

## Synthetische RNA-Schalter

# RNA-basierte Regulation der Genexpression: künstliche Genschalter

MONIKA FINKE, MAIKE SPÖRING, JÖRG S. HARTIG  
FACHBEREICH CHEMIE UND KONSTANZ RESEARCH SCHOOL CHEMICAL BIOLOGY,  
UNIVERSITÄT KONSTANZ

**RNA-based gene control mechanisms pose an elegant and straightforward way to switch on, off, or fine-tune transgene expression without the need for expressing regulatory proteins. A small molecule effector binds directly to a ligand-binding aptamer RNA structure and thereby modulates expression of an associated target gene. We established genetic switches based on regulation of self-cleaving ribozymes and polyadenylation that allow for control of transgene expression in bacteria, yeast, human cell lines and *Caenorhabditis elegans* in a robust and dose-dependent manner.**

DOI: 10.1007/s12268-021-1566-8  
© Die Autoren 2021

■ Über die klassischen Funktionen von mRNAs, tRNAs und rRNAs in der Genexpression hinaus sind in den letzten Jahren viele weitere Funktionen von RNAs beschrieben worden, insbesondere zur Regulation der Genexpression. So führen RNA-Interferenz auslösende RNAs zur Hemmung der Genexpression in vielen höheren Organismen. In Bakterien dienen sRNAs zur Kontrolle der Expression. Darüber hinaus sind vermehrt kleine, selbst-schneidende Ribozyme entdeckt worden. Eine Vielzahl von Ligandenbindenden RNAs (Aptamere) sind im Labor generiert oder in der Natur als Bestandteil von RNA-Schaltern entdeckt worden. Die

Eigenschaft, dreidimensionale Strukturen und wechselnde Konformationen anzunehmen, machen solche funktionalen RNAs sehr geeignet, um die Genexpression zu beeinflussen.

Ein Beispiel RNA-basierter Genregulation bilden Riboschalter (Riboswitches). Solche RNA-basierten Genschalter sind meist in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) von bakteriellen mRNAs zu finden. Durch direkte Interaktion der RNA mit einem niedermolekularen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb der RNA, die schließlich die Expression des codierten Gens beeinflusst. Dabei kann die Genexpres-

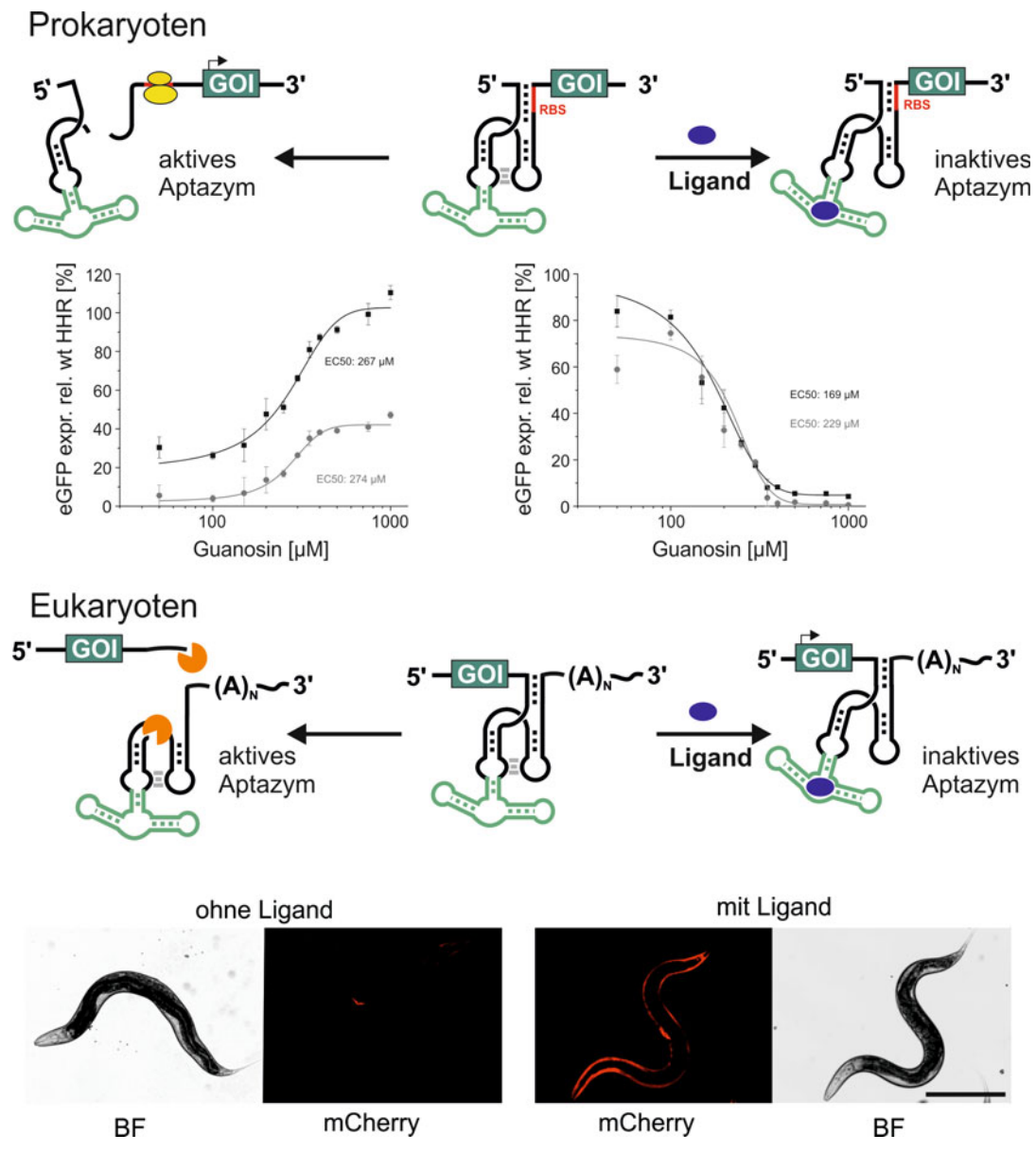
sion induziert (An-Schalter) oder gehemmt (Aus-Schalter) werden. Die Regulation kann sowohl auf Ebene der Transkription, z. B. über Bildung eines Terminatorstamms, als auch auf Ebene der Translation, z. B. über eine Maskierung der Ribosomen-Bindestelle (RBS), stattfinden. Das Spektrum der Liganden in natürlich vorkommenden Riboswitches beinhaltet u. a. Ko-Enzyme, anorganische Ionen, Nukleobasen, Aminosäuren und Signalmoleküle [1].

Im Allgemeinen bestehen Riboswitches aus zwei Domänen, der Sensor- oder Aptamerdomäne, die spezifisch und hochaffin den Liganden bindet, sowie der Expressionsplattform, welche durch die induzierte Konformationsänderung die Genexpression beeinflusst. Analog zu natürlich vorkommenden Riboswitches lassen sich auch synthetische RNA-Schalter entwerfen und für eine Kontrolle der Genexpression nutzen. Oft verwendete Aptamere binden etwa Tetracyclin, Thiaminpyrophosphat, Theophyllin, Guanin oder Neomycin. Die verwendeten Expressionsplattformen reichen von Strukturen, welche die Bindung von Ribosomen beeinflussen, über Zielsequenzen für microRNAs bis hin zu katalytisch aktiven RNAs, den Ribozymen [2]. Die Aptamerdomäne wird in synthetischen Designs oft durch ein Kommunikationsmodul mit der Expressionsplattform verknüpft. Dieses stellt sicher, dass die Ligandenbindung effizient an

Konstanzer Online-Publikations-System (KOPS)  
URL: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:352-2-qdh9ed9g311d7>

Hier steht  
eine Anzeige.

 Springer



◀ **Abb. 1:** Aptazyme in Pro- und Eukaryoten. **Prokaryoten:** Im aktiven Zustand des Ribozyms wird die RNA geschnitten und die Ribosomen-Bindestelle (RBS) für das Ribosom zugänglich. Im inaktiven Zustand wird die RBS maskiert und das Zielprotein wird nicht translatiert. Gezeigt ist ein Aus-Schalter, der bei Anwesenheit des Liganden die RBS maskiert sowie die Anwendung von je zwei An- und Aus-Schaltern in *Escherichia coli*. Durch Zugabe des Liganden (hier: Guanosin) wird die GFP-Expression in dosisabhängiger Weise induziert (links) oder inhibiert (rechts). **Eukaryoten:** Im aktiven Zustand des Ribozyms wird der Poly(A)-Schwanz abgeschnitten und die mRNA wird abgebaut. Durch Zugabe des Liganden wird das Ribozym inaktiviert und die RNA wird stabilisiert und in der Folge exprimiert. Gezeigt ist die induzierte Expression von mCherry mit 10 μM Ligand (Tetracyclin) in Muskelzellen von *Caenorhabditis elegans*. BF: *bright field* (= Durchlicht); GOI: *gene of interest*. Maßstabsbalken: 300 μm.

die Expressionsplattform „kommuniziert“ wird, d. h. zu einer Konformationsänderung und Auswirkung auf die Genexpression führt.

**Ribozym-basierte Genschalter**

In der Vergangenheit wurden oft kleine selbstschneidende Ribozyme als Expressionsplattformen eingesetzt. Die Reaktion lässt sich durch Fusion mit einem Aptamer Liganden-abhängig steuern. Verschiedene Kombinationen aus selbstschneidenden Ribozymen und Aptameren sind erfolgreich zum Einsatz gekommen [3]. Wir haben vor allem das Hammerhead- und das Twister-Ribozym verwendet, um verschiedene Liganden-abhängige Schalter in *Escherichia coli* zu entwickeln [4, 5]. Hier kann die Proteintranslation nur dann erfolgen, wenn das Ribozym in seiner aktiven Form vorliegt und den RNA-

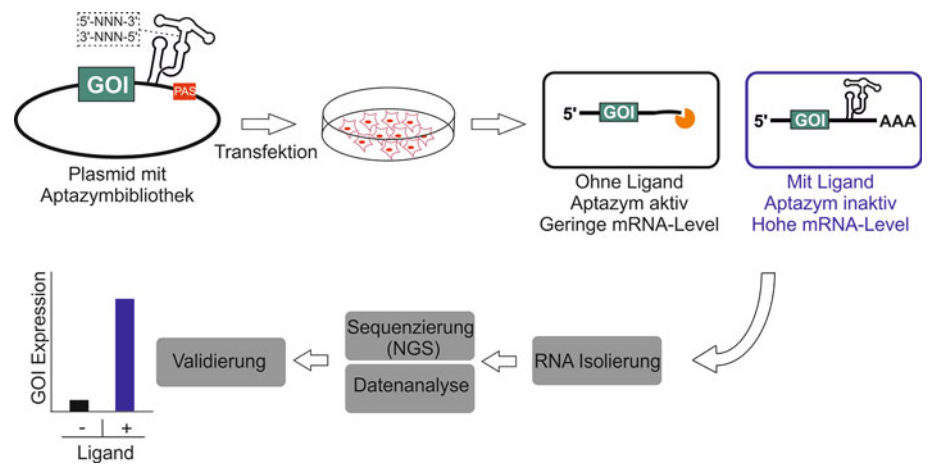
Strang schneidet (Abb. 1). Dies führt zur Freisetzung der RBS-Sequenz und der Initiation der Translation. In Eukaryoten erfolgt der Einsatz von Liganden-abhängigen Ribozymen generell in der 5'- oder 3'-UTR der gewünschten mRNA. Die Ribozym-katalysierte Spaltung führt dort zu einer Destabilisierung der mRNA und somit zur Hemmung der Genexpression (Abb. 1, [6]).

Schwieriger ist aufgrund des fehlenden Durchsatzes die Entwicklung funktionaler RNA-Schalter in humanen Zellen. Daher wurden Riboswitches hier vielfach durch rationale Ansätze entworfen. Ein interessantes Design gelang der Arbeitsgruppe um Beatrix Süß, TU Darmstadt, durch die Kontrolle von Hammerhead-Ribozymen mit Tetracyclin [7]. Wir konnten zeigen, dass diese Tetracyclin-abhängigen Ribozyme sich auch in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* übertra-

gen lassen (Abb. 1, [8]). Die Induktion ist in verschiedenen Wachstumsstadien und gewebespezifisch möglich und ermöglichte die Etablierung eines Huntington-Krankheitsmodells basierend auf der induzierbaren Expression stark aggregierender Proteine. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die Tetracyclin-abhängigen Ribozyme auch eignen, um die Genexpression in einem Mausmodell zu kontrollieren [9]. Hier gelang die bis zu 15fache Induktion eines über einen Adeno-assoziierten-Virus(AAV)-Vektor eingebrachten Transgens. Für die AAV-basierte Gentherapie scheinen RNA-Schalter besonders geeignet, da sie ohne potenziell immunogene regulatorische Proteine auskommen.

Die Entwicklung artifizierender Riboswitches in Eukaryoten über rationales Design hat effiziente Genschalter hervorgebracht. Jedoch sind Struktur-Funktions-Beziehun-

► **Abb. 2:** Arbeitsablauf des NGS-basierten Screens zur Identifikation funktionaler Riboswitches in humanen Zellen. Ein Plasmid mit einer Aptazymbibliothek wird in HEK293-Zellen transfiziert. Die Zellen werden ohne oder mit Ligand behandelt und die mRNA daraufhin isoliert. Die mRNA-Menge wird mittels NGS-Sequenzierung ermittelt, wobei die individuellen Aptazymsequenzen selbst als Barcode dienen. Funktionale Schalter werden durch Unterschiede in den mRNA-Mengen in An- und Abwesenheit des Liganden identifiziert. GOI: *gene of interest*; PAS: Polyadenylierungssignal.



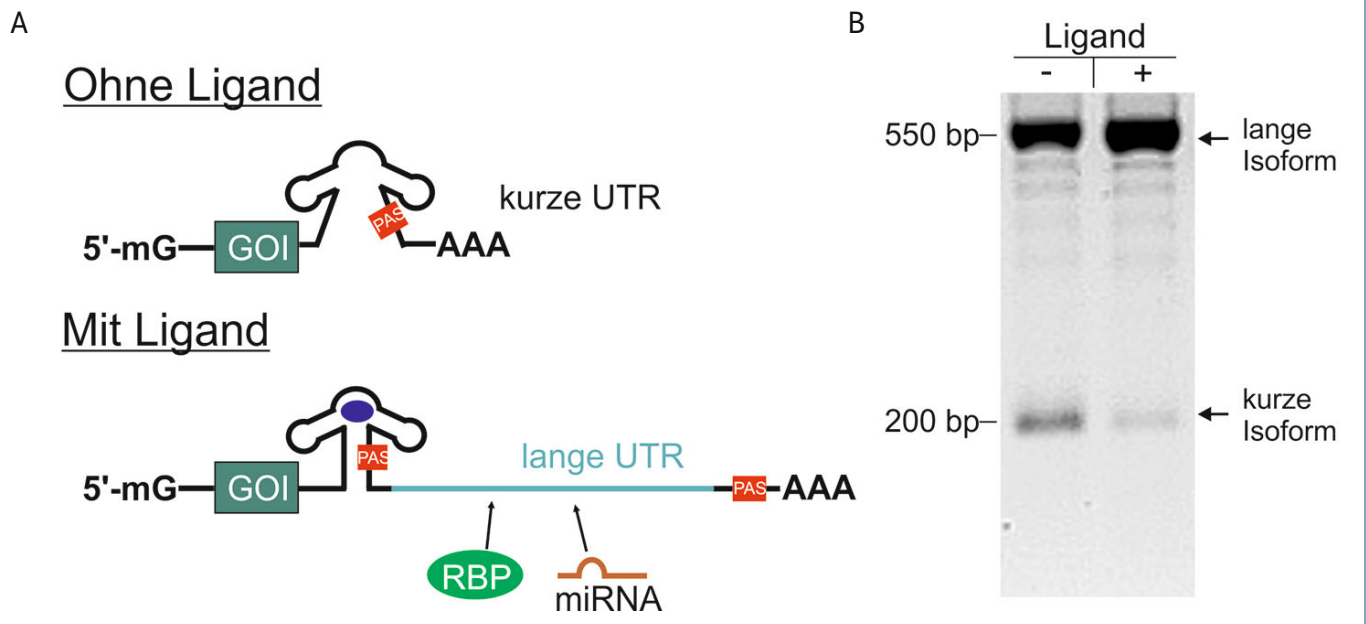
gen und der Einfluss des mRNA-Kontexts komplex und erfordern oft die Durchmusterung größerer Sequenzbibliotheken. Die weitere Entwicklung funktioneller Riboswitches in zellulären Systemen bedarf daher Screeningmethoden zur parallelen Analyse großer Sequenzbibliotheken. Gemeinsam mit dem Unternehmen Boehringer Ingelheim haben wir kürzlich einen effizienten, NGS-basierten Hochdurchsatzscreen entwickelt [10]. Dieses Verfahren erlaubt die

Durchmusterung von mehr als 10.000 verschiedenen Schaltervarianten in transient transfizierten Zellen. Funktionale Sequenzen werden in diesem Ansatz durch direkte Messung der individuellen mRNA-Level durch RNA-Sequenzierung identifiziert. Durch das jeweils unterschiedliche Kommunikationsmodul in den Sequenzvarianten der Bibliothek entfällt die Notwendigkeit eines Barcodes (**Abb. 2**). Unter Anwendung des neuen Screeningverfahrens ist es uns

gelingen, weitere Tetracyclin- und Guanin-sensitive Aptazyme zu entwickeln. Zudem konnten wir zeigen, dass sich diese Methode auch auf andere Expressionsplattformen anwenden lässt. Dazu haben wir einen Genschalter basierend auf der U1-snRNP (*U1 small nuclear ribonucleoprotein*)-abhängigen Polyadenylierung entwickelt. Die Ausweitung des Screens auf weitere Expressionsplattformen und der hohe Durchsatz machen diese Methode zu einem zukunftssträchtigen

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 3:** Aptamer-basierte Kontrolle der alternativen Polyadenylierung. **A,** Die Bindung eines Liganden an das Aptamer kontrolliert die Verfügbarkeit des proximalen Polyadenylierungssignals (PAS), sodass nur in Anwesenheit des Liganden eine lange 3'-UTR gebildet wird. Diese bietet Interaktionsmöglichkeiten für RNA-Bindeproteine (RBP) oder microRNAs (miRNAs). **B,** Nachweis der gebildeten langen und kurzen 3'-UTR Isoformen mittels PCR-Amplifizierung nach reverser Transkription. GOI: *gene of interest*; UTR: untranslatierte Region.

Werkzeug zur Weiterentwicklung von synthetischen Riboswitches.

### Aptamer-basierte Kontrolle der Polyadenylierung

Eine weitere Entwicklung aus unserer Gruppe ist ein Design zur Liganden-gesteuerten Regulation der Polyadenylierung [11]. Der Poly(A)-Schwanz, der während der eukaryotischen mRNA-Reifung an die primären Transkripte angehängt wird, schützt diese vor zellulären Abbauprozessen. Wird die Polyadenylierung verhindert, verringert dies die Stabilität der mRNA und somit auch die Genexpression. In unserem Design haben wir das Poly(A)-Signal reversibel über ein Aptamer maskiert. Die Bindung des Liganden verhindert dabei die Erkennung des

Poly(A)-Signals. Wir konnten in HeLa-Zellen zeigen, dass dies eine effektive Möglichkeit ist, um die Genexpression zu kontrollieren. Eine Regulation ist dabei mit verschiedenen Aptameren und Poly(A)-Signalen möglich. Zusätzlich zur Stabilität der gebildeten mRNA konnten wir zeigen, dass sich das Verfahren auch eignet, um alternative Polyadenylierung und damit die Länge und mögliche Funktionen der 3'-UTR zu steuern (**Abb. 3**).

### Zusammenfassung und Ausblick

Bisherige Entwicklungen im Bereich der synthetischen RNA-basierten Genschalter zeigen ein großes Potenzial für die Kontrolle der Transgenexpression in diversen Organismen. Durch die direkte Interaktion von Effektormolekülen mit in die mRNA eingefügten

RNA-Schaltern wird die Notwendigkeit der Expression zusätzlicher und fremder regulatorischer Proteine umgangen und die Nutzung natürlicher Promotoren ermöglicht. Dies minimiert unerwünschte Nebenwirkungen und reduziert die Komplexität der verwendeten Expressionssysteme. Mit oftmals weniger als 100 Nukleotiden sind synthetische Riboswitches einfach in die mRNA zu integrieren und hinterlassen einen minimalen genetischen Fußabdruck. Diese Eigenschaften prädestinieren RNA-Schalter für den Einsatz in der Grundlagenforschung und zeigen großes Potenzial für künftige gentherapeutische Anwendungen. Die Anwendung neuester NGS-basierter Screeningverfahren und die Erschließung weiterer Expressionsplattformen lässt hoffen, dass zukünftig noch

Hier steht  
eine Anzeige.

 Springer

effizientere Schalter für weitere Einsatzfelder entwickelt werden.

## Danksagung

Wir danken unseren Kooperationspartnern, die mit uns verschiedenste RNA-Schalter in einer Reihe von Organismen und Anwendungen entwickelt haben. Gefördert wurden die Arbeiten vor allem durch die DFG im Rahmen des Teilprojekts 5 des Sonderforschungsbereichs 969: „Chemische und biologische Prinzipien der zellulären Proteostase“.

## Literatur

- [1] Breaker RR (2011) Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Mol Cell* 43: 867–879
- [2] Sporing M, Finke M, Hartig JS (2020) Aptamers in RNA-based switches of gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 63: 34–40
- [3] Felletti M, Hartig JS (2017) Ligand-dependent ribozymes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8
- [4] Felletti M, Stifel J, Wurmthaler LA et al. (2016) Twister ribozymes as highly versatile expression platforms for artificial riboswitches. *Nat Commun* 7: 12834
- [5] Stifel J, Sporing M, Hartig JS (2019) Expanding the toolbox of synthetic riboswitches with guanine-dependent aptazymes. *Synth Biol (Oxf)* 4: ysy022
- [6] Sack M, Stifel J, Kreft SG et al. (2019) Neomycin-dependent hammerhead ribozymes for the direct control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods* 161: 35–40
- [7] Beilstein K, Wittmann A, Grez M et al. (2015) Conditional control of mammalian gene expression by tetracycline-dependent hammerhead ribozymes. *ACS Synth Biol* 4: 526–534
- [8] Wurmthaler LA, Sack M, Gense K et al. (2019) A tetracycline-dependent ribozyme switch allows conditional induction of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 10: 491

[9] Strobel B, Duchs MJ, Blazevic D et al. (2020) A small-molecule-responsive riboswitch enables conditional induction of viral vector-mediated gene expression in mice. *ACS Synth Biol* 9: 1292–1305

[10] Strobel B, Sporing M, Klein H et al. (2020) High-throughput identification of synthetic riboswitches by barcode-free amplicon-sequencing in human cells. *Nat Commun* 11: 714

[11] Sporing M, Boneberg R, Hartig JS (2020) Aptamer-mediated control of polyadenylation for gene expression regulation in mammalian cells. *ACS Synth Biol* 9: 3008–3018

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Jörg S. Hartig  
Fachbereich Chemie und  
Konstanz Research School Chemical Biology  
Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10  
D-78457 Konstanz  
joerg.hartig@uni-konstanz.de

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer

## AUTOREN



### Monika Finke

2011–2017 Studium Life Science an der Universität Konstanz. Seit 2017 Promotion in der Gruppe von Prof. Dr. J. S. Hartig. Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Entwicklung synthetischer RNA Schalter zur regulierten Genexpression in pro- und eukaryotischen Modellorganismen.



### Maïke Spöring

2011–2016 Studium Life Science an der Universität Konstanz. Seit 2016 Promotion in der Gruppe von Prof. Dr. J. S. Hartig. Forschungsschwerpunkt liegt auf der Erschließung neuer Liganden und Expressionsplattformen für künstliche RNA-Schalter.



### Jörg S. Hartig

1994–2000 Chemiestudium an der Universität Bonn. 2000–2003 Promotion an der Uni Bonn. 2003–2005 Postdoc an der Stanford University, CA, USA. Seit 2006 tätig an der Universität Konstanz, zuerst als Junior-Professor im Rahmen des Lichtenberg-Programms der VolkswagenStiftung, ab 2011 als Professor für Biopolymer-Chemie.