

Ligandenabhängige Regulierung einer Transfer-RNA in Bakterien**

Barbara Berschneider, Markus Wieland, Marina Rubini und Jörg S. Hartig*

Als Boten-, Transfer- und ribosomale RNA (mRNA, tRNA und rRNA) sind Ribonucleinsäuren von essenzieller Bedeutung während der Genexpression. Über diese bereits seit langem bekannten Funktionen hinaus sind RNAs auch an der Regulierung der Genexpression beteiligt. Zum Beispiel können bestimmte Motive in mRNAs, sogenannte RNA-Schalter („riboswitches“), die Genexpression durch ligandenabhängige Bildung von Sekundärstrukturen in der RNA steuern.^[1] Das Konzept der natürlichen RNA-Schalter kann durch das Einfügen von ligandenbindenden Sequenzen (Apptameren) in die mRNA nachgeahmt werden, was eine externe Regulierung der Genexpression ermöglicht.^[2,3] Auf dieser Grundlage entwickelten sowohl Ogawa und Maeda als auch unsere Arbeitsgruppe ein erweitertes Expressionssystem, bei dem mithilfe durch Liganden schaltbarer Ribozyme die Translation in Bakterien reguliert werden kann.^[4–7] In Hefe wurden auf der Basis ähnlicher Liganden-gesteuerter Ribozyme verschiedene Logikschalter konstruiert.^[8]

Diese Beispiele zeigen, dass sich dieser einfache, aber äußerst effektive Mechanismus von ligandenabhängigen, selbstspaltenden Ribozymen auf verschiedene Organismen übertragen lässt. Unserer Meinung nach sollte es aber auch möglich sein, das Prinzip auf weitere Klassen von RNA über die Regulierung von mRNAs hinaus anzuwenden, was wir hier am Beispiel von tRNAs zeigen. In unserem System aktiviert die Theophyllin-vermittelte Selbstspaltung eines Hammerhead-Ribozyms (HHR) eine tRNA; erst nach erfolgter Spaltung kann diese von der Translationsmaschinerie genutzt werden.

Unserer Kenntnis nach ist dies das erste künstliche Werkzeug zur Regulierung einer tRNA in lebenden Zellen mithilfe einer niedermolekularen Verbindung. Allerdings haben Westhof und Mitarbeiter gezeigt, dass die tRNA^{Asp} in Hefe spezifisch von dem Antibiotikum Tobramycin gebunden und dadurch die Aspartylationsreaktion gehemmt wird.^[9]

[*] B. Berschneider,^[+] M. Wieland,^[+] Dr. M. Rubini, Prof. Dr. J. S. Hartig
Fachbereich Chemie und Konstanz Research School Chemical
Biology (KoRS-CB), Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-885-140
E-Mail: joerg.hartig@uni-konstanz.de
Homepage: <http://www.uni-konstanz.de/FuF/chemie/jhartig>

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] J.S.H. dankt der VolkswagenStiftung für die großzügige Förderung im Rahmen der Lichtenberg-Professur und dem Fonds der Chemischen Industrie für die zusätzliche finanzielle Unterstützung. M.W. und J.S.H. bedanken sich außerdem beim Zukunftskolleg der Universität Konstanz. Weiter möchten wir Astrid Joachimi für die ausgezeichnete technische Unterstützung danken.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900851> zu finden.

Außerdem wurden selbstspaltende HHRs bereits zuvor in tRNAs und rRNAs der Hefe eingebaut, um einen Polymerase-II-unabhängigen Polyadenylierungsmechanismus zu untersuchen.^[10] Erst kürzlich wurde ein In-vitro-Translationssystem zur Bestimmung von Theophyllin entwickelt, dessen Grundlage die Verknüpfung eines Minimalmotiv-HHRs und einer tRNA darstellt.^[11]

Wir folgerten, dass es möglich sein sollte, selbstspaltende Ribozyme zur Regulierung der Aktivität einer tRNA *in vivo* zu nutzen: Hierzu entwickelten wir in *Escherichia coli* ein tRNA-HHR-Fusionskonstrukt, in dem die tRNA-Funktion direkt von der Ribozymaktivität abhängig ist. Dazu fügten wir an das 5'-Ende der tRNA ein schnell spaltendes HHR-Motiv, dessen Helices I und II tertiäre Wechselwirkungen eingehen können (Abbildung 1a).^[12,13] Als Reportersystem für die Funktion der spezifischen tRNA *in vivo* während der Translation verwendeten wir eine tRNA^{Ser}, deren Anticodon so abgeändert wurde, dass sie das Amber-Stoppcodon erkennt (Amber-Suppressor-tRNA^{Ser}_{CUA}). Zusätzlich wurde im offenen Leseraster des verwendeten Reportergens eGFP ein Serin-Codon durch ein Amber-Stoppcodon ersetzt (Ser50AUG).^[11,14] Im Fall einer nichtfunktionalen tRNA^{Ser}_{CUA} sollte die Translation an dieser Stelle vorzeitig abbrechen, wohingegen eine Aktivierung der tRNA^{Ser}_{CUA} zum Einbau von Serin und damit zur Expression des intakten Reporters führen sollte (Abbildung 1c). Wie erwartet, führt das Einfügen des Amber-Stoppcodons in das offene Leseraster von eGFP zu einer vollständigen Hemmung der eGFP-Expression. Lässt man hingegen zusätzlich noch tRNA^{Ser}_{CUA} in der Zelle transkribieren, so kann die eGFP-Expression vollständig wiederhergestellt werden (Amber-Suppression).

Unser Ziel war es, ein Konstrukt zu entwickeln, das uns die Ribozym-vermittelte Regulierung der tRNA *in vivo* ermöglicht. Die tRNA sollte dabei erst nach erfolgter Ribozymspaltung von der Translationsmaschinerie genutzt werden können. Dazu sollten das Ribozym und die tRNA derart verknüpft werden, dass sich die für die tRNA typische Kleeball-Sekundärstruktur nicht mehr bilden kann, solange das Ribozym ungespalten vorliegt (Abbildung 1a und b). Unter Zuhilfenahme des mfold-Programms^[15] gelang es uns, ein Konstrukt zu entwerfen, bei dem die Helix I von HHR so weit verlängert ist, dass diese mit dem 5'-Ende der tRNA hybridisieren kann und somit die Bildung der Akzeptor- und der D-Helix verhindert ist. Die dadurch entstehende Fehlfaltung sollte die Prozessierung der tRNA inhibieren und einen vorzeitigen Abbau dieser RNA einleiten,^[17–19] was die Bildung einer funktionalen tRNA unterbindet. Erst durch die Selbstspaltung des Ribozymes sollten die beiden entstehenden RNA-Fragmente dissoziieren und dadurch die richtige Faltung einer funktionalen tRNA ermöglicht werden (Abbildung 1a). Ein ähnliches Prinzip haben wir bereits erfolgreich verwendet, als wir die Translation einer bakteriellen mRNA

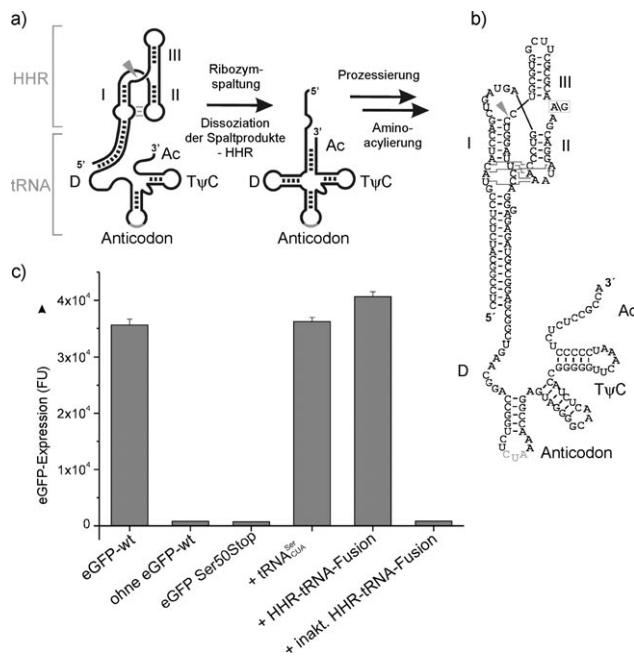


Abbildung 1. Ribozym-abhängige Regulierung der tRNA-Funktion in vivo. a) Die Verknüpfung des HHR mit der tRNA-Sequenz führt zu einer nichtfunktionalen tRNA, da die Bildung der Akzeptor- und D-Helix verhindert wird. Der graue Pfeil kennzeichnet die Spaltstelle des Ribozyme. b) Nukleotidsequenz des HHR-tRNA-Fusionskonstrukts. Die beiden eingerahmten Nukleotide geben die Position der A-zu-G-Punktmutation an, durch die das HHR inaktiviert werden kann.^[15] Das CUA-Anticodon, welches das Amber-Stopcodon erkennt, ist mit grauer Schrift dargestellt. c) Fluoreszenzanalyse der eGFP-Expression im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) unter Verwendung der folgenden Konstrukte: wt-eGFP-mRNA und wt-Serin-tRNA (eGFP-wt); ein Kontrollklon ohne eGFP-Gen (ohne eGFP); ein Amber-Stopcodon ersetzt ein Serin-Codon im offenen Leseraster der eGFP-mRNA (eGFP-Ser50-Stop); eGFP-Ser50Stop mit der entsprechenden Amber-Suppressor-tRNA_{CUA}^{Ser} (+ tRNA_{CUA}^{Ser}); eGFP-Ser50Stop mit dem HHR-tRNA-Fusionskonstrukt (+ HHR-tRNA-Fusion) und das gleiche Konstrukt mit der Ribozym-inaktivierenden Punktmutation im aktiven Zentrum (+ inakt. HHR-tRNA-Fusion).

dadurch regulierten, dass erst die Selbstspaltung eines Ribozyme und anschließende Dissoziation der Spaltprodukte die Ribosomenbindestelle freigab.^[4-6]

Tatsächlich erreichte die eGFP-Expression, sobald die tRNA_{CUA}^{Ser} mit einem aktiven HHR verknüpft und zusammen mit der Amber-mRNA verwendet wurde, vergleichbare Werte wie die unveränderte tRNA in Kombination mit der unveränderten wt-eGFP-mRNA (Abbildung 1c, HHR-tRNA Fusion). Es ist allerdings bemerkenswert, dass eine Suppressor-tRNA zusammen mit der entsprechenden Amber-mRNA ein vergleichbares Expressionsniveau erreicht wie das natürliche System; üblicherweise hat die Amber-Suppression eine maximale Effizienz von 20 bis 30%.^[20] Inaktiviert man das angehängte HHR durch eine A-zu-G-Punktmutation im aktiven Zentrum (Abbildung 1b), kann durch Fluoreszenzmessung keine eGFP-Expression mehr nachgewiesen werden. Somit hängt die tRNA-Funktion in diesem System vollständig von der Ribozymaktivität ab. Diese Experimente belegen, dass die in Abbildung 1 gezeigte Verknüpfung eines HHR mit einer tRNA ein äußerst leis-

tungsstarkes System zur Regulierung der tRNA-Aktivität in vivo darstellt.

Als nächstes wollten wir dieses System so weiterentwickeln, dass wir die tRNA-Aktivität durch einen externen Reiz steuern können. Dazu sollte ein Aptamer in das Ribozym integriert werden, um ein ligandenabhängiges Aptazym zu erhalten. Wir haben bereits in einer früheren Arbeit durch eine In-vivo-Durchmusterung ein Theophyllin-abhängiges Aptazym (damals theoHHAz^[4] genannt, Abbildung 2) ge-

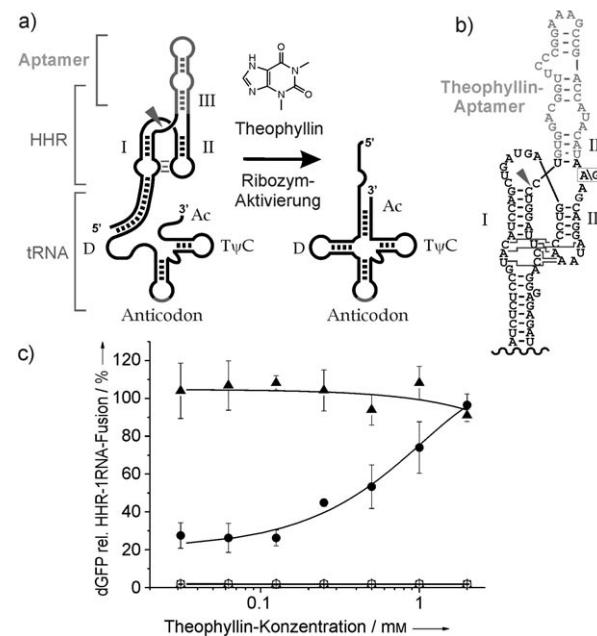


Abbildung 2. Ligandenvermittelte Regulierung der tRNA-Aktivität in vivo. a) Das theoHHAz-tRNA-Fusionskonstrukt, zusammengesetzt aus einem Theophyllin-abhängigen Aptazym (theoHHAz) verknüpft mit der tRNA. Das Theophyllin-Aptamer befindet sich in Helix III des Aptazym (Aptamer-Domäne in grau dargestellt). b) Nukleotidsequenz des theoHHAz-tRNA-Fusionskonstrukts. (Die tRNA-Domäne ist identisch mit der in Abbildung 1b gezeigten.) c) Theophyllin-abhängige tRNA-Verwendung: eGFP-Expression der ursprünglichen HHR-tRNA- (Dreiecke) und der Theophyllin-abhängigen theoHHAz-tRNA-Fusionskonstrukte (Kreise) in vivo. Die offenen Dreiecke und Kreise repräsentieren entsprechende Konstrukte, die durch die A-zu-G-Punktmutation inaktiviert wurden.

funden und charakterisiert, das es ermöglichte, die Translation durch Zugabe von Theophyllin auszulösen. Diese Aptamersequenz wollten wir nun verwenden, um die Aktivität der tRNA durch Zugabe von Theophyllin spezifisch zu regulieren. Obwohl dieses Aptazym ursprünglich im Zusammenhang mit einer mRNA optimiert wurde, wies es interessanterweise auch im tRNA-Kontext eine sehr gute Schaltbarkeit auf (theoHHAz-tRNA-Fusion, Abbildung 2c). Gibt man zu diesem Konstrukt Theophyllin in das Wachstumsmedium, wird die eGFP-Expression konzentrationsabhängig induziert, da die tRNA nun von der Translationsmaschinerie verwendet werden kann.

Die durch eGFP-Fluoreszenzmessung von intakten *E. coli*-Zellen erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend durch Bestimmung der tatsächlichen exprimierten Menge des Proteins eGFP verifiziert. Dazu wurde mithilfe eines Konju-

gats aus Nickel-Nitrilotriacetat (Ni-NTA) und alkalischer Phosphatase (AP), das an den „His-Tag“ des eGFP bindet, die Menge an eGFP im Zell-Lysat mit einem Western-Blot bestimmt (siehe die Hintergrundinformationen). Die erhaltenen Ergebnisse stimmten dabei sehr gut mit den Fluoreszenzmessungen überein (Abbildung 3): Wenn man ein aktives HHR mit der tRNA verknüpft, wird eGFP exprimiert; wurde das HHR des Fusionskonstrukts jedoch durch eine Punkt-

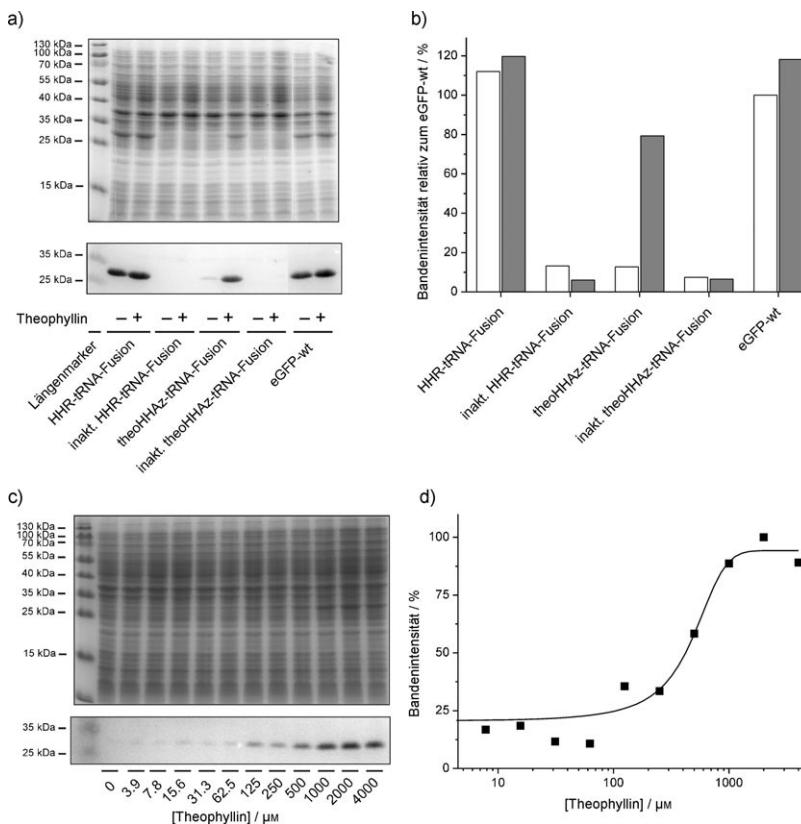


Abbildung 3. Western-Blot der eGFP-Expression in *Escherichia coli*: a) SDS-PAGE (oben) und Western-Blot (unten), bei dem ein Ni-NTA-AP-Konjugat genutzt wurde, um das eGFP anhand dessen „His-Tag“ nachzuweisen. Die Theophyllin-Konzentration im Medium betrug 2 mM in den entsprechenden Versuchen. b) Quantitative Auswertung des Western-Blots aus (a). c) Western-Blot der Theophyllin-abhängigen eGFP-Expression des theo-HHAz-tRNA-Fusionskonstrukts. d) Quantitative Auswertung des Western-Blots aus (c).

mutation inaktiviert, kann auf dem Western-Blot hingegen kein eGFP nachgewiesen werden. Ersetzt man das HHR durch das Theophyllin-abhängige Aptazym, sieht man auch hier eine Theophyllin-abhängige Expression von eGFP nur, wenn das Ribozym nicht durch eine Punktmutation inaktiviert wurde (Abbildung 3a und 3b). Abbildung 3c und 3d zeigen einen Western-Blot zu der konzentrationsabhängigen eGFP-Expression bei Zugabe von Theophyllin, der wiederum in sehr guter Übereinstimmung mit den durch Fluoreszenzmessung erhaltenen Ergebnissen ist.

Wir haben bereits zuvor durch die Bestimmung der Spaltungskinetik des ligandenabhängigen Ribozyms theo-HHAz in vitro zeigen können, dass die katalytische Aktivität tatsächlich durch Zugabe von Theophyllin induziert wird.^[4] Im Folgenden versuchten wir, die Stabilität der Ribozym-

gesteuerten tRNA in vivo zu charakterisieren. Dazu untersuchten wir die isolierte RNA auf einem Northern-Blot, wobei eine DNA-Hybridisierungssonde gegen das 5'-Ende des entsprechenden Konstrukts verwendet wurde (siehe die Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Wurde ein aktives HHR mit der tRNA verknüpft, konnte auf dem Northern-Blot ein kurzes RNA-Fragment nachgewiesen werden, das dem 5'-Spaltprodukt (66 nt) entspricht (Spur 1 und 2). Al-

lerdings ist dabei die Bandenintensität des 5'-Spaltprodukts geringer als für das inaktivierte Konstrukt (Spur 3 und 4). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten Nuclease sein, die das Spaltprodukt abbauen.^[19,21] Das inaktivierte HHR-tRNA-Fusionskonstrukt kann bei starker Bandenintensität mit größerer Länge nachgewiesen werden. Es muss angemerkt werden, dass die Zugabe von Theophyllin zu keiner Änderung der Bandenintensität bei diesen beiden Konstrukten führte. Dies legt nahe, dass weder die tRNA-Expression noch deren Stabilität durch Theophyllin beeinflusst werden, solange das entsprechende Aptamer nicht eingefügt wurde. Das Theophyllin-abhängige theo-HHAz-tRNA-Fusionskonstrukt (das wegen der zusätzlichen Aptamersequenz etwas länger ist als das HHR-tRNA-Konstrukt) zeigt erwartungsgemäß eine deutliche Abnahme des nichtgespaltenen Volllängenprodukts bei Zugabe von Theophyllin (Abbildung S1B). Das 5'-Spaltprodukt scheint dabei schnell abgebaut zu werden, was mit den Angaben in Lit. [19,21] übereinstimmt. Als Kontrolle, dass die Hybridisierungssonde spezifisch an das 5'-Ribozymende der Konstrukte bindet, wurde in der letzten Spur des Northern-Blots ein Konstrukt ohne eingefügtes Ribozym aufgetragen. Die prozessierte und funktionale tRNA alleine wird erwartungsgemäß nicht detektiert.

Zusammenfassend haben wir ein System zur Regulierung der tRNA-Aktivität in *E. coli* durch einen externen Liganden entwickelt. Interessanterweise konnte dabei eine

unerwartet starke eGFP-Expression beobachtet werden, obwohl die tRNA_{CUA}^{Ser} mit dem „Release Factor 1“ um die Bindungsstelle im Ribosom konkurrieren muss.^[22,23] Dies hat üblicherweise zur Folge, dass man höchstens eine 20- bis 30%-ige Effizienz der Amber-Suppression erreichen konnte.^[20] Der hier vorgestellte Ansatz mit ligandengesteuerten Ribozymen zur Aktivierung einer tRNA könnte sich deshalb als äußerst nützlich beim ortsgerichteten Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren erweisen. Gegenwärtig ist es bereits möglich, zahlreiche nichtnatürliche Bausteine in ein gewünschtes Protein einzubauen, wobei neben den natürlichen Translationssystemen der Expressionsorganismen auch orthogonale Systeme verwendet werden.^[24–26] Dennoch sind diesen Ansätzen durch die komplexen Zusammenhänge der tRNA immer noch Grenzen gesetzt.^[27] Hier könnte es sich als sehr

nützlich erweisen, eine gewünschte tRNA in vivo spezifisch an- oder auszuschalten, um den gezielten Einbau von nicht-natürlichen Aminosäuren zu erleichtern.

Im Prinzip sollte es mit dem hier vorgestellten System auch möglich sein, verschiedene beladene tRNAs, die dasselbe Anticodon haben, durch unterschiedliche Aptazyme zu regulieren und somit einen ligandenabhängigen Austausch bestimmter Aminosäuren zu erzielen. Um eine solche Anwendung zu verwirklichen, versuchen wir, ein zweites, orthogonales tRNA-System in *E. coli* zu etablieren, das durch einen weiteren Liganden gesteuert werden kann. Da die Erkennung von spezifischen Sekundärstrukturen zur Prozessierung von tRNAs universell konserviert zu sein scheint,^[17] sollte es außerdem möglich sein, das hier vorgestellte System auf andere Organismen zu übertragen. Des Weiteren könnte dieses System, kombiniert mit anderen ligandenabhängigen Systemen zur Regulierung der Genexpression, die Entwicklung von mehrstufigen, hierarchisch arbeitenden „Bakteriencomputern“ sein. Zudem hat der allgemeine Ansatz, Ribozyme zur Steuerung von Schlüsselementen des genetischen Apparats zu verwenden, das Potenzial, weitere Klassen von RNAs über mRNAs und tRNAs hinaus zu regulieren.

Eingegangen am 12. Februar 2009,
veränderte Fassung am 2. Juli 2009
Online veröffentlicht am 8. September 2009
Auf Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht

Stichwörter: Genetischer Code · Hammerhead-Ribozym ·
Molekulare Schalter · RNA · Translation

-
- [1] W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, 59, 487.
-

- [2] M. Wieland, J. S. Hartig, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1873.
[3] B. Suess, J. E. Weigand, *RNA Biol.* **2008**, 5, 24.
[4] M. Wieland, J. S. Hartig, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2643; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2604.
[5] M. Wieland, A. Benz, B. Klauser, J. S. Hartig, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 2753; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2715.
[6] M. Wieland, M. Gfeller, J. S. Hartig, *RNA* **2009**, 15, 968.
[7] A. Ogawa, M. Maeda, *ChemBioChem* **2008**, 9, 206.
[8] M. N. Win, C. D. Smolke, *Science* **2008**, 322, 456.
[9] F. Walter, J. Putz, R. Giege, E. Westhof, *EMBO J.* **2002**, 21, 760.
[10] K. Düvel, R. Pries, G. H. Braus, *Curr. Genet.* **2003**, 43, 255.
[11] A. Ogawa, M. Maeda, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2204.
[12] A. Khvorova, A. Lescoute, E. Westhof, S. D. Jayasena, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 708.
[13] M. Martick, W. G. Scott, *Cell* **2006**, 126, 309.
[14] J. R. Sampson, M. E. Saks, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 4467.
[15] 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.
[16] M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 3406.
[17] A. K. Hopper, E. M. Phizicky, *Genes Dev.* **2003**, 17, 162.
[18] L. A. Kirsebom, *Biochimie* **2007**, 89, 1183.
[19] Z. Li, S. Reimers, S. Pandit, M. P. Deutscher, *EMBO J.* **2002**, 21, 1132.
[20] K. Wang, H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 770.
[21] Z. Li, S. Pandit, M. P. Deutscher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2856.
[22] E. Scolnick, R. Tompkins, T. Caskey, M. Nirenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, 61, 768.
[23] M. R. Capecchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 1144.
[24] L. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, 35, 225.
[25] A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 603.
[26] N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6586; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6426.
[27] P. Schimmel, D. Soll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10007.