

Transkription und RNA-Reifung

Neue Einblicke in die Genregulation mittels funktioneller Multiomik

ANNKATRIN BRESSIN, ANDREAS MAYER
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE GENETIK, BERLIN

Transcription by RNA polymerase II underlies fundamental cellular processes in eukaryotic cells, representing a major regulatory hub in gene expression. Transcription is tightly coupled with co-transcriptional RNA processing to allow the synthesis of functional RNAs. A misregulation can cause human disease. The recent advent of functional multiomics approaches now provides new general insights into the molecular mechanisms that control and link transcription with RNA maturation in cells.

DOI: 10.1007/s12268-022-1750-5
© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Durch die Gentranskription der RNA-Polymerase II (Pol II) werden alle proteincodierenden und eine Vielzahl an nicht codierenden RNAs im Zellkern von eukaryotischen Zellen gebildet. Die Transkription ist streng reguliert um sicherzustellen, dass benötigte Transkripte zur richtigen Zeit und

in der erforderlichen Menge zur Verfügung stehen damit grundlegende zelluläre Prozesse ablaufen können.

Stadien der Transkription

Bei der Pol-II-vermittelten Transkription können folgende Stadien unterschieden werden: Initiation, Elongation und Termination [1]. Während der Initiationsphase beginnt die RNA-Synthese. An die Initiation schließt sich die Elongation an. Während der Elongation wird die RNA Nukleotid für Nukleotid anhand der DNA-Vorlage durch den Pol-II-Elongationskomplex gebildet. Der produktive Elongationskomplex setzt sich aus der Pol II sowie assoziierenden Helferproteinen, den Elongationsfaktoren, zusammen [2]. Die Elongation ist kein kontinuierlicher Vorgang. Bereits kurz nach dem Start pausiert die Pol II im promotor-proximalen Bereich. Dieses frühe Pausieren der Pol II ist hochreguliert und dient als ein allgemeiner Kontrollpunkt in der RNA-Synthese [3]. Auf die Elongation folgt die Termination. Während der Termination dissoziiert die RNA-Polymerase vom Chromatin und steht dann für einen neuen Transkriptionszyklus zur Verfügung.

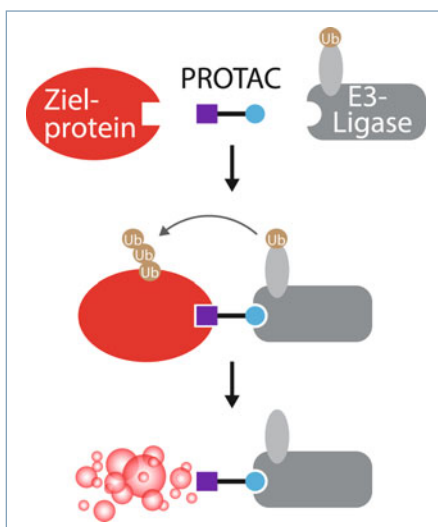
Kopplung von Transkription und RNA-Reifung

Damit funktionelle RNAs entstehen können, ist die Transkription eng mit der Weiterver-

arbeitung der neu entstehenden RNA gekoppelt [4]. Dieser „ko-transkriptionelle“ RNA-Reifeprozess wird von mehreren Enzymkomplexen ausgeführt, die direkt mit der Pol II während der Elongation interagieren. Sobald die naszierende RNA zugänglich ist, wird eine Kappe an ihr 5'-Ende angefügt, die unter anderem deren Stabilität erhöht. Zudem bindet das Spleißosom, ein gigantischer Protein-RNA-Komplex, um nicht proteincodierende Introns aus der RNA herauszuschneiden und codierende Exons miteinander zu verbinden [5]. Am 3'-Ende wird die RNA durch Enzymkomplexe geschnitten und im Anschluss mit einer Sequenz von Adeninresten versehen. Viele der molekularen Mechanismen, die der Koordination von Transkription und RNA-Reifung zugrunde liegen, sind noch unklar.

Zielsetzung und experimenteller Ansatz

Ein wichtiges Ziel unserer Forschungsarbeit ist es, die direkten Funktionen von Proteinen in der Genregulation von menschlichen Zellen aufzuklären und damit neue Einblicke in die Mechanismen der Transkription sowie der Weiterverarbeitung der RNA zu ermöglichen. Um systemweite Einblicke zu erhalten, kommt ein funktioneller „Multiomik“-Ansatz zur Anwendung. Dieser Ansatz beinhaltet Methoden, die es ermöglichen, zielgenau und sehr rasch die Funktion des betreffenden Zielproteins in der menschlichen Zelle auszuschalten, bevor der Phänotyp durch indirekte Effekte überlagert wird. Es handelt sich dabei um die PROTAC (*Proteolysis Targeting Chimera*)-Systeme (Abb. 1, [6]). PROTACs bestehen aus zwei Armen, die über ein Verbindungsstück miteinander verbunden sind. Der eine Arm bindet an das Zielprotein, der andere an eine E3-Ubiquitin-Ligase (Abb. 1). Dies führt zur Markierung des Zielproteins mit Ubiquitin, gefolgt von dessen schnellem Abbau durch das Proteasom. Die unmittelbaren Folgen der raschen Eliminierung des Zielproteins für die Transkription und den RNA-Reifeprozess werden dann in hoher zeitlicher



▲ **Abb. 1:** Schneller und induzierter Abbau von Zielproteinen in der Zelle mittels PROTACs. PROTACs binden gleichzeitig an das Zielprotein (rot) und eine E3-Ubiquitin-Ligase (E3). Dies bewirkt die Ubiquitinierung (Ub) des Zielproteins und dessen schnellen Abbau durch das Proteasom.

Auflösung mit genom-, transkriptom- und proteomweiten Verfahren untersucht.

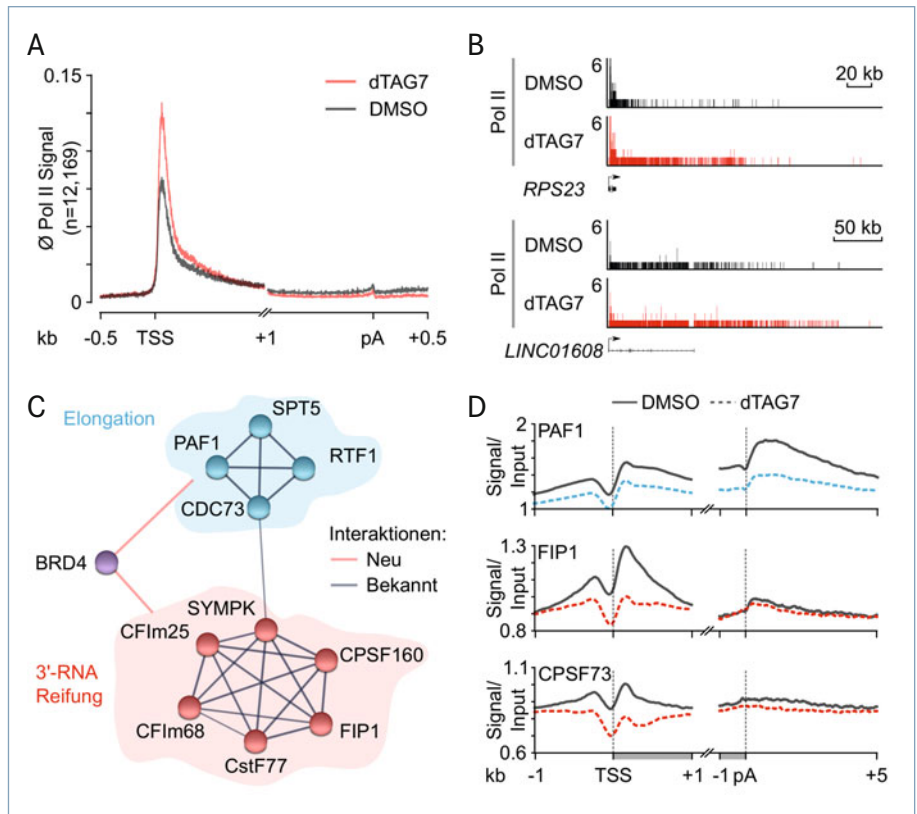
Multiomik am Beispiel von BRD4

Wir haben diesen funktionellen Multiomik-Ansatz kürzlich genutzt, um mögliche direkte Funktionen des Proteins BRD4 in der Regulation der Transkription und RNA-Reifung in menschlichen Zellen aufzuklären [7]. BRD4 ist das bekannteste Mitglied der BET-Proteinfamilie, zu der bei Säugetieren auch BRD2, BRD3 und BRDT zählen [8]. BRD4 ist bei der Entstehung einer Vielzahl menschlicher Erkrankungen beteiligt, wie etwa von Leukämien, und ist damit ein wichtiges Wirkstoffziel für diese Krankheiten [9]. BET-Proteine spielen eine Rolle in der Transkriptionselongation [10, 11]. Allerdings war unklar, welche Funktionen sie dabei ausüben.

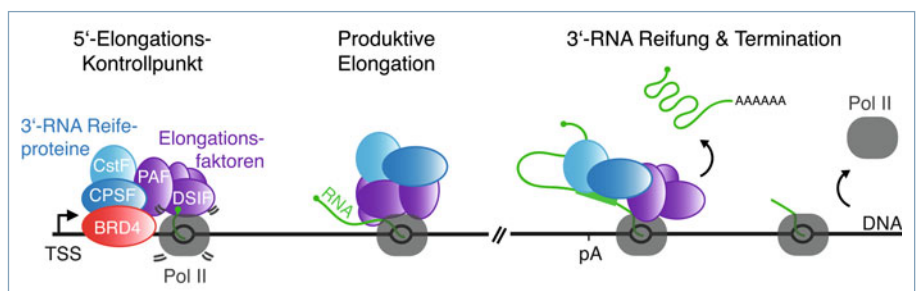
Zur Funktionsaufklärung von BRD4 haben wir mithilfe von CRISPR-Cas9 eine neue Zelllinie hergestellt, die BRD4 mit einem Degron-Tag vom natürlichen Genlokus exprimiert [7]. Die Zugabe des PROTACs, der sowohl an den Degron-Tag also auch an die E3-Ubiquitin-Ligase bindet, eliminiert BRD4 nahezu vollständig in weniger als zwei Stunden. Um die sofortigen Auswirkungen des Verlusts von BRD4 auf die Transkription zu messen, kam die „NET-seq“-Methode zur Anwendung. NET-seq erlaubt es, die Position der Pol II mit Nukleotidauflösung entlang des Genoms zu bestimmen [12]. Die NET-seq-Analyse zeigte, dass der akute Verlust von BRD4 unmittelbar einen globalen Abfall der Elongation und ein Akkumulieren von Pol II in der promotorproximalen Region bewirkte (**Abb. 2A**). Gleichzeitig führte die Eliminierung von BRD4 zu einem Terminationsdefekt (**Abb. 2B**). Die Pol II schoss über das Ziel hinaus.

Wie stehen die beobachteten Defekte am Anfang und Ende der Gene im Zusammenhang? Um diese Frage zu klären, half eine Kombination aus unterschiedlichen Verfahren der quantitativen Proteomik sowie Genomik. Diese Verfahren konnten zeigen, dass BRD4 sowohl Pol II Elongationsfaktoren als auch Proteine bindet, die für die Weiterverarbeitung der neu entstehenden RNA am Ende der Gene und für die Termination wichtig sind (**Abb. 2C**). Der Verlust von BRD4 führte unmittelbar zur Dissoziation dieser Faktoren vom Chromatin und störte zudem deren Rekrutierung im promotorproximalen Bereich (**Abb. 2D**).

Diese Beobachtungen stützen folgendes Modell zur Funktionsweise von BRD4 in der Transkription und der ko-transkriptionellen



▲ **Abb. 2:** Funktionelle Multiomik am Beispiel von BRD4. **A, B,** Pol-II-Signalmessungen mittels NET-seq für humane Zellen (K562) nach zweistündiger BRD4-Degradierung (dTAG7) und im Kontrollexperiment (DMSO). Die Visualisierung zeigt das Pol-II-Signal (**A**) im Durchschnitt an aktiven Genen und (**B**) exemplarisch an zwei Genen. **C,** Massenspektroskopische Identifizierung von ausgewählten BRD4-Interaktionspartnern. **D,** ChIP-seq-Bindungsprofil von Elongations- (blau) und 3'-RNA-Reifeproteinen (rot) an Genen nach Eliminierung von BRD4 (dTAG7) und im Kontrollexperiment (DMSO). TSS: Transkriptionsstartstelle; pA: Polyadenylierungsstelle; kb: Kilobasen (modifiziert nach [7]).



▲ **Abb. 3:** Modell zur Funktionsweise von BRD4 in der Transkription und dem ko-transkriptionellen Reifeprozess der RNA. BRD4 steuert den 5'-Elongations-Kontrollpunkt in dem Elongationsfaktoren (violett) und 3'-RNA-Reifeproteine (blau) zur Pol II im promotorproximalen Bereich des Gens rekrutiert werden. Dies ermöglicht die produktive Elongationsphase der Pol II sowie die spätere Spaltung der naszierenden RNA (grün) an der Polyadenylierungsstelle (pA) und die Termination. Während der Termination dissoziiert die Pol II vom Chromatin und steht dadurch für eine neue Runde der Gentranskription zur Verfügung. TSS: Transkriptionsstartstelle; (modifiziert nach [7])

RNA-Reifung in menschlichen Zellen (**Abb. 3, [7]**): BRD4 steuert den allgemeinen Kontrollpunkt während der frühen Elongationsphase im promotorproximalen Bereich der Gene. Dabei hilft BRD4 bei der Assemblierung eines funktionellen Pol-II-Elongationskomplexes

und macht dadurch die produktive Elongation und RNA-Synthese erst möglich. Zusätzlich hilft BRD4 bei der Rekrutierung von RNA-Reifeproteinen während dieses frühen Kontrollpunkts. Dies wiederum ermöglicht, dass die RNA am Ende der Gene geschnitten

und die Termination erfolgen kann. BRD4 stellt damit ein neues Bindeglied zwischen der Transkription und der ko-transkriptionellen Weiterverarbeitung der RNA dar.

Zukünftige Forschung

In Zukunft werden wir den funktionellen Multiomik-Ansatz weiter verfeinern und auf andere Faktoren der Genregulation ausweiten, um die direkten Wirkmechanismen dieser Proteine in menschlichen Zellen zu verstehen. Zudem werden wir unsere Studien auf Krankheitsmodelle ausdehnen, um die Rolle der Zielproteine bei der Entstehung dieser Krankheiten zu bestimmen. Die Hoffnung ist, dass die neu gewonnenen Einblicke in die molekularen Mechanismen der Krankheitsentstehung einen möglichen Beitrag zur Entwicklung spezifischerer Therapieformen in Zukunft leisten.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (418415292) unterstützt. ■

Literatur

- [1] Cramer P (2019) Organization and regulation of gene transcription. *Nature* 573: 45–54
- [2] Vos SM, Farnung L, Boehning M et al. (2018) Structure of activated transcription complex Pol II-DSIF-PAF-SPT6. *Nature* 560: 607–612
- [3] Gonzalez M N, Blears D, Svejstrup J Q (2021) Causes and consequences of RNA polymerase II stalling during transcript elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22: 3–21
- [4] Gehring NH, Roignant J (2021) Anything but ordinary – emerging splicing mechanisms in eukaryotic gene regulation. *Trends Genet* 37: 355–372
- [5] Wahl MC, Will CL, Lührmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136: 701–718
- [6] Hanzl A, Winter G W (2020) Targeted protein degradation: current and future challenges. *Curr Opin Chem Biol* 56: 35–41
- [7] Arnold M, Bressin A, Jasnovidova O et al. (2021) A BRD4-mediated elongation control point primes transcribing RNA polymerase II for 3'-processing and termination. *Mol Cell* 81: 3589–3603
- [8] Wu S, Chiang C (2007) The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* 282: 13141–13145
- [9] Valent P, Zuber J (2014) BRD4: a BET (ter) target for the treatment of AML? *Cell Cycle* 13: 689–690
- [10] Winter GE, Mayer A, Buckley DL et al. (2017) BET bromodomain proteins function as master transcription elongation factors independent of CDK9 recruitment. *Mol Cell* 67: 5–18
- [11] Muhar M, Ebert A, Neumann T et al. (2018) SLAM-seq defines direct gene-regulatory functions of the BRD4-MYC axis. *Science* 360: 800–805
- [12] Mayer A, Di Julio J, Maleri S et al. (2015) Native elongating transcript sequencing reveals human transcriptional activity at nucleotide resolution. *Cell* 161: 541–554

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:

Dr. Andreas Mayer
 Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik
 Otto-Warburg-Laboratorien
 Ihnestraße 63-73
 D-14 195 Berlin
 mayer@molgen.mpg.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Annkatrin Bressin

2010–2016 Bioinformatikstudium an der FU Berlin. Seit 2017 Doktorandin an der International Max-Planck Research School for Computational Biology and Scientific Computing am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin unter Anleitung von Dr. A. Mayer.



Andreas Mayer

2002–2007 Biologiestudium an der LMU München. 2012 Promotion in Biochemie am Genzentrum der LMU unter Anleitung von Dr. P. Cramer. 2012–2016 Postdoktorand an der Harvard Medical School in Boston, MA, USA, im Labor von Dr. L. S. Churchman. Seit Januar 2017 Leiter einer unabhängigen Max-Planck-Forschungsgruppe am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin.