

Zellfreier Assay

Quantifizierung von Transkription und Translation von Riboschaltern

MARIA WIRTZ MARTIN, ANNA WACKER, HARALD SCHWALBE
 INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE UND CHEMISCHE BIOLOGIE, ZENTRUM FÜR BIOMOLEKULARE MAGNETISCHE RESONANZ (BMRZ), GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT

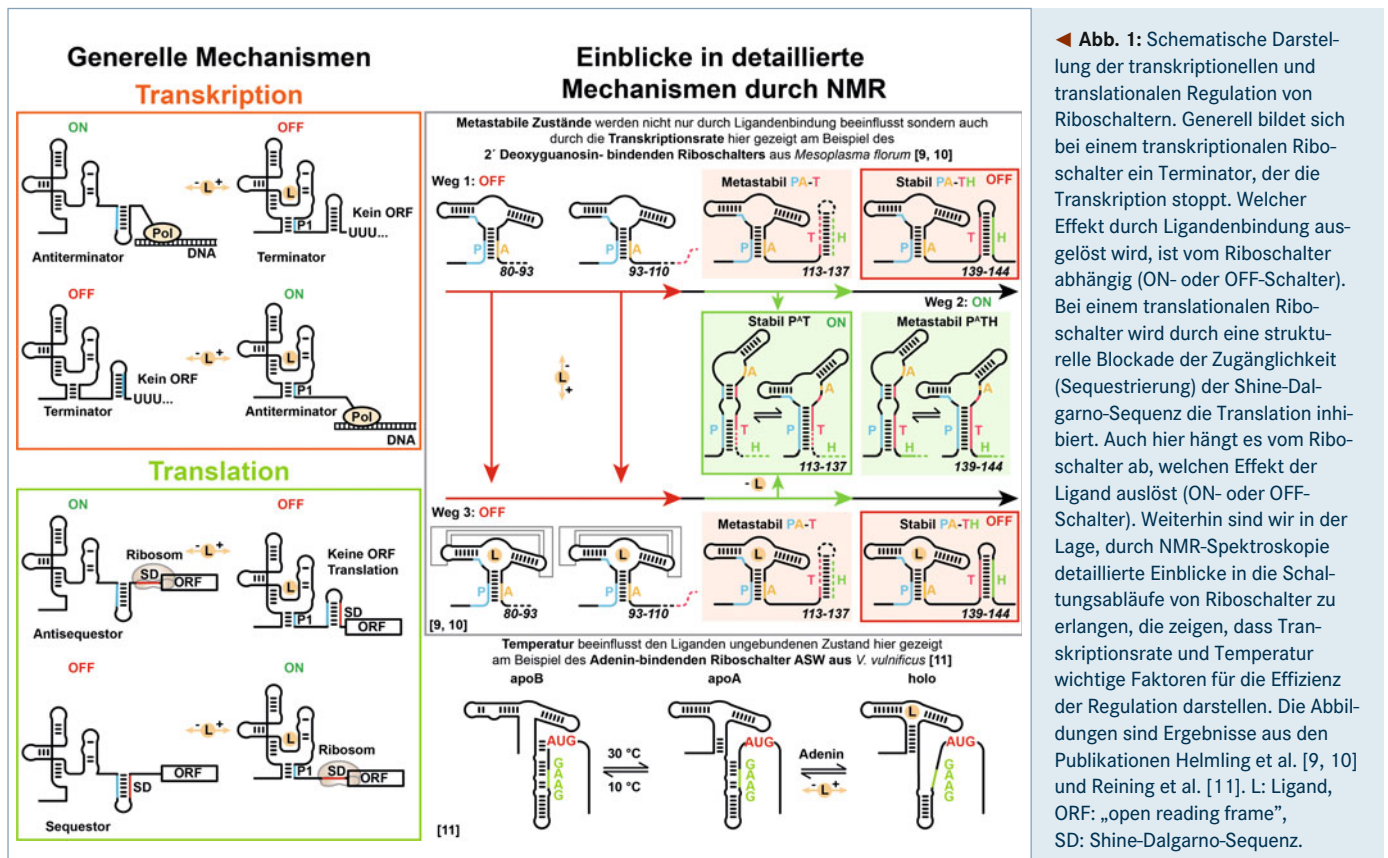
Riboswitches change their secondary structure upon ligand binding, sending a signal that triggers transcriptional or translational gene regulation. Our dual-readout assay allows the simultaneous detection of ligand-dependent changes in transcription and translation. The cell-free assay utilizes the parallel detection of the fluorescent Mango (IV) aptamer downstream of the transcribed mRNA and GFP fluorescence to quantify transcription and translation products in the presence or absence of ligand.

DOI: 10.1007/s12268-024-2198-6
 © Die Autorinnen und Autoren 2024

■ In diesem Artikel stellen wir die Entwicklung eines zellfreien Assays zur gleichzeitigen Quantifizierung von mRNA und

Proteinmengen vor [1]. Weshalb ist das wichtig? Die gleiche Sequenz einer Ribonukleinsäure (RNA) kann mehrere, fast

gleich stabile Konformationen annehmen. Diese konformationelle Heterogenität ist typisch für RNAs und hat häufig eine funktionale Rolle. Eine besondere Klasse von RNA-Regulationselementen, bei denen allosterische konformationelle Änderungen die Funktion bestimmen, sind Riboschalter (*riboswitches*) [2–5]. Riboschalter regulieren als so genannte *cis*-Elemente die Genexpression ihrer eigenen mRNA, indem sie ihren Faltungszustand als Reaktion auf intrinsische zelluläre Signale ändern können. Die bei Weitem meisten Riboschalter wurden bisher in den nicht translatierten Bereichen bakterieller messenger-RNA (mRNA) gefunden, wo sie überwiegend auf die Änderung der Konzentration bestimmter Metabolite reagieren. Häufig sind die durch Riboschalter regulierten Genprodukte zentrale Elemente im Stoffwechsel des jeweiligen Metaboliten.

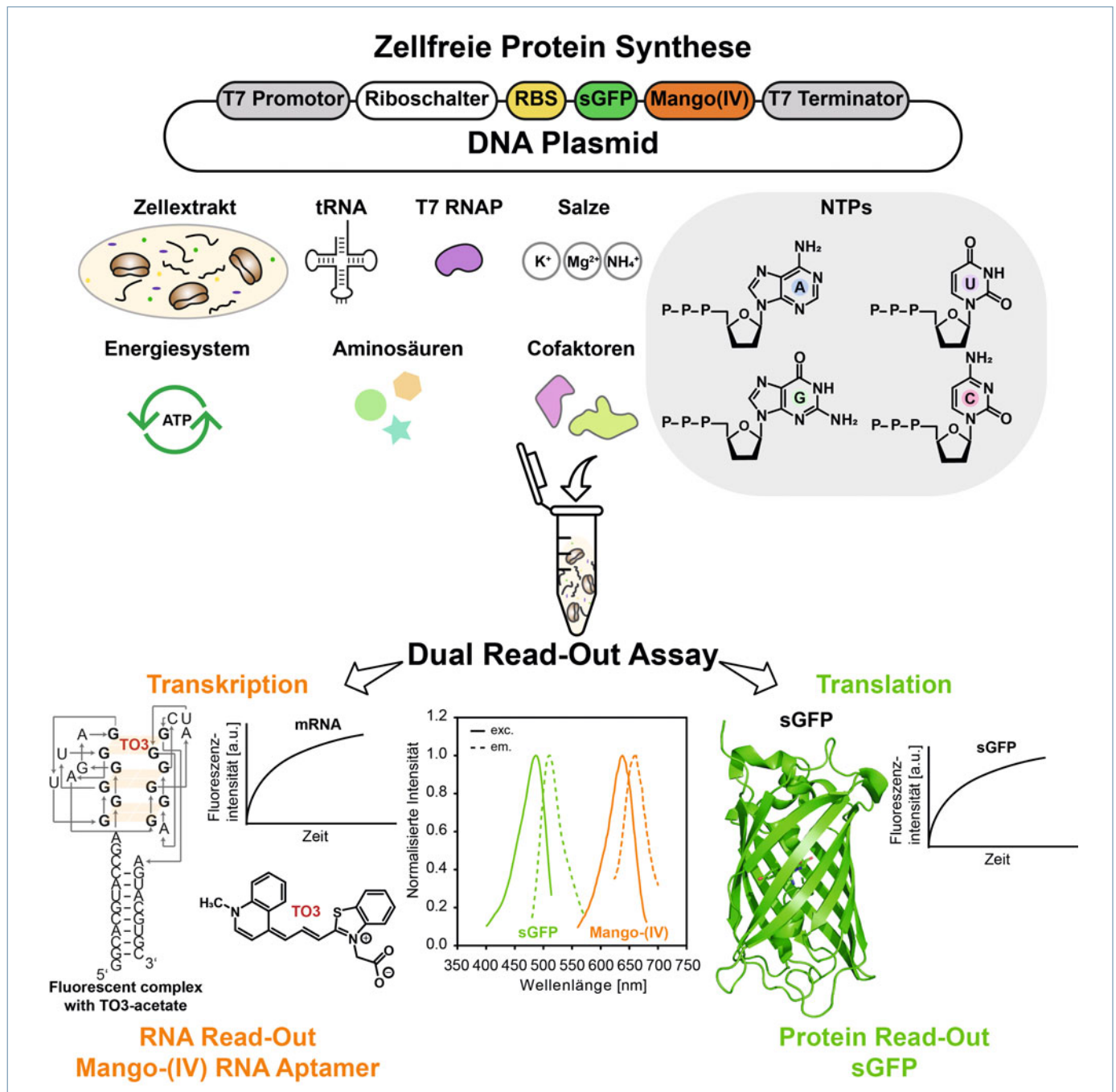


◀ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der transkriptionellen und translationalen Regulation von Riboschaltern. Generell bildet sich bei einem transkriptionalen Riboschalter ein Terminator, der die Transkription stoppt. Welcher Effekt durch Ligandenbindung ausgelöst wird, ist vom Riboschalter abhängig (ON- oder OFF-Schalter). Bei einem translationalen Riboschalter wird durch eine strukturelle Blockade der Zugänglichkeit (Sequestrierung) der Shine-Dalgarno-Sequenz die Translation inhibiert. Auch hier hängt es vom Riboschalter ab, welchen Effekt der Ligand auslöst (ON- oder OFF-Schalter). Weiterhin sind wir in der Lage, durch NMR-Spektroskopie detaillierte Einblicke in die Schaltungsabläufe von Riboschalter zu erlangen, die zeigen, dass Transkriptionsrate und Temperatur wichtige Faktoren für die Effizienz der Regulation darstellen. Die Abbildungen sind Ergebnisse aus den Publikationen Helmling et al. [9, 10] und Reining et al. [11]. L: Ligand, ORF: „open reading frame“, SD: Shine-Dalgarno-Sequenz.

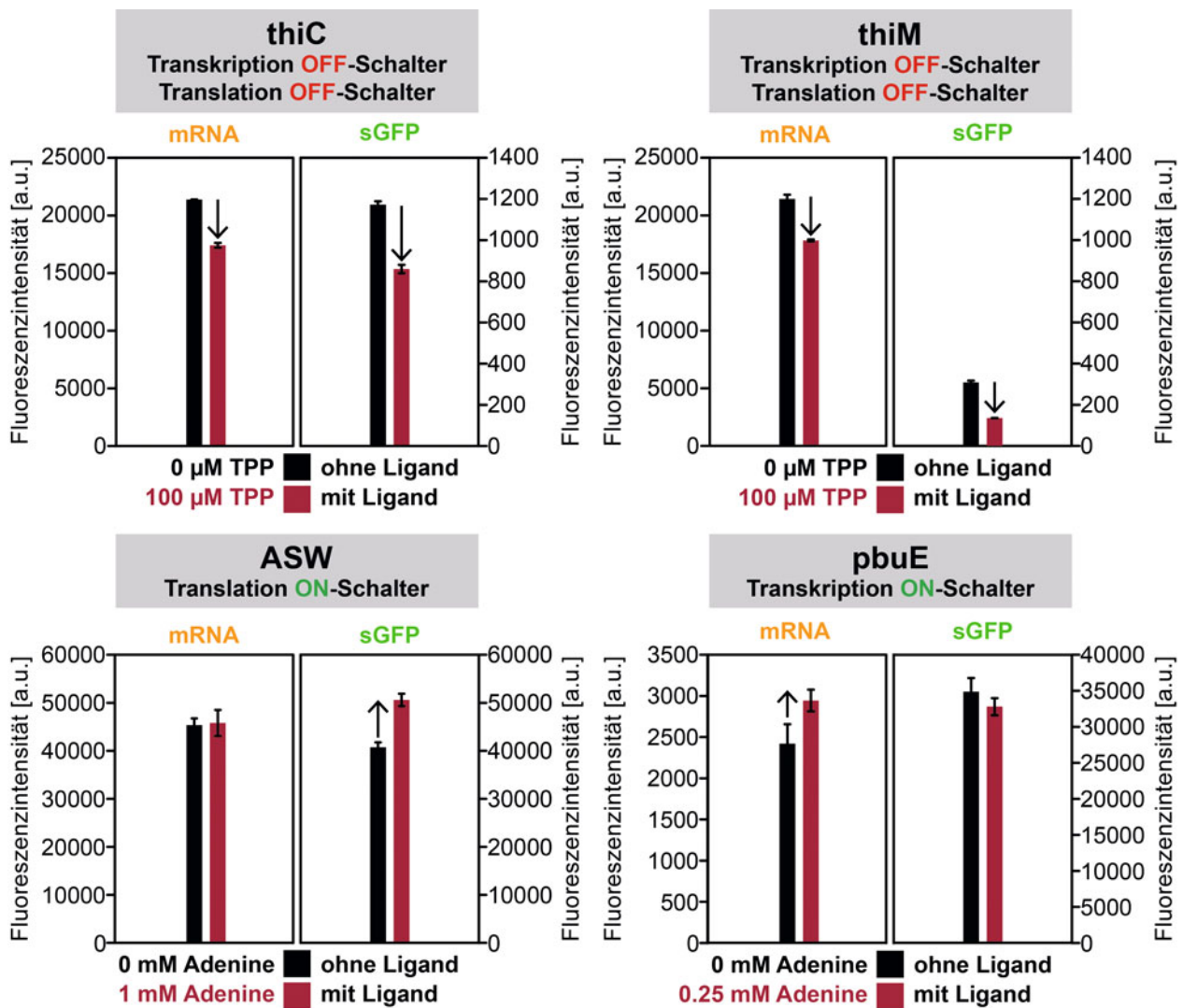
Die spezifische Bindung der Riboschalter an Metabolite, z. B. Nukleobasen, Aminosäuren, Aminoglykoside bis hin zu Fluorid-Anionen, setzt eine spezifische molekulare Erkennung des Metaboliten durch die RNA voraus. So binden die Metabolite spezifisch und mit hoher Affinität an einen hochstrukturierten Teil der mRNA, die ähnlich wie Proteine

spezifische Bindungstaschen bilden kann. In Analogie zum Sprachgebrauch im von Tuerk und Gold entwickelten SELEX-Verfahren wird dieser Metabolit-bindende Teil des Riboschalter die Aptamerdomäne genannt [7, 8]. Die Bindung des Metaboliten an die Aptamerdomäne des Riboschalters bewirkt eine Änderung der Konformation der nachfolgen-

den (3′)-mRNA-Sequenz der Expressionsplattform. Die Umfaltung der mRNA-Expressionsplattform bewirkt die Weiterleitung des Signals, und die Zelle reagiert so auf die Änderung der Konzentration des Metaboliten. Diese Umfaltung kann bereits stattfinden, während die mRNA überhaupt erst transkribiert wird (Abb. 1).



▲ **Abb. 2:** Zellfreies Reportersystem zur gleichzeitigen Messung von mRNA und Proteinmengen mithilfe von genregulierenden Riboschaltern. Für diesen Assay werden einige Komponenten benötigt, die auch aus dem zellfreien Expressionssystem bekannt sind (Zellextrakt, tRNAs, T7 RNAP, Salze, ATP, Aminosäuren, NTPs, Ko-Faktoren etc.). Das Spezielle an unserem System ist das Design des DNA-Templates (mit genregulierenden Riboschaltern plus Mango-Modul) sowie die Messung der Menge transkribierter RNA durch das Hinzugeben von TO3-Acetat. Die Translationseffizienz wird durch die gemessene Fluoreszenzintensität von sGFP ermittelt. Einfache Modulation dieses Systems kann durch unterschiedliche Riboschalter im DNA-Template und durch Zugabe des entsprechenden Liganden erfolgen.



▲ **Abb. 3:** Gemessene Fluoreszenzintensitäten des zellfreien Reportersystems mit unterschiedlichen Riboschaltern. ThiC und thiM aus *Escherichia coli* gelten als Transkriptions- und Translationsregulierend und führen beim Vorhandensein des Liganden TPP zu einer Erniedrigung der mRNA- als auch der sGFP-Fluoreszenzintensitäten, verglichen mit ligandenfreien Messungen. Beim Adenin-bindenden Riboschalter ASW aus *Vibrio vulnificus* ist beim Vorhandensein von Liganden (Adenin) nur eine Erhöhung der sGFP-Fluoreszenzintensität zu messen, aber keine Änderung in der Fluoreszenzintensität der mRNA, da es sich bei diesem Riboschalter um einen translationsaktivierenden Riboschalter handelt. Der transkriptionsaktivierende pbuE-Schalter aus *Bacillus subtilis* zeigt eine Erhöhung der mRNA-Fluoreszenzintensität beim Vorhandensein von Liganden (Adenin) und keine nennenswerte Änderung in der sGFP-Fluoreszenzintensität. Zeitpunkt der hier dargestellten Daten: nach 120 min.

Der Faltungszustand der Expressionsplattform diktiert nun das Schicksal der mRNA: Neben der Möglichkeit, dass die Umfaltung der Expressionsplattform ihren eigenen Abbau befördert oder inhibiert, findet man in den bisher gefundenen 25 Riboschalterklassen insbesondere zwei Mechanismen (**Abb. 1**): Expressionsplattformen Transkriptions-regulierender Riboschalter falten in ein Terminationssignal, das ihre eigene Synthese beendet. Dies hat zur Folge, dass der entscheidende Teil der mRNA, die codierende Sequenz, erst gar nicht hergestellt wird. Translations-regulierende Riboschalter wiederum können durch einen Faltungszustand ihrer Expressionsplattform verhindern, dass die mRNA von Ribosomen erkannt und in die von ihr codierten Proteine übersetzt wird.

Für alle diese funktionalen Varianten besteht nun die Möglichkeit, dass die Bindung des Metaboliten den funktionalen Prozess befördert oder behindert; es gibt also ON- und OFF-Riboschalter (**Abb. 1**).

Um zu verstehen, welcher dieser beiden fundamentalen Mechanismen der Genregulation – Transkriptions- oder Translationsregulation – von einem bestimmten Riboschalter angewandt wird, muss man parallel und gleichzeitig sowohl die Menge seiner eigenen mRNA als auch die Menge seines Genprodukts (Protein) in der Zelle quantifizieren: Auf Transkriptionsebene regulierende Riboschalter zeigen signalabhängig eine Änderung der Proteinmenge, die quantitativ mit der Änderung der Menge an in voller Länge hergestellter mRNA einhergeht. Auf

Translationsebene regulierende Riboschalter zeigen signalabhängige Änderung in der Proteinmenge, die allerdings nicht mit eventuellen Änderungen der mRNA-Menge korreliert ist.

Um gleichzeitig mRNA- und Proteinmengen quantifizieren zu können, haben wir ein neues zellfreies Reportersystem entwickelt [1] (**Abb. 2**). Unser Reportersystem kann die Wirkungsweise eines beliebigen Riboschalters aufklären, solange dessen Sequenz bekannt ist: Das offene, zellfreie System erlaubt eine genaue Kontrolle aller beteiligten Komponenten, von der mRNA über die Translationsmaschinerie bis zu den exprimierten Proteinen als funktionalem Readout. Das System ist so konzipiert, dass externe Faktoren – wie Temperatur und auch die Sig-

nalstärke – beliebig verändert werden können, denn nicht alle Riboschalter wirken hier im gleichen Konzentrations- oder Temperaturbereich. Der Clou des neuen Systems ist es, dass in Abhängigkeit der Signale automatisch beide entscheidenden Konzentrationen gleichzeitig erfasst werden: die Menge der vollständig hergestellten mRNA und die Menge des exprimierten Reporterproteins – und zwar beides über hochempfindliche und unabhängige, d. h. bei unterschiedlicher Wellenlänge emittierenden Fluoreszenzsignale. Die Menge an vollständig hergestellter mRNA wird anhand des Mango-Moduls gemessen, das wir an das 3'-Ende der mRNA gesetzt haben, um tatsächlich nur in voller Länge vorhandene mRNA sichtbar zu machen. Die orange Fluoreszenz des Mango-Moduls nimmt ab, sobald die Herstellung der vollständigen mRNA durch eine signalabhängige Riboschalter-Umfaltung gehemmt wird. Die grüne Fluoreszenz des Reporter-Proteins sGFP nimmt ab, sobald der Translationsapparat diese mRNA entweder nicht mehr erkennt, weil der Riboschalter die Erkennungsstelle verdeckt, oder diese einfach nicht ausreichend mehr vorhanden ist, weil der Riboschalter die Herstellung verhindert.

Allerdings wirken nicht alle Riboschalter exklusive nur auf einer der beiden Ebenen. Sie sind also häufig nicht strikt ausschließlich transkriptions- oder translationsregulierend. Durch die gleichzeitige Quantifizierung der mRNA- und der Proteinmenge ist unser System in der Lage, auch Zwischenstufen beider Funktionsweisen sichtbar zu machen, wie wir am Beispiel dreier Riboschalter zeigen (**Abb. 3**). Für die Genregulation ist außerdem nicht nur die *ad hoc*-Umsetzung eines Signals von Bedeutung, sondern auch der zeitliche Verlauf dieser Signalwirkung. Die Robustheit unseres Systems erlaubt eine Beobachtung der mRNA- und der Proteinmengen über Zeiträume bis zu zwei Stunden, währenddessen das Signal einmalig oder beliebig oft wiederholt oder konstant appliziert werden kann.

Unsere Experimente zeigen, dass die maximale Regulationspanne eines Riboschalters stark variieren kann und nicht nur von der Herstellungseffizienz der jeweiligen mRNA bzw. des zugehörigen Proteins abhängig ist, sondern auch von deren jeweiliger Stabilität. Auch diese Eigenschaft kann in unserem Reportersystem charakterisiert werden, indem beispielsweise die Neuproduktion von mRNA ab einem bestimmten Zeitpunkt

durch Inhibition der RNA-Polymerase verhindert wird.

Zusammenfassend haben wir einen zellfreien Assay entwickelt, der gleichzeitig Transkriptions- und Translationseffizienz über orthogonale Fluoreszenzreadouts ermöglicht. Der modulare Aufbau des Reportergens ermöglicht es, viele verschiedene mRNA-Regulationselemente einzubauen. Wir zeigen dies für verschiedene Riboschalter und konnten zudem zeigen, dass es neben selektiven Transkriptions- und Translationschaltern auch hybride Riboschalter gibt, die beide Prozesse in einer metabolitkonzentrationsabhängigen Weise regulieren. Im Gegensatz zu zellulären Assaysystemen erlaubt der zellfreie Assay eine komplette Kontrolle aller an der Regulation beteiligten Komponenten, was wichtige Einsichten für quantifizierende, systembiologische Forschungsansätze liefert. ■

Literatur

- [1] Bains JK, Qureshi NS, Ceylan B, Wacker A, Schwalbe H (2023) Cell-free transcription-translation system: a dual read-out assay to characterize riboswitch function. *Nucleic Acids Res* 51: e82
- [2] Miranda-Rios J, Navarro M, Soberon M (2001) A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9736–9741
- [3] Stormo GD, Ji Y (2001) Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression? *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9465–9467
- [4] Winkler W, Nahvi A, Breaker RR (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419: 952–956

- [5] Mironov A, Gusarov I, Rafikov R et al. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* 111: 747–756
- [6] Schwalbe H, Buck J, Fürtig B et al. (2007) Structures of RNA switches: insight into molecular recognition and tertiary structure. *Angew Chem Int Ed Engl* 46: 1212–1219
- [7] Gilbert SD, Batey RT (2005) Riboswitches: natural SELEXion. *Cell Mol Life Sci* 62: 2401–2404
- [8] Tuerk C, Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249: 505–510
- [9] Helmling C, Wacker A, Wolfinger MT et al. (2017) NMR Structural Profiling of Transcriptional Intermediates Reveals Riboswitch Regulation by Metastable RNA Conformations. *J Am Chem Soc* 139: 2647–2656
- [10] Helmling C, Klötzner DP, Sochor F et al. (2018) Life times of metastable states guide regulatory signaling in transcriptional riboswitches. *Nat Commun* 9: 944
- [11] Reining A, Nozinovic S, Schlepckow K et al. (2013) Three-state mechanism couples ligand and temperature sensing in riboswitches. *Nature* 499: 355–359

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. Harald Schwalbe
 Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
 Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz (BMRZ)
 Goethe-Universität Frankfurt
 Max-von-Laue-Straße 7
 D-60438 Frankfurt a. M.
 schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Harald Schwalbe

Chemiestudium und Promotion. 1993–1995 PostDoc. 1995–1999 Habilitand. 1999–2001 Assistant Professor. 2001 Associate Professor. Seit 2003 Professor für Chemie an der Goethe-Universität Frankfurt a. M. 2011–2023 Sprecher des SFB 902 „Molekulare Mechanismen RNA-basierter Regulation“. 2020 Gründer des weltweiten Forschungsnetzwerks Covid19-nmr. Seit 2022 Direktor des EU-Infrastrukturprogramms Instruct-ERIC.



Maria A. Wirtz Martin

Biochemiestudium in Frankfurt a. M. Seit 2020 Promotion im Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe Universität Frankfurt a. M.



Anna Wacker

Biochemiestudium in Frankfurt a. M. 2012 Promotion. 2013–2019 Koordinatorin des SFB 902. Seit 2020 PostDoc bei Prof. Dr. H. Schwalbe, Goethe-Universität Frankfurt a. M.