

Wie Riboschalter die Transkription an- und ausschalten

Ulrike Rieder, Christoph Kreutz, Ronald Micura (2010): Folding of a transcriptionally acting PreQ1 Riboswitch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, doi: 10.1073/pnas.0914925107



Nicht-codierende mRNA-Abschnitte – die sogenannten Riboschalter – können nach Ligandenbindung an ihre 5'-gelegene Aptamerdomäne die Struktur der anliegenden Expressionsplattform verändern und so die Transkription terminieren oder die Initiation der Translation unterbinden. So sah die bisherige Modellvorstellung der Riboschalter-Funktion aus. Doch wie das Umschalten genau funktioniert, war im Detail unbekannt. Anfang Juni ist es der Gruppe von Prof. Dr. Ronald Micura vom CMBI der Universität Innsbruck gelungen, erstmals Licht ins Dunkel des Riboschalter-Mechanismus zu bringen. Durch vergleichende Struktur- und Markierungsexperimente einzelner Nukleotide des bakteriellen Riboschalters PreQ1, der den Liganden 7- Aminomethyl-7-deazaguanin (PreQ1) bindet und als Transkriptionsterminator wirkt, entdeckte Erstautorin Ulrike Rieder, dass zwei Konformationen des Riboschalters in einem definierten Gleichgewicht vorliegen. Durch die Ligandenbindung wird dieses Gleichgewicht verschoben, wobei ein einziges Nukleotid als An/Aus-Schalter fungiert. Das verbesserte molekulare Verständnis der Riboschalter-Funktion legt die Grundlage für diverse neue Versuche, zum Beispiel um Riboschalter zu designen, die nach Bindung ihrer Liganden definierte Effektorfunktionen ausführen.

Die Südtirolerin Ulrike Rieder absolvierte 2007 ihr Chemiestudium an der Universität Innsbruck mit Auszeichnung. Derzeit arbeitet sie an ihrer Dissertation und als Strahlenschutzbeauftragte am Institut für Organische Chemie in Innsbruck in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ronald Micura. Ihr Forschungsschwerpunkt bezieht sich dabei auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Riboschaltern zur Regulierung der Genexpression in Bakterien. Während ihrer Dissertation konnte sie an diversen Konferenzen im In- und Ausland teilnehmen. Im Zuge einer Kooperation verbrachte sie für Kristallisationsversuche einen Forschungsaufenthalt am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (NY, USA).

LABORWELT:

Was sind die wichtigsten Erkenntnisse aus Ihrer Studie?

Rieder:

Riboschalter können ohne die Mitwirkung von Proteinen Metaboliten in selektiver und konzentrationsabhängiger Weise binden und stellen daher ein ausgeklügeltes Genregulationselement in Bakterien dar. Diese RNA-Elemente bestehen aus einer Metabolit-bindenden Domäne und einer überlappenden Expressionsplattform, die durch ihre Liganden-induzierte Konformationsänderung die Expression der entsprechenden Gene modulieren kann. Obwohl viele Fortschritte in der 3D-Bestimmung von Aptamer-Liganden-Komplexen erzielt wurden, ist jedoch die Art der Kommunikation zwischen den beiden Domänen noch relativ unklar. Untersuchungsobjekt war der kleinste bisher bekannte Riboschalter preQ1. PreQ1 ist dabei ein Vorläufermolekül in der Biosynthese des hochmodifizierten Nukleotids Queuosin. Die Frage stellte sich, wie dieser Riboschalter die Information der Ligandenbindung an seine Expressionsplattform übertragen kann, obwohl keine deutliche Sequenzüberlappung zwischen dem Aptamer und dem Terminator erkennbar ist. Wir konnten nun nachweisen, dass diese nicht-kommunikative Situation zwischen Aptamer und Terminator durch die Einführung eines zusätzlichen Hairpins (Antiterminator) gelöst werden kann, der in einem bistabilen Gleichgewicht mit dem Terminator

steht. Durch Ligandenzugabe verändert sich die Population deutlich zu Gunsten des Terminators („Aus-Zustand“). Wichtig dabei ist, dass die Kommunikation zwischen Aptamer und Terminator über den Antiterminator durch ein einziges Nukleotid vermittelt wird. Dieses ist einerseits im An-Zustand in die Ausbildung eines Basenpaares des Antiterminators und andererseits im Aus-Zustand eines Basenpaares des Aptamer-Liganden-Komplexes involviert. Durch die Ligandenbindung wird über dieses eine Nukleotid der Antiterminator thermodynamisch geschwächt beziehungsweise aufgebrochen und dadurch teilweise zum Terminator umstrukturiert, der wiederum den genetischen Effekt weiterleitet.

LABORWELT:

Wie sind sie experimentell vorgegangen?

Rieder:

Die ersten wichtigen Ergebnisse erhielten wir durch Struktur-Probing, mit dessen Hilfe die Sekundärstruktur der RNA untersucht werden kann. ¹H- und ¹⁵N-NMR-Spektroskopie zur Detektion von Imino- und Aminoprotonen in Basenpaaren wurden verwendet, um die Ligandenerkennung und -interaktionen nachzuweisen. Entscheidend war die Verifizierung der Gleichgewichtsstrukturen in der Expressionsplattform durch ¹⁹F-NMR-Spektroskopie. Wesentlich war zudem die thermodynamische und kinetische Untersuchung mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie. Bei allen Methoden ist es besonders wichtig, die Struktur der RNA

durch die verschiedenen Labels so wenig wie möglich zu beeinflussen.

LABORWELT:

Wie geht Ihre Forschungsarbeit jetzt weiter?

Rieder:

Ich werde dieses Jahr meine Dissertation abschließen und mich auf eine Postdoc-Stelle bewerben. Damit überlasse ich die weiteren Folgestudien meinen Kollegen.

LABORWELT:

Welche Hürden müssen vor einer Anwendung von Riboschaltern noch genommen werden?

Rieder:

Generell ist die detaillierte Untersuchung von Faltungsprozessen wichtig und trägt zum besseren Verständnis der Genregulation auf molekularer Ebene bei. In Bezug auf die Entwicklung zum Beispiel neuer Antibiotika müssen viele Fragen geklärt werden. Dabei ist es wichtig, Substanzklassen zu finden, die die Expression von essentiellen Genen unter einem bestimmten Niveau hemmen, das ausschlaggebend für das Überleben der Zelle ist. Ein Problem könnten allerdings Bakterienstämme mit hohen Mutationsraten sein, wodurch die Bindung unmöglich wird oder die Substanz durch Transportproteine wieder ausgeschleust wird.