

Argonaute-Proteine

Die erstaunliche Vielseitigkeit der Argonauten-Crew

SARAH WILLKOMM, BENEDIKT MOISSL, HENRI MICHEL, DINA GROHMANN
LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE UND ARCHAENZENTRUM,
UNIVERSITÄT REGENSBURG

Cellular nucleic acid levels are specifically regulated by Argonaute (Ago) proteins. Eukaryotic (e)Ago participates mainly in posttranscriptional regulation of gene expression. In contrast, prokaryotic (p)Ago proteins are involved in defense processes. Our work adds to the understanding of pAgo function and elucidates dynamic aspects of Ago-mediated substrate binding thereby highlighting mechanistic differences between eAgo and pAgo proteins.

DOI: 10.1007/s12268-020-1453-8
© Die Autoren 2020

In allen drei Domänen des Lebens übernehmen Argonaute(Ago)-Proteine Funktionen in der Regulation zellulärer Nucleinsäurelevel. Alle bisher charakterisierten Ago-Proteine binden kurze RNA- oder DNA-Oligonukleotide (*guides*), die die Erkennung von komplementären Nucleinsäuren (*targets*) ermöglichen. Katalytisch aktive Ago-Varianten können ein *target* endonukleolytisch spalten. eAgos sind Schlüsselenzyme der RNA-Interferenz (RNAi), durch die ca. 60 Prozent unserer Gene posttranskriptionell reguliert werden. Fehler in der RNAi haben verheerende Konsequenzen und verursachen z. B. Diabetes, Krebs und Herzversagen. Neueste Studien u. a. aus unserem Labor zeigen, dass pAgos in einen anderen biologischen Prozess involviert sind – der Verteidigung einer Zelle gegen Fremd-DNA. Wie dies auf molekularer Ebene abläuft, ist an vielen Stellen nur wenig verstanden.

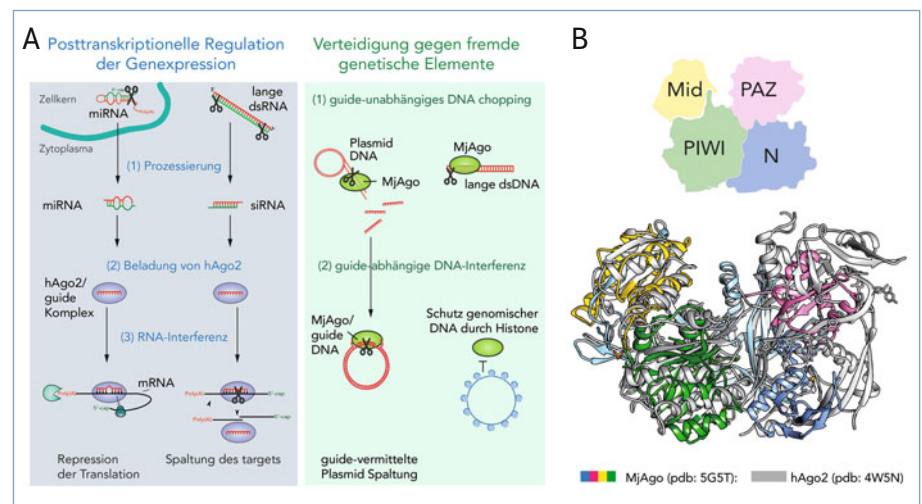
Argonaute ist das Schlüsselenzym der RNA-Interferenz

Hauptakteur der RNAi in humanen Zellen ist das katalytisch aktive hAgo2 (**Abb. 1A**), das mit nicht-codierenden microRNAs (miRNA) assoziiert. Nach Transkription werden miRNAs über verschiedene Biogeneseschritte prozessiert. Die reife ca. 21 Nucleotide lange doppelsträngige miRNA wird dann durch hAgo2 gebunden, wobei einer der beiden Stränge als *guide* in hAgo2 verbleibt. Da

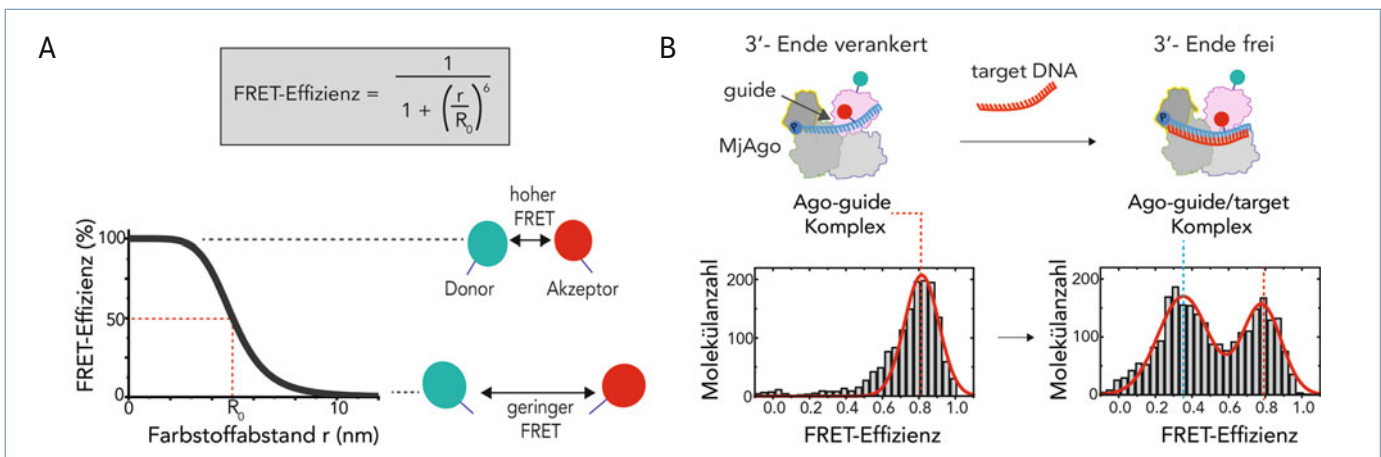
eine partielle Komplementarität zwischen *guide* und *target* ausreicht, um einen Effekt zu erzielen, kann eine einzelne miRNA über hundert mRNAs regulieren. Außerdem kann

hAgo2 mit exogen zugeführten kurzen RNAs (siRNA) beladen werden. Dieser Weg hat sich schnell als hilfreiches Werkzeug in der Molekularbiologie etabliert, um die Expression spezifischer Gene zu unterbinden. Über den miRNA-gesteuerten Weg wird meist die Translation der *target*-mRNA reprimiert. Ist hAgo2 jedoch mit einer zum *target* vollständig komplementären siRNA beladen, kommt es zur endonukleolytischen Spaltung des *targets* (**Abb. 1A**). Beide Fälle führen zur Reduktion der Proteinproduktion.

Aufgrund der weitreichenden Bedeutung der RNAi für die Zelle und des biotechnologischen Anwendungspotenzials sind Struktur und molekulare Mechanismen des Proteins von großem Interesse. pAgos spielen beim strukturellen Verständnis der Ago-Familie eine wichtige Rolle, da hAgo2 zunächst nicht kristallisierbar war. Die pAgo-



▲ **Abb. 1:** Regulation von Nucleinsäureleveln in der Zelle durch Argonaute-Proteine. **A**, Mechanismus der humanen RNA-Interferenz (RNAi) als posttranskriptioneller Regulationsmechanismus und der archaeellen DNA-Interferenz (DNAi) [8] zur Verteidigung gegen Fremd-DNA. Bei der RNAi werden im Kern transkribierte oder exogen zugeführte lange dsRNAs durch RNasen zu kurzen miRNAs oder siRNAs prozessiert (links, 1). Diese werden von hAgo2 gebunden (links, 2), ein Strang wird entlassen, während der andere als *guide* hAgo2 zu komplementären *target*-RNAs führt, die direkt gespalten oder über die Rekrutierung weiterer Proteine degradiert werden (links, 3). Das archaeelle MjAgo kann sich mittels *guide*-unabhängiger dsDNA-Spaltung unabhängig von zusätzlichen Nucleasen *guide*-DNAs herstellen (rechts, 1), was jedoch ein relativ langsamer Prozess ist. Mit Hilfe dieser kurzen *guide*-DNA-Substrate kann komplementäre dsDNA in einem zweiten Schritt effizient gespalten werden (rechts, 2). **B**, Strukturelle Homologie von hAgo2 und MjAgo [4]. N: N-terminale Domäne; PAZ: PIWI-Argonaute-Zwille-Domäne; Mid: *middle*-Domäne; PIWI: *P element-induced wimpy testis*-Domäne.



▲ Abb. 2: Einzelmolekül FRET-Studien zeigen Konformationsänderungen des Ago-guide-Komplexes auf. **A**, Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz (r : Abstand zwischen den Fluorophoren). **B**, Hohe FRET-Effizienz bei Verankerung des 3'-Endes des guides in der PAZ-Domäne. Bindung des targets löst Freigabe des 3'-Endes aus, was sich in einer Population mit geringer FRET-Effizienz widerspiegelt [5].

Varianten aus *Pyrococcus furiosus* (PfAgo) [1], *Aquifex aeolicus* [2] und *Thermus thermophilus* (TtAgo) [3] wurden als erste strukturell aufgeklärt. Charakteristisch sind die vier Domänen (N-, PAZ-, Mid- und PIWI-Domäne), die in zwei Flügeln angeordnet sind (**Abb. 1B**). Das 5'- bzw. das 3'-Ende des guide-Strangs wird in der Mid- respektive in der PAZ-Domäne gebunden. Die Nukleotide des guides sind jedoch exponiert, um eine Hybridisierung mit dem target zu ermöglichen.

Konformationelle Dynamik ermöglicht Argonaute-vermittelte Nukleinsäurebindung

Um die Dynamik von Ago-Proteinen zu analysieren, nutzt unsere Arbeitsgruppe Einzelmolekül-FRET-Messungen. FRET steht für Förster-Resonanzenergietransfer, ein Prozess, bei dem Energie von einem Donor- auf einen in räumlicher Nähe befindlichen Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff übertragen wird (**Abb. 2A**). Dieses Messverfahren wird auch als „molekulares Lineal“ bezeichnet, weil zum einen der Energietransfer direkt proportional zum Abstand zwischen den Fluorophoren ist und FRET zweitens im biomolekular relevanten Nanometerbereich abläuft (ca. 2–8 nm). Die Effizienz des Energietransfers kann auch bei einzelnen Molekülen gemessen werden. Somit kann die konformationelle Heterogenität in einer Molekülpopulation erfasst werden. Für unsere FRET-Messungen nutzten wir zunächst das pAgo aus dem hyperthermophilen Archaeon *Methanocaldococcus jannaschii* (MjAgo), da die erforderliche positionsgenaue Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe zu diesem Zeitpunkt nur mit einem pAgo möglich war. Unsere

smFRET-Messungen zeigen, dass das 3'-Ende des guides bei Bindung des targets aus der PAZ-Bindetasche entlassen wird (**Abb. 2B**, [5]). Der hyperthermophile Ursprung unseres Modellproteins ermöglicht eine Trennung von target-Bindung und -Spaltung über die Temperatureinstellung. Dadurch konnten wir nachweisen, dass bereits allein die Bindung des targets die Freisetzung des 3'-Endes des guides verursacht.

Um zu verstehen, ob die molekularen Mechanismen der guide-Bindung zwischen MjAgo und hAgo2 konserviert sind, haben wir eine Technik namens SLAM FRET (*site-specific labeling of native mammalian proteins*) entwickelt. Damit ist nun auch eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung von nativem hAgo2 möglich [6]. Der Vorteil hier: hAgo2 wird direkt in humanen Zellen hergestellt und enthält somit alle funktionell notwendigen posttranslationalen Modifikationen. Zeitaufgelöste smFRET-Messungen mit hAgo2 in unserem Labor zeigen u. a., dass die gleiche Konformationsänderung in Bezug auf den guide bei Beladung von hAgo2 mit einem target hervorgerufen wird. Interessant ist, dass ein dynamisches Dissoziieren und Assoziieren des guide-Strangs an die PAZ-Domäne stattfindet.

Prokaryotische Argonaute-Proteine – Verteidigung statt RNA-Interferenz

Mittlerweile verdeutlichen Kristallstrukturen von hAgo2 die strukturelle Ähnlichkeit von pAgos und eAgos. Aber impliziert eine konservierte Struktur auch eine gleiche biologische Rolle des Proteins? Mehrere Indizien deuteten früh darauf hin, dass der Prozess der RNAi nicht in Prokaryoten vorkommt, da ihnen z. B. Homologe wichtiger Proteine für

die Prozessierung von miRNAs fehlen. Außerdem weisen die bisher charakterisierten pAgo-Vertreter ein im Vergleich zu eAgos viel breiteres guide- und target-Spektrum auf. Während eAgos ausschließlich RNA nutzen, wird von den meisten bisher untersuchten pAgo-Varianten DNA bevorzugt [7]. Welche Funktion haben also pAgos?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden in verschiedenen Laboren Nukleinsäuren sequenziert, die im zellulären Kontext mit pAgos assoziiert sind. Die Ergebnisse zeigen, dass von pAgos vor allem Sequenzabschnitte fremder Nukleinsäuren (z. B. Plasmid-DNA) gebunden werden. Die Frage, wie die Fremd-DNAs zu guide-Strängen prozessiert werden, beantwortet u. a. unser archaeelles Modellsystem. Neben kurzen DNA guide- und target-Strängen kann MjAgo lineare und zirkuläre doppelsträngige DNA sogar ohne einen guide schrittweise prozessieren [8] – eine Aktivität, die als DNA *chopping* bezeichnet wird [9]. Die eigene genomische DNA wird durch Histone vor einem Abbau bewahrt [8]. Somit stellen pAgos ihre eigenen guide-Stränge her. Bei Invasion fremder DNA könnte konstitutiv exprimiertes Ago folglich eine rasche erste Reaktion der Verteidigung ermöglichen. Durch die selbst produzierten guide-Stränge wird der Abbau der Fremd-DNA dann in einer zweiten Phase beschleunigt. Guide-unabhängiger Abbau linearer und zirkulärer doppelsträngiger DNA (Plasmide) wird auch von TtAgo und PfAgo katalysiert [9,10]. Dies lässt vermuten, dass DNA *chopping* bei pAgos weit verbreitet ist. Es gibt jedoch auch pAgos, welche guide-RNAs verwenden, um eine target-DNA zu binden [11].

Das molekulare Waffenarsenal der Prokaryoten

Auffällig ist die funktionelle Ähnlichkeit der pAgos zu den Nukleasen der CRISPR-Cas-Systeme, was ihnen in den letzten Jahren erhöhte Aufmerksamkeit verschafft hat. In einigen Fällen ist das *ago*-Gen sogar im CRISPR-Cas-Operon codiert [11] und in *Thermus thermophilus* wurde eine Stimulation der Cas-Expression durch Ago beobachtet [12]. Daher wird spekuliert, ob der Ago-Verteidigungsmechanismus möglicherweise die erste Verteidigungslinie bildet und später sogar ein Austausch von Produkten zwischen beiden Systemen erfolgt. Die Tatsache, dass in manchen Prokaryoten mehrere Verteidigungssysteme codiert sind, verdeutlicht, dass Prokaryoten aufgrund der Vielzahl an Viren und Bakteriophagen unter konstantem evolutionären Druck stehen. Das Wettrüsten zwischen Gegner und Wirt könnte so die hohe Diversität der pAgo- und CRISPR-Cas-Mechanismen erklären. ■

Literatur

- [1] Song J, Smith SK, Hannon GJ (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305:1434–1437
- [2] Yuan YR, Pei Y, Ma JB et al. (2005) Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* 19:405–419
- [3] Wang Y, Juranek S, Li H et al. (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* 456:921–926
- [4] Willkomm S, Oellig CA, Zander A et al. (2017) Structural and mechanistic insights into an archaeal DNA-guided Argonaute protein. *Nat Microbiol* 2:17035
- [5] Zander A, Holzmeister P, Klose D et al. (2014) Single-molecule FRET supports the two-state model of Argonaute action. *RNA Biology* 11:45–56
- [6] Gust A, Jakob L, Zeitler D et al. (2018) Site-specific labeling of native mammalian proteins for single-molecule FRET measurements. *ChemBioChem* 19:780–783
- [7] Willkomm S, Makarova KS, Grohmann D (2018) DNA silencing by prokaryotic Argonaute proteins adds a new layer of defense against invading nucleic acids. *FEMS Microbiology Reviews* 42:376–387
- [8] Zander A, Willkomm S, Ofer S et al. (2017) Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Nat Microbiol* 2:17034
- [9] Swarts DC, Szczepaniak M, Sheng G et al. (2017) Autonomous generation and loading of DNA guides by bacterial Argonaute. *Mol Cell* 65:985–998
- [10] Swarts DC, Hegge JW, Hinojo I et al. (2015) Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA. *Nucleic Acids Res* 43:5120–5129
- [11] Kaya E, Doxzen K, Knoll K et al. (2016) A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity. *Proc Natl Acad Sci* 113:4057–4062
- [12] Swarts DC, Koehorst JJ, Westra ER et al. (2015) Effects of argonaute on gene expression in *Thermus thermophilus*. *PLoS One* 10:e0124880

Funding 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. Dina Grohmann
Lehrstuhl für Mikrobiologie und
Archaeenzentrum
Universität Regensburg
Universitätsstraße 31
D-93053 Regensburg
dina.grohmann@ur.de

AUTOREN



Das Argonaute-Experten-Team studiert sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Ago-Proteine und erforscht deren evolutionäre Entwicklung und molekulare Mechanismen mit biochemischen und biophysikalischen Methoden (v.l.n.r.): Benedikt Moissl, Dina Grohmann, Sarah Willkomm und Henri Michel

Benedikt Moissl

2012–2018 Studium Biochemie an der Universität Regensburg, seit 2018 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Grohmann.

Dina Grohmann

1996–2002 Studium Biologie an der Universität Düsseldorf, seit 2019 W3-Professorin für Mikrobiologie und Leiterin des Archaeenzentrums an der Universität Regensburg.

Sarah Willkomm

2006–2011 Studium Molecular Life Sciences an der Universität zu Lübeck, seit 2015 PostDoc am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.

Henri Michel

2011–2019 Studium Biochemie an der Universität Ulm und an der Universität Tübingen, seit 2020 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Grohmann.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer