

Ein RNA-Schalter für Proteinmutationen

Die RNA ist ein vielseitiges Molekül, das nicht nur zur Informationsweitergabe dient, sondern auch ebenso wie Enzyme chemische Reaktionen katalysieren kann. Solche Ribozyme (von Ribonukleinsäure und Enzym) sorgen beispielsweise im Ribosom für die Verknüpfung der Aminosäuren bei der Proteinbiosynthese. Professor Jörg Hartig von der Universität Konstanz hat nun eine neue Ribozym-basierte Methode entwickelt, um den Einbau von Aminosäuren bei der Translation durch RNA-Schalter, sogenannte „Riboswitches“ zu kontrollieren. Diese bieten einige Vorteile gegenüber klassischen Methoden zur Genregulation.

Bei der Charakterisierung von Proteinen werden oft Protein-Mutanten erzeugt, um die Rolle einzelner Aminosäuren für die Funktion des ganzen Proteins zu untersuchen. Dazu muss für jede Protein-Variante jeweils eine passende Mutation erzeugt und in den Modellorganismus eingebracht werden. So war es zumindest bisher meist der Fall. Doch es scheint auch einfacher zu gehen, wie Jörg Hartig, Professor für Biopolymerchemie an der Universität Konstanz gezeigt hat.

Er hat einen RNA-basierten „Werkzeugkasten“ entwickelt, um beim ribosomalen Einbau eine Aminosäure durch eine andere auszutauschen und so die Protein-Zusammensetzung auf post-transkriptionaler Ebene zu beeinflussen. Bei den dafür eingesetzten „Werkzeugen“ handelt es sich um Riboswitches, die die Genexpression auf der Ebene der Translation kontrollieren können. „Das sind RNA-Schalter der Genexpression, die Proteinmutationen ohne Veränderungen des Genotyps einführen können“, erklärt Hartig.

Riboswitches sind RNA-Sequenzabschnitte, die direkt vor dem translatierten Bereich der mRNA liegen und die selbst nicht translatiert werden. Natürlicherweise kommen sie fast ausschließlich bei Bakterien vor und sind generell aus zwei Teilen aufgebaut: der Aptamer-Domäne und der Expressionsplattform. Bei der Aptamer-Domäne handelt es sich um einen kurzen RNA-Abschnitt, der eine spezielle 3D-Struktur ausbilden und dadurch ein spezifisches Zielmolekül, beispielsweise Tetracyclin binden kann. Durch die Bindung an dieses Zielmolekül verändert sich die Faltung der Aptamer-Domäne, wodurch auch die Expressionsplattform beeinflusst wird. Diese bewirkt in der Folge die Änderung der Genexpression. So kann beispielsweise durch eine Konformationsänderung der Expressionsplattform die Ribosomen-Bindestelle verdeckt werden, wodurch die Translation des Gens verhindert wird.

Designer-tRNA als Schlüssel zum Austausch der Aminosäuren



Prof. Jörg Hartig von der Universität Konstanz hat ein neues „RNA-Werkzeug“ entwickelt, mit dem die Genexpression auf der Ebene der Translation verändert werden kann.

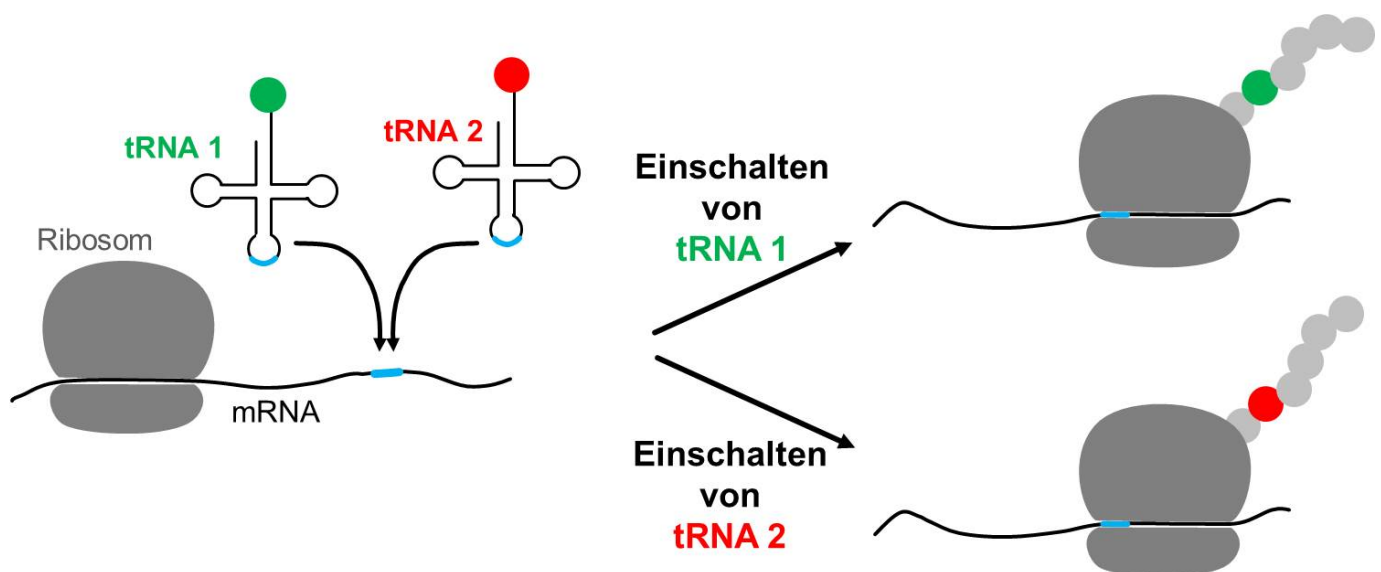
© Universität Konstanz

Jörg Hartig und seine Arbeitsgruppe haben sich aber ein noch ausgeklügelteres System ausgedacht und das Prinzip auf die t-RNA übertragen: „Wir haben das Ribozym mit der tRNA in einer Weise verknüpft, welche die normalerweise eingenommene Faltung der tRNA stört und so die

Verwendung der tRNA hemmt“, erläutert Hartig. Induziert man nun den Riboswitch und damit die Spaltung der tRNA, schneidet sich das Ribozym von der tRNA, welche dann entsprechend ihrer Funktion in der Translation verwendet wird. „Durch die Zugabe eines kleinen Effektor-Moleküls zum Wachstumsmedium wird diese tRNA also eingeschaltet“, schildert er weiter.

Bei den kontrollierten tRNAs handelt es sich um sogenannte amber Suppressor-tRNAs. Diese besitzen eine Mutation in der Anticodon-Schleife, die dazu führt, dass ein amber Stoppcodon (UAG) in der RNA bei der Translation unterdrückt und stattdessen zum Einbau einer Aminosäure benutzt wird. „Mit unseren tRNA-Schaltern können wir dann kontrollieren, ob die Translation am Stoppcodon abbricht oder mit der gewünschten Aminosäure fortgesetzt wird“, verdeutlicht Hartig die Funktionsweise des Systems. Die mRNA wird also je nach tRNA unterschiedlich gelesen und der gezielte Einbau einer bestimmten Aminosäure an dieser Position wird möglich.

Zur Schaltung des Aminosäureeinbaus benötigt man für E. coli nur ein auf einem Plasmid eingebrachtes tRNA-Schaltsystem, welches aus Aptamer, Ribozym und Amber-Suppressor-tRNA zusammengesetzt ist. Setzt man dabei mehrere tRNA-Schaltsysteme parallel ein, die jeweils eine andere Aptamer-Domäne aufweisen, können also durch die Zugabe verschiedener Effektormoleküle auch verschiedene tRNAs geschaltet werden. Dadurch ist auch der gezielte Einbau verschiedener Aminosäuren möglich. „So können unterschiedliche Proteine synthetisiert werden, indem wir variierende Kombinationen von Effektormolekülen einsetzen: Zugabe von Effektor 1 ermöglicht Einbau von Aminosäure 1, Zugabe von Effektor 2 entsprechend Aminosäure 2, bei Zugabe von beiden Effektoren erhält man eine Mischung von Proteinvarianten“, erklärt der Biochemiker das System. Gibt man dagegen keinen der Effektoren zu, so erhält man ein verkürztes Protein, da die Translation am ersten Stoppcodon abbricht.



Schema zur posttranskriptionalen Erzeugung von Proteinvarianten durch die Kontrolle von Designer-tRNAs mittels RNA-Schalter.

© Hartig

Anwendungsmöglichkeiten von Proteindesign bis zur Virus-Kontrolle

Generell sind RNA-Schalter nicht nur für biotechnologische Anwendungen und die Synthetische Biologie interessant, um beispielsweise gezielt Proteine zu designen. Durch sie werden auch ganz neue Möglichkeiten zur Genregulation in Systemen eröffnet, in denen konventionelle Ansätze nicht ausreichend funktionieren.

Ein Beispiel ist der Einsatz zur Kontrolle der Genexpression in onkolytischen Viren, die gezielt Tumor-Zellen befallen und töten. Eine effiziente Kontrolle der Genexpression in solch maßgeschneiderten Viren ist aus Sicherheitsgründen unerlässlich. Allerdings versagen klassische Systeme oft, da sich die Stöchiometrie zwischen benötigten Transkriptionsfaktoren und den Zielsequenzen im viralen Erbgut während der viralen Replikationszyklen stark ändert. Bei den Riboswitches ergibt sich dieses Hindernis nicht, da sie Teil der entsprechenden mRNA sind und somit jede abzulesende RNA-Botschaft auch einen Schalter zum Ein- oder Ausschalten mitbringt. „In einer Kooperation mit Dirk Nettelbeck vom DKFZ Heidelberg konnten wir zeigen, dass sich unsere RNA-Schalter sehr gut für diese Anwendung eignen“, berichtet Hartig (BIOPRO-Beitrag: „Viren mit eingebautem Gen-Schalter“).

Nach Einschätzung des Forschers sollte der Ansatz mit jedem Protein funktionieren, wenn auch je nach Sequenzkontext unterschiedlich effizient. Aktuell arbeitet seine Gruppe außerdem an der Übertragung des Prinzips in Eukaryonten. „Wir sind optimistisch, mit unseren Schaltern und dem zugrundeliegenden System den Aminosäureeinbau in Zukunft auch in höheren Organismen steuern zu können“, prognostiziert Hartig hoffnungsvoll.

Fachbeitrag

16.12.2013

Bettina Baumann

BioLAGO

© BIOPRO Baden-Württemberg GmbH

Weitere Informationen

Literatur:

Markus Wieland, Jörg Hartig: Genregulatoren aus dem Baukasten – das Hammerhead-Ribozym; BIOSpektrum 02/2010

Prof. Dr. Jörg S. Hartig

Universität Konstanz

Fachbereich Chemie

Tel.: +49-7531-88-4575

E-Mail: joerg.hartig(at)uni-konstanz.de

Der Fachbeitrag ist Teil folgender Dossiers



Chemische Werkzeuge für biologische Anwendungen

Universität Konstanz

