

RNA-Schalter

Genregulatoren aus dem Baukasten – das Hammerhead-Ribozym

MARKUS WIELAND, JÖRG S. HARTIG

FACHBEREICH CHEMIE UND KONSTANZ RESEARCH SCHOOL CHEMICAL BIOLOGY,
UNIVERSITÄT KONSTANZ

Durch Verknüpfung von Aptamerdomänen mit dem Hammerhead-Ribozym kann man eine Liganden-abhängige Kontrolle über eine autokatalytische RNA-Spaltung erreichen. Solche allosterischen Ribozyme können vielseitig als artifizielle Genschalter eingesetzt werden.

Ligand-dependent in *cis*-cleavage of RNA can be achieved by attaching aptamers to the hammerhead ribozyme scaffold. Such allosteric ribozymes are versatile building blocks for rationally designed artificial riboswitches.

Die Entwicklung von neuen Schaltern zur Regulation der Genexpression ist ein wichtiges Teilgebiet der Synthetischen Biologie und Biotechnologie. Besonders bei der Herstellung von komplexen, regulatorischen Netzwerken benötigt man eine Vielzahl von unterschiedlichen Schaltern. Im Idealfall wäre dabei der Auslöser eines einzelnen Schalters im Voraus beliebig wählbar. Des Weiteren sollte solch ein Schaltelement mit anderen frei kombinierbar sein. Immer noch werden hauptsächlich Protein-basierte Genschalter

benutzt, obwohl gerade RNA-basierte Schalter einige interessante Vorteile aufweisen.

Natürliche RNA-Schalter

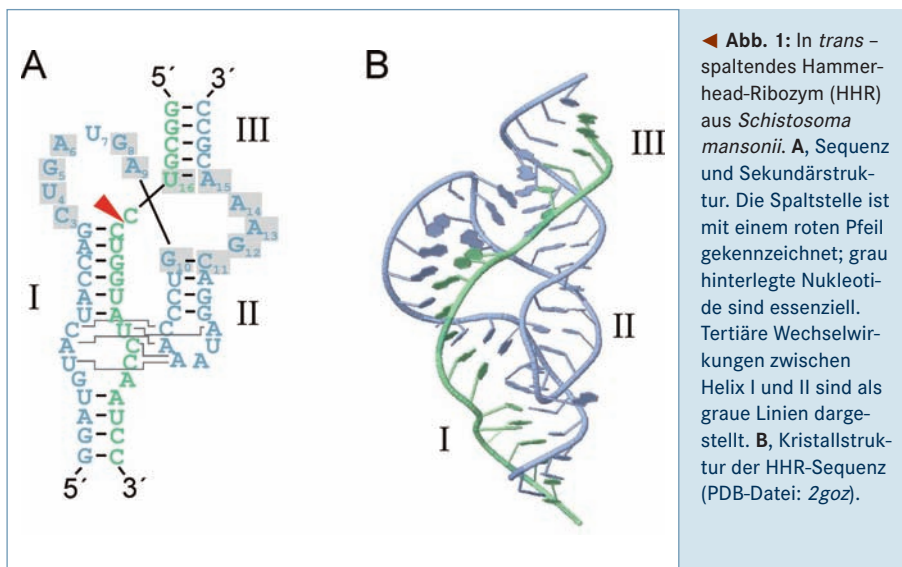
Erst 2002 wurden die ersten natürlichen Genschalter in bakterieller mRNA entdeckt, deren Wirkungsweise ausschließlich auf der Wechselwirkung zwischen Liganden und RNA beruhen und die damit völlig unabhängig von regulatorischen Proteinen arbeiten [1]. Bis heute wurde eine Vielzahl solcher Riboschalter (*riboswitches*) identifiziert, die jedoch

fast alle einen vergleichbaren Aufbau aufweisen: Sie bestehen gewöhnlich aus einer Aptamerdomäne, die für die Bindung eines spezifischen Liganden verantwortlich ist, und einer Expressionsplattform, welche die Genexpression beeinflusst. Die Bindung des Liganden führt zu einer Änderung der Aptamer-Sekundärstruktur, was wiederum die Faltung der Expressionsplattform beeinflusst. In Bakterien hat dies zur Folge, dass je nach Art des RNA-Schalters die Ausbildung eines Transkriptions-Terminators oder die Initiation der Translation selbst beeinflusst wird [1]. Charakteristisch für *riboswitches* ist ein hoher Grad an Modularität, da verschiedene Aptamerdomänen mit unterschiedlichen Expressionsplattformen verknüpft sein können.

Künstliche RNA-Schalter

Dieser einfache, aber äußerst effektive Aufbau diente als Grundlage für die Herstellung von künstlichen RNA-Schaltern. Synthetisch hergestellte Aptamere wurden nahe der Ribosomen-Bindestelle (RBS) eines Reportergens eingefügt und dadurch die Kontrolle über die Translationsinitiation in Bakterien erhalten [2, 3]. Dabei dient als Expressionsplattform meist eine kurze RNA-Sequenz, die Liganden-abhängig die RBS und somit die Translation blockiert.

Dieses verhältnismäßig einfache System wurde von uns dahingehend weiterentwickelt, dass ein Hammerhead-Ribozym (HHR) als Expressionsplattform verwendet werden konnte. Die katalysierte RNA-Selbstspaltung kann durch eine Verknüpfung mit einem Aptamer Liganden-abhängig gestaltet werden, wodurch ein sogenanntes allosterisches Ribozym oder auch kurz Aptazym entsteht. Das HHR selbst besteht aus einem konservierten katalytischen Zentrum, welches von den drei variablen Helices I, II und III flankiert wird (Abb. 1). Außerdem stabilisieren tertiäre Wechselwirkungen zwischen den Helices I und II die katalytisch aktive Faltung des HHR und ermöglichen erst dadurch die RNA-Spaltung bei intrazellulären Magnesium-



Konzentrationen [4]. Die Verknüpfung eines Aptamers mit dem Ribozym ermöglicht darüber hinaus eine Liganden-abhängige Kontrolle der Spaltungsreaktion.

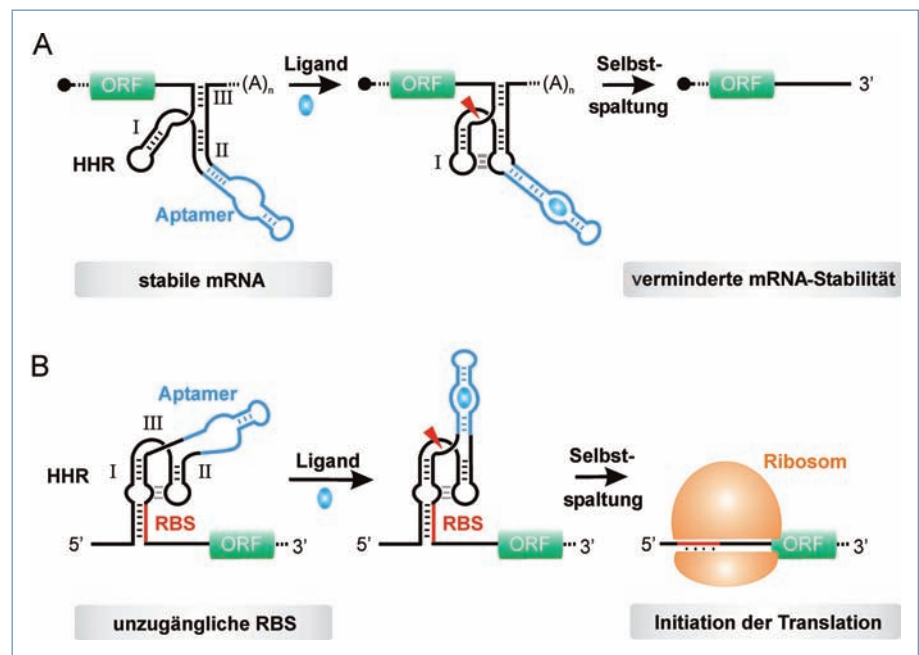
Im Wesentlichen werden zwei Prinzipien zur Konstruktion von Ribozym-basierten Schaltern ausgenutzt: (1) Essenzielle Segmente werden durch die Ribozym-Aktivität von der RNA abgetrennt, (2) Die Dissoziation der Spaltungsprodukte führt zu einer veränderten RNA-Sekundärstruktur.

Alle bisherigen HHR-basierten Genschalter lassen sich auf einen dieser beiden vereinfachten Mechanismen zurückführen. Bei der Entwicklung von neuen RNA-Schaltern könnte es deshalb hilfreich sein, diese als Ausgangspunkt zu benutzen.

Kontrolle der Translation von Boten-RNAs

Die ersten HHR-basierten RNA-Schalter wurden für eukaryotische Systeme entwickelt. Dabei wurde ein Aptazym in die untranslatierten Regionen (UTRs) einer mRNA eingefügt. Durch Selbstspaltung wurde dann entweder die essenzielle 5'-Cap-Struktur oder der 3'-Poly(A)-Schwanz abgetrennt. Die dadurch stark verminderte mRNA-Stabilität führte schlussendlich zu einer verringerten Genexpression. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass verschiedene Aptazyme gleichzeitig in eine UTR eingeführt werden können. So konnten auf einfachste Weise eine Reihe von logischen Gattern (Boole'sche Gatter) konstruiert werden, die mehrere Eingaben (Liganden) zu einem entsprechenden Ergebnis (Genexpression) prozessierten [5].

Um ein ähnliches System zur Kontrolle der Genexpression in Bakterien zu entwickeln, musste ein neuer Mechanismus entwickelt werden, da die mRNA-Stabilität in Bakterien nicht in gleicher Weise über Nukleasen reguliert wird. Wir erreichten dies durch eine Regulation der Sekundärstruktur der RBS und damit der Translationsinitiation [6]. Dazu wurde die RBS in eine verlängerte Helix I des HHR eingebaut und dadurch die Ribosomen-



▲ **Abb. 2:** Vergleich der Translationskontrolle durch ein Aptazym in eukaryotischen und bakteriellen Zellen. **A,** In eukaryotischen Zellen wird die Translation indirekt über die mRNA-Stabilität reguliert. **B,** In Bakterien kann direkt die Translationsinitiation kontrolliert werden, indem die Ribosomen-Bindestelle (RBS) in die Helix I des Ribozyms eingebaut wird. Roter Pfeil: Spaltstelle; HHR: Hammerhead-Ribozym; ORF: *open reading frame*. Weitere Erläuterungen siehe Text.

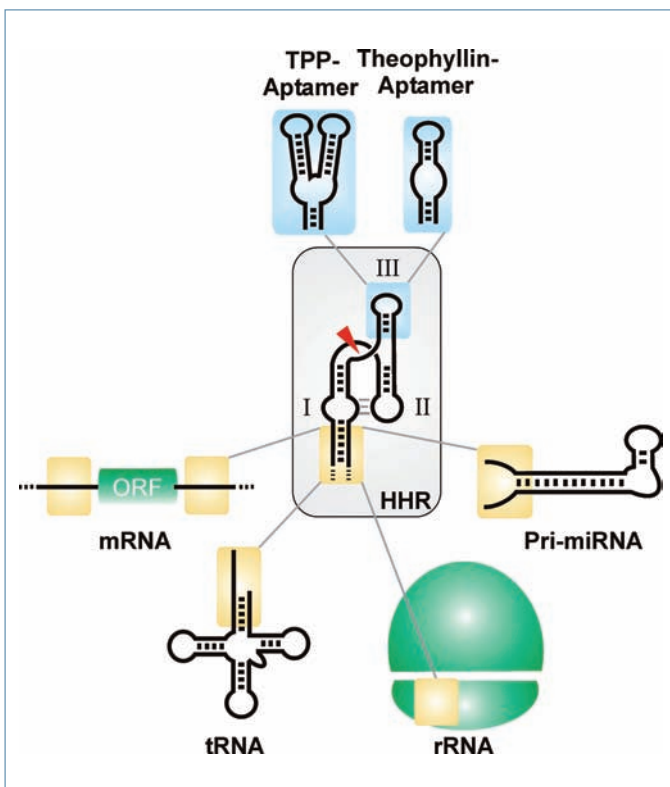
bindung an die mRNA verhindert. Nur durch Selbstspaltung des Ribozyms wurde die RBS wieder freigesetzt und erst daraufhin die Translation des Reportergens ermöglicht (**Abb. 2**). Somit ahmt das artifizielle System natürlich vorkommende, auf einer Regulation der Zugänglichkeit der RBS beruhende *riboswitches* nach. Nach einer Optimierung der Verknüpfungssequenz zwischen dem von uns verwendeten Theophyllin-Aptamer und dem Ribozym wurden Sequenzen erhalten, die eine Steigerung der Expression um einen Faktor 100 bei Zugabe des Liganden Theophyllin ins Medium zeigen [7].

Ein Vorteil der beschriebenen RNA-Schalter besteht in einem hohen Grad an Modularität, das heißt es können einzelne Domänen ausgetauscht werden, um neue Funktionen zu erhalten. Das Prinzip des zugrunde liegenden RNA-Schalters wird dabei nicht verän-

dert, sondern dient lediglich als Plattform für verschiedene Aptamerdomänen (**Abb. 3**). So konnte in dem hier beschriebenen Genschalter das Theophyllin-Aptamer durch eine andere Aptamerdomäne (für Thiaminpyrophosphat, TPP, aus dem natürlich vorkommenden TPP-*riboswitch*) ersetzt werden. Nach erneuter Sequenz-Optimierung identifizierten wir zahlreiche Schaltervarianten, welche die Genexpression entweder induzieren oder hemmen [8].

Kontrolle von Transfer-RNAs

Die universale und Protein-unabhängige Funktionsweise dieser RNA-Schalter sollte den Einsatz nicht auf die Kontrolle von mRNAs beschränken, sondern sich auch zur Regulation weiterer RNA-Klassen in Bakterien einsetzen lassen. Zu diesem Zweck verknüpften wir in einem ersten Beispiel ein



◀ **Abb. 3:** Das Hammerhead-Ribozym (HHR) kann vielseitig als Plattform für die Regulation von funktionalen RNAs verwendet werden. So können verschiedene Aptamere die Regulation durch unterschiedliche Liganden ermöglichen. Auf der anderen Seite können verschiedene RNA-Klassen wie z. B. mRNA, tRNA, rRNA und miRNA durch den Einbau von Ribozymen kontrolliert werden. TPP: Thiaminpyrophosphat; ORF: open reading frame.

Liganden-gesteuertes Ribozym mit einer tRNA [9]. Dazu wurde eine tRNA auf eine Weise mit dem Ribozym verknüpft, dass die typische Kleeblattfaltung der tRNA und somit die weitere Prozessierung und Aminoacylierung verhindert wird. Sobald das Ribozym sich aber von der tRNA absplattet, kann die ursprüngliche Kleeblattfaltung und somit die tRNA-Funktion hergestellt werden. Interessanterweise konnte das im mRNA-Kontext etablierte Theophyllin-abhängige Aptazym für dieses Konstrukt übernommen werden. Dies zeigt, dass sich solche funktionalen RNA-Domänen modular wie in einem Baukasten nicht nur miteinander kombinieren lassen, sondern dass sie auch in anderen Kontexten eingesetzt werden können.

Ribozyme zur Kontrolle von RNA-Interferenz

Noch beeindruckender ist allerdings, dass man das gleiche Theophyllin-abhängige Aptazym auch in eukaryotischen Systemen einsetzen kann. Ähnlich den beschriebenen mRNA- und tRNA-basierten RNA-Schaltern, konnte das HHR in eukaryotischen Zellen benutzt werden, um die Aktivität von mikroRNAs (miRNAs) zu regulieren. Dazu wurden wiederum Sequenzabschnitte der pri-miRNA (Primärtranskript) in die Helix I des Theophyllin-abhängigen Aptazyms eingebaut und somit die ursprüngliche Faltung zerstört. Das

entstandene HHR-pri-miRNA-Konstrukt konnte nicht mehr von der RNase Drosha erkannt und prozessiert werden, sodass die RNA-Interferenz gehemmt bleibt. Nur durch die Liganden-kontrollierte Spaltung und die darauffolgende Dissoziation der Spaltprodukte konnte die eigentliche Faltung und damit die Wirksamkeit der Knock-down-Aktivität der miRNA wiederhergestellt werden [10].

Ribozym-basierte Kontrolle der kleinen ribosomalen Untereinheit

Durch Verwendung von selbstspaltenden Ribozymen lässt sich sogar die Aktivität des Ribosoms in *E. coli* regulieren. Um dies zu erreichen, haben wir ein Liganden-abhängiges Aptazym an geeigneter Position in die 16S-rRNA eingefügt [11]. Dabei beeinträchtigte das Einfügen des Ribozyms in Helix 6 der 16S-rRNA die Aktivität des Ribosoms nicht. Erst die Ribozym-vermittelte Spaltung führte zur Deaktivierung der Translation. Auch in diesem Fall konnte eine Sequenz verwendet werden, die zuvor schon in einem anderen Kontext – nämlich der Kontrolle der mRNA-Translation mittels TPP [8] – bereits Anwendung fand. Besonders im Zusammenhang mit orthogonalisierten mRNA-Ribosomen-Paaren (welche hier verwendet wurden, [12]) könnten sich schaltbare Ribosomen als nützlich bei der Herstellung von komplexen Gen-Netzwerken erweisen. ■

Literatur

- [1] Tucker BJ, Breaker RR (2005) Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr Opin Struct Biol* 15:342–348
- [2] Desai SK, Gallivan JP (2004) Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *J Am Chem Soc* 126:13247–13254
- [3] Suess B, Hanson S, Berens C et al. (2003) Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res* 31:1853–1858
- [4] Khvorova A, Lescoute A, Westhof E et al. (2003) Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat Struct Biol* 10:708–712
- [5] Win MN, Smolke CD (2008) Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices. *Science* 322:456–460
- [6] Wieland M, Hartig JS (2008) Improved aptazyme design and *in vivo* screening enable riboswitching in bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* 47:2604–2607
- [7] Wieland M, Gfell M, Hartig JS (2009) An expanded hammerhead ribozyme scaffold for the regulation of bacterial gene expression. *RNA* 15:968
- [8] Wieland M, Benz A, Klausner B et al. (2009) Artificial ribozyme switches containing natural riboswitch aptamer domains. *Angew Chem Int Ed Engl* 48:2715–2718
- [9] Berschneider B, Wieland M, Rubini M et al. (2009) Small-molecule-dependent regulation of transfer RNA in bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* 48:7564–7567
- [10] Kumar D, An CI, Yokobayashi Y (2009) Conditional RNA interference mediated by allosteric ribozyme. *J Am Chem Soc* 131:13906–13907
- [11] Wieland M, Berschneider B, Erlacher MD et al. (2010) Aptazyme-mediated regulation of 16S ribosomal RNA. (im Druck)
- [12] Rackham O, Chin JW (2005) A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. *Nat Chem Biol* 1:159–166

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Jörg S. Hartig
Universität Konstanz
Fachbereich Chemie
Universitätstraße 10
D-78457 Konstanz
Tel.: 07531-88-4575
joerg.hartig@uni-konstanz.de

AUTOREN



Markus Wieland

Jahrgang 1981. 2001–2006 Life Science-Studium an der Universität Konstanz. 2007–2010 Promotion an der Universität Konstanz. Seit Februar 2010 Postdoc an der ETH Zürich.



Jörg Hartig

Jahrgang 1974. 1994–2003 Chemiestudium und Promotion in Bonn. 2003–2005 Postdoc an der Stanford University, CA, USA. Seit 2006 Lichtenberg-Professor (gefördert von der VolkswagenStiftung) für Biopolymer-Chemie am Fachbereich Chemie der Universität Konstanz.