

Neue Erkenntnisse zur Genregulation – hochauflöste Strukturen von Cobalamin-Riboschaltern**

Marie F. Soulière, Andrea Haller, Tobias Santner und Ronald Micura*

B_{12} -Cofaktor · Faltung · Genexpression · Metabolite · RNA

Seit der Entdeckung der ersten mRNA-Riboschalter im Jahr 2002 hat sich das Konzept, dass kleine Moleküle, zumeist Metabolite, direkt an die naszierende RNA-Kette binden und dadurch sich gegenseitig ausschließende Faltungswege einleiten, für viele Bakterien, aber auch andere Organismen bestätigt.^[1] Diese Interaktion resultiert in der Hoch- oder Niederregulierung der Expression des entsprechenden Gens.^[2] Die unterschiedliche Natur der Liganden, die an dieser Strategie teilnehmen, reicht von Enzym-Cofaktoren und Nukleotidvorläufern bis hin zu Aminosäuren und Ionen. Dazu gehören Adenosylcobalamin (AdoCbl), Thiaminpyrophosphat, Adenin, Guanin, 7-Aminomethyl-7-deazaguanin (preQ₁), S-Adenosylmethionin, S-Adenosylhomocystein, Adenosintriphosphat, Lysin, Glycin, Glutamin, Tetrahydrofolat, Flavinmononukleotid, cyclisches Diguanylat, Glucosamin-6-phosphat, Fluorid- und Magnesium-Ionen, und wahrscheinlich viele mehr, die zukünftig noch entdeckt werden.

Die Größe der Metabolit-bindenden RNA-Domäne reicht von 34 Nukleotiden für preQ₁^[3] bis hin zu 200 Nukleotiden für AdoCbl.^[1a] Bemerkenswerterweise konnte für fast alle oben genannten Riboschalter die dreidimensionale Struktur der Aptamerdomäne im Ligand-gebundenen Zustand mittels hochauflösender Röntgen-Strukturaufklärung gelöst werden, was wesentlich zum Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Systeme beitrug.^[4] Im Gegensatz dazu entzieht sich die am 3'-Ende angrenzende Expressionsplattform normalerweise der Kristallisation, ebenso wie viele apo-Formen der Aptamere. Dies spiegelt die intrinsisch dynamische Natur von Ligand-freien Riboschaltern wider und geht mit der Tatsache einher, dass Expressionsplattformen eine weit weniger konservierte Konsensussequenz als Aptamere aufweisen.^[5] Erstere sind entstanden, um strukturelle Voraussetzungen zu erfüllen, die für die unterschiedlichen Wirkungsarten der Genexpression benötigt werden. Dies

betrifft in erster Linie die Transkriptions- und Translationsebene, aber auch die Kontrolle von Spleißstellen, mRNA Abbau und vermutlich weitere grundlegende zelluläre Prozesse, deren Steuerung durch Riboschalter erst noch entdeckt werden muss.

In dieser Hinsicht erscheint es nicht unverständlich, dass sich der größte bekannte und überaus komplexe Cobalamin-Riboschalter (der als einer der ersten seiner Art entdeckt wurde, wenn nicht sogar als allererster)^[1a,d] der dreidimensionalen Strukturbestimmung und der Aufklärung seines molekularen Mechanismus mehr als eine Dekade lang entzog. Erst kürzlich gelang es den Forschungsgruppen um R. Batey^[6] und A. Serganov^[7] unabhängig voneinander, hochauflöste Kristallstrukturen von Cobalamin-Riboschaltern zu erhalten. Gemeinsam mit einer Anfang diesen Jahres erschienenen funktionellen Studie von T. Pan^[8] und Mitarbeitern über den Ligand-induzierten Faltungsweg führen diese Untersuchungen zu einem detaillierten molekularen Verständnis für das Cobalamin-spezifische Ansprechen von mRNAs.

Eine erste wichtige Erkenntnis der neuen Arbeiten ist, dass AdoCbl nicht das einzige B_{12} -Cofaktor-Derivat ist,^[9] das an diese Riboschalter-Familie mit hoher Affinität bindet. In Zellversuchen entdeckten Batey und Mitarbeiter, dass einige Cobalamin-Riboschalter aus marinen cyanobakteriellen und ökologischen (env) Genomen von Meeresoberflächenproben bedeutend höhere Affinitäten zu Methylcobalamin (MeCbl) oder Aquocobalamin (AqCbl) als zu AdoCbl (Abbildung 1) aufwiesen. Dieser Unterschied, der in direkter Relation zur An- bzw. Abwesenheit einer peripheren Strukturerweiterung (P8-P11; siehe unten) steht, führt zur Definition von zwei Klassen von Cobalamin-Riboschaltern (Abbildung 2).^[10] Beide Klassen besitzen einen gemeinsamen Grundkörper, der aus einer evolutionär konservierten Vierwege-Kreuzung („four-way junction“) besteht, die für die Erkennung des Cobalamins verantwortlich ist. Zusätzlich verwenden beide Klassen eine „kissing-loop“ Interaktion zwischen der Schleife L5 des Hauptrezeptors und der Schleife L13 der Nebenregion, welche die Expressionsmaschinerie dirigiert. Bei transkriptionsregulierenden Cobalamin-Riboschaltern repräsentiert L13/P13 normalerweise den Antiterminator, während bei denen, die die Translation regulieren, L13 kritische Sequenzabfolgen beinhaltet, die an der Freigabe oder Sequenzierung der ribosomalen Bindungsstelle (RBS) beteiligt sind. Die beiden Klassen von Cobalamin-Riboschaltern unter-

[*] Dr. M. F. Soulière, Mag. A. Haller, Mag. T. Santner, Prof. Dr. R. Micura
Institut für Organische Chemie (IOC) und Center for Molecular Biosciences (CMBI), Universität Innsbruck, Center für Chemie und Biomedizin (CCB)
6020 Innsbruck (Österreich)
E-Mail: ronald.micura@uibk.ac.at

[**] Wir danken Robert T. Batey (University of Boulder) und Alexander Serganov (NYULMC) für das Bereitstellen der Manuskripte und pdb-Daten vor ihrer Veröffentlichung.

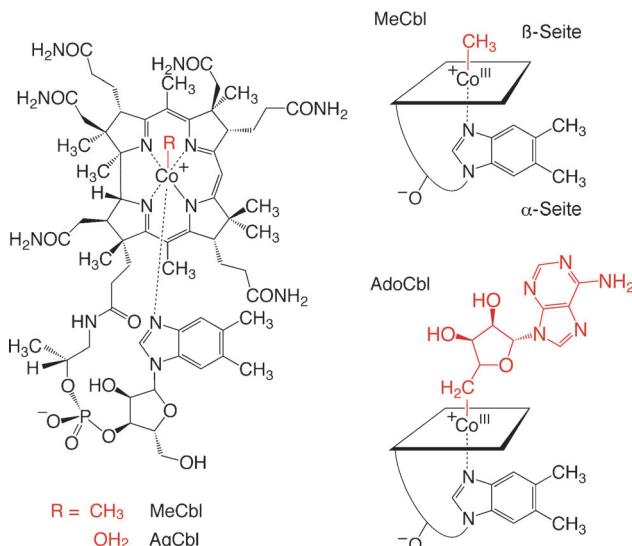


Abbildung 1. Strukturformel der Cobalamine Methylcobalamin ($R = \text{CH}_3$, MeCbl), Aquocobalamin ($R = \text{H}_2\text{O}$, AqCbl) und Coenzym-B₁₂ ($R = 5'$ -Desoxy-5'-adenosyl, Adenosylcobalamin, AdoCbl) und verwendete Symbole für diese Cbls.

scheiden sich durch eine ausgedehnte periphere Verlängerung von P6 (mit P7, P8, P10 und P11) für die AdoCbl-Klasse, und außerdem durch einen zusätzlichen Stamm P2 zwischen P1 und P3 (Abbildung 2). Die P6-Erweiterung und der zusätzliche Stamm P2 fehlen bei der MeCbl/AqCbl Bindungsklasse gänzlich oder sind stark gekürzt.

Frühere Sekundärstrukturvorhersagen, die auf bioinformatischen Sequenz- und chemischen Modifizierungsuntersuchungen beruhten,^[1a,10,11] sind in den 3D-Strukturen in gleicher Weise widergespiegelt. Zwei der neu gelösten Strukturen beziehen sich auf AdoCbl-bindende Riboschalter. Einer von ihnen entstammt dem transkriptionsregulierenden System aus *Symbiobacterium thermophilum*; die untersuchte RNA besteht aus dem Rezeptor-Grundkörper und der peripheren P6-Verlängerung, P13/L13 fehlen jedoch.^[7] Diese Struktur ergänzt die zweite Struktur eines translationsregulierenden Vollängensystems aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* (*Tte*), welches das ausschlaggebende Regulationselement P13/L13 enthält.^[6] Im Vergleich mit den Strukturen der Klasse der viel kleineren AqCbl-bindenden Riboschaltern (*env8AqCbl*), wovon wiederum eine Struktur mit und eine ohne P13/L13 ist, wird die Art und Weise der Cobalamin/RNA-Erkennung durch diese profunde Strukturdatenbasis offensichtlich.^[6]

Die globale Architektur aller vier Ligand-gebundenen RNAs offenbart eine koaxiale Stapelung der Stämme P1/P3/P6 und P4/P5/P13 (Abbildung 2). Diese beiden Anordnungen sind in der AqCbl-Klasse direkt miteinander verbunden, und zwar durch Wechselwirkungen zwischen L4 und L6. Die klassenspezifischen peripheren Verlängerungen (P6 versus P6–P11) grenzen an den Grundkörper und beeinflussen die Konformation von J6/3 signifikant, die eine Schlüsselrolle für die Liganderkennung darstellt. Diese Anordnung dient der Ausbildung einer Bindungstasche für Cobalamin in Form einer tiefen Kluft. Bedeutenderweise ist die van-der-Waals-

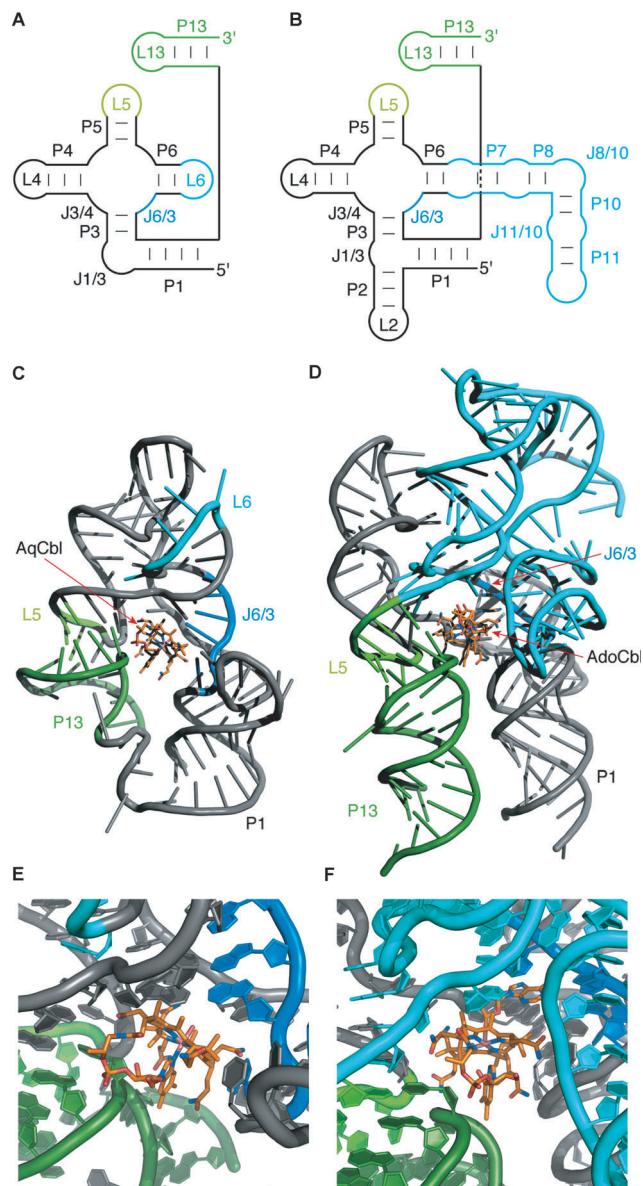


Abbildung 2. Cobalamin-sensitive Riboschalter. Sekundärstruktur für AqCbl- und MeCbl- (A) und für AdoCbl- (B) Bindungsklassen; C) Darstellung des AqCbl-gebundenen Riboschalters *env8AqCbl*; D) Darstellung des AdoCbl-Riboschalters aus *Tte*; E, F) Ausschnitt aus der AqCbl-Bindungstasche (E) und der AdoCbl-Bindungstasche (F).^[6]

Oberflächenkomplementarität zwischen Cobalamin und RNA-Bindungstasche die treibende Kraft der Interaktion. Der Ligand bedient sich dabei nicht zur Gänze des vollen Wasserstoffbrückenbindungszeitraums, um mit der RNA zu interagieren, stattdessen sind hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen charakteristisch. In beiden Klassen wird Cobalamin zwischen der kleinen Furche von P3/P6 und der aus Basenpaaren zwischen L5 und L13 geformten Helix eingeklemmt. Die entsprechenden RNA-Kristallstrukturen, denen P13/L13 fehlen, sind deckungsgleich mit ihren Volllängen-Gegenstücken und implizieren ein relativ starres Gerüst der offenen Rezeptordomäne, die sich durch Andocken des regulativen P13/L13 Elements über die „kissing-loop“-

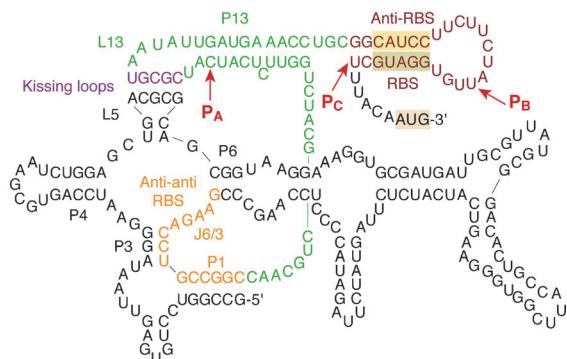
Interaktion zu L5 schließt und so Cobalamin einhüllt. Die Diskriminierung von AqCbl und AdoCbl erfolgt durch eine dichte Stapelung von Purinen in den einzelsträngigen Verbindungen (J3/4 und J6/3) von *env8AqCbl*, welche den Raum einschränken und sterisch mit großen Substituenten an der Cobalamin β -axialen Seite interferieren. Der Corrin-Ring ist dabei nahezu senkrecht zu den Basen des Purinbasenstapels orientiert.

Im Gegensatz dazu zeigt die AdoCbl-Bindungsklasse konformationelle Unterschiede in J6/3 auf, die aufgrund der peripheren Verlängerungen (P7–P11) ermöglicht werden. Dieses komplexe Interaktionsnetzwerk ermöglicht dem Riboschalter, den Adenosylrest von AdoCbl durch selektive Erkennung seiner Watson-Crick-Seite an der Hoogsteen-Kante eines konservierten Adenosinrests in einer Aushöhlung von J6/3 unterzubringen.

Die neuen Kristallstrukturen bieten nicht nur neue Erkenntnisse in die molekulare Erkennungsweise zwischen RNA und B_{12} -Cofaktoren, sondern zeigen auch, dass dieser Riboschalter durch Tertiärstrukturkontakte an der Schnittstelle zwischen Aptamer und Expressionsplattform seine regulative Funktion ausübt. Im Gegensatz dazu verwenden die meisten anderen Riboschalter ausschließlich Motivänderungen auf Sekundärstrukturebene für denselben Zweck. Dies hat entscheidende Konsequenzen, da sich RNA-Tertiärstrukturen generell wesentlich langsamer ausbilden als lokale Sekundärstrukturen. Dies ist umso wichtiger für B_{12} -Riboschalter, die sich gegenseitig ausschließende Sekundärstruktur motive in der Expressionsplattform verwenden (z.B. Antiterminator versus Terminator, oder ribosomale Bindungsstellen, welche durch definierte Nukleotidwechselwirkungen sequestriert oder freigesetzt werden). Solche Riboschalter-RNAs würden das Risiko eingehen, in einem von zwei möglichen Faltungspfaden gefangen zu bleiben und dadurch das Potenzial zur Regulation einzubüßen.^[2,5]

Wie die Zelle mit diesem Problem umgeht, beschrieben Pan und Mitarbeiter, indem sie experimentell aufzeigen, dass das Pausieren der RNA-Polymerase während der Transkription des AdoCbl-sensitiven Riboschalters aus *Escherichia coli* *btuB* ein fundamentales Ereignis darstellt.^[8] Die Autoren identifizierten Verweilstellen an strategischen Positionen, welche die Faltung und strukturelle Umlagerung des Vollängen-Riboschalters erleichtern, jedoch nur einen minimalen Effekt auf die Faltung der isolierten Aptamerdomäne haben. Das Innehalten an diesen Regulationsstellen verhindert die Bildung alternativer Strukturen und hat eine Chaperonfunktion bei dem Zusammenspiel zwischen der Faltung des Aptamers und der Expressionsplattform. Genauer gesagt stellt die anti-anti-RBS-Region einen Teil des Aptamers in der Coenzym- B_{12} -gebundenen Struktur (Gen-AUS-Struktur) dar, welche die Paarung der anti-RBS- mit der RBS-Region erlaubt (Abbildung 3A). In der apo-Struktur (Gen-AN-Struktur) ist die anti-anti-RBS Region mit der anti-RBS Region gepaart, um eine Antiaptamer-Struktur zu bilden, dadurch ist die RBS für das Ribosom zugänglich (Abbildung 3B). Eine der drei identifizierten Verweilstellen (P_A) befindet sich kurz vor der Schleife L13. Das naszierende Transkript außerhalb des RNA-Polymerase-Austrittskanals entspricht daher genau den erfolgreich kristallisierten Do-

A Ligand-gebunden, Gen-AUS: Aptamer und RBS Stamm-Schleife



B Ligand-frei, Gen-AN: Antiaptamer (apo-Riboschalter)

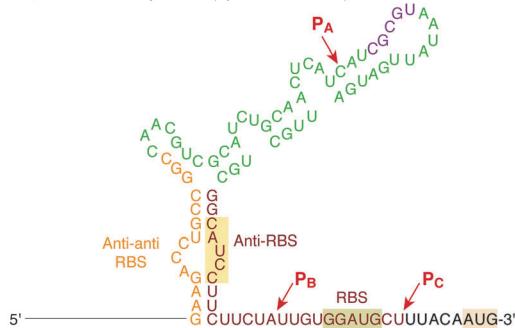


Abbildung 3. Sekundärstrukturmodelle der Gen-AUS- (A) und Gen-AN-Formen (B) für den AdoCbl-Riboschalter aus *E. coli* *btuB*. Drei definierte Verweilstellen (P_A , P_B , P_C), die kritisch für Faltung, Liganderkennung und Sekundärstrukturumlagerung der Expressionsplattform sind, wurden für die Transkription bei geringer Ligandkonzentration identifiziert.^[9]

mänen, denen das regulative Element P13/L13 fehlt. Dieser Teil des Transkripts faltet in die Aptamerstruktur, und das Aussetzen der Transkription stellt genügend Zeit zur Verfügung, sodass der Cobalamin-Ligand, sofern in ausreichender Konzentration vorhanden, von der RNA erkannt wird. Eine nachfolgende Verweilstelle (P_B) wurde identifiziert, welche darauf das P13/L13-Element vom Austrittskanal freisetzt und genügend Zeit für das Andocken und die Bildung der „kissing-loop“-Tertiärinteraktion zwischen L5/L13 bereitstellt, bevor die Polymerase mit der Transkription fortsetzt. Die nächste Verweilstelle (P_C) scheint hauptverantwortlich für die erforderliche Rückfaltung in den Antiaptamer-Zustand zu sein, sofern kein Cobalamin-Ligand vorliegt und der ursprüngliche Faltungsweg eingeschlagen werden muss, um die gegensätzliche Genregulationsantwort zu erhalten. Ein vergleichbarer Polymeraseverweilzeit-Mechanismus wurde schon experimentell für Flavinmononukleotid- und Thiaminpyrophosphat-Riboschalter^[12a,b] bestätigt und für andere (z.B. Purin-Riboschalter) vorgeschlagen^[12c,d] und könnte eine allgemeine Strategie der Zelle darstellen, um mit cotranskriptionellen Faltungsproblemen umzugehen.

Alle drei Studien gemeinsam liefern ein umfassendes Bild zum molekularen Mechanismus der hochgradig komplexen B_{12} -Riboschalter. Die Kombination hochauflösender Strukturdaten und funktioneller biochemischer Analysen offenbart, dass die Ligand-abhängige Faltung und Rückfaltung in einen cotranskriptionellen Prozess eingebettet ist, der von der

Transkriptionsrate und definierten Pausen der RNA-Polymerase abhängt.

Eingegangen am 10. Oktober 2012
Online veröffentlicht am 7. Januar 2013

- [1] a) A. Nahvi, N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1043–1049; b) A. S. Mironov, I. Gusalov, R. Rafikov, L. E. Lopez, K. Shatalin, R. A. Krenneva, D. A. Perumov, E. Nudler, *Cell* **2002**, *111*, 747–756; c) W. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker, *Nature* **2002**, *419*, 952–959; d) X. Nou, R. J. Kadner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7190–7195.
- [2] a) K. E. Deigan, A. R. Ferré-D'Amaré, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1329–1338; b) A. Serganov, D. J. Patel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 279–286; c) S. Blouin, J. Mulhbacher, J. C. Penedo, D. A. Lafontaine, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 400–416; d) T. M. Henkin, *Genes Dev.* **2008**, *22*, 3383–3390; e) H. Schwalbe, J. Buck, B. Furtig, J. Noeske, J. Wöhner, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1232–1240; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1212–1219; f) J. C. Cochrane, S. A. Strobel, *RNA* **2008**, *14*, 993–1002; g) A. D. Garst, A. L. Edwards, R. T. Batey, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, DOI: 10.1101/cshperspect.a003533; h) A. Haller, U. Rieder, M. Aigner, S. C. Blanchard, R. Micura, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 393–400.
- [3] a) A. Roth, W. C. Winkler, E. E. Regulski, B. W. K. Lee, J. Lim, I. Jona, J. E. Barrick, A. Ritwik, J. N. Kim, R. Welz, D. Iwata-Reuy, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 308–317; b) T. Santner, U. Rieder, C. Kreutz, R. Micura, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11928–11931.
- [4] A. Serganov, *RNA Biol.* **2010**, *7*, 98–103.
- [5] A. Haller, M. F. Soulière, R. Micura, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1339–1348.
- [6] J. E. Johnson, Jr., F. E. Reyes, J. T. Polaski, R. T. Batey, *Nature* **2012**, *492*, 133–137.
- [7] A. Peselis, A. Serganov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 1182–1184.
- [8] G. A. Perdrizet II, I. Artsimovitch, R. Furman, T. R. Sosnick, T. Pan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 3323–3328.
- [9] K. Gruber, B. Puffer, B. Kräutler, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4346–4363.
- [10] A. Nahvi, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 143–150.
- [11] S. Gallo, M. Oberhuber, R. K. Sigel, B. Kräutler, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1408–1414.
- [12] a) J. K. Wickiser, W. C. Winkler, R. R. Breaker, D. M. Crothers, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 49–60; b) T. N. Wong, T. Pan, *Methods Enzymol.* **2009**, *468*, 167–193; c) J. K. Wickiser, M. T. Cheah, R. R. Breaker, D. M. Crothers, *Biochemistry* **2005**, *44*, 13404–13414; d) U. Rieder, C. Kreutz, R. Micura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10804–10809.