

## Nicht-codierende RNA

# Wie RNA die Genregulation beeinflusst

IANA KIM, VLADYSLAVA GORBOVYTSKA, CLAUS-D. KUHN  
ELITENETZWERK BAYERN, UNIVERSITÄT BAYREUTH

The first described non-coding RNAs (ncRNAs), microRNAs, regulate mRNA fate in a post-transcriptional manner. With the advent of modern high-throughput methods many novel classes of ncRNAs were described. In contrast to microRNAs, most of these regulate the transcription process itself and hence are of fundamental biological importance. Work in our laboratory addresses how transcriptional regulation by ncRNAs influences biological processes ranging from regeneration to neuronal plasticity.

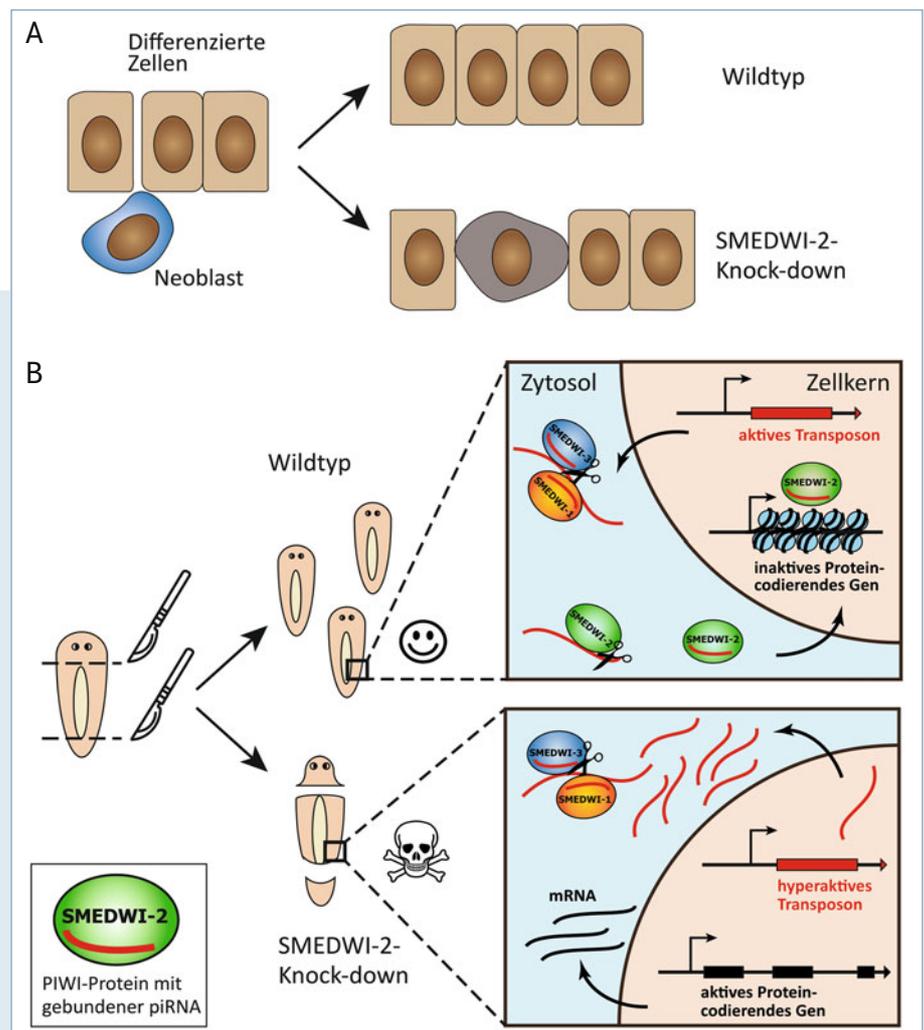
DOI: 10.1007/s12268-017-0832-2  
© Springer-Verlag 2017

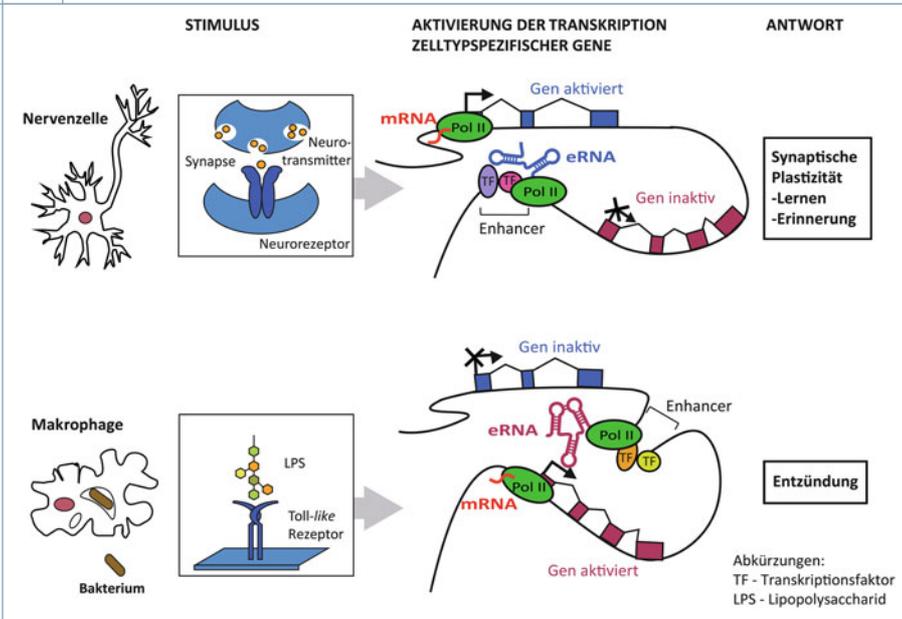
■ Mit der Entdeckung von Mikro-RNAs wurde klar, dass RNA nicht nur ein Zwischenprodukt der Proteinsynthese ist, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielt. Da Mikro-RNAs nicht in Proteine überscribed werden, wurden sie als nicht-codierende RNA bezeichnet (*non-coding RNA*, ncRNA). Mikro-RNAs sind in der Lage, viele

verschiedene *messenger*-RNAs (mRNAs) zu erkennen und deren Abbau einzuleiten. Sie sind essenziell für Entwicklungsentscheidungen humaner Zellen und spielen in den meisten höheren Organismen eine zentrale Rolle, wie z. B. bei der Larvenentwicklung von *Caenorhabditis elegans*. Deregulierte Mikro-RNAs sind Kennzeichen lebensbedrohlicher Krankheiten wie der Leukämie und dem Lymphom.

Durch die Verbesserung der Hochdurchsatz-Analysemethoden für RNAs wurden weitere Klassen von ncRNA entdeckt. Blockiert man deren Funktion oder Entstehung, so hat dies gravierende Folgen für den gesamten Orga-

► **Abb. 1:** Wie piRNAs die Regeneration von Planarien steuern. **A,** Nach dem Knock-down eines essenziellen PIWI-Proteins, SMEDWI-2, sind die Stammzellen (Neoblasten) in Planarien nicht mehr in der Lage zu differenzieren. **B,** Das Schema links zeigt ein klassisches Amputationsexperiment, bei dem ein Tier in drei Teile zerteilt wird, um dessen Regenerationsfähigkeit zu prüfen. Rechts ist unsere Hypothese für die essenzielle Funktion von piRNAs in Planarien dargestellt: In Wildtyp-Tieren bauen sie aktive Transposons im Zytosol ab. Darüber hinaus schalten an SMEDWI-2 gebundene piRNAs Transposons und andere mRNAs wahrscheinlich auch auf epigenetischem Wege im Zellkern aus. Da Planarien keine DNA-Methylierung besitzen, gehen wir davon aus, dass diese Repression auf heterochromatische Histonmodifikationen zurückzuführen ist. Die Sequenzinformation der piRNAs dient dabei dazu, die Heterochromatinbildung nur in bestimmten Bereichen des Genoms auszulösen. Wird SMEDWI-2 mithilfe von RNA-Interferenz ausgeschaltet (SMEDWI-2-Knock-down), werden sowohl Transposons als auch Protein-codierende Gene dereguliert, was die Regeneration blockiert und zum Tod des Organismus führt.





**▲ Abb. 2:** Die Rolle von Enhancer-RNAs (eRNAs) bei der zellspezifischen Genaktivierung. Die Abbildung zeigt zwei biologische Prozesse, bei denen eRNAs eine wichtige Rolle spielen. Diese Prozesse vereint, dass die betroffenen Zellen eine Vielzahl von Stimuli zusammenführen müssen, um eine schnelle, spezifische Zellantwort zu geben. Zum einen ist ein solches Verhalten bei Neuronen der Fall, die exzitatorische Aktivitätsänderungen mithilfe von eRNAs in langfristige Genexpressionsänderungen übersetzen. Diese Änderungen sind eine der Grundlagen für die Plastizität des Gehirns, das heißt für dessen Fähigkeit zum Lernen und Erinnern. Auch bei der Stimulation von Makrophagen durch fremdartige Substanzen, wie z. B. Bakterien, spielen eRNAs eine wichtige Rolle. Nach ihrer Stimulation lösen Makrophagen eine akute Entzündungsreaktion aus, welche die Entfernung der Fremdsubstanzen entscheidend vorantreibt.

nismus. Leider ist von den meisten neu entdeckten ncRNAs nicht bekannt, wie sie im Detail wirken. Diese Wissenslücke bringt mit sich, dass der Einfluss von ncRNAs auf Zellen höherer Organismen und auf menschliche Erkrankungen nicht abgeschätzt werden kann.

Das Ziel unserer Arbeit ist es deshalb, die Wirkungsweise neuartiger ncRNAs zu entschlüsseln. Wir hoffen, dass die Aufklärung ihrer molekularen Wirkmechanismen zum Verständnis des Einflusses von ncRNAs auf die menschliche Gesundheit beiträgt. Die genaue Kenntnis der Wirkmechanismen ist die Voraussetzung für die Entwicklung klassischer oder auch nukleinsäurebasierter Medikamente. Im Folgenden möchten wir zwei Projekte aus unserem Labor vorstellen, die sich dem Einfluss von ncRNAs auf die Organregeneration und neuronale Plastizität widmen.

**Wie piRNAs die Organregeneration steuern**

Während es für den Menschen und die meisten höheren Lebewesen nach Abschluss ihrer Embryonalentwicklung nicht mehr möglich ist, ganze Organe aus einzelnen Stammzellen zu formen, sind Süßwasser-Planarien von Stamm der Plattwürmer jedoch dazu in der Lage. Sie verdanken ihre Regenerationsfähigkeit einer Vielzahl von Neoblasten, pluripotenten Stammzellen, die im ganzen Körper

erwachsener Tiere verteilt sind. Neoblasten sind in der Lage, jedwedes Organ eines adulten Tieres nachzubilden. Die Regenerationsfähigkeit von Planarien ist so ausgeprägt, dass selbst amputierte Fragmente, die nur ein Hundertstel des adulten Organismus ausmachen, zu vollständigen Tieren heranwachsen können [1]. Diese erstaunlichen Fähigkeiten werden durch eine Vielzahl konservierter Transkriptionsfaktoren gesteuert, die im ganzen Tierreich weit verbreitet sind. Im Jahr 2005 wurde jedoch klar, dass auch kleine RNAs, die *PIWI-interacting RNAs* (piRNAs), beim Regenerationsprozess von Planarien eine wichtige Rolle spielen [2]. Die piRNAs sind einzelsträngige RNAs, die an Mikro-RNAs erinnern, jedoch mit einer Länge von 23 bis 35 Nukleotiden (je nach Organismus) etwas länger sind als diese. Sie binden an PIWI-Proteine, eine Klasse von Proteinen, die zur Argonaute-Familie gehören (Argonaute selbst bindet an Mikro-RNAs). Die dominierende Funktion von piRNAs ist die posttranskriptionale und epigenetische Stilllegung von Transposons [3]. Transposons sind bei Säugetieren überwiegend in den Keimzellen und während der embryonalen Präimplantationsphase aktiv, da dort das Genom generell in aktivierter Form vorliegt. Dies ist bei Planarien nicht der Fall – piRNAs kommen dort in großer Zahl in den Neoblasten vor.

Mit unserer Arbeit wollen wir verstehen, wie piRNAs zur Differenzierungsfähigkeit von Neoblasten beitragen. Dies ist deshalb von besonderem Interesse, da ein Knock-down von SMEDWI-2, einem essenziellen PIWI-Protein in Planarien, die Differenzierung von Neoblasten in andere Zelltypen hemmt (Abb. 1A). Da piRNAs in *Drosophila* auf epigenetischem Wege Gene abschalten [4] und sequenzspezifisch mRNAs rekrutieren [5], gehen wir der Frage nach, ob piRNAs in Planarien nicht nur aktive Transposons zerstören, sondern auch Gene regulieren, die essenziell für die Differenzierung von Neoblasten in andere Zelltypen sind. Das Genom von Planarien ist äußerst repetitiv und enthält eine Vielzahl aktiver und inaktiver Transposonsequenzen. Wir vermuten daher, dass piRNAs ihre Sequenzinformation für die Ausbildung von repressiven Chromatinstrukturen (Heterochromatin) nutzen, was wiederum zur gezielten Abschaltung von stammzellrelevanten Genen führen könnte (Abb. 1B). Um den Mechanismus der Genregulation durch piRNAs aufzudecken, bedienen wir uns Hochdurchsatzanalysen von mRNAs und piRNAs aus Planarien und kombinieren diese mit Immunpräzipitations- und RNA-Interferenz-Experimenten. Wir trennen dabei Neoblasten von differenzierten Zellen mithilfe von Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) ab. Dieser Schritt ist unerlässlich, um die möglicherweise unterschiedliche Funktion von piRNAs in Stammzellen und differenzierten Zellen aufzuklären.

Die Ergebnisse unserer Arbeit übertragen wir auf die Organregeneration beim Menschen, wobei wir jedoch nicht davon ausgehen, dass piRNAs eine ähnliche Rolle beim Menschen spielen wie bei Planarien. Allerdings könnten Gene, welche in Planarien von piRNAs reguliert werden, im Menschen z. B. von Mikro-RNAs oder anderen ncRNAs gesteuert werden. Da es immer noch unmöglich ist, ein menschliches Organ aus einer geringen Anzahl von Stammzellen wachsen zu lassen, werden unsere Forschungsergebnisse dazu beitragen, die menschliche Organregeneration besser steuern zu können.

**Wie Enhancer-RNAs zu neuronaler Plastizität beitragen**

Enhancer sind DNA-Elemente, die in großer Zahl in unserem Genom vorkommen und unterschiedliche Transkriptionsfaktoren binden. Diese Bindung wird durch Koaktivator-komplexe, wie Mediator, auf RNA-Polymerase II (Pol II) übertragen und damit in die Akti-

vierung der Transkription spezifischer Zielgene übersetzt. Die kombinatorische Bindung unterschiedlicher zelltypspezifischer Transkriptionsfaktoren an denselben Enhancer bestimmt größtenteils, in welchem Ausmaß ein Gen aktiviert wird, und damit, in welche Zelle sich eine pluripotente Stammzelle entwickelt oder welchem Zelltyp eine Zelle angehört. Dieser Lehrmeinung widerspricht, dass der Aktivierungsgrad eines Gens nur selten allein aus der Kenntnis um gebundene Transkriptionsfaktoren abgeleitet werden kann. Es scheint ein Puzzleteil zu fehlen, um Genaktivierungsraten verlässlich ableiten zu können.

Dieses Puzzleteil könnten die kürzlich entdeckten Enhancer-RNAs (eRNAs) sein. Sie entstehen durch die Transkription von Enhancern mittels Pol II [6, 7] und aktivieren ihre Zielgene in *cis*, ähnlich den Transkriptionsfaktoren, die an die Enhancer-Elemente binden (**Abb. 2**). Im Gegensatz zu den gut untersuchten kleinen ncRNAs (wie z. B. MikroRNAs) ist der Wirkmechanismus von eRNAs noch fast vollständig unbekannt.

Die eRNAs haben eine herausragende Stellung in Neuronen, denn sie tragen zu deren langfristiger Anpassung an synaptische Aktivität bei. Diese Anpassung geht mit einer erheblichen Induktion von *immediate early genes* (IEGs) wie *Arc* und *c-fos* einher [8]. Änderungen der Expression von neuronalen IEGs wird als Ausdruck von Gedächtnisbildung und plastischen Veränderungen der neuronalen Konnektivität gesehen und im Begriff „neuronal Plastizität“ zusammengefasst. Die Fähigkeit von IEGs, schnell auf neuronale Aktivitätsänderungen zu reagieren, basiert darauf, dass die meisten IEG-Promotoren im *promoter-proximal paused state* der Transkription vorliegen. Dies bedeutet, dass der Transkriptionsprozess durch Pol II initiiert wurde, Pol II jedoch vor dem Übergang in die Elongationsphase pausiert. *Promoter-proximal pausing* ist ein nicht auf Neuronen beschränkter Mechanismus, durch den Metazoen ihre Transkriptionsleistung sehr schnell in Reaktion auf eine Vielzahl von Entwicklungsstimuli und auch auf Stimuli aus der Umwelt ändern können.

Wir wollen die Frage beantworten, wie es eRNAs möglich ist, die Transkription von IEGs in Neuronen und anderen Zelltypen zu induzieren. Wir verfolgen dabei die Hypothese, nach der neuronale eRNAs an einen Proteinkomplex binden, der durch Bindung von naszierender mRNA den *paused state* von Pol II auslöst. Die Bindung von eRNAs an densel-

ben Komplex könnte die gebundene naszierende mRNA verdrängen und dadurch zu erhöhten Transkriptionsraten führen [9]. Da bisher in eRNAs keine konservierten Sequenzmotive gefunden wurden, steht für uns im Vordergrund, die funktionell wichtigen Bereiche der mehr als eine Kilobase großen RNAs zu identifizieren. Wir bedienen uns dazu RNA-Seq-basierter Methoden, um die exakten Sequenzen aller neuronalen eRNAs zu bestimmen. Die eRNA-Sekundärstrukturen kartieren wir dann mithilfe von chemischen RNA-Strukturanalysemethoden, wie SHAPE (*selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) und SHAPE-MaP (*SHAPE and mutational profiling*) [10]. Darüber hinaus untersuchen wir die Interaktionen von in Neuronen induzierten eRNAs und in *promoter-proximal pausing* involvierter Proteinkomplexe mithilfe von biochemischen und strukturellen Methoden.

Unsere Experimente haben zum Ziel, die Rolle von eRNAs bei der Regulation der Transkription in höheren, multizellulären Organismen aufzuklären. eRNAs haben das Potenzial, prinzipiell zell- und organspezifische Genexpression zu steuern oder zumindest entscheidend zu beeinflussen. Darüber hinaus tragen eRNAs zur neuronalen Plastizität bei. Es ist deshalb unerlässlich, die Mechanismen ihrer Wirkung besser zu verstehen. ■

## Literatur

- [1] Elliott SA, Sánchez Alvarado A (2013) The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:301–326
- [2] Reddien PW, Oviedo NJ, Jennings JR et al. (2005) SMED-WI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310:1327–1330
- [3] Czech B, Hannon GJ (2016) One loop to rule them all: the ping-pong cycle and piRNA-guided silencing. *Trends Biochem Sci* 41:324–337
- [4] Sienski G, Donertas D, Brennecke J (2012) Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell* 151:964–980
- [5] Vourekas A, Alexiou P, Vretos N et al. (2016) Sequence-dependent but not sequence-specific piRNA adhesion traps mRNAs to the germ plasm. *Nature* 531:390–394
- [6] De Santa F, Barozzi I, Mietton F et al. (2010) A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol* 8:e1000384
- [7] Kim TK, Hemberg M, Gray JM et al. (2010) Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465:182–187
- [8] Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477–485
- [9] Schaukowitz K, Joo JY, Liu X et al. (2014) Enhancer RNA facilitates NELF release from immediate early genes. *Mol Cell* 56:29–42
- [10] Smola MJ, Rice GM, Busan S et al. (2015) Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension and mutational profiling (SHAPE-MaP) for direct, versatile and accurate RNA structure analysis. *Nat Protoc* 10:1643–1669

## Korrespondenzadresse:

Dr. Claus-D. Kuhn  
Elitenetzwerk Bayern, Universität Bayreuth  
BIOmac Forschungszentrum für  
Bio-Makromoleküle  
Universitätsstraße 30  
D-95447 Bayreuth  
Tel.: 0921-55-4356  
claus.kuhn@uni-bayreuth.de  
www.kuhnlab.uni-bayreuth.de

## AUTOREN



### Vladyslava Gorbovytska

2008–2013 Biochemiestudium (B. Sc.) an der Universität Bielefeld. 2013–2016 Studium der Biochemie und Molekularen Biologie (M. Sc.) an der Universität Bayreuth. Seit 2016 Doktorandin in der Arbeitsgruppe „Gene regulation by non-coding RNA“ innerhalb des Elitenetzwerks Bayern an der Universität Bayreuth.



### Iana Kim

2005–2011 Biologiestudium (B. Sc. und M. Sc.) an der Universität Woronesch, Russische Föderation. 2011–2014 Forschungsassistentin an der Russischen Akademie der Wissenschaften in Moskau. Seit 2015 Doktorandin in der Arbeitsgruppe „Gene regulation by non-coding RNA“ innerhalb des Elitenetzwerks Bayern an der Universität Bayreuth.



### Claus-D. Kuhn

1999–2003 Biochemiestudium an den Universitäten Regensburg und Stockholm, Schweden. 2003–2008 Doktorarbeit am Genzentrum der LMU München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Cramer. 2008–2014 Postdoc am Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L. Joshua-Tor. Seit 2014 Gruppenleiter innerhalb des Elitenetzwerks Bayern an der Universität Bayreuth.