

## Genregulation

# Nicht-codierende RNA als Regulator der Neurogenese

MARIUS F. SCHNEIDER, PETER B. BECKER  
BIOMEDIZINISCHES CENTRUM MÜNCHEN, LEHRSTUHL MOLEKULARBIOLOGIE,  
LMU MÜNCHEN

**Long, non-coding (lnc) RNAs emerge as crucial regulators of gene expression. Their ability to interact with DNA and protein mediates the recruitment of regulators to defined chromosomal loci. LncRNAs are particularly abundant in brain tissues where they are involved in cell specification. We described a novel lncRNA, *RUS* (RNA upstream to *Slitrk3*), which interacts with epigenetic regulators and contributes to shaping the gene expression program of neural precursor cells towards neurogenesis.**

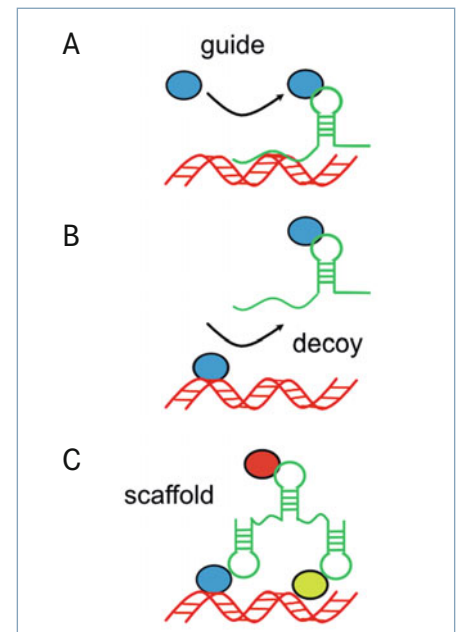
DOI: 10.1007/s12268-023-1891-1  
© Die Autoren 2023

Der Großteil der Genome höherer Eukaryoten wird zu bestimmten Zeiten und in bestimmten Zellen transkribiert, aber nur ein kleiner Teil der daraus resultierenden RNAs codiert für Proteine. Die Genome von Säugtieren enthalten auch Gene tausender stabiler RNAs, die länger als 200 Nukleotide sind und offensichtlich nicht codieren (lange, nicht-codierende (lnc) RNAs, [1–3]).

Die Anzahl an potenziellen lncRNAs übertrifft die von Proteinen um ein Mehrfaches. Bis auf wenige, lange bekannte lncRNAs, wie z. B. die XIST-RNA, die eine zentrale Rolle in der Inaktivierung eines X-Chromosoms in weiblichen Zellen von Säugtieren spielt, sind die Funktionen der meisten lncRNAs, die in groß angelegten Sequenzierungsprojekten entdeckt werden, noch nicht verstanden. Bemerkenswert ist, dass der Anteil der lncRNAs, die zellspezifisch exprimiert werden, die Zahl entsprechender protein-codierender Gene übersteigt. Auch exprimieren Tumore viele lncRNAs, die im gesunden umliegenden Gewebe nicht zu finden sind.

Da viele lncRNAs im Zellkern lokalisiert sind, wird vor allem ihre Rolle in der Regulation der Transkription untersucht. In der Tat ist die Mehrzahl der annotierten lncRNAs in menschlichen Zellen im Chromatin angereichert und kann dort an bestimmten genomischen Bereichen lokalisiert wer-

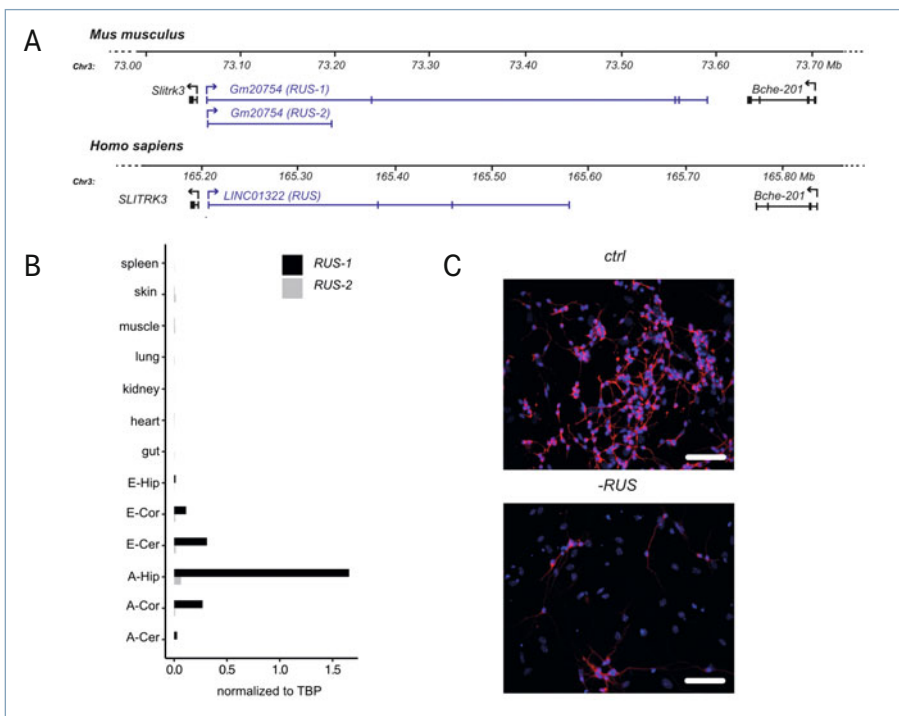
den. Die Wirkweise von lncRNAs ergibt sich aus ihren biochemischen Eigenschaften, die sie zur Bindung an Nucleinsäuren und Proteine befähigt. Sie können nicht nur mit anderen RNAs hybridisieren, sondern auch nach lokaler Denaturierung mit definierten DNA-Sequenzen Basenpaarungen eingehen (Stichwort: *R-loop*) oder dreisträngige Helices (*triple helices*) mit DNA mittels Hoogsteen-Basenpaarung bilden. Eine Vielzahl von Proteinen im Zellkern weisen Domänen auf, die RNA-Epitope aus Sequenz und Sekundärstruktur spezifisch binden können. Die Kombination aus DNA- und Proteinbindung erlaubt lncRNAs, Chromatin-modifizierende Enzyme und andere regulatorische Proteine an bestimmte genomische Loci zu rekrutieren (**Abb. 1A**), deren Bindung zu verhindern (**Abb. 1B**) oder als Gerüst zur Assemblierung von Proteinkomplexen zu dienen (**Abb. 1C**). Weil Proteine auch an die gerade durch Transkription entstehende lncRNA binden können, finden sich einige lncRNA-Gene in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Orten, die reguliert werden sollen. Die Wirkung gering exprimierter RNAs bleibt meist auf die unmittelbare Nachbarschaft des lncRNA-Gens begrenzt (Cis-Regulation). Abundanter lncRNAs bilden Komplexe mit Proteinen und können Wirkorte im gesamten Zellkern erreichen (Trans-Regulation). Die Fähigkeit



▲ **Abb. 1:** Wirkmechanismen nukleärer lncRNAs. **A,** lncRNAs können durch *R-loops* oder *Triple Helices* DNA binden und so die Bindung regulatorischer Proteine an Chromatin vermitteln. **B,** lncRNAs können die Chromatinbindung regulatorischer Proteine verhindern. **C,** lncRNAs können als Gerüst zur Assemblierung von Multiproteinkomplexen dienen.

von lncRNAs, Positionsbestimmung im Genom zu vermitteln, befähigt sie auch zur allelspezifischen epigenetischen Regulierung, wie sie beim genomischen Imprinting, der X-Chromosomen-Inaktivierung oder rDNA-Regulierung bedeutsam ist [1–3].

Ein besonders reichhaltiges Kompendium an lncRNAs wird im Gehirn von Säugtieren exprimiert (schätzungsweise 40 Prozent der bekannten lncRNAs); dabei korreliert die Anzahl der lncRNAs mit der Größe des Gehirns. Hirnspezifische lncRNAs sind in der Regel evolutionär konservierter als solche, die in anderen Geweben vorkommen, und ihre Gene befinden sich häufig in der Nähe von Genen, die an der neuronalen Entwicklung oder an Gehirnfunktionen beteiligt sind. Tatsächlich erweisen sich lncRNAs als wesentlich bei wichtigen Prozessen der



▲ **Abb. 2:** Charakterisierung der *RUS*-RNA (Details in [6]). **A**, Der Genort und das 5'-Ende von *RUS* ist in den Genomen von Mensch und Maus konserviert. **B**, Die beiden murinen Isoformen (*RUS-1*, *RUS-2*) kommen überwiegend im neuronalen Gewebe vor (RT-PCR normalisiert gegen mRNA des TBP). **A**: adult; E: embryonal; Cer: Cerebellum; Cor: Cortex; Hip: Hippocampus. **C**, RNA-Interferenz gegen *RUS* führt zu verminderten Neurogenese in der *in vitro*-Differenzierung (Immunfärbung mit dem neuronalen Marker  $\beta$ -Tubulin III). Maßstab = 50  $\mu$ m.

Gehirnentwicklung – wie der Festlegung des Neuroektoderms, der Spezifikation und Proliferation neuraler Vorläuferzellen sowie deren Differenzierung in Neuronen (Neurogenese) oder andere neurale Zelltypen (Glio-genese) [4, 5].

### Identifizierung einer neuen lncRNA mit Wirkung in der Neurogenese

Unsere Gehirne produzieren ungefähr 20.000 lncRNAs, von denen nur wenige näher untersucht sind. Auf der Suche nach neuen lncRNAs, die eine Rolle in der Neurogenese spielen könnten, durchforsteten wir verschiedene Datenbanken nach lncRNAs, die überwiegend in neuronalen Geweben exprimiert werden. Ein Kandidatengeng erregte unsere Aufmerksamkeit, weil es direkt neben dem Gen für das Transmembranprotein *Slitrk3* liegt, das eine wichtige Funktion in der Synapsenbildung hat. Weil der genomische Lokus des lncRNA-Gens zwischen Maus und Menschen konserviert ist, bezeichneten wir das lncRNA-Gen *RNA upstream to Slitrk3* (*RUS*) [6]. Neben der syntänischen Konservierung weisen die orthologen Gene in Maus und Mensch ein konserviertes 5'-Ende auf (**Abb. 2A**).

Wir fanden, dass *RUS* nur im neuronalen Gewebe und vor allem im adulten Gewebe exprimiert wird (**Abb. 2B**). Die Expression von *RUS* während der Differenzierung steigt von neuronalen Vorläuferzellen zu Neuronen an, ein Hinweis auf eine Rolle während der Differenzierung. Um die *RUS*-Expression während der Neurogenese genauer zu untersuchen, differenzierten wir embryonale kortikale Stammzellen (NSCs) zu unreifen Neuronen in einem Zellkultursystem. Hier konnten wir die Auswirkung der Depletierung von *RUS* mithilfe der RNA-Interferenztechnologie (shRNA) bestimmen. Immunhistochemischen Färbungen zeigten eine verminderte Expression des neuronalen Markers  $\beta$ -Tubulin III nach der Reduktion von *RUS* (**Abb. 2C**). Eine Charakterisierung des Phänotyps durch Transkriptomanalysen (RNA-Seq) zeigte, dass die Reduktion von *RUS* sich schon negativ auf die Proliferation neuraler Vorläuferzellen auswirkte. Die gleichzeitige Hemmung der Proliferation (und damit der Zellerneuerung) und der neurogenen Differenzierung führt möglicherweise dazu, dass neuronale Vorläuferzellen widersprüchliche Signale erhalten, die eine Apoptose auslösen, wie wir es nach der Reduktion von *RUS* beobachteten [6].

Zellfraktionierungsexperimente ergaben, dass *RUS* sich überwiegend im Zellkern befindet. Mithilfe der ChIRP-Technologie, bei der *RUS* im Chromatin fixiert und nach Hybridisierung an biotinylierte *antisense*-Oligonukleotide mitsamt der gebundenen DNA aufgereinigt wird, konnten wir beobachten, dass viele Gene in der Nähe von *RUS*-Bindestellen nach der Reduktion von *RUS* dereguliert wurden.

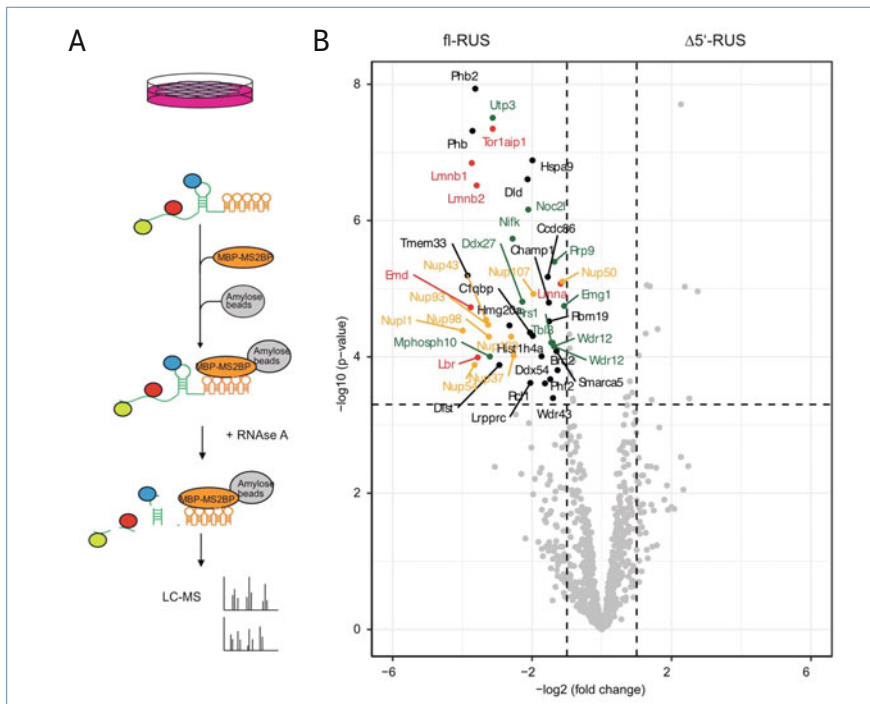
Um einen Hinweis auf den Wirkmechanismus von *RUS* zu erhalten, ermittelten wir Proteine, die in Neuroblastomzellen (Neuro2A) an das konservierte 5'-Ende der lncRNA binden. Dazu versahen wir *RUS* (und eine Kontrolle, der das 5'-Ende fehlte) mit einem MS2-Tag, das aus fünf *stem loop*-Strukturen aus dem MS2-Bakteriophage besteht. Diese RNA-Sekundärstruktur wird spezifisch von dem Capsid-Protein des MS2-Phagen (MS2BP) gebunden. Die RNAs exprimierten wir in Neuro2A-Zellen und reinigten die sich dort gebildeten RNA-Protein-Komplexe mithilfe der MS2-Affinitätschromatografie auf (**Abb. 3A**). Die gebundenen Proteine wurde mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Proteomanalyse ergab, dass an das konservierte 5'-Ende besonders Komponenten der Kernhülle (Lamina und Kernporen, rot und orange markiert in **Abb. 3B**) und auch des Nukleolus (grün in **Abb. 3C**) binden. Die Kernhülle und die Oberfläche des Nukleolus bilden Kernkompartimente, in denen stillgelegtes Chromatin angereichert ist. *RUS* könnte also bei der Repression von Genen durch Rekrutierung in ein repressives Kompartiment im Zellkern wirken [6].

### Die Evolution von lncRNAs als Transkriptionsregulatoren

Der Beitrag der vielen lncRNAs zur Regulation DNA-basierter Prozesse im Zellkern (vornehmlich der Transkriptionskontrolle) kann derzeit nicht überschätzt werden. Die Eigenschaft dieser Moleküle, als Mittler zwischen Nukleinsäuren und Proteinen zu wirken, spielt sicher eine große Rolle. lncRNAs können wohl im Zuge der Evolution schnell Funktionalität erwerben. Die allgegenwärtige Transkription des Genoms stellt ein unerschöpfliches Reservoir an Molekülen zur Verfügung, die zunächst nicht funktionell sind. Die Möglichkeit, durch intramolekulare Basenpaarung dynamische dreidimensionale Strukturen auszubilden, die in ihrer Komplexität Proteinstrukturen noch übertreffen, prädestiniert sie für eine Funktion in der Chromatinregulation und macht sie zu

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



**Abb. 3:** Affinitätsreinigung von *RUS*-interagierenden Proteinen. **A**, schematischer Überblick der Affinitätsreinigung von *RUS*-interagierenden Proteinen (farbige Kugeln). *RUS*-RNA (grün), markiert mit einem MS2-Tag (orange), wird stabil in Neuro2A-Zellen exprimiert. Die RNA wird durch Bindung an MS2BP-Maltosebindungsprotein an einer Matrix gereinigt und gebundene Proteine mittels RNAse-Verdau und Massenspektrometrie eluiert und analysiert. **B**, *Volcano plot* zur Darstellung der durch *RUS*-Bindung angereicherten Proteine (je Protein ein Punkt) im Vergleich zu der 5'-Deletionsmutante. Signifikante Proteine ( $p$ -Wert  $< 0,002$  und  $fold\ change > 2$ ) wurden mit ihrem Namen beschriftet (rot: Lamina, orange: Kernpore, grün: Nukleolus). Originaldaten publiziert in [6].

einem idealen Substrat für eine „konstruktive neuronale Evolution“ [2, 7].

### Literatur

- [1] Engreitz JM, Ollikainen N, Guttman M (2016) Long non-coding RNAs: Spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 17: 756–770
- [2] Rinn JL, Chang HY (2020) Long Noncoding RNAs: Molecular Modalities to Organismal Functions. *Ann Rev Biochem* 89: 283–308
- [3] Stattolo L, Guo CJ, Chen LL et al. (2021) Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22: 96–118
- [4] Briggs JA, Wolvetang EJ, Mattick JS et al. (2015) Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Mammalian Nervous System Development, Plasticity, Disease, and Evolution. *Neuron* 88: 861–877
- [5] Zimmer-Bensch G (2019) Emerging roles of long non-coding RNAs as drivers of brain evolution. *Cells* 8: 1399
- [6] Schneider MF, Müller V, Müller SA et al. (2022) LncRNA *RUS* shapes the gene expression program towards neurogenesis. *Life Sci Alliance* 5: e202201504
- [7] Palazzo AF, Koonin E (2020) Functional Long Non-coding RNAs Evolve from Junk Transcripts. *Cell* 183: 1151–1161

**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. Marius Schneider  
 Lehrstuhl Molekularbiologie  
 Biomedizinisches Centrum  
 Ludwig-Maximilians-Universität  
 Großhaderner Straße 9  
 D-82152 Planegg/Martinsried  
 Marius.Schneider@bmc.med.lmu.de

### AUTOREN



**Marius F. Schneider**  
 2009–2015 Biochemiestudium, Universität Tübingen. 2015 Promotion an der Medizinischen Fakultät der LMU in München. Seit 2022 Postdoktorat an der Medizinischen Fakultät der LMU in München.



**Peter B. Becker**  
 1978–1983 Biologiestudium, Universität Heidelberg. 1987 Promotion an der Universität und am DKFZ Heidelberg. 1988–1991 Postdoktorat am National Cancer Institute, NIH, Bethesda, USA. 1991–1999 Gruppenleiter am EMBL, Heidelberg. Seit 1999 Professor für Molekularbiologie an der Medizinischen Fakultät der LMU in München.