

abzuwarten, ob sich diese Strategie der Expressionshemmung letztendlich bewährt. Die prinzipiellen Vorteile liegen auf der Hand: Wie das Antigenprinzip, so ist auch die Bindung/Blockierung des offenen Komplexes ein fast universelles Prinzip zur Inhibition der Genexpression.

Darüber hinaus sollten agPNA jedoch auch in der Lage sein, mehrere Spleißvarianten eines Gens mit einer einzigen Sequenz zu unterdrücken. Die Zelle verfügt in der Regel nur über zwei Kopien eines Gens, ganz im Gegensatz zur mRNA, die normalerweise in vielen hundert Kopien in einer Zelle vorliegen kann. Im Falle einer verbesserten Administration der agPNA sollte diese Methode daher diejenige der Antisense-Moleküle an Sensitivität und folglich auch im Hinblick auf die Selektivität noch übertreffen. Es bleibt spannend, diese Entwicklung auch in den kommenden Jahren weiter zu verfolgen.

Christoph Arenz
Humboldt Universität zu Berlin
Christoph.arenz@chemie.hu-berlin.de

- 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* 1991, 254, 1497–1500.
- 2) M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* 1993, 365, 566–568.
- 3) N. Svanvik, G. Westman, D. Y. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* 2000, 281, 26–35.
- 4) O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem.* 2005, 6, 69–77.
- 5) U. Landegren, R. Kaiser, J. Sanders, L. Hood, *Science* 1988, 241, 1077–1080.
- 6) S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *ChemBioChem.* 2005, 6, 2098–2103.
- 7) I. Boll, R. Krämer, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 7849–7856.
- 8) *Stellvertretend für eine Reihe aktueller Beispiele:* K. Albertshofer, A. M. Siwkowski, E. V. Wanczewicz, C. C. Esau, T. Watanabe, K. C. Nishihara, G. A. Kinberger, L. Malik, A. B. Eldrup, M. Manoharan, R. S. Geary, B. P. Monia, E. E. Swayze, R. H. Griffey, C. F. Bennett, M. A. Maier, *J. Med. Chem.* 2005, 48, 6741–6749.
- 9) T. Shirasaki, S. Pankratova, P. E. Nielsen, *Chem. Biol.* 2005, 12, 923–929.
- 10) I. V. Smolina, V. V. Demidov, V. A. Soldatenkov, S. G. Chasovskikh, M. D. Frank-Kamenetski, *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, e146.
- 11) B. A. Janowski, K. Kaihatsu, K. E. Huffman, J. C. Schwartz, R. Ram, D. Hardy, C. R. Mendelson, D. R. Corey, *Nature Chem. Biol.* 2005, 1, 210–215.

RNA-Schalter

◆ Bis vor kurzem sah man die Rolle der RNA nur als Überträger der genetischen Information von der DNA zu den Proteinen. Seit der Entdeckung, dass RNA auch strukturelle, katalytische und regulatorische Funktionen übernehmen kann, hat sich diese Sicht drastisch geändert. So ähneln RNA-Moleküle in ihrer strukturellen Vielfalt viel stärker den Proteinen als dem chemisch verwandten „Schwestermolekül“ DNA. RNA-Moleküle können komplexe dreidimensionale Strukturen annehmen, um Bindetaschen oder katalytische Zentren zu bilden und so als biologischer Katalysator, Regulator oder Strukturelement fungieren.

Das Spektrum der in den letzten Jahren neu entdeckten RNA-Moleküle ist sehr groß. Kleine, nicht kodierende RNA, bekannt als short interfering RNA (siRNA), micro RNA (miRNA) in Eukaryoten und small noncoding RNA (srRNA) in Bakterien können die Expression vieler Gene reprimieren, in dem sie entweder an komplementäre messenger RNA (mRNA) oder an Proteine binden und deren biologische Aktivität modulieren.^{1–4)} Solche RNA können ganze Signalketten in zellulären Adaptations- und Differenzierungsprozessen steuern, den Virulenzstatus pathogener Bakterien bestimmen oder als Masterregulatoren der globalen Genexpression wirken.

Alternative Konformationen – Grundlage RNA-basierter Genschalter

◆ Neben den kleinen nicht kodierenden RNA-Molekülen gibt es eine weitere Gruppe regulatorischer RNA-Moleküle, die RNA-Schalter. Diese Schalterelemente sind im 5'-untranslatierten Bereich, also vor

dem eigentlichen Genstart, lokalisiert. Dabei bildet der regulatorische Bereich der RNA mit dem kontrollierten mRNA-Transkript eine Einheit. Die RNA-Schalter können zwei sich gegenseitig ausschließende Konformationen einnehmen, wobei nur eine der beiden eine Expression des anschließenden Gens zulässt.

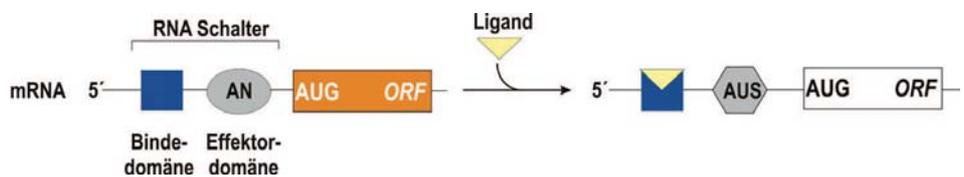
Änderungen der zellulären Bedingungen stabilisieren eine der beiden Konformationen. Die Information dazu übermitteln meist Effektormoleküle. Solche Effektoren können Sensorproteine, RNA-Moleküle, z. B. in Form von unbeladenen tRNA-Molekülen, oder die Stoffwechselzwischenprodukte selbst sein.⁵⁾

2002 entdeckte Breaker eine neue Klasse von RNA-Schaltern, die er „riboswitches“ nannte.^{5–8)} Diese Schalterelemente setzen sich aus zwei Domänen zusammen (Abbildung 1). Zum einen bilden sie eine Bindedomäne, mit der sie ihren Liganden über eine direkte Wechselwirkung detektieren können. Eine Effektor-domäne interpretiert dann den Status der Bindedomäne und beeinflusst über eine Konformationsänderung die Expression der nachfolgenden Gene direkt. Neu an diesen Schalterelementen ist also, dass sie nur aus RNA-Elementen aufgebaut sind und dabei die Sensor- und Regulatorfunktion in einem Molekül vereinen. Damit sind sie nicht auf zusätzliche Sensormoleküle, z. B. Proteinfaktoren, für die Signaldetektion angewiesen.

Grundsätzliche Mechanismen der RNA-Schalter

◆ RNA-Schalter sind an vielen grundlegenden Stoffwechselwegen in phylogenetisch unterschiedlichen Bakterienspezies beteiligt. In den meisten Fällen dienen sie der Rückkopplungsregulation: Wenn die Konzentration eines Metaboli-

Abb. 1. Grundsätzliche Organisation von RNA-Schaltern in bakteriellen mRNA. Die Bindung eines Liganden an die Bindedomäne stabilisiert eine alternative Konformation der Effektor-domäne. Dies führt zu einer veränderten Expression des nachfolgenden Gens. ORF (offener Leserahmen): Abschnitt der DNA-Sequenz zwischen dem Translations-Startsignal (AUG) und dem terminierenden Codon, der in eine Polypeptidsequenz translatiert werden kann.



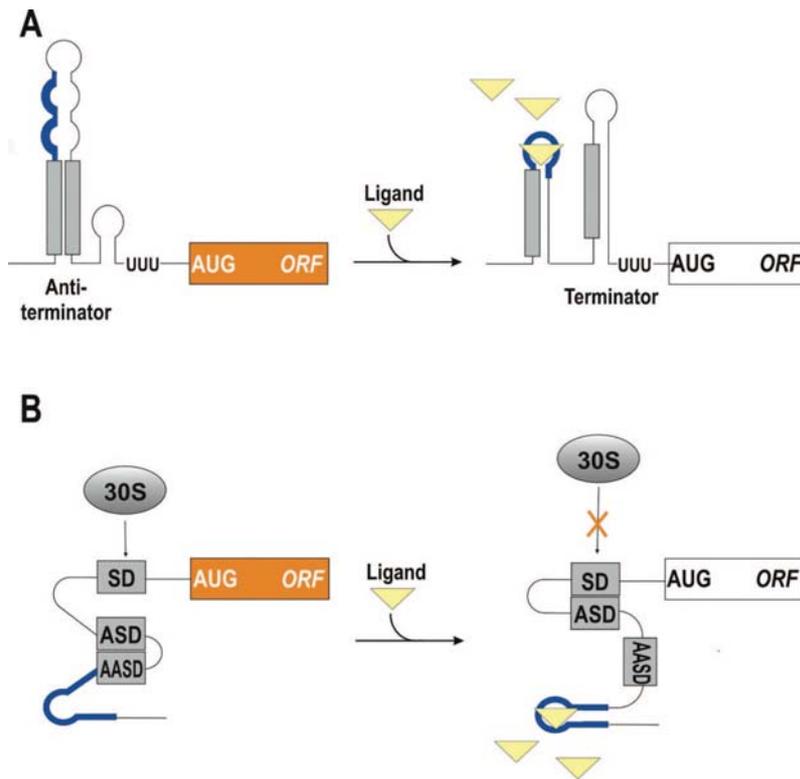


Abb. 2. Grundsätzliche Mechanismen der Genkontrolle durch RNA-Schalter.

A) Transkriptionskontrolle. Die Bindung des Liganden an die Bindedomäne (blau) bewirkt eine Umstrukturierung der Effektordomäne (grau). Dies führt zur Auflösung einer Antiterminator-Struktur und zur Bildung eines transkriptionellen Terminators. Dieser bewirkt den Abbruch der mRNA-Synthese.

B) Translationskontrolle. Die Bindung des Liganden an die Bindedomäne (blau) bewirkt eine Umstrukturierung in der Effektordomäne (grau) und führt zur Basenpaarung der ribosomalen Bindestelle (SD) mit einem komplementären Bereich (Anti-SD, ASD). In Abwesenheit des Liganden ist dieser mit einer SD-identischen Sequenz (Anti-Anti-SD, AASD) gepaart. Die SD-ASD-Basenpaarung führt zu einer Maskierung der ribosomalen Bindestelle, sodass diese für die Erkennung durch die kleine ribosomale Untereinheit (30S) unzugänglich wird.

ten in der Zelle einen bestimmten Wert überschritten hat, inhibiert er die Gene, die für seine Aufnahme und Biosynthese nötig sind. Dabei sind zwei grundsätzliche Mechanismen zu unterscheiden (Abbildung 2).

Ein Mechanismus ist die transkriptionelle Termination. Sie erfolgt zeitgleich mit der mRNA-Synthese am sich bildenden mRNA-Transkript. Der 5'-untranslatierte Bereich der mRNA bildet eine Stamm-Schleifen-Struktur (Antiterminator), die keinen Einfluss auf die mRNA-Synthese hat. Steigt die Konzentration des Liganden, bindet er an die Bindedomäne und bewirkt so eine Umstrukturierung in der Effektordomäne und die Bildung einer Terminatorstruktur. Dies führt zum Abbruch der mRNA-Synthese.⁹⁾

Der zweite Mechanismus besteht in der Maskierung der Bindestelle des Ribosoms (Shine-Dalgarno-Sequenz, SD). Wieder ist der 5'-untranslatierte Bereich hochstrukturiert, die Ribosomenbindestelle aber gut zugänglich. Eine steigende Ligandenkonzentration führt zur Besetzung der Bindedomäne, die eine Umstrukturierung der Effektordomäne bewirkt. Dies hat zur Folge, dass die SD in einen helicalen Bereich eingeschlossen und somit für das Ribosom unzugänglich wird. Die Translation ist damit verhindert.^{10,11)}

Die bisher identifizierten RNA-Schalter sind maßgeblich an der Regulation von Transport und Biosynthese vieler Vitamine sowie des Amino- und Nucleinsäurestoffwechsels beteiligt. Sie binden Liganden wie Adenosylcobalamin, Thiaminpyro-

phosphat, Flavinmononucleotid, S-Adenosylmethionin, Lysin, Glycin, Guanin und Adenin, wobei ihre Ligandenbindung hoch selektiv ist und Dissoziationskonstanten von 5 bis 300 nM aufweist.⁵⁻⁸⁾

RNA-Schalter – erst die Spitze des Eisbergs?

◆ Die Mehrzahl der charakterisierten RNA-Schalter funktioniert nach einem der beiden zuvor beschriebenen Mechanismen. Jedoch wurden in den letzten Jahren weitere RNA-Schalter identifiziert, die vermuten lassen, dass weitaus mehr Gene über direkte RNA-Ligand-Wechselwirkung reguliert werden. So gibt es Beispiele für positive Regulation wie im Fall des Adenin-Schalters, wo die Bindung des Liganden zwar auch zu einer Umstrukturierung der Effektordomäne führt, jedoch nicht der Terminator, sondern der Antiterminator stabilisiert wird. Dies aktiviert die Genexpression.¹²⁾

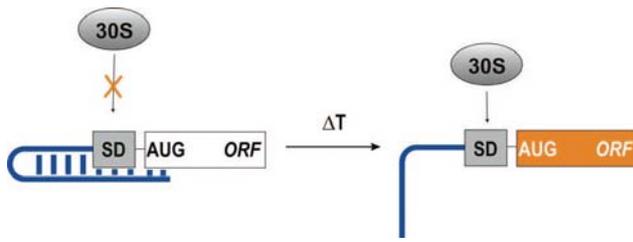
Ein neuartiger Mechanismus greift im Fall eines RNA-Schalters, der die Synthese eines Vorläufermoleküls der Zellwandsynthese, Glucosamin-6-phosphat, reguliert. Hierbei bewirkt die Ligandenbindung eine autokatalytische Spaltung dieser RNA. Dies hat wahrscheinlich die Degradation des nachfolgenden Gens zur Folge.¹³⁾ Der genaue Mechanismus dieser Regulation ist jedoch noch nicht geklärt.

Ein weiterer RNA-Schalter, der an der Glycin-Biosynthese beteiligt ist, besteht aus zwei Bindedomänen und misst die intrazelluläre Konzentra-



Beatrix Süß, Jahrgang 1971, studierte von 1989 bis 1994 Biologie in Greifswald und Erlangen und promovierte 1998 bei Wolfgang

Hillen, Erlangen. In der gleichen Arbeitsgruppe war sie, unterbrochen von einem Aufenthalt bei Renee Schroeder, Wien, bis 2000 als Postdoc tätig und forschte über Aptamer-vermittelte Translationsregulation. Seit 2001 arbeitet sie an ihrer Habilitation über regulatorisch aktive RNA-Moleküle.



tionen über kooperative Bindung.¹⁴⁾ Über In-silico-Analysen endogener Regionen in Bakterien wurden eine Reihe weiterer RNA-Schalter vorhergesagt. Derzeit sind diese Regulatoren noch nicht bis ins Detail charakterisiert. Sekundärstrukturanalysen deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei diesen um vollkommen neuartige Regulationsmechanismen handeln könnte.¹⁵⁾

RNA-Thermometer

◆ Eine weitere bemerkenswerte Klasse von RNA-Schaltern sind die RNA-Thermometer. Im Gegensatz zu den RNA-Schaltern, die auf ein chemisches Signal (An- und Abwesenheit eines Liganden) reagieren, detektieren RNA-Thermometer ein physikalisches Signal, die Veränderung der Umgebungstemperatur.

Alle bekannten RNA-Thermometer modulieren die Effizienz der Translation, indem sie den Zugang der Ribosomenbindestelle kontrollieren (Abbildung 3). Während bei moderaten Temperaturen die SD in einem helicalen Bereich eingeschlossen ist, führt eine Temperaturerhöhung zum Aufschmelzen und somit zur Freilegung der Bindestelle. Beispiele hierfür sind die Regulation von Hitzeschockgenen sowie die Kontrolle von Virulenzfaktoren einiger pathogener Bakterien, bei denen eine Temperaturerhöhung auf 37°C als kritisches Signal für die Infektion eines Wirtsorganismus dient.

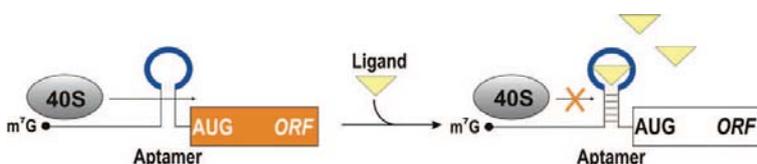
RNA-Schalter – ein Relikt aus einer RNA Welt?

◆ Kontrovers diskutiert wird die Frage, ob es sich bei RNA-Schaltern um ein phylogenetisch sehr altes Regulationsprinzip handelt, ein Relikt einer früheren RNA-Welt, da diese Schalterelemente vollkommen ohne Proteinfaktoren auskommen. Die physiologische Bedeutung von RNA-Schaltern in der heutigen Welt lässt sich nur erahnen, sollte aber nicht unterschätzt werden. Allein im Bodenbakterium *Bacillus subtilis* sind vermutlich mindestens 4% aller Gene durch RNA-Schalter reguliert.⁵⁾

Ähnlichkeiten bakterieller Binde-domänen aus RNA-Schaltern mit Sequenzen in Pflanzen und Pilzen, die über In-silico-Analysen identifiziert wurden, lassen vermuten, dass RNA-Schalter nicht nur in Bakterien, sondern auch in Eukaryoten existieren könnten.¹⁶⁾

Ein weites Feld für RNA-Ingenieure

◆ Die direkte Verknüpfung der Binde-domäne eines RNA-Schalters mit einer beliebigen Effektor-domäne eröffnet zudem ein breites biotechnologisches Anwendungsgebiet. Eine Möglichkeit ist dabei der Einsatz von RNA-Aptameren für die konditionale Genexpression, also dem gezielten An- und Abschalten eines Gens. Aptamere sind kleine, in vitro selektierte RNA-Moleküle, die mit hoher Affinität und Spezifität eine Vielzahl an Li-



ganden binden können. In den 5'-untranslatierten Bereich einer mRNA inseriert, können sie als Komplex mit ihrem Liganden mit initialen Schritten der Translation interferieren. In Abwesenheit des Liganden hat das Aptamer keinen Einfluss auf die Genexpression (Abbildung 4).¹⁷⁾

Eine Reihe weiterer RNA-Schalter, die in den letzten Jahren über rationales Design und In-vitro-Selektion entwickelt wurden, zeugen vom enormen Potential, welches das Prinzip der direkten Liganden-RNA-Wechselwirkung für die gezielte, ligandengesteuerte Manipulation biologischer Prozesse bietet.¹⁸⁾

Beatrix Süß
Universität Erlangen-Nürnberg
bsuess@biologie.uni-erlangen.de

- 1) G. Meister, T. Tuschl, Nature 2004, 16, 343.
- 2) L. He, G. J. Hannon, Nature Rev. Genet. 2004, 5, 522.
- 3) S. Gottesman, Annu. Rev. Microbiol. 2004, 58, 273.
- 4) G. Storz, J. A. Obdyke, A. Zhang, Curr. Opin. Microbiol. 2004, 7, 140.
- 5) W. C. Winkler, Arch. Microbiol. 2005, 183, 151.
- 6) E. Nudler, A. S. Mironov, Trends Biochem. Sci. 2004, 29, 11.
- 7) F. J. Grundy, T. M. Henkin, Curr. Opin. Microbiol. 2004, 7, 126.
- 8) W. C. Winkler, R. R. Breaker, Annu. Rev. Microbiol. 2005, 59, 487.
- 9) W. C. Winkler, S. Cohen-Chalamish, R. R. Breaker, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99, 15908.
- 10) W. C. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker, Nature 2002, 419, 952.
- 11) A. S. Mironov, I. Gusarov, R. Rafikov, L. E. Lopez, K. Shatalin, R. A. Krenova, D. A., Perumov, E. Nudler, Cell 2002, 111, 747.
- 12) M. Mandal, R. R. Breaker, Nature Struct. Mol. Biol. 2004, 11, 29.
- 13) W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, Nature 2004, 428, 281.
- 14) M. Mandal, M. Lee, J. E. Barrick, Z. Weinberg, G. M. Emilsson, W. L. Ruzzo, R. R. Breaker, Science 2004, 306, 275.
- 15) K. A. Corbino, J. E. Barrick, J. Lim, R. Welz, B. J. Tucker, I. Puskarz, M. Mandal, N. D. Rudnick, R. R. Breaker, Genome Biol. 2005, 6, R70. J. E. Barrick, K. A. Corbino, W. C. Winkler, A. Nahvi, M. Mandal, J. Collins, M. Lee, A. Roth, N. Sudarsan, I. Jona, J. K. Wickiser, R. R. Breaker, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 6421.
- 16) N. Sudarsan, J. E. Barrick, R. R. Breaker RNA 2003, 9, 644.
- 17) B. Suess, S. Hanson, C. Berens, B. Fink, R. Schroeder, W. Hillen, Nucleic Acids Res. 2003, 31, 1853.
- 18) G. Bauer, B. Suess, J. Biotechnol., im Druck.

Abb. 3. Translationskontrolle über RNA-Thermometer. Die Bindestelle für das Ribosom (SD) ist in einen helicalen Bereich eingebunden, der sie für die Erkennung durch die kleine ribosomale Untereinheit (30S) unzugänglich macht. Temperaturerhöhung führt zum Aufschmelzen der helicalen Struktur, die SD wird demaskiert und die nachfolgenden Gene exprimiert.

Abb. 4. Translationskontrolle durch künstliche RNA-Schalter. Ein in vitro selektiertes RNA-Molekül (Aptamer) wird in den 5'-untranslatierten Bereich einer mRNA inseriert. Erst durch Ligandenbindung wird die Struktur des Aptamers so stabilisiert, dass es ein Hindernis für das Ribosom ist.