

Plug and Play mit RNA**

Günter Mayer,* Sabine Lennarz, Falk Rohrbach und Fabian Tolle

Aptamere · GFP · Nanoarchitekturen · RNA ·

Supramolekulare Chemie

Galt die RNA früher allein als Vermittler zwischen dem Genom und dem Proteom, so tritt heute immer mehr zutage, dass sie auch noch eine Vielzahl weiterer Aufgaben in zellulären Prozessen innehat und dabei eine ähnlich diverse funktionelle Bandbreite wie Proteine aufweist.^[1] Das verbesserte Verständnis des Zusammenspiels zwischen der Form und der Funktion von RNA-Molekülen hat Wissenschaftler dazu angeregt, neuartige molekulare Werkzeuge auf RNA-Basis zu entwickeln. Nichtcodierende RNAs wurden in praktisch allen Domänen des Lebens gefunden, und die Untersuchung ihrer Biologie hat ein verstärktes Interesse an RNA – und dabei besonders an artifiziellen, synthetischen RNA-Bausteinen – ausgelöst. Trotz ihrer relativ geringen chemischen Diversität (einem Umstand, der eine effiziente chemische Synthese ermöglicht) können RNA-Moleküle dank ihrer sequenzabhängigen Sekundär- und Tertiärstruktur eine unglaubliche Fülle verschiedener Substanzen spezifisch erkennen. Die selektive Wechselwirkung dieser RNA-Elemente, so genannter Aptamere, ermöglicht die spezifische Erkennung und Bindung einer Vielzahl von Biomolekülen wie RNA, DNA und Proteinen, aber auch kleinerer Moleküle.^[2] Dies wiederum kann zum Aufbau von komplexen übergeordneten Strukturen oder zur Regulation von biologischen Prozessen innerhalb der Zelle genutzt werden.

Zwei aktuelle Publikationen demonstrieren das hohe Potenzial synthetischer RNA-Moleküle weit über bereits etablierte Anwendungen hinaus: Während Delebeque et al. Strukturen entwickelt haben, die sich in Bakterien selbst zusammenlagern,^[3] ist es Paige et al. gelungen, RNA-Fluorophore zu entwickeln, die ähnlich wie GFP in eukaryotischen Systemen als Reporter für endogene RNA fungieren können.^[4]

Delebeque und Mitarbeiter haben RNA-Aptamere, die spezifische Proteine erkennen, in ein definiertes RNA-Grundgerüst eingebracht. Die Expression dieser multimeren RNA-Moleküle führt zu einer spontanen Zusammenlagerung komplexer Architekturen in prokaryotischen Zellen. Diese gezielte räumliche Orientierung ermöglicht die Induktion

ausgeprägter biologischer Funktionen, hervorgerufen durch verstärkte Proteinwechselwirkung (Abbildung 1). Die geschickte Auswahl der RNA-Sequenz ermöglicht das Design von selbstorganisierten RNA-Strukturen, die sich im Inneren von lebenden Zellen zu „Kacheln“ und später zu übergeordneten zweidimensionalen (2D-)Feldern zusammenlagern. Der Einsatz von selektiven proteinbindenden RNA-Aptameren ermöglicht die kontrollierte Positionierung der Zielproteine auf der Oberfläche dieser RNA-Matrix, wobei die Aptamerdomänen als Andockstelle und Templat fungieren.

Die daraus resultierende Möglichkeit einer durch das RNA-Gerüst induzierten Protein-Protein-Wechselwirkung wurde an zwei eindrucksvollen Beispielen demonstriert. Im ersten Beispiel wurden die Fluoreszenz eines künstlich geteilten „grün Fluoreszierenden Proteins“ (GFP) wieder hergestellt. In einem zweiten Beispiel wurden durch das RNA-Gerüst zwei an der Wasserstoffproduktion beteiligte Enzyme

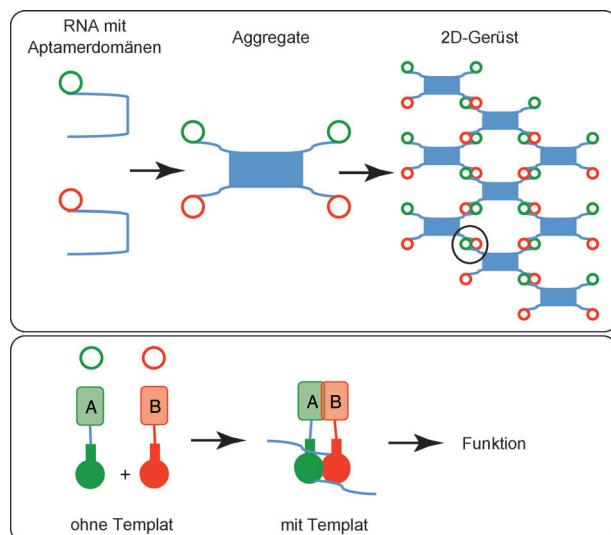


Abbildung 1. RNA-Architektur zur kontrollierten räumlichen Anordnung von Proteinen im Inneren von prokaryotischen Zellen. Oben: Aptamerdomänen enthaltene RNA-Strukturen (grüne und rote Kreise) werden durch die zelleigene Transkriptionsmaschinerie hergestellt und lagern sich spontan über Hybridisierungsdomänen (blaue Linien) zu „Kacheln“ zusammen, die sich wiederum ebenfalls spontan zu übergeordneten RNA-„Feldern“ organisieren. Unten: Vergrößerung des Ausschnittes im schwarzen Kreis des oberen Bildes. Zwei verschiedene Fusionsproteine A und B werden über die Aptamerdomänen auf der RNA-Matrix gebunden; dabei werden die Proteine in räumliche Nähe gebracht, was wiederum eine biologische Funktion induziert.

[*] Prof. Dr. G. Mayer, Dipl.-Biol. S. Lennarz,
Dipl.-Lebensmittelchem. F. Rohrbach, M. Sc. F. Tolle
Life & Medical Sciences Institute, University of Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
E-Mail: gmayer@uni-bonn.de
Homepage: <http://www.mayerlab.de>

[**] Wir danken allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für ihre Beiträge sowie der DFG und dem BMBF für finanzielle Unterstützung.

([FeFe]-Hydrogenase und Ferredoxin) in räumliche Nähe gebracht, wodurch eine über 20fach erhöhte Wasserstoffproduktion gegenüber der Reaktion ohne Templat erhalten wurde. Dies demonstriert die erfolgreiche RNA-vermittelte Kolokalisation der katalytischen Kaskade.

Multienzymatische Prozesse sind oft räumlich hoch organisiert, wodurch eine effiziente Weitergabe der Substrate an das nächste katalytische Zentrum damit eine gesteigerte Ausbeute sequenzieller metabolischer Reaktionen möglich werden. Die Arbeit von Delebecque et al. eröffnet nun den Zugang zu künstlichen Reaktionspfaden für die In-vivo-Produktion von beispielweise Treibstoffen, Medikamenten oder Chemikalien, die durch traditionelle chemische Synthesen schlecht zugänglich sind. Anders als bei DNA-basierten An-sätzen kann RNA durch die zelleigene Transkriptionsmaschinerie im Inneren lebender Zellen produziert werden und sich somit dort, wie von Delebecque et al. gezeigt, autonom zu komplexen Gerüststrukturen zusammenlagern.

In einer anderen Studie haben Paige et al. eine simple, aber elegante Strategie entwickelt, um fluoreszierende Markierungen zur Visualisierung von RNA-Molekülen in lebende Zellen einzuführen. Ausgehend vom Fluorophor 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)imidazolin-5-on (HBI), der auch in GFP gefunden wird, wurde ein Analogon synthetisiert und zur Selektion eines RNA-Aptamers verwendet. GFP erhält seine Fluoreszenzeigenschaften infolge einer korrekten Protein-faltung, einer autokatalytischen intramolekularen Cyclisie- rung und einer Koordination des resultierenden Fluorophors über Wasserstoffbrücken.^[5] In Anlehnung daran wurden für das HBI-Analogon 3,5-Difluor-4-hydroxybenzyliden (DFHBI) mithilfe von In-vitro-Selektion RNA-Aptamere gefunden, die nicht nur DFHBI erkennen, sondern auch seine Fluoreszenz aktivieren.

Das so erhaltene Aptamer, wegen seiner Fluoreszenzeigenschaften „Spinach“ (Spinat) genannt, wurde in native 5S-RNA geklont und in Säugetierzellen (HEK293T) exprimiert, woraufhin nach Zugabe von DFHBI eine Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Angesichts der enormen Bedeutung von GFP und seinen Derivaten für die Proteincharakterisierung und Zellbiologie lässt sich erahnen, welch enormen Einfluss diese „grün fluoreszierenden RNAs“ (GFRs) für die Visualisierung der nativen RNA-Dynamik in lebenden Zellen haben könnten. Der „Spinach“-DFHBI-Komplex zeigt ähnliche Fluoreszenzeigenschaften wie GFP, ist aber wesentlich stabiler gegen Photobleichung. „Spinach“ wurde bereits zur Analyse der intrazellulären Dynamik endogener RNAs in lebenden Säugetierzellen eingesetzt, wobei die Bildung und Translokation von 5S-RNA durch die Fluoreszenz des Komplexes visualisiert wurde. Die Klonierung der „Spinach“-Sequenz in ein interessierendes RNA-Molekül könnte die Verfolgung verschiedener endogener RNAs z. B. in Säugetierzellen ermöglichen (Abbildung 2). Durch den Einsatz verschiedener GFRs ließe sich auch eine Vielzahl endogener RNAs simultan untersuchen.

Paige et al. gelang es, verschiedene RNA-Fluorophor-Komplexe herzustellen, die praktisch das ganze sichtbare Lichtspektrum abdecken, allerdings haben die meisten dieser Komplexe niedrige Quantenausbeuten und eignen sich somit

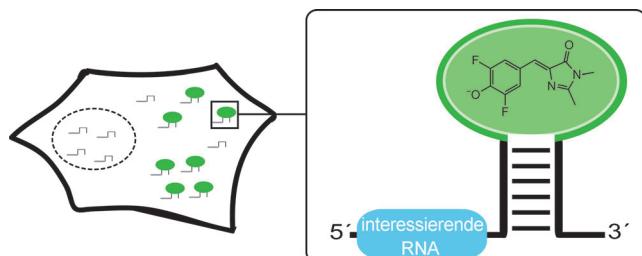


Abbildung 2. Lebendzellvisualisierung des „Spinach“-DFHBI-Komplexes. „Spinach“ ist ein RNA-Aptamer, das an DFHBI bindet und so dessen Fluoreszenz aktiviert. Die Sequenz von „Spinach“ kann in ein zu analysierendes RNA-Molekül kloniert werden und ermöglicht damit die Untersuchung endogener RNA in lebenden Säugetierzellen.

nicht für anspruchsvolle mikroskopische Anwendungen. Strukturuntersuchungen und ein damit einhergehendes, tieferes Verständnis könnten die Entwicklung verbesserter RNA-Fluorophor-Paare mit unterschiedlichen Emissionsmaxima, wie es bei GFP und seinen Derivaten der Fall ist, und so die Visualisierung der Kolokalisation verschiedener RNA-Moleküle und Proteine ermöglichen. In Kombination mit anderen RNA-Werkzeugen könnte dieses System hilfreich sein, um beispielsweise allosterische oder FRET-Sonden zu entwickeln, die nach der Aptamerbindung an das jeweilige Ziel fluoreszieren.^[6] Damit würde dann nicht nur die Lokalisation, sondern auch die quantitative Analyse der Zielstruktur möglich sein.

Beide Publikationen demonstrieren das enorme Potenzial von RNA-Aptameren zur Herstellung synthetischer Multienzymkomplexe ebenso wie zur Verfolgung biologischer Funktionen im Inneren von Zellen. Die Einfachheit, mit der Aptamere generiert werden können, und die Möglichkeit zur modularen Kombination ermöglichen eine breite Anwendung, hier gezeigt am Beispiel von Lokalisation, Visualisierung und räumlicher Ausrichtung von RNA und anderen Biomolekülen in der Zelle, die zu den größten Herausforderungen biologischer Assays zählen. Die beiden Arbeiten machen deutlich, dass RNA-Elemente dazu beitragen können, unser Wissen über diese Prozesse zu vertiefen, und vielfältige Anwendungen finden können. Damit erweist sich wieder einmal die Fähigkeit von RNA-Bauteilen, ähnlich wie Proteine, komplexe Strukturumgebungen darzustellen.

Eingegangen am 19. September 2011
Online veröffentlicht am 15. November 2011

- [1] J. Krol, I. Loedige, W. Filipowicz, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 597–610.
- [2] G. Mayer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2710–2727; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672–2689.
- [3] C. J. Delebecque, A. B. Lindner, P. A. Silver, F. A. Aldaye, *Science* **2011**, *333*, 470–474.
- [4] J. S. Paige, K. Y. Wu, S. R. Jaffrey, *Science* **2011**, *333*, 642–646.
- [5] A. Miyawaki, T. Nagai, H. Mizuno, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 557–562.
- [6] J. L. Vinkenborg, N. Karnowski, M. Famulok, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 519–527.