

Hochmodulare Struktur und Ligandenbindung durch „Conformational Capture“ in einem minimalistischen RNA-Schalter**

Elke Duchardt-Ferner, Julia E. Weigand, Oliver Ohlenschläger, Sina R. Schmidtke, Beatrix Suess und Jens Wöhnert*

Professor Horst Kessler zum 70. Geburtstag und Professor Christian Griesinger zum 50. Geburtstag gewidmet

RNA-Schalter sind hochstrukturierte RNA-Motive in den nichttranslatierten Regionen vieler mRNAs mit genregulatorischer Aktivität.^[1] Durch Konformationsänderungen, die durch direkte Wechselwirkung mit kleinen Metaboliten als Liganden induziert werden, modulieren sie entweder die Termination der Transkription oder die Initiation der Translation.

Viele natürlich vorkommende RNA-Schalter sind groß und strukturell sehr komplex. Demgegenüber leiten sich synthetische RNA-Schalter, die als maßgeschneiderte, genregulatorische Elemente für Anwendungen in der synthetischen Biologie dienen, von in vitro selektierten kleinen RNA-Aptameren ab.^[2] Allerdings sind nur sehr wenige in vitro selektierte Aptamere auch in vivo regulatorisch aktiv, obwohl ihre Ligandenaffinitäten und -spezifitäten mit denen natürlicher RNA-Schalter vergleichbar sind.^[3]

Erst kürzlich haben Suess et al. in einem zweistufigen Selektionsverfahren, in dem ein In-vitro-SELEX-Pool in einem auf genregulatorische Aktivität ausgerichteten In-vivo-Screening in einem Reportergen-Assay in Hefe getestet wurde, einen RNA-Schalter für das Aminoglycosid-Antibiotikum Neomycin B identifiziert.^[2b] Das daraus hervorgegangene, durch Neomycin B und Ribostamycin (Abbildung 1a) schaltbare RNA-Element (N1) besteht aus nur 27 Nukleotiden, die eine asymmetrische Haarnadelstruktur annehmen

(Abbildung 1b). Somit ist N1 der kleinste bisher identifizierte in vivo aktive RNA-Schalter. Sowohl die Sequenz als auch die Sekundärstruktur von N1 unterscheiden sich vollständig von einem anderen in vitro selektierten, aber regulatorisch inaktiven RNA-Aptamer für den gleichen Liganden (R23).^[4] Stattdessen ähnelt N1 teilweise der natürlich vorkommenden Bindungsstelle für Aminoglycosid-Antibiotika, der ribosomalen A-Stelle (Abbildung 1b).

Die NMR-Analyse des RNA-Schalters N1 im Komplex mit Ribostamycin enthüllt die strukturelle Grundlage für seine regulatorische Aktivität und weist auf einen Ligandenbindungsmechanismus durch „conformational capture“ hin. Unsere Ergebnisse geben Einblicke in den modularen Aufbau von Ligandenbindungsstellen in RNA und zeigen strukturelle und dynamische Besonderheiten auf, die N1 mit größeren, natürlich vorkommenden RNA-Schaltern sowie mit einigen anderen regulatorisch aktiven Aptameren teilt. Diese Erkenntnisse können als Leitfaden für die Entwicklung neuartiger synthetischer RNA-Schalter für gezielte In-vivo-Anwendungen dienen.

Struktur des N1-Ligand-Komplexes – der „AUS“-Zustand des RNA-Schalters:

N1 unterdrückt die Genexpression nach Bindung an Neomycin B oder Ribostamycin (ein mit Neomycin verwandtes, aber kleineres Aminoglycosid).^[2b] Die NMR-Spektren der beiden N1-Ligand-Komplexe (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) zeigen, dass die Bildung beider Komplexe mit ähnlich hoher Affinität erfolgt und ihre Strukturen sehr ähnlich sind. Der Beitrag von Ring IV im Neomycin zur RNA-Bindung scheint daher vernachlässigbar zu sein. Da die Resonanzsignale des Ribostamycins eine bessere spektrale Auflösung haben, zogen wir daher für die NMR-Spektroskopie den N1-Ribostamycin-Komplex heran (siehe Tabelle 1). Die Signalzuordnungen der NMR-Spektren und die Strukturkoordinaten wurden hinterlegt (BMRB-Code: 16609, pdb-Code 2kxm).^[5]

Trotz einer flexiblen internen Ausbauchung („bulge“) von drei Nucleotiden (C6–U8) enthält die Struktur des Ribostamycin-gebundenen N1 einen durchgängigen helicalen Stamm mit kanonischen Basenstapelungen zwischen dem G5:C23- und dem G9:C22-Basenpaar. Die hoch strukturierte apikale Schleife faltet sich zu einem „U-Turn“-Motiv (U14–A16), das durch das U13:U18-Basenpaar abgeschlossen wird (Abbildung 1c–e).

Die Bindungsstelle der Ringe I und II des Ribostamycins liegt zwischen der großen Furche von N1 in der Region von G5:C23 bis U13:U18 und A17, das aus der apikalen Schleife

[*] Dr. E. Duchardt-Ferner, S. R. Schmidtke, Prof. Dr. J. Wöhnert
Institut für Molekulare Biowissenschaft, Zentrum für Biomolekulare
Magnetische Resonanz (BMRZ)
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt (Deutschland)
Fax: (+49) 69-798-29527
E-Mail: woehnert@bio.uni-frankfurt.de

Dr. J. E. Weigand, Prof. Dr. B. Suess
Institut für Molekulare Biowissenschaft
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt (Deutschland)

Dr. O. Ohlenschläger
Leibniz-Institut für Altersforschung (Fritz-Lipmann-Institut)
Biomolekulare NMR-Spektroskopie
Beutenbergstraße 11, 7740 Jena (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Aventis-Foundation durch die Einrichtung zweier Stiftungsprofessuren für Chemische Biologie (B.S. und J.W.), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (WO 901/1-2, SU 402/4-1) und das Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz (BMRZ) der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201001339> zu finden.

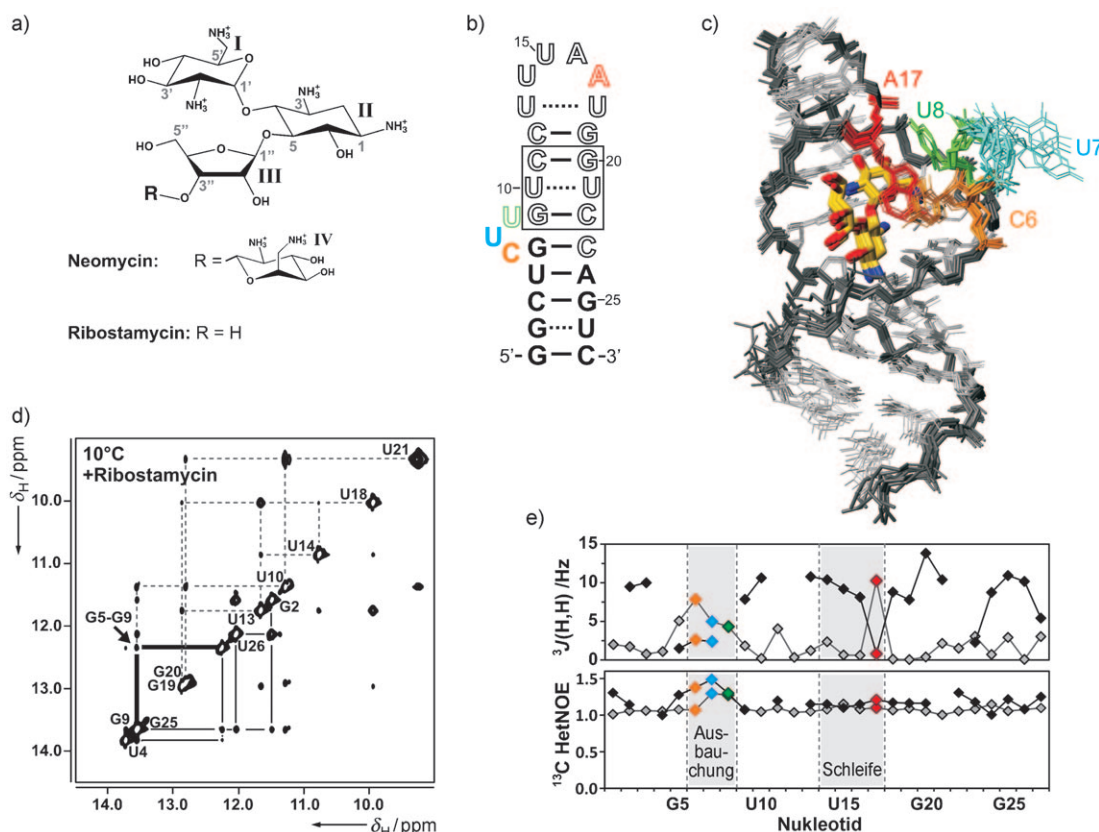


Abbildung 1. Struktur des N1-Ribostamycin-Komplexes. a) Konstitution der 2'-Desoxystreptamin-Antibiotika Neomycin B und Ribostamycin. b) Nukleotidsequenz mit der aus NMR-Daten abgeleiteten Sekundärstruktur des Ribostamycin-gebundenen N1. Die Konsensus-Sequenz des In-vivo-Selektionsexperiments für regulatorisch aktive Neomycin-abhängige RNA-Schalter (U8–C23) ist durch offene Buchstaben gekennzeichnet. Sequenzübereinstimmungen mit der ribosomalen A-Stelle sind durch einen Kästchen gekennzeichnet.^[2b] Die in der internen Ausbuchtung lokalisierten Reste und A17 in der apikalen Schleife sind farblich codiert. c) NMR-Strukturbündel, erzeugt durch Überlagerung der zehn Strukturen mit der geringsten Energie. Die Farbcodierung der Nukleotide ist die gleiche wie in (b); Farbcodierung für Ribostamycin: rot O, blau N, gelb C. d) Imino-protonen-Region eines 2D- ^1H , ^1H -NOESY-Spektrums von N1 gebunden an Ribostamycin bei 10°C. NOE-Konnektivitäten sind durch durchgezogene (G2 bis G5), fette (G5 bis G9) und gestrichelte Linien (G9 bis U21) dargestellt. Der NOE zwischen G5 und G9 (Pfeil) weist auf eine coaxiale helicale Stapelung hin. e) Interne Dynamik des Ribostamycin-gebundenen N1. $^3J(\text{H},\text{H})$ -Kopplungskonstanten (oben) und ^{13}C -HetNOE-Werte (unten). Nukleotide der apikalen Schleife und internen Ausbuchtung sind grau schattiert und farblich wie in (b) markiert. Eine große $^3J(\text{H}1',\text{H}2')$ -Kopplung (grau) und eine kleine $^3J(\text{H}3',\text{H}4')$ -Kopplung (schwarz) für A17 zeigen eine C2'-endo-Zuckerkonformation an; G5 bis U8 befinden sich in einem Konformationsgleichgewicht. Die ^{13}C -HetNOE-Werte der Nukleobasen C6/8 (grau) und der Ribose-C1'-Atome (schwarz) zeigen eine flexible interne Ausbuchtung und eine rigide apikale Schleife an.

ausgestülpt ist (Abbildung 2). Ring III befindet sich in der Nähe des Phosphatrückgrats des 3'-Strangs (U18 bis G20). Gleichzeitige Kontakte des Liganden mit dem G5:C23-Basenpaar unterhalb und G9:C22 oberhalb der internen Ausbuchtung (Abbildung 2b) verklammern den unteren und oberen helicalen Stamm und stabilisieren somit die durchgehende coaxiale Stapelung der beiden Stämme über die flexible interne C6-U8-Ausbuchtung hinweg. Die Nukleotide in der Ausbuchtung selber sind nicht in Kontakt mit dem Liganden. Eine detaillierte Beschreibung der Struktur des N1-Ribostamycin-Komplexes findet sich in den Hintergrundinformationen.

Eine vergleichende Betrachtung zeigt Ähnlichkeiten zwischen dem N1-Ribostamycin-Komplex und anderen Aminoglycosid-bindenden RNAs auf. Der helicale Stamm in der Nähe des U10:U21-Basenpaares ähnelt der ribosomalen A-Stelle (Abbildung S7A).^[6] Trotz nur schwach ausgeprägter Sequenzhomologie ähnelt das „U-Turn“-Motiv in der apikalen Schleife zwei in vitro selektierten Tobramycin-Aptameren

(Abbildung S7B).^[7] Außerdem liegt das aus der apikalen Schleife ausgestülpte A17 in der gleichen C2'-endo-Zuckerkonformation und Basenorientierung vor wie in der ansonsten strukturell nicht verwandten Fünf-Nukleotid-Schleife von R23 im Komplex mit Neomycin (Abbildung S7C) und zeigt ähnliche Basenstapelungen mit Ring I des Aminoglycosids.^[4a] Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeiten unterscheiden sich die Details der N1-Wechselwirkungen mit dem Liganden von denen der anderen Motive (Abbildung S8). Die hohe Ligandenaffinität von N1 ist offenbar das Ergebnis einer modularen Kombination aus verschiedenen Aminoglycosid-bindenden Teilmotiven (Abbildung S7D), deren detaillierter Wechselwirkungsmodus jeweils auf eine optimale Affinität hin angepasst wurde.

Der „AN“-Zustand von N1 – ein dynamisches Gleichgewicht:

In Abwesenheit des Liganden werden die Zielgene von N1 exprimiert. In diesem Zustand werden in den 1D- und 2D-NOESY-Imino-protonen-Spektren bei Temperaturen $> 10^\circ\text{C}$

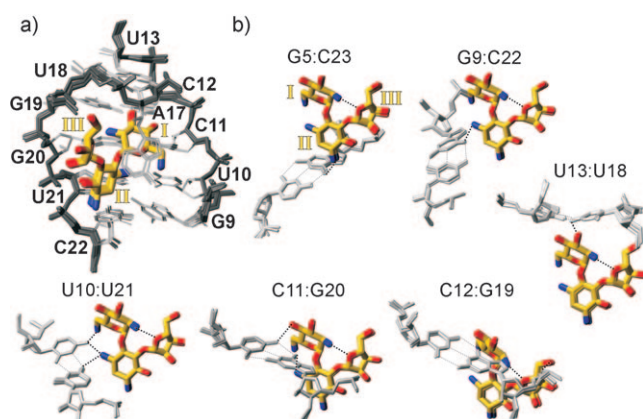


Abbildung 2. Die N1-Ribostamycin-Bindungstasche. a) Die Lage von Ribostamycin in der Bindungstasche; die Darstellung zeigt eine Überlagerung der zehn energieärmsten Strukturen. b) Wechselwirkungen von N1-Nukleotiden mit Ribostamycin. Aus den berechneten Strukturen abgeleitete intra- (graue punktierte Linien) und intermolekulare (schwarze punktierte Linien) Wasserstoffbrücken oder elektrostatische Wechselwirkungen.

Tabelle 1: NMR- und Strukturverfeinerungsstatistiken für die zehn Strukturen mit der niedrigsten Energie des N1-Ribostamycin-Komplexes.

NMR-Restraints			
Abstand-Restraints gesamt			915
N1-RNA			718
	intranukleotid		362
	sequenziell		186
	Weitbereich		120
	Wasserstoffbrücken		50
Ribostamycin			63
N1-Ribostamycin			134
Dieder-Restraints gesamt			106
Ribosezucker			48
Phosphat-Rückgrat			58
Strukturstatistik			
Paarweise RMSD-Werte [Å]			
N1-Ribostamycin (alle Nukleotide)		0.90 ± 0.33	
N1-Ribostamycin (G2–G5, G9–U26)		0.54 ± 0.20	
Ribostamycin		0.04 ± 0.02	

(Abbildung 3a, S9) nur wenige scharfe Signale beobachtet. Dies deutet auf eine offene Struktur (Abbildung 3b, links) mit fünf Basenpaaren in der unteren Helix (G1:C27–G5:C23) und einer verkürzten oberen Helix hin, die nur noch zwei Basenpaare (C11:G20 und C12:G19) enthält. Die apikale Schleife und das G9:C22- sowie das U10:U21-Basenpaar der oberen Helix sind destabilisiert. Bei tieferen Temperaturen erscheinen jedoch zusätzliche Iminoprotonensignale in diesen Spektren (Abbildung 3a), deren chemische Verschiebungen sowohl für Watson-Crick- als auch für nicht-kanonische Basenpaare typisch sind. Bei -6°C ähneln sowohl das $1\text{D-}^1\text{H}$ -Spektrum des freien N1 als auch die beobachteten NOE-Kontakte (Abbildung 3c) stark denen des N1-Ribostamycin-Komplexes bei hohen Temperaturen. Insbesondere ist die obere Helix durch zwei zusätzliche Basenpaare (G9:C22 und U10:U21) verlängert, und ein NOE zwischen dem G5- und dem G9-Iminoproton deutet auf eine coaxiale Stapelung

zwischen der oberen und der unteren Helix hin. Darüber hinaus geht die apikale Schleife eine Faltung ein unter Ausbildung des U13:U18-Basenpaares und des „U-Turn“-Motivs mit seiner charakteristischen Wasserstoffbrücke zwischen dem Iminoproton von U14 und dem gegenüberliegenden Phosphatrückgrat. Dementsprechend liegt freies N1 in einem temperaturabhängigen Konformationsgleichgewicht zwischen einer offenen Form (oder einem Ensemble aus mehreren offenen Formen) und einer kompakten, hoch strukturierten Konformation vor, die stark an den ligandengebundenen Zustand von N1 erinnert (Abbildung 3b).

Das Vorkommen der „gebundenen“ Konformation innerhalb des Konformationsensembles von freiem N1 deutet auf eine Bindung des Aminoglycosids durch einen „conformational capture“-Mechanismus hin. Dabei selektiert der Ligand die vorgebildete, gebundene Konformation aus dem Konformationsensemble der freien RNA für die Bindung. Dieser Mechanismus ist eine in jüngster Zeit auf dem Gebiet der Protein-Ligand-Wechselwirkungen viel diskutierte Alternative zum „induced-fit“-Bindungsmechanismus und wurde erst kürzlich auch für RNA-Ligand-Systeme beschrieben.^[8] In der freien RNA ist das basengepaarte, enthalpisch bevorzugte und dem gebundenen Zustand ähnliche Konformer bei höheren Temperaturen weniger populiert als das entropisch vorteilhafte, offene Konformer. Durch die Ligandenbindung wird dieser entropische Nachteil anscheinend durch zusätzliche enthalpisch vorteilhafte intermolekulare Wechselwirkungen überkompensiert. Die Differenz der freien Energie des außergewöhnlich stabilen Komplexes und des Konformationsensembles der freien RNA ist wahrscheinlich die Grundlage für die Funktion des Neomycin-erkennenden RNA-Schalters als ein ligandenstabilisierter „Prellbock“ für das Ribosom während des Scannings des 5'-nichttranslatierten Bereichs der mRNA und damit für seine genregulatorische Aktivität.

Ein entscheidender Faktor für die Destabilisierung des kompakten Zustands des freien N1 scheint die untere Ausbauchung (C6–U8) zu sein, die mit der coaxialen Stapelung der unteren und der oberen Helix sowie der Stabilität der angrenzenden Basenpaare interferiert. Damit ließe sich auch die teilweise Konservierung dieser Sequenz im Pool der in vivo selektierten genregulatorisch aktiven RNAs funktionell erklären, obwohl sie nicht mit dem Liganden wechselwirkt.^[2b] Der destabilisierende Effekt der Ausbauchung wird sowohl durch die ligandeninduzierte Stabilisierung des U10:U21- und des G9:C22-Basenpaares in der oberen Helix als auch durch die induzierte coaxiale Helixstapelung bei gleichzeitiger Wechselwirkung mit dem G5:C23-Basenpaar in der unteren Helix überwunden. Darüber hinaus begünstigt die Ligandenbindung die gefaltete Konformation der apikalen Schleife durch Stabilisierung des U13:U18-Basenpaares und vorteilhafte hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Ligand und A17. Die ligandeninduzierte Stabilisierung verschiedener Strukturelemente und deren Wechselwirkungen wurde auch für einige natürlich vorkommende RNA-Schalter beobachtet.^[1b] Insbesondere die ligandeninduzierte Positionierung von zwei helicalen Elementen relativ zueinander durch die gleichzeitige Wechselwirkung mit dem Liganden erinnert z. B. an den Ligandenbindungsmodus des natürlichen Thiaminpy-

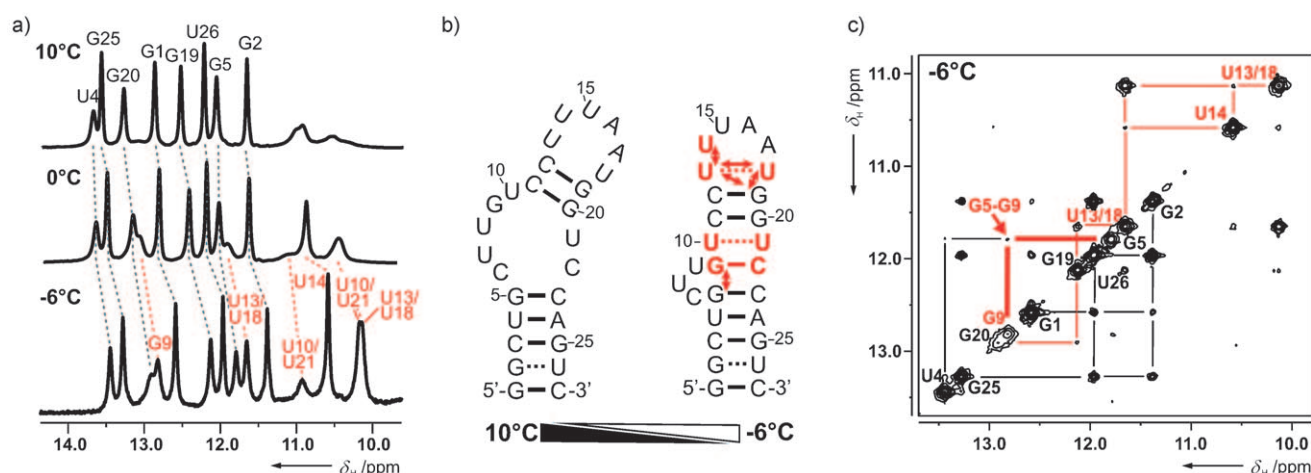


Abbildung 3. Temperaturabhängiges Konformationsgleichgewicht in freiem N1. a) Iminoregion des 1D-¹H-Spektrums bei unterschiedlichen Temperaturen. Im Spektrum bei 10°C sind die Nukleotide mit scharfen Iminosignalen gekennzeichnet. Im Spektrum bei -6°C sind die Nukleotide mit Signalen höherer Intensität bei tieferen Temperaturen gekennzeichnet. Änderungen der chemischen Verschiebung sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. b) Temperaturabhängige Sekundärstrukturänderungen. Nukleotide, für die bei tieferen Temperaturen eine Iminoressonanz erscheint, sowie neu gebildete Basenpaare sind rot dargestellt. Neue NOE-Konnektivitäten sind durch Pfeile gekennzeichnet. c) Iminoregion eines 2D-[¹H,¹H]-NOESY-Spektrums bei -6°C. NOE-Konnektivitäten bei 10°C, die bei tieferen Temperaturen an Intensität gewinnen, sind durch schwarze und rote Linien markiert. Der Pfeil markiert den NOE, der auf die coaxiale Helixstapelung zwischen G5 und G9 (fettgedruckte Linien) hinweist.

rophosphat-abhängigen RNA-Schalters, wo ein difunktionaler Ligand die interhelicale Packung fördert, oder des preQ₁-RNA-Schalters, wo der Ligand eine coaxiale Helix-Stapelung vermittelt.^[9]

Interessanterweise deuten die NMR-Daten für andere Aptamere mit bestätigter Aktivität als RNA-Schalter, insbesondere das Malachitgrün- und das Theophyllin-Aptamer, ebenfalls auf einen offenen, unstrukturierten Grundzustand und einen hoch strukturierten ligandengebundenen Zustand hin.^[3a,b,8e,10] In Analogie zur internen Ausbauchung von N1 zeigen die Strukturen dieser Aptamerkomplexe konformativ dynamische Nukleotide in der Nähe der Ligandenbindungsstelle, die weder direkte Wechselwirkungen mit dem Liganden eingehen noch zur Stabilisierung des Komplexes beitragen. Man kann vermuten, dass diese Nukleotide eine offene Form der freien RNA induzieren und dadurch die Aktivität als RNA-Schalter fördern, obwohl sie nicht für diesen Zweck selektiert wurden. Das Wechselspiel zwischen einem offenen Grundzustand und einem hoch strukturierten, hoch affinen ligandengebundenen Zustand scheint ein bestimmender Faktor für die genregulatorische Aktivität vieler natürlich vorkommender und synthetischer RNA-Schalter zu sein.

Eingegangen am 5. März 2010,
veränderte Fassung am 29. April 2010
Online veröffentlicht am 14. Juli 2010

Stichwörter: Aminoglycoside · Molekulare Erkennung · NMR-Spektroskopie · RNA · RNA-Schalter

- [2] a) G. Werstuck, M. R. Green, *Science* **1998**, 282, 296–298; b) J. E. Weigand, M. Sanchez, E. B. Gunnesch, S. Zeiher, R. Schroeder, B. Suess, *RNA* **2008**, 14, 89–97; c) S. Topp, J. P. Gallivan, *ACS Chem. Biol.* **2010**, 5, 139–148.
- [3] a) D. Grate, C. Wilson, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2565–2570; b) I. Harvey, P. Garneau, J. Pelletier, *RNA* **2002**, 8, 452–463; c) B. Suess, S. Hanson, C. Berens, B. Fink, R. Schroeder, W. Hillen, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 1853–1858.
- [4] a) L. Jiang, A. Majumdar, W. Hu, T. J. Jaishree, W. Xu, D. J. Patel, *Structure* **1999**, 7, 817–827; b) M. G. Wallis, U. von Ahsen, R. Schroeder, M. Famulok, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 543–552.
- [5] S. R. Schmidtke, E. Duchardt-Ferner, J. E. Weigand, B. Suess, J. Wöhnert, *Biomol. NMR Assignments* **2010**, 4, 115–118.
- [6] B. Francois, R. J. Russell, J. B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vicens, E. Westhof, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 5677–5690.
- [7] a) L. Jiang, D. J. Patel, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 769–774; b) L. Jiang, A. K. Suri, R. Fiala, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 35–50.
- [8] a) N. Leulliot, G. Varani, *Biochemistry* **2001**, 40, 7947–7956; b) H. M. Al-Hashimi, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1506–1519; c) Q. Zhang, X. Sun, E. D. Watt, H. M. Al-Hashimi, *Science* **2006**, 311, 653–656; d) Q. Zhang, A. C. Stelzer, C. K. Fisher, H. M. Al-Hashimi, *Nature* **2007**, 450, 1263–1267; e) F. M. Jucker, R. M. Phillips, S. A. McCallum, A. Pardi, *Biochemistry* **2003**, 42, 2560–2567; f) B. F. Volkman, D. Lipson, D. E. Wemmer, D. Kern, *Science* **2001**, 291, 2429–2433.
- [9] a) D. J. Klein, T. E. Edwards, A. R. Ferre-D'Amare, *Nat. Struct. Biol.* **2009**, 16, 343–344; b) M. Kang, R. Peterson, J. Feigon, *Mol. Cell* **2009**, 33, 784–790; c) R. C. Spitale, A. T. Torelli, J. Krucinska, V. Bandarian, J. E. Wedekind, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 11012–11016; d) A. Serganov, A. Polonskaia, A. T. Phan, R. R. Breaker, D. J. Patel, *Nature* **2006**, 441, 1167–1171; e) S. Thore, M. Leibundgut, N. Ban, *Science* **2006**, 312, 1208–1211; f) K. Lang, R. Rieder, R. Micura, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 5370–5378.
- [10] a) G. R. Zimmermann, R. D. Jenison, C. L. Wick, J. P. Simorre, A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 644–649; b) J. Flinders, S. C. DeFina, D. M. Brackett, C. Baugh, C. Wilson, T. Dieckmann, *ChemBioChem* **2004**, 5, 62–72.

- [1] a) A. Serganov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 251–259; b) A. Roth, R. R. Breaker, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 305–334; c) A. D. Garst, R. T. Batey, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2009**, 1789, 584–591.