozyme bei $200 \mu M$ Mg^{2+} . Quadrate: HHR, Dreiecke: theo-HHAz. Ausgefüllte Symbole: ohne Theophyllin; offene Symbole: 4 mM Theophyllin. Kleines Bild: PAGE-Analyse der Spaltungsreaktion des theo-HHAz. *In-cis*-spaltende Ribozyme wurden durch In-vitro-Transkription hergestellt, indem man einen Blockierstrang zugab, der mit dem aktiven Zentrum des Ribozyms hybridisierte und so die Spaltung während der Transkription verhinderte. B) Konzentrationsabhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit (relativ zur Reaktion ohne Theophyllin). Quadrate: HHR, Dreiecke: theo-HHAz.

dass mithilfe des In-vivo-Screenings Ribozyme mit einem genau für die Regulation der Genexpression passenden Aktivitätsbereich ($k_{obs} = 1\text{--}3 \text{ min}^{-1}$) gefunden wurden. Anders als bei früheren Strategien mit In-vitro-Selektion wurde hier durch ein In-vivo-Screening direkt der gewünschte Phänotyp isoliert.

Zusammenfassend haben wir hier ein neuartiges „Hammerhead“-Aptazym vorgestellt, welches den Einsatz von Ribozymen als künstliche RNA-Schalter ermöglicht. Dieser Ansatz hat Vorteile gegenüber dem einfachen Einfügen der entsprechenden Aptamersequenz in die mRNA: Das Schneiden der Boten-RNA stellt eine irreversible und drastische Veränderung der Information dar. Vergleichbare Auswirkungen auf die Genexpression könnten selbst in Organismen erwartet werden, bei denen sich die genetischen Mechanismen beträchtlich unterscheiden. Wir prüfen zurzeit, ob es möglich ist, das entwickelte Aptazymdesign zur Regulation der Genexpression auf Eukaryoten zu übertragen. Die Schaltung der Genexpression in Bakterien wurde möglich durch die Entwicklung eines Mechanismus, bei dem ein Ribozym die RBS maskiert und diese bei Aktivierung der

autokatalytischen Spaltung freisetzt. Indem wir ein Aptamer erstmals über Helix III einföhrten und so die tertiären Wechselwirkungen zwischen Helix I und II nicht beeinträchtigt wurden, erhielten wir ein Ribozym, das selbst bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen aktiv bleibt. Durch das anschließende Screening von Varianten, deren Verknüpfung zwischen Aptamer und Ribozym randomisiert wurde, konnten wir ein Ribozym identifizieren, das durch Liganden induzierbar war. Dieses Aptazym weist selbst bei geringen Mg^{2+} -Konzentrationen eine sehr hohe katalytische Aktivität auf. Neben diesem innovativen Design eines künstlichen RNA-Schalters wurden erste Hinweise über das benötigte Aktivitätsfenster für ein mRNA-spaltendes Ribozym in vivo erhalten. Die katalytischen Voraussetzungen regulatorischer „Hammerhead“-Ribozyme in vivo werden von uns derzeit genauer untersucht. Obwohl nur drei Nucleotide der Verknüpfung randomisiert wurden, konnten wir einen äußerst wirksamen genetischen Schalter in Bakterien identifizieren und charakterisieren. Die Durchmusterung größerer Bibliotheken sollte die Identifizierung von Ribozymen ermöglichen, die sich durch optimierte Regulationsraten auszeichnen und eine Theophyllin-abhängige Inhibition anstelle einer Aktivierung aufweisen.

Eingegangen am 13. August 2007,
veränderte Fassung am 25. September 2007
Online veröffentlicht am 12. Februar 2008

Stichwörter: Aptazyme · *Escherichia coli* ·
RNA-Ligand-Wechselwirkungen · RNA-Schalter

- [1] W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, 59, 487.
- [2] W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, 428, 281.
- [3] G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3584.
- [4] J. S. Hartig, S. H. Najafi-Shoushtari, I. Grune, A. Yan, A. D. Ellington, M. Famulok, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 717.
- [5] A. Khvorova, A. Lescoute, E. Westhof, S. D. Jayasena, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 708.
- [6] M. Martick, W. G. Scott, *Cell* **2006**, 126, 309.
- [7] M. D. Canny, F. M. Jucker, E. Kellogg, A. Khvorova, S. D. Jayasena, A. Pardi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10848.
- [8] 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.
- [9] L. Yen, M. Magnier, R. Weissleder, B. R. Stockwell, R. C. Mulligan, *RNA* **2006**, 12, 797.
- [10] G. Werstuck, M. R. Green, *Science* **1998**, 282, 296.
- [11] R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, 263, 1425.
- [12] B. Suess, B. Fink, C. Berens, R. Stentz, W. Hillen, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 1610.
- [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] P. J. Schlax, D. J. Worhunsky, *Mol. Microbiol.* **2003**, 48, 1157.
- [17] W. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker, *Nature* **2002**, 419, 952.
- [18] J. A. Collins, I. Irmov, S. Baker, W. C. Winkler, *Genes Dev.* **2007**, 21, 3356.
- [19] M. N. Win, C. D. Smolke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 14283.
- [20] K. Salehi-Ashtiani, J. W. Szostak, *Nature* **2001**, 414, 82.
- [21] J. Darnell, H. F. Lodish, D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, Freeman, New York, **1986**.
- [22] A. Romani, A. Scarpa, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 298, 1.